

Université de Montréal

**TRIBBLES PSEUDOKINASE 2 (TRIB2) DANS LE CONTRÔLE
MOLÉCULAIRE DE LA FONCTION OVARIENNE BOVINE**

Par

ALY WARMA

Département de biomédecine vétérinaire

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

Novembre 2021

© Aly WARMA, 2021

Université de Montréal

Département de biomédecine vétérinaire, Faculté de médecine vétérinaire

Cette thèse intitulée

**Tribbles pseudokinase 2 (TRIB2) dans le contrôle moléculaire de la fonction
ovarienne bovine**

Présentée par

Aly Warma

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

M. Alexandre Boyer
Président-rapporteur

M. Kalidou Ndiaye
Directeur de recherche

M. Younès Chorfi
Membre du jury

M. Vilceu Bordignon
Examineur externe

Résumé

Au cours des processus de croissance folliculaire et d'ovulation, les cellules stéroïdogéniques, y compris les cellules de granulosa (CG), jouent un rôle crucial dans la maturation et la libération de l'ovocyte. Notre laboratoire a identifié et caractérisé pour la première fois tribbles pseudokinase 2 (TRIB2) dans les CG de follicules ovariens. Des études ont démontré que TRIB2 joue un rôle dans la coordination de la mitose et la morphogenèse chez la drosophile alors que chez la souris, son expression dans les cellules du cumulus serait liée à la maturation ovocytaire. Cependant, le rôle exact de TRIB2 dans la fonction des CG et ses effets sur les voies de signalisation impliquées dans la croissance folliculaire restait à être défini. La présente étude de doctorat avait donc pour but d'étudier la fonction et les partenaires de liaison de TRIB2 dans les CG de follicules ovariens bovins. À l'aide d'un modèle d'étude *in vivo* consistant en des CG obtenues à partir de follicules à différents stades de développement, nous avons démontré une régulation à la baisse de TRIB2 par l'hormone lutéinisante (LH) et la gonadotrophine chorionique humaine (hCG) aussi bien au niveau du messager que de la protéine. De plus, les analyses utilisant un modèle *in vitro* de CG en culture ont montré que la FSH stimule l'expression de *TRIB2* tandis que l'inhibition de TRIB2 via CRISPR/Cas9 entraîne une réduction significative de la prolifération des CG ($P < 0,05$). Les analyses Western blot ont montré une augmentation des niveaux de phosphorylation d'ERK1/2 (MAPK3/1) et p38MAPK (MAPK14) suite à la surexpression de TRIB2. Ces résultats suggèrent un rôle de TRIB2 dans la croissance folliculaire et la modulation des voies MAPK. Avec l'approche double hybride chez la levure, nous avons identifié CALM1, INHBA, INPPL1, NT5E, SCD, SDHB et RAB14 comme partenaires de liaison de TRIB2. Les analyses RT-PCR ont montré que ces partenaires sont régulés différemment au cours du développement folliculaire et les manipulations de l'expression de TRIB2 (inhibition ou surexpression) résulte en une régulation différente (augmentation ou diminution) de l'expression des partenaires dans les CG. Ces résultats suggèrent un rôle de TRIB2 dans la régulation de cibles effectrices en lien avec la fonction des CG et le développement folliculaire. Enfin, un modèle de CG provenant de vaches en période post-partum a été utilisé pour mieux comprendre le contrôle de l'activité des CG. Des analyses complémentaires avec ce modèle ont révélé une réduction significative de TRIB2 chez les vaches ayant un taux élevé de BHB ($>1.4\text{mmol/L}$) comparé à celles ayant un faible taux de BHB

(<1.2mmol/L). Cette réduction était concomitante à une augmentation d'interleukines pro-inflammatoires et une réduction d'interleukines anti-inflammatoires dans les CG. L'ensemble de ces résultats supporte un rôle de TRIB2 dans la modulation de la signalisation MAPK dans les CG, apporte une preuve solide que TRIB2 pourrait agir comme un régulateur de la prolifération et de la fonction des CG et de l'expression de gènes cibles, et suggère que TRIB2 pourrait affecter la stéroïdogénèse au cours du développement folliculaire et lors de la période post-partum.

Mots-clés : Bovin, Ovaire, Développement folliculaire, Cellules de granulosa, TRIB2, MAPK, FSH, CRISPR/Cas9, Double hybride chez la levure.

Abstract

During the processes of follicular growth and ovulation, steroidogenic cells, including granulosa cells, play a crucial role in the maturation and release of the oocyte. Our lab identified and characterized for the first time tribble pseudokinase 2 (TRIB2) in GC of ovarian follicles. Previous studies have shown that TRIB2 plays a role in the coordination of mitosis and morphogenesis in *Drosophila* while in mice its expression in cumulus cells is linked to oocyte maturation. However, the exact mechanism of action of TRIB2 as well as its function and effects on signaling pathways in GC during follicular growth remained to be defined. This study aimed therefore to further investigate TRIB2 function and identify its binding partners in GC. TRIB2 inhibition and overexpression experiments were conducted using, respectively, CRISPR/Cas9 technology and the pQE1 system. Using an *in vivo* model consisting of GC obtained from follicles at different stages of development, we demonstrated a downregulation of TRIB2 by the endogenous luteinizing hormone (LH) and human Chorionic Gonadotropin (hCG) at both the messenger and protein levels. In addition, analyzes using an *in vitro* model of cultured GC, we showed that FSH stimulates the expression of TRIB2 while inhibition of TRIB2 via CRISPR-Cas9 resulted in a significant reduction in GC proliferation ($P < 0.05$). Western blot analyzes showed an increase in the phosphorylation levels of ERK1/2 (MAPK3/1) and p38MAPK (MAPK14) following TRIB2 overexpression. These results suggested a role of TRIB2 in follicular growth and modulation of MAPK pathways. In the second part of the thesis, we identified CALM1, INHBA, INPPL1, NT5E, SCD, SDHB and RAB14 as binding partners of TRIB2 in GC using the yeast two-hybrid approach. RT-qPCR analyzes showed that all of these partners are present in the dominant follicles but are differently regulated during follicular development. Moreover, TRIB2 manipulation (inhibition or overexpression) results in a different regulation (up- or down-regulation) of these partners expression in GC. These results suggest a role of TRIB2 in the regulation of effector targets genes related to follicular development and GC activity. In the third part of the thesis, a GC model from postpartum cows was also used to better understand the control of GC activity. Further analyzes using this model revealed a significant decrease of *TRIB2* in cows with high level of BHB (> 1.4 mmol/L) as compared to those with a low BHB levels (< 1.2 mmol/L). This reduction of *TRIB2* was concomitant with an increase in pro-inflammatory interleukins and a reduction in anti-

inflammatory interleukins in GC. Overall, these results support a role of TRIB2 in the modulation of MAPK signaling in GC, provide strong evidence that TRIB2 could act as a regulator of GC proliferation and function as well as expression of target genes in GC, and suggests that TRIB2 might affect steroidogenesis during follicular development and during the post-partum period.

Keywords : Bovine, Ovary, Follicular growth, Granulosa cells,TRIB2, MAPK, FSH, CRISPR/Cas9, Yeast two-hybrid.

Table des matières

Résumé	3
Abstract	5
Table des matières	7
Liste des tableaux	12
Liste des figures	13
Liste des sigles et abréviations	15
Remerciements	20
INTRODUCTION	21
CHAPITRE I: REVUE DE LA LITTÉRATURE	25
I.1. L’ovaire et le follicule ovarien	26
I.1.1. L’ovaire	26
I.1.2. Le follicule ovarien	28
I.1.2.1. La folliculogenèse	28
I.1.2.1.1. <i>La folliculogenèse basale</i>	29
I.1.2.1.2. <i>La folliculogenèse terminale</i>	32
I.1.2.2. La notion de vagues folliculaires	33
I.1.2.3. La notion de recrutement, sélection et dominance	34
I.1.2.4. L’atrésie folliculaire	37
I.1.2.5. La maturation ovocytaire	38
I.1.2.6. L’ovulation, la formation et la régression du corps jaune.....	40
I.1.2.6.1. <i>Le processus ovulatoire</i>	40
I.1.2.6.2. <i>La formation du corps jaune</i>	43
I.1.2.6.3. <i>La régression du corps jaune</i>	44
I.2. Les cellules somatiques stéroïdogéniques du follicule ovarien	45
I.2.1. Les cellules de la thèque.....	46
I.2.2. Les cellules de granulosa.....	48
I.2.2.1. L’origine des cellules de granulosa.....	48
I.2.2.2. La contribution des cellules de granulosa à la croissance folliculaire	48
I.3. Rôles des gonadotrophines et des facteurs de croissances dans la folliculogenèse	51
I.3.1. Actions des gonadotrophines FSH et LH.....	51

I.3.1.1.	Les cascades de signalisation des gonadotrophines	52
I.3.1.1.1.	<i>Les cascades de signalisation de la FSH</i>	52
I.3.1.1.2.	<i>L'activation simultanément des voies pro et anti-apoptotiques par la FSH.</i> ..	55
I.3.1.1.3.	<i>Les cascades de signalisation de la LH</i>	56
I.3.1.2.	La régulation de la croissance folliculaire par les gonadotrophines au cours du cycle œstral.....	58
I.3.1.3.	La régulation de la maturation finale du follicule pré-ovulatoire et de l'ovulation par les gonadotrophines.....	59
I.3.1.4.	Autres cascades de signalisation impliquées dans la folliculogenèse	63
I.3.1.4.1.	<i>Voie de signalisation WNT</i>	63
I.3.1.4.2.	<i>Voie de signalisation Hippo</i>	65
I.3.2.	Modulation du cycle œstral par les facteurs de croissance	67
I.3.3.	Modulation du cycle œstral en période post-partum	68
I.4.	Les molécules tribbles	70
I.4.1.	Membres de la famille tribbles	70
I.4.2.	Tribbles pseudokinase 2 (TRIB2)	72
I.4.2.1.	Mode d'action de TRIB2.....	72
I.4.2.2.	Régulation de l'expression de TRIB2	73
I.4.2.2.1.	<i>Voies de signalisation régulant l'expression de TRIB2</i>	73
I.4.2.2.2.	<i>Micro-ARN régulant l'expression de TRIB2</i>	74
I.4.2.3.	TRIB2 dans les pathologies.....	75
I.4.2.4.	TRIB2 dans la reproduction	76
CHAPITRE II: HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS		77
II.1.	Problématique et hypothèse	78
II.1.1.	Problématique.....	78
II.1.2.	Hypothèse.....	78
II.2.	Objectifs	78
CHAPITRE III: PREMIER ARTICLE		80
Functional effects of Tribbles Homolog 2 (TRIB2) in bovine ovarian granulosa cells		82
III.1.	Abstract	84
III.2.	Introduction	84
III.3.	Materials and Methods	86
III.3.1.	Cloning and characterization of TRIB2	86
III.3.2.	Experimental animal models	87
III.3.3.	mRNA expression analysis	88

III.3.4.	Production of polyclonal anti-bovine TRIB2 antibodies	88
III.3.5.	Cell extracts and Western blot analyses with anti-TRIB2 antibodies	89
III.3.6.	<i>In vitro</i> experiments	90
III.3.7.	Functional studies.....	90
III.3.7.1.	CRISPR-Cas9 experiments	90
III.3.7.2.	Overexpression experiments	91
III.3.8.	Statistical analysis	92
III.4.	Results	93
III.4.1.	TRIB2 regulation during follicular development.....	93
III.4.2.	TRIB2 is downregulated by hCG at the protein level during follicular development	93
III.4.3.	TRIB2 expression in granulosa cells vs. theca cells	94
III.4.4.	Tribbles mRNA are differently regulated during follicular development.....	94
III.4.5.	FSH stimulates TRIB2 mRNA expression.....	94
III.4.6.	Functional studies.....	95
III.4.7.	TRIB2 affects target transcription factors expression.....	95
III.4.8.	TRIB2 positively modulates ERK1/2 and p38MAPK phosphorylation in granulosa cells	96
III.5.	Discussion	96
III.6.	References	103
CHAPITRE IV: DEUXIÈME ARTICLE.....		115
Tribbles Pseudokinase 2 (TRIB2) Regulates Expression of Binding Partners in Bovine Granulosa Cells		117
IV.1.	Abstract	119
IV.2.	Introduction	120
IV.3.	Materials and Methods	121
IV.3.1.	Experimental Animal Model and <i>In Vivo</i> Sample Preparations	121
IV.3.2.	<i>In Vitro</i> Samples Preparation	122
IV.3.3.	Yeast Two-Hybrid Assay	123
IV.3.3.1.	Material and Media Legend	123
IV.3.3.2.	Generation of GC-cDNA Library and Construction of the Two-Hybrid Prey Library.....	123
IV.3.3.3.	Two-Hybrid Library Screening Using Yeast Mating.....	124
IV.3.3.4.	Co-IP Confirmation of Protein Interactions	124
IV.3.3.5.	Regulation of TRIB2 Partners during Follicular Development	125

IV.3.3.6.	TRIB2 Effects on Expression of Binding Partners	125
IV.3.4.	Statistical Analysis	126
IV.4.	Results	126
IV.4.1.	Yeast Two-Hybrid (Y2H) Screening Revealed Potential TRIB2 Partners in Granulosa Cells	126
IV.4.2.	TRIB2 Physically Interacts with its Binding Partners Identified with Y2H Screening.....	127
IV.4.3.	TRIB2 Partners Are Differentially Regulated during Follicular Development.	129
IV.4.4.	Effects of TRIB2 Inhibition and Overexpression on its Binding Partners.....	130
IV.5.	Discussion	131
IV.6.	Conclusion.....	136
IV.7.	References	137
CHAPITRE V: TROISIÈME ARTICLE		150
Interleukins' expression profile changes in granulosa cells of preovulatory follicles during the postpartum period in dairy cows.....		152
V.1.	Abstract	154
V.2.	Introduction	155
V.3.	Materials and Methods	157
V.3.1.	Animal Model for Analysis of IL and IL Receptors Expression in Granulosa Cells.....	157
V.3.2.	Animal Model for Analysis of ILs Expression Profile during the Postpartum Period.....	158
V.3.3.	Total RNA Extraction and RT-qPCR Analysis.....	158
V.3.4.	Total protein extraction and western blot analysis.....	159
V.3.5.	Statistical Analyses	160
V.4.	Results and discussion.....	160
V.5.	Conclusion.....	165
V.6.	References	166
CHAPITRE VII: DISCUSSION GÉNÉRALE, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES...174		
VII.1.	Discussion générale.....	175
VII.2.	Conclusions	185
VII.3.	Perspectives.....	186
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		188
ANNEXES.....		235
Annexe 1. Résumé des principales méthodes utilisées		235

Annexe 1.1. La technologie CRISPR/CAS9	235
Annexe 1.2. L'approche double hybride chez la levure pour identifier les protéines partenaires de TRIB2 dans les CG	236
Annexe 2. Annexe à l'article 3 : Régulation de l'expression de TRIB2 dans les cellules de granulosa de vaches BHB+ comparées aux vaches BHB-.	238

Liste des tableaux

CHAPITRE I: REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	25
Tableau 1. – Expression différentielle des ARNm exprimés en fonction du stade de développement lors des vagues folliculaires du cycle œstral.....	37
Tableau 2. – Résumé des facteurs de transcription régulant l’expression de TRIB2.	74
CHAPITRE III: PREMIER ARTICLE.....	80
Tableau 1. – Primers used in the expression analyses of Bos taurus genes by RT-qPCR.....	92
CHAPITRE IV: DEUXIÈME ARTICLE.....	115
Tableau 1. – Primers used in the expression analyses of Bos taurus genes by RT-qPCR.	125
Tableau 2. – List of potential binding partners of Tribbles 2 (TRIB2).....	127
CHAPITRE V: TROISIÈME ARTICLE	150
Tableau 1. – Primers used in the expression analyses of Bos taurus genes by RT-qPCR.	159

Liste des figures

CHAPITRE I: REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	25
Figure 1. – Résumé du contrôle hormonal et présentation schématique du développement folliculaire dans l'ovaire bovin. Modifiée de (Hurk, Abir et al. 2000, Richards and Pangas 2010).....	27
Figure 2. – Séquence schématique du développement folliculaire complet. Modifiée de (Araújo, Gastal et al. 2014).	29
Figure 3. – Les facteurs et les voies régulant l'activation des follicules primordiaux. Modifiée de (Chen, Yang et al. 2020).....	32
Figure 4. – Modèle hypothétique de la régression structurelle et fonctionnelle du corps jaune. Modifiée de (Skarzynski, Ferreira-Dias et al. 2008).	45
Figure 5. – Le système deux cellules et deux gonadotrophines pour la synthèse d'œstradiol dans le follicule. Modifiée de (Strauss, Modi et al. 2014).	47
Figure 6. – Changements fonctionnels dans les cellules de granulosa au cours du développement folliculaire (Monniaux, Caraty et al. 2009).	51
Figure 7. – Interférence entre les signaux stéroïdogéniques, de vie et de mort dépendants de la FSH dans les cellules de la granulosa. Modifiée de (Casarini and Crépieux 2019).	54
Figure 8. – La LH induit l'ovulation, l'expansion des COC, la maturation des ovocytes et la lutéinisation dans les follicules pré-ovulatoires. Modifiée de (Richards and Pangas 2010).....	57
Figure 9. – Représentation schématique de sécrétions hormonales et de croissance des follicules ovariens au cours du cycle œstral chez l'espèce bovine. Modifiée de (Crowe and Mullen 2013).....	60
Figure 10. – Représentation schématique de la signalisation WNT dans les cellules de la granulosa ovarienne. Modifiée de (Tej, Pulukuri et al. 2021).....	64
Figure 11. – Modèle l'incorporation de YAP/TAZ dans le complexe de destruction de la β -caténine. Modifié de (Azzolin, Panciera et al. 2014).	67
Figure 12. – Caractéristiques de signalisation classique des tribbles modifiée de (Eyers, Keeshan et al. 2017).....	71
CHAPITRE III: PREMIER ARTICLE.....	80
Figure 1. – <i>TRIB2</i> mRNA and protein expression and regulation in bovine GC	108
Figure 2. – <i>TRIB2</i> mRNA expression and regulation in bovine TC.....	109
Figure 3. – <i>TRIB1 and TRIB3</i> mRNA expression and regulation in bovine follicles.	110
Figure 4. – Effects of FSH on <i>TRIB2, CYP19A1 and PCNA</i> mRNA expression and GC proliferation.....	110
Figure 5. – Effects of <i>TRIB2</i> inhibition and overexpression.....	111
Figure 6. – Effects of <i>TRIB2</i> inhibition and overexpression on <i>CTGF</i> and <i>ANKRD1</i> mRNA expression in GC.	112

Figure 7. – In vivo analyses of ERK1/2 and p38MAPK phosphorylation levels post-hCG injection.....	113
Figure 8. – In vitro analyses of ERK1/2 and p38MAPK phosphorylation levels.	114
CHAPITRE IV: DEUXIÈME ARTICLE.....	115
Figure 1. – Chemiluminescence analyses and confirmation of TRIB2 interaction with its binding partners by Coimmunoprecipitation and Western blot analyses.....	146
Figure 2. – Calmodulin 1 (<i>CALM1</i>), inhibin subunit beta A (<i>INHBA</i>), inositol polyphosphate phosphatase-like 1 (<i>INPPL1</i>), 5'-nucleotidase ecto (<i>NT5E</i>), stearoyl-CoA desaturase (<i>SCD</i>), succinate dehydrogenase complex iron sulfur subunit B (<i>SDHB</i>) and Ras-associated protein 14 (<i>RAB14</i>) mRNA expressions in bovine granulosa cells.....	147
Figure 3. – Inhibition and overexpression of TRIB2 in granulosa cells (GCs).	148
Figure 4. – Effects of TRIB2 inhibition and overexpression on <i>CALM1</i> , <i>INHBA</i> , <i>INPPL1</i> , <i>NT5E</i> , <i>SCD</i> , <i>SDHB</i> and <i>RAB14</i>	149
CHAPITRE V: TROISIÈME ARTICLE	150
Figure 1. – Expression of target interleukin receptors in bovine granulosa cells during follicular development.....	169
Figure 2. – Expression of target interleukins in bovine granulosa cells during follicular development.....	170
Figure 3. – Expression profile of target interleukins in bovine granulosa cells during the postpartum period.....	171
Figure 4. – Western blot analysis of IL4 and IL15 expression during the postpartum period.....	172
Figure 5. – Expression profile of target interleukins receptors in bovine granulosa cells during the postpartum period.....	173
ANNEXES.....	235
Figure 1. – Le principe de la disruption génique médiée par CRISPR/Cas9.	236
Figure 2. – Méthode double-hybride dans les levures - Activation des gènes rapporteurs	237
Figure 3. – TRIB2 regulation in post-partum granulosa cells.	238

Liste des sigles et abréviations

17 β -HSD	17 bêta-Hydroxysteroid dehydrogenase
3 α HSD	3 α hydroxysteroid dehydrogenase ou AKR1C9
3 β HSD	3 β - hydroxysteroid dehydrogenase
ADAM	A disintegrin and metalloproteinase
ADAMTS	Disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 1
ADN	Acide désoxyribonucléique
AKT	A serine/threonine protein kinase
ALK	Anaplastic lymphoma kinase
AMH	Anti-mullerian hormone
AML	Acute myelogenous leukemia
AMPc	Cyclic adenosine monophosphate
ANKRD1	Ankyrin repeat domain 1
AP-1	Activator protein 1
APPL1	Adapter protein containing Pleckstrin homology domain, Phosphotyrosine binding domain and Leucine zipper motif
AREG	Amphiregulin
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATP	Adenosine triphosphate
BAX	BCL2-associated X protein
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2
BMP4	Bone morphogenetic protein 4
BTC	Betacellulin
C/EBP α/β	CCAAT enhancer binding protein alpha/beta
CALM1	Calmodulin 1
Cas9	CRISPR associated protein 9
CASP2	Caspase 2, apoptosis-related cysteine peptidase
CCIL	Centre canadien d'information laitière
CD25	alpha-chain of IL-2 receptor
CDK1	Cyclin-dependent kinase 1
cDNA	complementary DNA
CG / GC	Cellules de granulosa /Granulosa cells
Co-IP	Co-immunoprecipitation
COC	Cumulus-oocyte complex

COX-2	cyclooxygenase-2
CPEB1	Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding Protein 1
CREB	cAMP responsive element binding protein
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CTGF	Connective tissue growth factor
CXCR4	Chemokine CXC motif receptor 4
CYP11A1	Cytochrome P450 Family 11 Subfamily A Member 1
CYP17A1	Cytochrome P450 Family 17 Subfamily A Member 1
CYP19A1	Cytochrome P450 Family 19 Subfamily A Member 1
DEMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12
DHEA	Dehydroepiandrosterone
DMC1	DNA meiotic recombinase 1
ECM	Extracellular matrix
Edn1 ; 2	Endothelin 1 ; 2
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
EGR1	Early growth response 1
EREG	Epiregulin
ERK1/2	Extracellular regulated kinase ½
ERS2	Estrogen receptor beta
FGF	Fibroblast Growth Factor
FIGLA	Folliculogenesis-specific basic helix-loop-helix
FOS	Finkel-Biskis-Jinkins osteosarcoma
FOXL2	Forkhead box protein L2
FOXO3	Forkhead box O3
FSH	Follicle-stimulating hormone
FSHR	Follicle stimulating hormone receptor
GAL4	Galactose-responsive transcription factor GAL4
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
GDP	Guanosine diphosphate
GIPC	GAIP-interacting protein C terminus
GLYT1	Glycine transporter 1
GnRH	Gonadotropin-releasing hormone
GPCR	G protein-coupled receptors
GRK	G Protein-Coupled Receptor Kinases
GTP	Guanosine triphosphate

GVBD	Germinal vesicle breakdown
Hbegf	Heparin-binding EGF-like growth factor
hCG	Human chorionic gonadotropin
Has2	Hyaluronan synthase 2
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HIF	Hypoxia-inducible factor
HSD17B1	Hydroxysteroid 17-Beta Dehydrogenase 1
HSD3B2	Hydroxy-Delta-5-Steroid Dehydrogenase, 3 Beta- And Steroid Delta-Isomerase 2
IAP	Inhibitor of Apoptosis Proteins
IGF	Insulin-like growth factor
IGFBP	Insulin-like growth factor-binding protein
IL1A	Interleukin 1, alpha
INHBA	Inhibin subunit beta A
INPPL1	Inositol polyphosphate phosphatase-like 1
JNK	c-Jun N-terminal kinase
JUNun	<i>Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit</i>
KGF	Keratinocyte growth factor
KITLG	KIT ligand
LH	Luteinizing hormone
LHCGR	Luteinizing hormone/Choriogonadotropin receptor
LHX8	LIM homeobox 8
LIF	Leukemia inhibitor factor
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MSH5	mutS homolog 5
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NF-KB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NOBOX	NOBOX oogenesis homeobox
NR5A1	Nuclear receptor subfamily 5 group A member 1
NT5E	5'-nucleotidase ecto
OCT4	Octamer-binding transcription factor 4
P4	Progesterone
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PCR	Polymerase chain reaction
PDE	Phosphodiesterase
PDGF	Platelet-derived growth factor

PGF2a	Prostaglandin F2 alpha
PGR	Progesterone receptor
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PKA	Protein kinase A
PKC	Protein kinase C
PML	Promyelocytic leukemia protein
PPAR γ	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
pQE	pQE-TriSystem His-Strep2 vector
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
Ptgs2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2
PTX3	Pentraxine 3
RAB14	Ras-associated protein 14
RGS2	Regulator of G-protein signaling
RLU	Relative light unit
RPL19	Ribosomal Protein L19
RT-qPCR	Real time -quantitative polymerase chain reaction
RUNX	Runt-related transcription factor
SCD	Stearoyl-CoA desaturase
SDHB	Succinate dehydrogenase complex iron sulfur subunit B
sgRNA	Single guide RNA
SMAD	Small mothers against decapentaplegic
SNAP25	Synaptosomal-associated protein 25
SOHLH1	Spermatogenesis and oogenesis specific basic helix-loop-helix 1
SP1	specificity protein 1
SST	Somatostatin
STAR	Steroidogenic acute regulatory protein
STRA8	stimulated by retinoic acid gene 8 homolog
TGFb	Transforming Growth Factor beta
TNFAIP6	TNF alpha induced protein 6
TRIB	Tribbles homolog
TSH	Thyroid-stimulating hormone
VEGFA	Vascular endothelial growth factor alpha
VNN2	Ascular non-inflammatory molecule 2
Y2H	Yeast two-hybrid
YAP	Yes-associated protein
β TrCP	β -transducing repeat-containing protein

Dédicace

Même si on ne possède rien au monde, on doit toujours quelque chose à nos parents. Je vous dédie cet ouvrage de thèse, plus précisément à mon père Feu Moussa dit Tanké Warma, qui nous a quitté durant les travaux de cette thèse, que le TOUT CREATEUR vous accueille dans le bonheur éternel.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Dr. Kalidou Ndiaye de la Faculté de médecine vétérinaire qui m'a encadré tout au long de cette thèse et qui m'a fait partager ses brillantes intuitions. Merci pour votre leadership, votre passion pour la science, vos conseils et encouragements prodigués, votre disponibilité permanente durant tout au long de ce travail et votre accueil chaleureux et social dans votre laboratoire depuis ma descente d'avion le 19 décembre 2016 jusqu'aujourd'hui. Veuillez recevoir ma très haute gratitude et mes reconnaissances les plus profondes.

Dr. Alexandre Boyer et Dr. Younes Chorfi de la Faculté de médecine vétérinaire, je voudrais vous exprimer mes remerciements pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail de thèse. Je remercie également Dr. Vilceu Bordignon de l'Université McGill en sa qualité d'examineur externe d'avoir accepté de juger ce travail, merci pour votre disponibilité. Que vous trouvez tous ici l'expression de ma profonde gratitude.

Je tiens aussi à remercier l'ensemble du personnel de mon laboratoire, notamment les Dr Jacques Lussier et Dr David W. Silversides pour leurs judicieux conseils et leur bonne humeur communicative, ainsi que Manon Salvat et Diana Raiwet pour leur soutien constant. Un merci particulier à mes collègues du Labo : Marianne, Soma et Amir, je souhaite que notre lien d'amitié établi se prolonge indéfiniment.

Un grand merci à tous les membres de mon comité conseil : Professeurs Christopher Price, Younès Chorfi et Réjean Lefebvre. Merci à tous les membres de notre lab meeting de chaque lundi notamment les membres des labos de Dr. D. Boerboom, Dr. A. Boyer, Dr. G. Zamberlam, Dr. G. St-Jean et Dre. J. Brind'Amour. Les apports scientifiques que vous m'avez apportés sont inestimables.

Un merci à mes collègues du bureau : Jennifer, Bruno, Soloman et Laura ainsi qu'aux corps professoral et administratif de la Faculté de médecine vétérinaire que j'ai eu à côtoyer tout au long de mes études doctorales. Un merci également au corps enseignant du département de Sciences de la vie et de la terre de l'École Normale Supérieure (ENSup) de Bamako, particulièrement à Dr. Moussa K KANTE.

Un merci spécial à ma famille, à vous qui m'avez suivi tout au long de ces années contre vents et marées. Pour moi, ce n'aurait pas été facile sans le soutien, l'encouragement, l'amour et l'immense joie de vivre que vous m'avez procuré.

Je remercie la Banque Islamique de Développement (BID) pour m'avoir financé pendant les trois ans et le FRQNT pour les deux ans de mon doctorat. Cette thèse est l'aboutissement de vos investissements.

Enfin, je remercie tous ceux qui de près ou de loin, même parfois à leur insu ont contribué à l'élaboration du travail, qu'ils trouvent ma reconnaissance.

INTRODUCTION

L'industrie laitière est une industrie majeure au Canada avec un rôle économique important dont le total des recettes monétaires a été estimé à 6,99 milliards de dollars en 2019 [Centre canadien d'information laitière (CCIL)]. Cependant, des études épidémiologiques ont prouvé que l'efficacité de la reproduction bovine est en baisse constante dans le monde entier et que les vaches avec la plus grande production de lait ont la plus forte incidence d'infertilité (Lucy 2001, Chagas, Bass et al. 2007). Cette baisse de l'efficacité reproductive chez les vaches laitières se traduit, chaque année, par des pertes économiques importantes dans les industries agricoles et laitières. Une meilleure connaissance des mécanismes moléculaires fondamentaux contrôlant les processus reproductifs pourrait éventuellement conduire au développement de technologies qui améliorent l'efficacité de la reproduction et par conséquent réduire les coûts de production alimentaire.

Bien qu'il existe une grande quantité de connaissances sur la physiologie de l'ovaire, les mécanismes moléculaires liés au déclin de l'efficacité reproductive ne sont pas entièrement compris. Dans les espèces mono-ovulatoires comme la vache, la croissance folliculaire finale comporte le recrutement cyclique de petits follicules, la sélection d'un follicule dominant et l'ovulation qui aboutit à la libération d'un ovocyte mature. Chez l'espèce bovine, les processus de recrutement, sélection et dominance sont répétés 2 à 3 fois par cycle œstral de 21 jours. Au cours du cycle œstral bovin, le dernier follicule dominant subit une différenciation, ce qui permet la sécrétion de l'œstradiol pour déclencher l'onde pré-ovulatoire de l'hormone lutéinisante (LH), suivie de l'ovulation et de la différenciation en un corps jaune (Ginther, Beg et al. 2001). La transcription de gènes cibles qui contrôlent la croissance d'un follicule dominant est ainsi rapidement diminuée ou inhibée suite à la relâche de la LH (Ndiaye, Fayad et al. 2005), alors que la LH augmente ou induit l'expression de gènes impliqués dans l'ovulation et la lutéinisation (Sayasith, Sirois et al. 2013, Lussier, Diouf et al. 2017). Ces observations démontrent l'importance d'études sur la fonction des gènes au cours des dernières étapes du développement folliculaire et de l'ovulation pour mieux coordonner l'activité ovarienne. Malgré tout, chez les espèces mono-ovulatoires, les processus de recrutement cyclique ainsi que les phases de sélection et de dominance au cours de la croissance folliculaire finale suivies de l'ovulation et la lutéinisation restent encore mal connus. Toutefois, durant ces processus, les cellules stéroïdéniques dont les cellules granulosas jouent un rôle crucial dans la maturation et la libération de l'ovocyte (Dorrington, Moon et al. 1975, Xu, Allen Garverick et al. 1995, Shimizu 2016, Zielak-Steciwo et al. 2016). En effet, les cellules de granulosas (CG) sont un composant particulièrement important du follicule

parce que de nombreux facteurs tels que les récepteurs à la FSH (FSHR) dans les petits follicules et les follicules en croissance, les récepteurs à la LH/Chorionic Gonadotropin (LHCGR) dans les follicules ovulatoires, les hormones stéroïdes (œstradiol et progestérone) et des facteurs de croissance sont produits par les CG et affectent le devenir du follicule. Une régulation adéquate de l'activité des CG est donc cruciale pour la production en temps opportun de facteurs paracrines qui soutiennent la croissance folliculaire et ovocytaire pour le succès de la reproduction. Similairement, l'expression de gènes cibles dans les CG, leurs fonctions ainsi que leurs mécanismes d'action et les voies de signalisation affectées doivent être mieux caractérisés. Enfin, une meilleure compréhension du contrôle de l'activité des CG en période post-partum est également une composante importante de notre recherche dans la mesure où l'anovulation post-partum prolongée constitue une cause significative de baisse de performance reproductive chez la vache.

À la lumière de cela, notre laboratoire a identifié et caractérisé un membre de la famille des Tribbles pseudokinase (TRIB2) exprimé de façon différentielle dans les follicules dominants bovins (Ndiaye, Fayad et al. 2005). TRIB2 est un membre atypique de la famille des protéines tribbles qui est composée de TRIB1, TRIB2 et TRIB3. Les protéines tribbles font partie de la superfamille des protéines sérine/thréonine kinases. Il a été démontré que TRIB2 joue un rôle clé dans la coordination de la mitose et de la morphogénèse chez la drosophile alors que chez la souris son expression dans les cellules du cumulus serait liée à la maturation ovocytaire (Mata, Curado et al. 2000, Brisard, Chesnel et al. 2014). Par ailleurs, il a été rapporté que CCAAT/Enhancer-binding protein alpha (C/EBP α) et Yes-associated protein sont des effecteurs cibles de TRIB2 (Keeshan, He et al. 2006, Dedhia, Keeshan et al. 2010). Cependant, les rôles exacts de TRIB2 dans la fonction des cellules reproductrices et, en particulier ses effets sur la croissance folliculaire et l'ovulation restent encore à définir. Des études sont donc nécessaires pour explorer la fonction et le mode d'action de TRIB2 afin de parvenir à une meilleure compréhension de la physiologie ovarienne.

Dans un premier temps, afin d'étudier le rôle de TRIB2 dans la fonction des cellules de Granulosa au cours du développement folliculaire, nous avons utilisé des modèles *in vivo* et *in vitro* combinés à des expériences d'inhibition et de surexpression (Article 1). Nous avons ensuite utilisé l'approche du double hybride pour identifier les partenaires de liaison de TRIB2 dans les cellules de granulosa du follicule dominant et avons analysé les effets de l'inhibition ou la surexpression de TRIB2 sur ces partenaires (Article 2). Dans l'article 3, nous avons analysé diverses interleukines dans les cellules de granulosa provenant de vaches en période post-partum avec une analyse

complémentaire de la régulation de TRIB2 chez ces vaches en post-partum. Les résultats de ce projet de recherche sont présentés dans les chapitres III, IV et V constituent le corps de mes travaux de doctorat après la recension de la littérature en chapitre I et l'hypothèse les objectifs en chapitre II. Ces travaux de thèse permettent de déterminer l'importance physiologique de TRIB2 et ses partenaires dans le follicule en développement, d'améliorer notre compréhension de la physiologie de l'ovaire et d'éclaircir le rôle de la signalisation de TRIB2 dans la croissance folliculaire. Les résultats de ce projet pourraient mener à des façons novatrices de contrôler la fonction ovarienne en identifiant de nouvelles cibles moléculaires pour améliorer la fertilité.

CHAPITRE I: REVUE DE LA LITTÉRATURE

I.1. L'ovaire et le follicule ovarien

I.1.1. L'ovaire

Les ovaires font partie de l'appareil reproducteur femelle des vertébrés et sont deux glandes génitales situées dans la cavité abdominale à l'extrémité des cornes utérines. L'activité de l'ovaire évolue au cours du temps : elle est cyclique à partir de la puberté, qui débute vers huit mois chez la vache, hormis lors des gestations, et s'étend jusqu'à la fin de la vie chez la vache et jusqu'à la ménopause chez la femme. L'ovaire est un organe hautement organisé composé de cellules germinales (ovocytes) et de cellules somatiques (cellules de la granulosa, cellules de la thèque et cellules stromales) dont les interactions dictent la formation et le développement des follicules, l'ovulation et la formation du corps jaune (Fig.1B) (Hurk, Abir et al. 2000). Le corps jaune est la structure du système endocrinien qui se forme à partir du follicule ovarien après l'ovulation et qui est nécessaire pour l'établissement et le maintien de la grossesse. De nombreux événements dans l'ovaire d'adulte sont contrôlés par deux hormones, l'hormone folliculo-stimulante (FSH) et l'hormone lutéinisante (LH), sécrétées par la glande pituitaire antérieure sous le contrôle d'impulsions de *gonadotropin-releasing hormone* (GnRH) de l'hypothalamus (Fig.1A) (Richards and Pangas 2010). Les impulsions de GnRH à basse fréquence stimulent une légère augmentation des niveaux de FSH au début du cycle menstruel chez la vache, améliorant la croissance des follicules, tandis que les impulsions de GnRH à haute fréquence entraînent une forte augmentation des niveaux de LH (un événement connu sous le nom de « LH surge » ou « pic de LH »), déclenchant l'ovulation et la formation du corps jaune (Vizcarra, Wettemann et al. 1996, Vizcarra, Wettemann et al. 1997, Hurk, Abir et al. 2000, Richards and Pangas 2010). L'ovaire joue également un rôle clé dans ces processus, assurant la libération des ovocytes fécondables et le maintien de la fonction des cellules lutéales qui est nécessaire pour la gestation, en dirigeant les mécanismes de rétroaction vers l'hypothalamus et l'hypophyse. Par exemple, les œstrogènes produits par les cellules du follicule en développement inhibent à la fois la production de la FSH en agissant sur l'hypothalamus et provoquent des impulsions de GnRH élevées, qui déclenchent la poussée de LH qui initie l'ovulation. Ainsi, la fertilité dépend d'événements endocriniens hautement orchestrés impliquant plusieurs systèmes organiques (Richards and Pangas 2010).

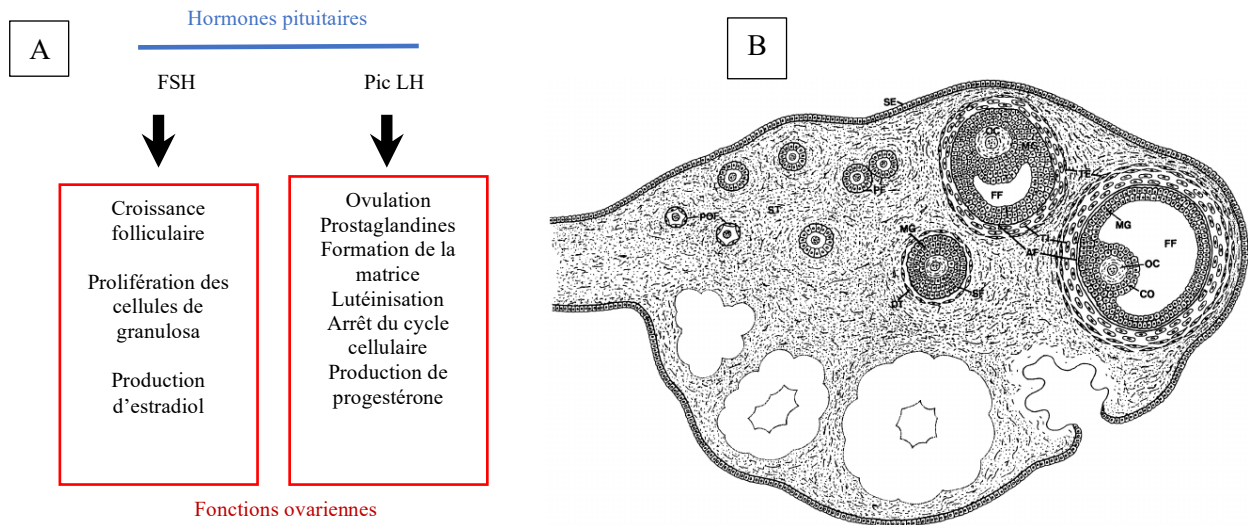


Figure 1. – Résumé du contrôle hormonal et présentation schématique du développement folliculaire dans l'ovaire bovin. Modifiée de (Hurk, Abir et al. 2000, Richards and Pangas 2010).

A) Les gonadotrophines hypophysaires FSH et LH font partie de l'axe hypothalamo-hypophysogonadique qui régulent de manière coordonnée le cycle œstral chez la vache ou par le feedback (rétroaction). La FSH contrôle la croissance des cellules de la granulosa (CG) et la production d'œstradiol, tandis que la LH contrôle l'ovulation et la lutéinisation folliculaire. (B) Une présentation schématique du développement folliculaire est présentée, montrant les principaux types de cellules et les stades folliculaires. Le follicule ovarien est composé d'un seul ovocyte entouré de cellules somatiques (cellules de la granulosa) et de cellules thécales. Les follicules se développent du stade primordial au stade primaire et secondaire indépendamment des gonadotrophines hypophysaires. La FSH stimule la croissance jusqu'au stade folliculaire pré-ovulatoire, caractérisé par les cellules de la granulosa qui entourent directement l'ovocyte (cellules du cumulus) et celles qui constituent la majeure partie de la paroi du follicule. Le follicule pré-ovulatoire contient un ovocyte entouré de cellules du cumulus qui sont séparées des cellules de la granulosa murale par une cavité (antre) remplie de liquide. Suite à la poussée de LH, le follicule rompt à travers la surface ovarienne, et les cellules restantes du follicule se différencient pour former un corps jaune. SE = surface epithelium; POF = follicule primordial; PF = follicule primaire; SF = follicule secondaire; AF = follicule antral; MG = membrane de la granulosa; DT = thèque en développement; OC = ovocyte; FF = liquide folliculaire; TI = thèque interne; TE = thèque externe; CO = cumulus oophorus; ST = tissu stromal.

I.1.2. Le follicule ovarien

Le follicule ovarien est considéré comme l'unité fonctionnelle de l'ovaire, ayant comme mission la production d'un ovule mature, apte à la fécondation. Le follicule ovarien est composé d'un seul ovocyte entouré de cellules somatiques (cellules de la granulosa) et de cellules thécales. Le follicule ovarien a été mis en évidence pour la première fois en 1672 par Reignier De Graaf, anatomiste et médecin néerlandais en observant le système reproducteur chez la lapine (Setchell 1974). Le développement des follicules ovariens, ou folliculogénèse, commence au démarrage de la croissance du follicule primordial et se termine à l'ovulation. L'ovulation, stade ultime de la folliculogénèse, ne se produit que si les caractéristiques endogènes (développementales, hormonales, métaboliques) de l'individu et son environnement (saison, nutrition, interactions sociales) le permettent (Monniaux, Caraty et al. 2009).

I.1.2.1. La folliculogénèse

La phase de croissance folliculaire est définie comme l'intervalle entre le moment où le follicule quitte la réserve jusqu'au moment où il atteint l'ovulation (Drion, Beckers et al. 1997). Elle est divisée en deux étapes principales : le recrutement initial des follicules primordiaux dans le « pool » des follicules en croissance et le recrutement cyclique des follicules en croissance pour former des ou un follicule ovulatoire (Fig. 2) (Norris and Kh 2011, Araújo, Gastal et al. 2014, Hsueh, Kawamura et al. 2015). On peut également différencier ces étapes en les qualifiant de stades pré-antral et antral, ou encore folliculogénèse basale et folliculogénèse terminale (Monniaux, Caraty et al. 2009).

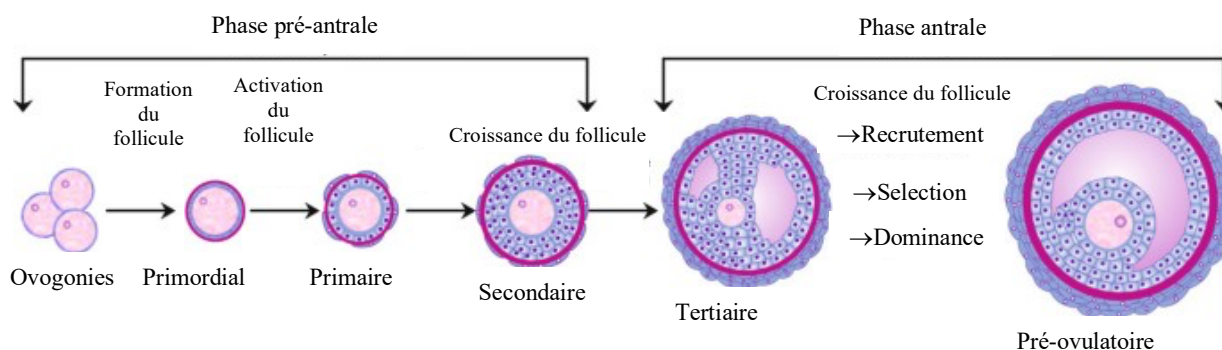


Figure 2. – Séquence schématique du développement folliculaire complet. Modifiée de (Araújo, Gastal et al. 2014).

Phase pré-antrale : Formation et début de croissance et activation des follicules primordiaux et croissance des follicules primaires et secondaires. Phase antrale : formation d'un follicule tertiaire (cavité antrale remplie du liquide folliculaire). La croissance folliculaire se poursuit à travers les phases de recrutement, de sélection, de dominance et de stade pré-ovulatoire des vagues folliculaires. Les ovogonies se développent à partir d'une cellule germinale primordiale et se différencient en ovocyte dans l'ovaire. Le liquide folliculaire est un exsudat plasmatique conditionné par les produits de sécrétion des cellules de la granulosa et de l'ovocyte.

1.1.2.1.1. La folliculogénèse basale

Chez la vache, des follicules primordiaux complètement formés sont présents 90 jours post-conception (Yang and Fortune 2008). Il a été estimé qu'il y aurait au total environ 2 100 000 cellules germinales primordiales (CPG) formées durant la vie fœtale et ce nombre serait réduit à 130 000 ovocytes à la naissance (Aerts and Bols 2010). La croissance folliculaire ne concerne que 10 % du stock folliculaire (Hanzen, Lourtie et al. 2000).

L'initiation de la croissance ou l'activation des follicules primordiaux constitue la transition du follicule primordial au stade de follicule primaire. Ceci s'accompagne de prolifération et de différenciation des cellules de la granulosa en une forme cuboïde au lieu d'être aplaties (Aerts and Bols 2010). La nature et la succession des événements ainsi que les facteurs impliqués dans les événements conduisant à l'activation des follicules au repos ne sont pas encore entièrement déterminés. Cependant, de multiples observations réalisées après des expériences d'hypophysectomie (rat, brebis) (Monniaux, Caraty et al. 2009), de désensibilisation hypophysaire par un long traitement avec un agoniste du GnRH (toutes espèces) (Monniaux, Caraty et al. 2009)

ou d'inactivation (*knock-out*) du gène codant pour la chaîne β de la FSH ou son récepteur chez la souris (Kumar, Wang et al. 1997, Dierich, Sairam et al. 1998) ainsi que chez des femmes présentant un déficit en FSH, suggèrent fortement que la LH et la FSH ne sont pas directement impliquées dans ce processus (Matthews, Borgato et al. 1993, Gougeon 2010). Néanmoins, elles sont capables de moduler le développement folliculaire basal par leur action sur les cellules de granulosa et de thèque (Monniaux, Caraty et al. 2009).

La folliculogénèse basale est contrôlée par de nombreux facteurs de croissance, d'origines ovocytaire et somatique, agissant essentiellement selon un mode paracrine de régulation. Il existe un équilibre entre les facteurs stimulant l'activation des follicules au repos et d'autres facteurs l'inhibant. Plusieurs facteurs ovocytaires semblent jouer un rôle important dans l'initiation de la croissance des follicules primordiaux. Chez les mammifères, les mutations du gène des gènes codant pour les facteurs de transcription ovocytaires *NOBOX oogenesis homeobox* (NOBOX) (Qin, Shi et al. 2009), *LIM homeobox 8* (LHX8) (Fu, Zhang et al. 2016), *spermatogenesis and oogenesis specific basic helix-loop-helix 1 ou 2* (SOHLH1) (Pangas, Choi et al. 2006) ou (SOHLH2) (Choi and Rajkovic 2006) sont associés à une insuffisance ovarienne prématurée ou au blocage du démarrage de la croissance folliculaire. En revanche, l'inactivation dans l'ovocyte des facteurs ubiquistes *forkhead box O3* (FOXO3) (Bao, Hayakawa et al. 2011) ou phosphatase and *tensin homolog* (PTEN) induit une activation massive des follicules primordiaux bovins *in vitro* (Bao, Hayakawa et al. 2011, Maidarti, Clarkson et al. 2019).

De nombreuses molécules d'origine somatique, dont la cytokine Kit Ligand (KITLG) exprimée par les cellules de granulosa dès le stade de follicule primordial, se liant à un récepteur tyrosine kinase stimule l'initiation de la croissance folliculaire en activant la voie de signalisation phosphatidylinositol kinase (PI3K), elle-même constituée d'enzymes et facteurs de transcription qui induisent ou bloquent l'activation de follicules primordiaux. Chez la vache, il a été montré que le KL favorise le développement précoce des follicules en induisant la prolifération et l'organisation des cellules souches stromales autour des petits follicules (Parrott and Skinner 2000). Ces observations ont suggéré que KL peut agir comme un « organisateur de cellules thèques » dérivé de la granulosa pour favoriser le recrutement des cellules souches des cellules stromales ovariennes (Parrott and Skinner 2000). Par ailleurs, l'hormone antimüllérienne (AMH) a inhibé l'activation des follicules primordiaux bovins et atténué la croissance des follicules activés *in vitro* (Yang, Cushman et al. 2017). Il a été également démontré chez la ratte et chez la femme que l'AMH inhibe

l'activation des follicules de la réserve en inhibant l'expression du récepteur c-kit ainsi que la synthèse du KL, du *Keratinocyte growth factor* (KGF) et du récepteur 1 du *Fibroblast Growth Factor* (bFGF) (Gougeon 2010). Le *leukemia inhibiting factor* (LIF) stimule l'initiation dans l'ovaire néonatal de ratte en stimulant la synthèse du KL par les CG (Nilsson, Kezele et al. 2002). Il a également été observé que les souris dépourvues des facteurs de transcription FOXO3a (Castrillon, Miao et al. 2003) et *Forkhead box protein L2* (FOXL2) (Schmidt, Ovitt et al. 2004), présentent une déplétion accélérée de la réserve ovarienne suggérant que ces facteurs de transcription inhibent l'initiation de la croissance des follicules primordiaux. Chez ces souris déficientes en FOXL2, les CG aplaties ne se transforment pas en CG cuboïdales (Schmidt, Ovitt et al. 2004). Le facteur de croissance *Bone Morphogenetic Proteins 4* (BMP4), exprimé par les cellules stromales du cortex ovarien, pourrait aussi réguler le l'initiation de la folliculogenèse. En effet, l'administration de BMP4 à des rattes (Nilsson and Skinner 2003) ou des souris (Gougeon 2010) stimule l'initiation de la croissance des follicules. Le modèle d'ovaire de souris ou de rat nouveau-né en culture a été utilisé pour montrer que d'autres protéines, telles que le facteur de croissance des fibroblastes basiques 2 (FGF2) (Nilsson and Skinner 2004), le facteur de croissance des kératinocytes (KGF) (Kezele, Nilsson et al. 2005), l'insuline (Kezele, Nilsson et al. 2002), le facteur de croissance dérivé des plaquettes (*Platelet-derived growth factor* : PDGF) (Nilsson, Detzel et al. 2006), peuvent également stimuler l'initiation de la croissance des follicules primordiaux.

Les hormones stéroïdiennes semblent aussi être impliquées dans l'activation des follicules ovariens; puisque le traitement de macaques pré-pubères par les androgènes stimule l'activation des follicules de la réserve, tandis que l'œstradiol et la progestérone semblent inhiber cette activation (Gougeon 2011). La somatostatine (SST), un puissant inhibiteur de la génération d'AMPc dans la plupart des cellules épithéliales (Rajkumar, Kerr et al. 1992), est capable d'inhiber l'activation du système KL/c-Kit dans le testicule (Goddard, Bauer et al. 2001), et un antagoniste des récepteurs SST peut augmenter l'initiation spontanée de la croissance folliculaire dans les ovaires en culture de souris nouveau-nés (Gougeon, Delangle et al. 2010).

Prises ensemble, les données disponibles suggèrent fortement que le système KL/c-Kit joue le rôle central dans le processus par lequel les follicules quittent la phase de repos pour entrer dans la phase de croissance (Fig.3) (McLaughlin and McIver 2009, Chen, Yang et al. 2020).

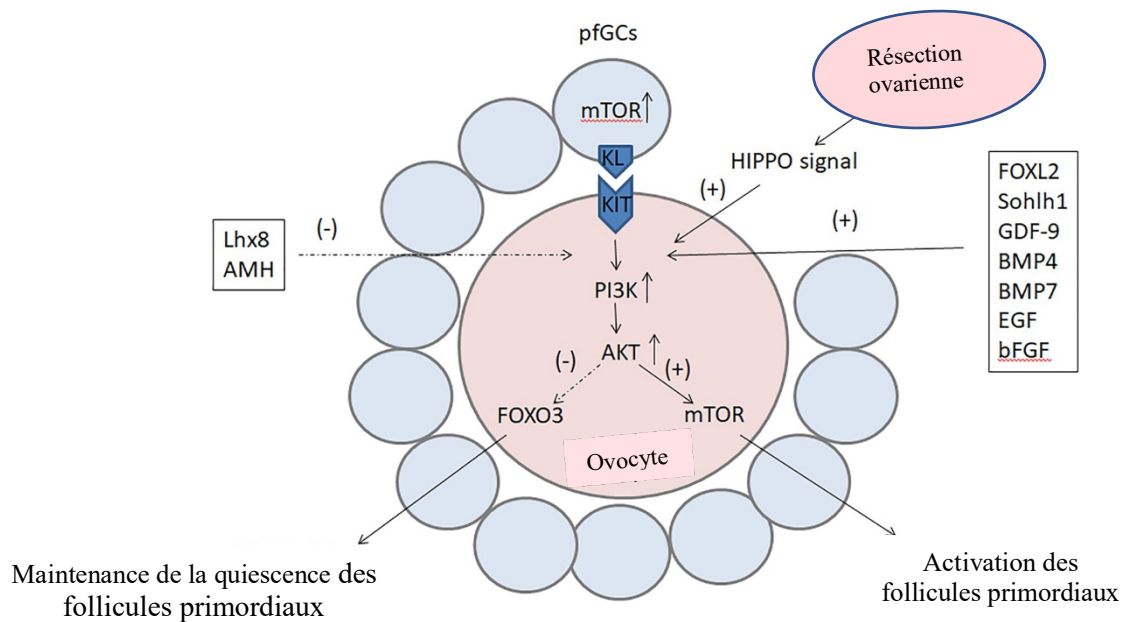


Figure 3. – Les facteurs et les voies régulant l'activation des follicules primordiaux. Modifiée de (Chen, Yang et al. 2020).

Le signal PI3K-Akt est la principale voie de transduction dans les ovocytes et joue un rôle clé dans l'activation des follicules primordiaux. D'une part, le signal PI3K-Akt peut réguler positivement mTOR pour activer les follicules primordiaux. D'autre part, il peut empêcher FOXO3 de se localiser dans le noyau et l'empêcher de maintenir la quiescence des follicules primordiaux. L'activation des follicules primordiaux peut également être activée par le signal mTOR dans les cellules de granulosa de follicules primordiaux (pfGC) et le signal Hippo après résection ovarienne. Des facteurs tels que FOXL2, Sohlh1, NOBOX, GDF-9, BMP4, BMP7, bFGF et EGF initient l'activation des follicules primordiaux, tandis que Lhx8 et AMH sont des facteurs suppresseurs dans ce processus. pfGCs, primordial follicle granulosa cells; *PI3K*, phosphoinositide 3-kinase; *Akt*, serine/threonine protein kinase; *mTOR*, mammalian target of rapamycin; *FOXO3*, forkhead box O3; *FOXL2*, forkhead box L2; *Sohlh1*, spermatogenesis- and oogenesis-specific basic helix-loop-helix-containing protein 1; *NOBOX*, newborn ovary homeobox gene; *GDF-9*, growth differentiation factor-9; BMP, bone morphogenetic protein; *bFGF*, basic fibroblast growth factor; *EGF*, epidermal growth factor; *Lhx8*, LIM homeobox 8; *AMH*, anti-Mullerian hormone.

1.1.2.1.2. La folliculogénèse terminale

La folliculogénèse terminale est strictement dépendante de la présence de la FSH et, pour les stades terminaux de maturation du follicule pré-ovulatoire, de la présence de la LH. L'apparition

de récepteurs de LH sur les cellules de granulosa est la « signature » d'une maturité complète du follicule, qui devient apte à ovuler. Cette maturité finale est atteinte pour des tailles folliculaires variant entre 0,5 mm de diamètre chez les rongeurs et 9 mm de diamètre chez la vache (Monniaux, Caraty et al. 2009). Outre les gonadotrophines, les principaux régulateurs de la croissance folliculaire terminale sont l'IGF1 et l'insuline, qui sensibilisent les follicules à la FSH (De Pascali, Tréfier et al. 2018). En particulier, l'action synergique de FSH et d'IGF1 joue un rôle déterminant dans le début de la phase terminale de croissance, permettant l'émergence du futur follicule pré-ovulatoire (De Pascali, Tréfier et al. 2018). Ensuite, la dominance du follicule pré-ovulatoire est assurée par la LH, hormone à laquelle ce follicule est progressivement devenu hypersensible et qui prend le relais de la FSH. Les gonadotrophines FSH et LH agissent sur leurs cellules cibles via leurs récepteurs membranaires spécifiques, respectivement FSHR et LHCGR (Richards 1980). L'activation de ces récepteurs par leurs ligands stimule la production d'AMPc par l'enzyme adénylate cyclase (ADCY), puis l'activation de la *protein kinase, cAMP-dependent* (PRKAC) (RICHARDS, JONASSEN et al. 1979) et de nombreuses autres kinases : MAPK1 (Salvador, Maizels et al. 2002, Cottom, Salvador et al. 2003), MAPK14 (Maizels, Cottom et al. 1998, Salvador, Maizels et al. 2002), PIK3 (Richards 2001). La phosphorylation de différents facteurs de transcription (CREB1, NR5A1, SP1) (Richards 2001) par ces kinases active l'expression d'un ensemble de gènes cibles tels que CYP19A1 (Fitzpatrick and Richards 1994), INHBB (Pei, Dodson et al. 1991), FSHR et LHCGR dans les cellules de granulosa (Sasano, Okamoto et al. 1989, Johnson and Woods 2007), CYP17A1 (Sasano, Okamoto et al. 1989) dans les cellules de la thèque et CYP11A1, STAR et HSD3B2 dans ces 2 types cellulaires (Lécureuil, Kara et al. 2007, Monniaux, Caraty et al. 2009).

I.1.2.2. La notion de vagues folliculaires

De nombreuses études échographiques ont confirmé la notion des vagues folliculaires selon laquelle le développement folliculaire apparaît non pas de manière aléatoire mais sous la forme de croissances et de régressions synchrones de plusieurs follicules appelées vagues. Chaque vague consiste en l'émergence, tous les 7 à 9 jours environ, de plusieurs follicules, de diamètre égal ou supérieur à 3mm, parmi lesquels, au bout de quelques jours, apparaîtra un follicule dit dominant (Fortune and Quirk 1988, Sirois and Fortune 1988, Hanzen, Lourtie et al. 2000).

Durant le cycle sexuel chez la vache, une à quatre vagues par cycle ont été décrites. Habituellement cependant, un cycle ne comporte que 2 ou 3 vagues, le follicule pré-ovulatoire étant issu de la

dernière vague (Savio, Keenan et al. 1988, Sirois and Fortune 1988, Taylor and Rajamahendran 1991). Si trois vagues sont observées, elles débutent habituellement aux jours 2, 9 et 16 du cycle. Si celui-ci n'en comporte que deux, elles apparaissent aux jours 2 et 11 du cycle (Savio, Keenan et al. 1988, Sirois and Fortune 1988, Taylor and Rajamahendran 1991). Davantage étudié au cours du cycle sexuel, la notion de vagues folliculaires est également décrite en période pré-pubertaire (Hopper, Williams et al. 1993), en post-partum (Savio, Boland et al. 1990) et durant les 45, voire les 70 premiers jours de la gestation (Savio, Boland et al. 1990). En effet, malgré la présence d'un corps jaune, l'émergence de vagues de croissance folliculaire continue, mais sans phénomène de sélection ni de dominance (Hanzen, Lourtie et al. 2000).

I.1.2.3. La notion de recrutement, sélection et dominance

Les concepts de recrutement, sélection et dominance pour les primates ont été proposés par Di Zerega et Hodgen en 1980 (diZerega and Hodgen 1981). Leurs études histologiques *in vitro* ont été par la suite confirmées *in vivo* chez la vache par échographie et chez la brebis par marquage à l'encre des follicules (Driancourt and Cahill 1984).

Le recrutement est l'entrée en croissance terminale d'une cohorte de follicules gonado-dépendants. Un follicule gonado-dépendant est un follicule qui a dépassé le stade auquel habituellement la plupart des follicules deviennent atrétiques (Fortune 1994). Il s'agit d'un mécanisme aléatoire (Roche and Boland 1991) où seuls sont recrutés les follicules atteignant "la bonne taille au bon moment" (Drion, Beckers et al. 1997). Le recrutement est provoqué par l'augmentation transitoire de la FSH. La FSH agit sur ces follicules en augmentant leur aptitude à aromatiser les androgènes en œstrogènes. Le recrutement d'un nombre de follicules supérieur à celui nécessaire constitue en quelque sorte la garantie qu'au moins un follicule se trouve dans les conditions optimales de développement et de sensibilité à l'action de concentrations minimales de FSH (Fortune 1994). Il a été démontré que la destruction d'un follicule dominant au début ou en fin d'une vague de croissance folliculaire retardait dans le premier cas la régression des follicules de taille directement inférieure et entraînait dans le second cas un recrutement plus précoce des follicules lors de la vague suivante (Ko, Kastelic et al. 1991). La disparition du follicule dominant se traduirait par une nouvelle augmentation de la FSH qui permettrait au second follicule de devenir dominant à son tour (Fortune 1994). Le follicule dominant ainsi que le plus gros follicule subordonné sont presque de la même dimension lors de leur recrutement, mais ils divergent

graduellement. Cette étape est appelée la déviation (Ginther, Kot et al. 1997). Il est pertinent de noter que même avant ce processus de sélection du follicule dominant et de la déviation, tous les follicules ayant un diamètre supérieur à 5 mm sont capables de devenir un follicule dominant chez la vache (Ginther, Kot et al. 1997).

La sélection fait référence au processus par lequel parmi les nombreux follicules en croissance, seuls arriveront au stade pré-ovulatoire des follicules en nombre caractéristique de l'espèce ou de la race. Cette notion trouve sa confirmation dans la constance du nombre d'ovulations malgré la diversité quantitative et qualitative de la population folliculaire entre individus. L'atrésie joue un rôle essentiel dans cette sélection (Hanzen, Lourtie et al. 2000). La sélection est secondaire à la réduction de la FSH qui a initié le recrutement. En effet, le développement du groupe de follicules recrutés s'accompagne d'une augmentation de la production d'œstradiol, mais également d'inhibine. Ces deux hormones exercent un rétrocontrôle négatif sur la production hypophysaire de FSH qui diminue. Dès que la concentration en FSH circulante devient inférieure à celle induisant le recrutement, les follicules recrutés entrent en atrésie, à l'exception du (ou des) seul follicule sélectionné, le mécanisme du choix du (ou des) follicule ovulatoire n'étant pas tout à fait connu (Drion, Beckers et al. 1997).

La dominance fait suite à la sélection. Elle est morphologique et fonctionnelle (Lavoit and Fortune 1990). Elle est qualifiée de morphologique parce qu'elle est exercée par le plus gros follicule présent sur l'un ou l'autre ovaire et elle est également fonctionnelle parce que le follicule dominant est le seul qui soit capable de provoquer la régression de follicules en croissance, ou d'inhiber la croissance d'autres follicules (Ko, Kastelic et al. 1991), et d'ovuler dans un environnement hormonal approprié (Gong, Bramley et al. 1991). Elle correspond donc au blocage du recrutement et à l'accroissement rapide de volume du (ou des) follicule ovulatoire. Bien que la FSH diminue, le follicule dominant persiste car il a acquis un mécanisme d'autostimulation interne : l'œstradiol qu'il produit amplifie la synthèse de l'*insulin-like growth factor-1* (IGF1) qui est normalement sous le contrôle de la FSH. L'IGF1 stimule à son tour l'aromatase des androgènes en œstrogènes. De plus, l'acquisition par les cellules de granulosa de récepteurs à la LH, associée à la sécrétion active de LH, contribue à maintenir une concentration élevée en AMPc dans les cellules folliculaires, et donc à la croissance du follicule dominant (Webb, Gong et al. 1992). Le passage de la dépendance du follicule de la FSH à la LH a été considéré comme l'événement clé dans le développement du follicule dominant. Xu et al. (1995) (Xu, Garverick et al. 1995)

ont conclu que « l'acquisition de récepteurs à la LH dans les cellules de la granulosa peut être essentielle à l'établissement et au maintien de la dominance folliculaire, tandis que les récepteurs de la FSH ne peuvent jouer qu'un rôle permissif » (Xu, Garverick et al. 1995). Un follicule qui a acquis des récepteurs à la LH avant les autres follicules pourrait théoriquement affamer tous les autres follicules de gonadotrophines en inhibant sélectivement la FSH sans inhiber la LH. L'inhibition sélective de la FSH a été obtenue grâce aux voies de régulation indépendantes au sein de l'hypothalamus et de l'hypophyse qui contrôlent la FSH et la LH (Pawson and McNeilly 2005). Alors que la sécrétion de FSH est inhibée par l'œstradiol et l'inhibine, la sécrétion de LH ne l'est pas. Les données d'une étude de puces à ADNc soutenaient que le follicule dominant était dépendant de la LH (Mihm, Baker et al. 2006). Les mécanismes exacts par lesquels la LH contrôlait le devenir du follicule dominant persistant ne sont pas clairs (Lucy 2007), mais les mécanismes sous-jacents qui déclenchent l'expression du gène du récepteur de la LH dans les cellules de la granulosa peuvent impliquer la FSH et l'œstradiol (Segaloff, Wang et al. 1990).

Le destin final du follicule dominant une fois qu'il devient LH-dépendant est l'atrésie ou l'ovulation. Un follicule dominant qui n'est pas exposé à la poussée de LH survivra pendant une courte période avant de devenir atrétique (Valdez, Cuneo et al. 2005). Pendant cette période, le follicule dominant dépend de facteurs de croissance qui favorisent la transition de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire et empêchent l'apoptose dans les cellules de la granulosa (Quirk, Cowan et al. 2004). Un follicule dominant peut être maintenu dans un état persistant avec un traitement progestatif de faible intensité (Sirois and Fortune 1990, Savio, Thatcher et al. 1993). Bien qu'un follicule persistant conserve sa capacité à déclencher une poussée de LH et à ovuler, les ovocytes des follicules persistants sont moins sains (c'est à dire présentent une fertilité inférieure), peut-être parce que l'ovocyte est activé prématurément (Revah and Butler 1996, Mihm, Curran et al. 1999). La poussée de LH convertit les cellules en état de prolifération du follicule dominant en cellules quiescentes résistantes à l'apoptose (Quirk, Cowan et al. 2004). Plusieurs études antérieures ont utilisé le modèle follicule dominant bovin pour examiner les changements dans l'expression des gènes folliculaires lorsque le follicule dominant devient sélectionné dans la cohorte afin de permettre de mieux comprendre les mécanismes de croissance et de sélection folliculaire. Ces études ont rapporté une variation de l'expression des ARNm dans les cellules de granulosa et/ou de la thèque au cours des différentes étapes du développement folliculaire (Tableau 1) (Fayad,

Levesque et al. 2004, Ndiaye, Fayad et al. 2005, Hatzirodos, Irving-Rodgers et al. 2014, Zielak-Steciwo and Evans 2016, Lussier, Diouf et al. 2017).

Tableau 1. – Expression différentielle des ARNm exprimés en fonction du stade de développement lors des vagues folliculaires du cycle œstral.

Follicle stage	Gene symbol
Recruitment	CYP19, TBC1D1
Selection	CYP19, INHBA, ApoER2, MAPKK5, CPDFSHR, ESR2, INHA, ACVR1, CCND2, LHCGR, TIAF1, LASS4, TBC1D1
Dominance	CYP19, LHCGR, ERb, DICE-1, MCL-1, TBC1D1, CEBPb, SRFCTNNA, HGF, IL-6, TYRO3, JAM2
Atresia	TGFBRIII, COX-1, TNFa, CAD, DRAK-2, CASP-13, P58(IPK), Apaf-1, BTG-3, TS-BCLL, Siva, FADD, TNFSF8, FKHRL1, NCOR1, MIDN, STX7, SPC22, EHD3

Tiré et adapté de (Zielak-Steciwo and Evans 2016)

I.1.2.4. L'atrésie folliculaire

L'atrésie folliculaire chez les mammifères est un phénomène universel caractéristique des changements morphologiques dégénératifs dans les cellules de la granulosa et de la thèque. L'atrésie physiologique des follicules chez les vaches a été estimée par analyse histologique autour de 80% à 90% (Marion, Gier et al. 1968) et environ 99% Chez la femme (Jones 1978). L'atrésie des follicules est un processus cellulaire actif avec résorption du follicule impliquant l'infiltration des macrophages, la phagocytose, la migration des fibroblastes de la thèque et la production de collagène (Schultz and Wysocki 2009, Rodgers and Irving-Rodgers 2010). Dans les premiers stades de l'atrésie, morphologiquement, l'apoptose est induite dans les cellules de la granulosa situées à la surface interne de la couche de granulosa, mais pas dans les cellules du cumulus, les ovocytes ou les couches de thèque interne ou externe (Inoue, Matsuda et al. 2011), indiquant un rôle initiateur de l'apoptose des cellules de la granulosa dans l'atrésie folliculaire (Tilly, Kowalski et al. 1991, Jiang, Cheung et al. 2003). La privation de facteurs clés favorisant la survie et la stimulation par les ligands de la mort sont les principales causes de l'apoptose des cellules de la granulosa (Matsuda-Minehata, Inoue et al. 2006). Les protéines pro-apoptotiques induisent l'apoptose caractérisée par l'activation de la caspase-3 (CASP3) et la fragmentation

ultérieure de l'ADN (Matsuda-Minehata, Inoue et al. 2006, Matsuda, Inoue et al. 2012). Des études ont rapporté un grand nombre de gènes identifiés pouvant être impliqués dans l'activation de l'apoptose dans différents tissus et chez différentes espèces (Pennica, Nedwin et al. 1984, Hockenbery, Nuñez et al. 1990, Fernandes-Alnemri, Litwack et al. 1994, Munday, Vaillancourt et al. 1995, Markström, Svensson et al. 2002, Zhang, Liu et al. 2018, Albamonte, Albamonte et al. 2019). Certains de ces gènes sont essentiels au programme d'apoptose et la perte de leurs fonctions prévient la mort cellulaire (Billig, Chun et al. 1996). Lorsque la décision de mort cellulaire est déclenchée, l'exécution du mécanisme apoptotique requiert l'activation et la propagation coordonnées de plusieurs facteurs (Hengartner 2000). Ces facteurs incluent, entre autres, les caspases (Fernandes-Alnemri, Litwack et al. 1994, Munday, Vaillancourt et al. 1995, Zhang, Liu et al. 2018), la famille des lymphomes B/leucémies 2 (BCL2) (Hockenbery, Nuñez et al. 1990, Albamonte, Albamonte et al. 2019), le facteur *Inhibitor of Apoptosis Proteins* (IAP) et la famille de récepteurs du *Tumor necrosis factor alpha* (TNF α) (Pennica, Nedwin et al. 1984, Markström, Svensson et al. 2002). L'atrésie s'accompagne biochimiquement d'une augmentation des concentrations en enzymes lysosomales et en glycosaminoglycanes ainsi que d'une diminution des concentrations en œstradiol (Mariana, Monniaux et al. 1991). Les cellules de la granulosa disparaissent progressivement et le cumulus se dissocie. L'ovocyte dégénéré reste la dernière cellule identifiable (Hanzen, Lourtie et al. 2000).

I.1.2.5. La maturation ovocytaire

La maturation ovocytaire inclut la maturation nucléaire, la maturation cytoplasmique et la maturation moléculaire. La maturation nucléaire représente la reprise de la méiose arrêtée en prophase I depuis la vie embryonnaire jusqu'à la métaphase II. La première métaphase est réductionnelle, c'est-à-dire qu'elle réduit la diversité du bagage génétique en conservant dans l'ovocyte seulement un des deux homologues de chaque chromosome, tandis que la seconde métaphase est équationnelle étant donné que seules les chromatides-sœurs sont séparées. Le premier signe visible de la reprise du processus méiotique est le plissement de l'enveloppe de la vésicule germinale (Mermillod 1999). Les pores de cette enveloppe nucléaire disparaissent ensuite puis elle se rompt (*germinal vesicle breakdown* ou GVBD) et disparaît rapidement (3 h chez la souris, 4 h à 6 h chez la vache). La reprise méiotique se caractérise morphologiquement par la condensation de la chromatine, la dissolution de la membrane nucléaire et la formation du fuseau méiotique. Les microtubules s'organisent en fuseau mitotique et la plaque métaphasique se forme.

La mise en place de cette métaphase et la métaphase elle-même durent environ 10 à 12 h chez la souris (Mermillod 1999). L'anaphase et la télophase suivent ensuite rapidement, donnant lieu à l'expulsion du premier globule polaire, contenant la moitié du complément chromosomique (Taieb, Thibier et al. 1997). La transition de la phase G2-M du cycle cellulaire de l'ovocyte a été associée à une augmentation de l'activité de l'histone H1 kinase (Maizels 2006), qui a été attribuée au facteur de promotion de la phase-M (MPF). Le MPF est un hétérodimère composé d'une cycline B et de la kinase cycline-dépendante 1 (CDK1). Chez la souris, le profil d'activation du MPF entre la reprise méiotique et la métaphase II est diphasique, c'est à dire qu'il augmente lors de la reprise méiotique et demeure élevé jusqu'à la transition entre la méiose I et II (Brunet and Maro 2005). Elle augmente de nouveau lors de la métaphase II et demeure élevée jusqu'à la fécondation ou l'activation artificielle après lesquelles elle chute de nouveau (Brunet and Maro 2005).

La maturation cytoplasmique est caractérisée par la concentration des granules corticaux aux abords de la membrane plasmique dès la reprise de la méiose. Les granules corticaux sont de petites vésicules sphériques de 200 à 600 nm de diamètre. Cette migration des granules corticaux s'accompagne du rassemblement d'autres organites (mitochondries, Golgi) dans la région périnucléaire. Des remaniements du cytosquelette et de la membrane plasmique ont également été décrits (Hoodbhoy and Talbot 1994). Le follicule lui-même connaît d'importantes modifications lors de la maturation. Un des phénomènes les plus spectaculaires est l'expansion du cumulus. La FSH provoque l'expansion des cellules du cumulus *in vitro* mais pas la LH (Cecconi and Colonna 1996). *In vivo*, l'action de la FSH présente dans le fluide folliculaire avant le pic de LH pourrait être bloquée par un inhibiteur. La LH lèverait cette inhibition lors de son pic ovulatoire (Cecconi and Colonna 1996). D'un point de vue mécanique, l'expansion du cumulus est également importante puisqu'elle facilite le détachement du complexe cumulus oophorus-ovocyte et sa capture par le pavillon lors de l'ovulation. Il a été rapporté que les concentrations d'AMPc sont relativement plus élevées avant le pic de LH et que les modifications indiquant la reprise de la méiose se produisent après le pic pré-ovulatoire de la LH (Czieselsky, Prescott et al. 2016); la prévention d'une élévation intempestive de l'AMPc est donc essentielle pour prévenir les réponses prématurées dans le follicule. Pour veiller à ce que les processus dépendant de l'AMPc ne se produisent pas prématurément, les phosphodiésterases (PDE) ciblant l'AMPc sont continuellement actives dans plusieurs tissus et cellules dont les cellules de granulosa (Tsafirri, Chun et al. 1996).

I.1.2.6. L'ovulation, la formation et la régression du corps jaune

L'ovulation est la libération de l'ovocyte par la rupture de l'apex du follicule suite au pic de gonadotrophines. Cet ovocyte est recueilli par le pavillon de la trompe puis transite dans l'ampoule de la trompe où la fécondation peut se produire. Le follicule se transforme en corps jaune qui secrète la progestérone.

I.1.2.6.1. Le processus ovulatoire

Chez l'espèce bovine, l'ovulation est spontanée, déclenchée environ 29-30 h suivant la relâche des hormones gonadotropes ou du pic de LH alors que chez la femme elle est estimée à 35 h environ post-LH (Sirois 1994, Driancourt 2001). En réponse à la poussée de LH, la structure folliculaire est radicalement remodelée pour permettre l'ovulation, et un certain nombre de processus parallèles essentiels se produisent. Ceux-ci comprennent la dissolution de la membrane basale folliculaire, la néo-vascularisation, la formation d'une matrice unique dans le complexe de cellules du cumulus entourant l'ovocyte (expansion du cumulus) et la reprise de la division méiotique des ovocytes (Robker, Hennebold et al. 2018). Le mécanisme précis de l'ovulation au niveau cellulaire n'est pas complètement défini non plus. La réponse directe à la poussée ovulatoire de LH est prédominante dans les cellules de la granulosa murale en raison de niveaux de récepteurs plus élevés que dans les cellules du cumulus. Le signal ovulatoire est reçu et traité par les cellules de la thèque et de granulosa murale; ces dernières semblent transmettre un signal secondaire au cumulus entraînant une surexpression du récepteur à la LH au niveau du cumulus (Russell and Robker 2007). Une brève augmentation de la LH en circulation agit sur un ou plusieurs follicules pré-ovulatoires afin d'initier de nombreuses cascades de signalisation différentes qui entraînent une multitude de réponses, y compris la reprise de la méiose des ovocytes, l'activation du transporteur 1 de la glycine (GLYT1) pour réguler l'équilibre osmotique dans l'ovocyte, l'expansion du cumulus et l'ovulation et la formation du corps jaune. Ces événements dépendants de la LH se produisent à différentes échelles dans le temps, mais l'un des plus rapides est l'activation des mécanismes qui conduisent à la reprise de la méiose des ovocytes (Stocco, Telleria et al. 2007, Shuhaibar, Egbert et al. 2015, Jaffe and Egbert 2017, Richard and Baltz 2017).

L'arrêt méiotique doit être maintenu par les cellules somatiques du follicule ovarien. Ces facteurs d'origine somatique ont longtemps été regroupés sous l'appellation « inhibiteur méiotique de l'ovocyte » (de l'anglais « *oocyte meiotic inhibitor* » ou OMI). Cette reprise du cycle cellulaire

est donc sous le contrôle des OMI folliculaires. Il semblerait que chez toutes les espèces étudiées, l'AMPc est un OMI important (Tsafiriri and Pomerantz 1986), quoiqu'il ne soit pas exclu qu'il en existe d'autres. L'hypoxanthine, une purine présente dans le liquide folliculaire, pourrait également être considérée comme un OMI (Downs, Coleman et al. 1985, Sasseville, Cote et al. 2007). Chez les mammifères par exemple, la reprise de la méiose peut être induite *in vitro* simplement en séparant l'ovocyte des cellules du cumulus, suggérant l'existence d'un signal inhibiteur issu de ces cellules. Les cellules folliculaires émettent en effet des prolongements cytoplasmiques qui entourent l'ovocyte établissant des jonctions communicantes avec l'ovocyte (Terret 2004). La reprise de la méiose de l'ovocyte est provoquée *in vivo* par le pic ovulatoire de LH parallèlement à l'expansion du cumulus. La liaison de la LH à son récepteur, LHCGR, stimule des cascades de signalisation intracellulaire en activant, entre autres, l'adénylate cyclase causant une augmentation importante d'AMPc qui active la protéine kinase A (PKA) ainsi que la voie des *Extracellular regulated kinase 1/2* (ERK 1/2) et de la protéine kinase C (PKC). Ensuite, les kinases PKA, ERK1/2 et PKC activent 29 des facteurs de transcription dont les plus importants sont le *cAMP responsive element binding protein 1* (CREB), le *CCAAT enhancer binding protein alpha et beta* (C/EBP α/β), le récepteur à la progestérone (PGR) et la famille des facteurs de transcription liée au *Transcription factor subunit AP-1* tel que JUN et FOS (Colledge, Carlton et al. 1994, Hashimoto, Watanabe et al. 1994, Richards and Ascoli 2018, Robker, Hennebold et al. 2018). Suite au signal secondaire émis par les cellules folliculaires, la concentration intra-ovocytaire en AMPc diminue. La concentration en AMPc dépend de l'équilibre entre deux activités enzymatiques : la famille des adénylates cyclases qui permet la synthèse d'AMPc à partir d'ATP et la famille des phosphodiésterases qui permet la dégradation de l'AMPc en 5'-AMP. La liaison de l'AMPc aux sous-unités régulatrices de PKA entraîne la dissociation du complexe des unités régulatrices et catalytiques et la libération des sous-unités catalytiques actives. Lorsque la concentration en AMPc chute dans l'ovocyte, l'association des sous-unités catalytiques et régulatrices est favorisée, entraînant la réduction de l'activité PKA. Cette chute d'activité de la PKA induit l'activation du facteur de promotion de la phase-M (MPF) et la reprise de la méiose. Des traitements permettant de maintenir un fort taux d'AMPc ou d'augmenter l'activité PKA empêchent la reprise de la méiose et l'activation du MPF (Terret 2004).

Il a été décrit que les C/EBP α/β et PGR sont nécessaires pour induire plusieurs gènes ovulatoires critiques, tels que *hypoxia-inducible factors* (HIFs), *peroxisome proliferator-activated*

receptor gamma (PPAR γ), *disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 1* (ADAMTS-1), *endothelin 2* (EDN2), *vascular endothelial growth factor a* (VEGFa) et *prostaglandin-endoperoxide synthase 2* (PTGS2) qui, à leur tour contribuent à la rupture folliculaire, probablement via l'induction le remodelage de la matrice extracellulaire (ECM), la vasoconstriction, l'angiogenèse et la contraction des muscles lisses (Robker, Hennebold et al. 2018). De même, la *Progesterone receptor* (PGR) contribue à la régulation de certains aspects de l'inflammation durant l'ovulation (Akison, Robertson et al. 2018), à savoir la production de cytokines et l'infiltration des cellules immunitaires, qui caractérisent la rupture folliculaire. Fait intéressant, l'épuisement des leucocytes dendritiques, systémique ou local dans l'ovaire, a considérablement réduit les taux d'ovulation induits par l'hCG (Cohen-Fredarow, Tadmor et al. 2014).

Les facteurs EGF-like *amphiregulin* (AREG) (Sekiguchi, Mizutani et al. 2004), *epiregulin* (EREG) (Sekiguchi, Mizutani et al. 2004), et *betacellulin* (BTC) sont induits de manière transitoire par LH via le récepteur à LH dans les cellules de granulosa (Espey and Richards 2002). Ces molécules activent le *récepteur epidermal growth factor receptor* (EGFR) au niveau des cellules du cumulus, ce qui stimule l'expression de EREG et AREG au niveau du cumulus, l'expansion du cumulus et la reprise de la méiose (Park, Su et al. 2004, Inoue, Miyamoto et al. 2009, Zamah, Hsieh et al. 2010). La signalisation issue de EGFR via les MAPK est nécessaire à la phosphorylation des connexines 43. Celles-ci engendrent une fermeture des jonctions communicantes entre les cellules somatiques du follicule. Ainsi les MAPK ont de multiples effets et fonctions dans les mécanismes associés à l'ovulation (Norris, Freudzon et al. 2008, Norris, Freudzon et al. 2010). Au moment de l'ovulation et donc sous l'effet du pic de LH, les cellules de la granulosa quittent le cycle cellulaire suite à l'augmentation des inhibiteurs (p27 et p21) et à la diminution de la cycline D2 et entrent dans leur phase de différenciation finale menant à la lutéinisation (Hirshfield 1991, Richards 1994, Robker and Richards 1998).

La cascade des MAP kinases MAPK3/1 (ERK1/2) est une voie de signalisation fortement activée en réponse à une grande variété de stimuli externes. Elle est essentielle pour la prolifération de nombreux types cellulaires y compris les cellules ovariennes. Elle implique une cascade d'événements de phosphorylation grâce à un module de trois kinases: la sérine/thréonine kinase Raf, les kinases à double spécificité MEK1/2 et finalement, les sérine/thréonine kinases ERK1/2. L'activation des MAP kinases MAPK3/1 est permise grâce à la phosphorylation de résidus

thréonine et tyrosine d'un motif TEY particulier par les kinases à double spécificité MEK1/2. MAPK3/1 activées vont alors transférer au noyau et entraîner par phosphorylation, l'activation de nombreux facteurs de transcription importants pour la progression du cycle cellulaire (Cargnello and Roux 2011).

Des études chez la souris ont révélé que l'absence de signalisation MAPK3/1 réduit l'expression des gènes régulés par la LH, notamment le facteur de transcription *early growth response 1 (Egr1)*, ainsi que les gènes nécessaires à la rupture folliculaire (*Adamts1* et *Ptgs2*), à l'expansion du cumulus (*pentraxin 3 (Ptx3)* et *TNF alpha induced protein 6 (Tnfaip6)*), à la maturation des ovocytes (*Areg*) et les marqueurs de lutéinisation (*steroidogenic acute regulatory protein (Star)* et cytochrome P450 family 11 subfamily a member 1 (*Cyp11a1*)) (Su, Nyegaard et al. 2006, Fan, Liu et al. 2009, Siddappa, Beaulieu et al. 2015). L'inhibition pharmacologique de la signalisation MAPK3/1 dans des cellules de granulosa bovine de follicules entre 8 et 12 mm de diamètre provenant d'ovaires d'abattoir cultivées en présence de forskoline (pour mimer le pic de LH) a entraîné une régulation à la baisse des gènes ovulatoires ADAMTS1 (Schuermann, Rovani et al. 2018), *chemokine CXC motif receptor 4 (CXCR4)* (Sayasith and Sirois 2014), le *Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein (ADAM71)* (Sayasith, Lussier et al. 2013) (Sayasith and Sirois 2015), *vascular non-inflammatory molecule 2 (VNN2)* (Sayasith, Sirois et al. 2013) et *regulator of G-protein signaling (RGS2)* (Sayasith, Sirois et al. 2014). Alors que le traitement des cellules thécales bovines avec l'inhibiteur spécifique de l'activation de la MAP kinase (MEK) et de la p42/44 MAP kinase (PD98059) *in vitro* a entraîné une augmentation de l'expression de STAR et donc une augmentation de la production de progestérone (Tajima, Yoshii et al. 2005). Ces études démontrent que les MAPK3/1 jouent un rôle important dans la médiation de l'expression génique induite par la poussée de LH dans les cellules de granulosa et de la thèque du follicule ovulant chez l'espèce bovine.

1.1.2.6.2. La formation du corps jaune

Le corps jaune est une structure se développant après l'ovulation suite au pic de LH. Le follicule ayant ovulé se transforme en corps jaune ou corpus luteum (CL), c'est la lutéinisation. Les cellules de granulosa et de la thèque se transforment respectivement en grandes et petites cellules lutéales (Alila and Hansel 1984). Chez toutes les espèces de ruminants et chez d'autres mammifères, le CL exerce une fonction essentielle dans la régulation du cycle œstral. Il joue, en

plus, un rôle déterminant dans la mise en place et le maintien de la gestation et est alors qualifié de corps jaune gestatif. La principale hormone sécrétée par le CL est la progestérone (P₄). Il produit aussi l'ocytocine en fin de phase lutéale (Brownstein, Russell et al. 1980) et la relaxine en fin de gestation (Hudson, Haley et al. 1981, Hudson, John et al. 1984). La progestérone favorise le maintien de la gestation éventuelle, et empêche l'ovulation du follicule dominant des vagues folliculaires en cours. Au début du di-œstrus, la progestérone inhibe la formation des récepteurs à l'œstradiol. Cela empêche la fixation de l'œstradiol à son récepteur qui, autrement, stimulerait la synthèse de récepteurs à l'ocytocine par l'endomètre et permettrait la sécrétion de la PGF₂ alpha (Lamming and Mann 1995, Asselin, Goff et al. 1996).

Plusieurs gènes qui sont rapidement et transitoirement induits par la poussée de LH, ont été supposés être impliqués dans l'ovulation et l'induction de la lutéinisation. Parmi ces gènes induits de manière transitoire après la poussée de LH se trouvent le récepteur à la progestérone (PR) (Park and Mayo 1991, Natraj and Richards 1993), la cyclooxygénase 2 (cox-2) (Lim, Paria et al. 1997) et la protéine de liaison C/EBPβ (C/EBPβ) (Sterneck, Tessarollo et al. 1997). Des études ont démontré que les souris déficientes en PGR, C/EBPβ ou cox-2 sont stériles (Lydon, DeMayo et al. 1996, Lim, Paria et al. 1997, Sterneck, Tessarollo et al. 1997). Ces souris développent des follicules pré-ovulatoires mais ne parviennent pas à ovuler. Les souris femelles COX2-*knock-out* et PR-*knock-out* n'ovulent pas, même en réponse à des hormones exogènes, mais forment un CL contenant des ovocytes piégés, suggérant qu'une lutéinisation peut se produire en l'absence de COX2 et PGR (Lydon, DeMayo et al. 1996, Lim, Paria et al. 1997). En revanche, les souris C/EBPβ-KO ovulent des ovocytes fécondables en réponse à la stimulation avec des gonadotrophines, mais la lutéinisation n'a pas lieu et les CL ne se forment pas même lorsque les ovaires sont transplantés dans des hôtes normaux (Sterneck, Tessarollo et al. 1997). Ces données indiquent un rôle clé pour le C/EBPβ dans le processus de lutéinisation (Stocco, Telleria et al. 2007). En absence de fécondation, le CL régresse spontanément après une période plus ou moins longue selon les espèces.

1.1.2.6.3. La régression du corps jaune

Chez l'espèce bovine, dans des conditions normales, si aucune fertilisation ne se produit pendant un cycle œstral, le CL régresse à environ 18-19 jours après l'œstrus précédent. Ce

processus est dénommé lutéolyse normale et implique une diminution en P₄ (lutéolyse fonctionnelle) ainsi qu'une diminution du volume du CL et du flux sanguin (lutéolyse structurale). Chez la plupart des espèces, la PGF₂ α utérine est connue pour être un facteur lutéolytique principal, mais son action directe au sein du CL est encore débattue (Cannon, Petroff et al. 2003, Skarzynski, Jaroszewski et al. 2005, Ferreira-Dias and Skarzynski 2008, Skarzynski, Ferreira-Dias et al. 2008). L'action de la PGF₂ α sur le CL bovin est médiée par des facteurs locaux dont *Endothelin 1* (EDN1), des cytokines et le *nitric oxide* (NO) (fig.4) (Ferreira-Dias and Skarzynski 2008, Skarzynski, Ferreira-Dias et al. 2008). Le NO inhibe également de manière aiguë la libération de progestérone à partir des CL (Skarzynski, Ferreira-Dias et al. 2008).

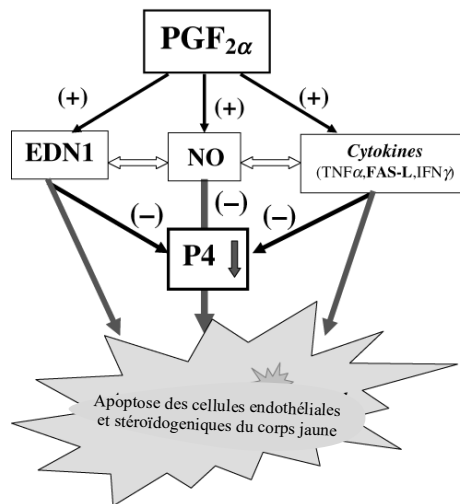


Figure 4. – Modèle hypothétique de la régression structurale et fonctionnelle du corps jaune. Modifiée de (Skarzynski, Ferreira-Dias et al. 2008).

I.2. Les cellules somatiques stéroïdogéniques du follicule ovarien

Le follicule pré-ovulatoire contient trois lignées cellulaires somatiques principales et distinctes. Les cellules de la thèque sont des cellules stromales ovariennes spécialisées séparées des couches de la granulosa par la membrane basale folliculaire, tandis que deux sous-lignées de cellules de la granulosa sont séparées l'une de l'autre par l'antra folliculaire (Fig. 5). Ces sous-

lignées cellulaires de la granulosa divergent pendant la croissance folliculaire, par le biais d'influences physiques et biochimiques, résultant soit d'un contact étroit avec la paroi folliculaire pour former des cellules de la granulosa murale, soit avec l'ovocyte pour former des cellules du cumulus. Surtout, la communication directe, ainsi que les interactions paracrines entre l'ovocyte et les cellules somatiques, sont nécessaires pour l'ovulation.

I.2.1. Les cellules de la thèque

Les cellules de la thèque sont observées une fois que le follicule a deux ou plusieurs couches de cellules de granulosa; elles deviennent sensibles à la LH et les enzymes stéroïdogéniques sont activées (Magoffin and Weitsman 1994). Les cellules thécales ont longtemps été considérées comme provenant des cellules de type fibroblaste au sein du stroma de l'ovaire (Peters 1969, Erickson, Magoffin et al. 1985, Honda, Hirose et al. 2007). Le progéniteur indifférencié des cellules de la thèque n'exprime pas les récepteurs à la LH ou les enzymes stéroïdogéniques et ne sont donc pas sensibles à la LH, montrant que l'initiation de la différenciation des cellules de la thèque est gonadotrophine indépendante (Magoffin and Weitsman 1994). Comme les cellules de la thèque ne sont pas associées aux follicules en croissance, on peut supposer que le follicule lui-même produit des facteurs qui envoient le signal au stroma de recruter des cellules qui forment la thèque (Young and McNeilly 2010).

Les cellules de la thèque sont fortement différenciées avec des caractéristiques structurales propres des cellules sécrétant des stéroïdes, y compris de nombreuses mitochondries, du réticulum endoplasmique, et des vésicules lipidiques (Magoffin 2005). Les mitochondries contiennent la première enzyme dans la voie stéroïdogénique assurant le clivage de la chaîne latérale du cholestérol, le cytochrome P450 (CYP11A) tandis que le réticulum endoplasmique contient les enzymes restantes nécessaires pour produire des androgènes (Fig.5). Les vésicules lipidiques stockent les précurseurs pour la synthèse des hormones stéroïdes comme les esters de cholestérol qui sont transportés dans les mitochondries par la *Steroidogenic acute regulatory protein* (Star) (Manna, Dyson et al. 2009). Les cellules thécales font partie des composantes du follicule, fournissant à la fois un support structurel et étant le producteur exclusif des androgènes ovariens, qui sont nécessaires en tant que substrats pour la production d'œstradiol dans les cellules de la granulosa voisines (Young and McNeilly 2010).

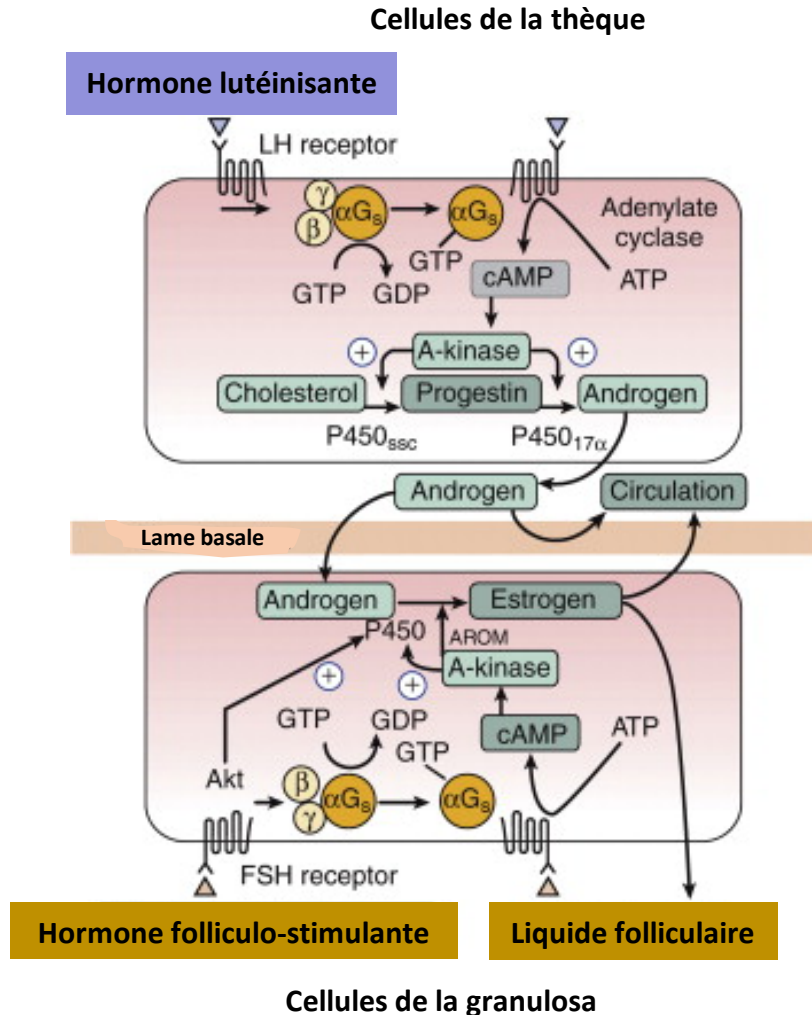


Figure 5. – Le système deux cellules et deux gonadotrophines pour la synthèse d'œstradiol dans le follicule. Modifiée de (Strauss, Modi et al. 2014).

Il a été démontré que la LH et la FSH stimulent l'adénylate cyclase via des récepteurs couplés à la protéine G. L'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) générée à partir de l'adénosine triphosphate (ATP) active la protéine kinase A pour stimuler l'expression des enzymes stéroïdogéniques respectives dans les cellules de la thèque et de la granulosa. De plus, dans les cellules de la granulosa, la liaison de la FSH à son récepteur conduit à l'activation de l'Akt, également connue sous le nom de protéine kinase B, probablement via un second messager phosphatidylinositol qui augmente l'expression de l'aromatase. GDP : guanosine diphosphate; GTP : guanosine triphosphate.

I.2.2. Les cellules de granulosa

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

I.2.2.1. L'origine des cellules de granulosa

Les cellules de la granulosa proviendraient de l'épithélium ovarien superficiel (Großhans and Wieschaus 2000). Ces cellules pré-granulosa entourent les ovocytes primordiaux. La cohorte de cellules de granulosa qui entoure chaque ovocyte a une origine oligoclonale (Van Deerlin, Cekleniak et al. 1997). Trois à cinq cellules mères sont estimées donner lieu à la liste complète des cellules de la granulosa dans un follicule mature (Van Deerlin, Cekleniak et al. 1997). Dans le follicule, les cellules de la granulosa ne reçoivent aucun apport sanguin direct. Ils reposent sur une lame basale qui les sépare de la thèque interne vascularisée. Par conséquent, il existe une barrière hémato-folliculaire relative qui restreint l'accès des substances de haut poids moléculaire, telles que les lipoprotéines de basse densité (LDL), au compartiment cellulaire de la granulosa (Strauss, Modi et al. 2014).

I.2.2.2. La contribution des cellules de granulosa à la croissance folliculaire

Le follicule ovarien mammifère, constitué d'un ovocyte qui subit une série d'événements biologiques, y compris l'ovulation, la fécondation et la formation d'un embryon, est entouré de cellules de la granulosa et de la thèque, qui produisent des signaux et des hormones pour permettre la compétence développementale de l'ovocyte (Su, Wu et al. 2004, Voronina, Lovasco et al. 2007). La prolifération et la différenciation des cellules de la granulosa (CG) sont cruciales pour la croissance folliculaire normale, le développement et la maturation de l'ovocyte, l'ovulation et la lutéinisation (Eppig 2001, Da Silva-Buttkus, Jayasooriya et al. 2008, D'Aurora, Sperduti et al. 2016). Il est bien connu que les CG du follicule ovarien communiquent avec l'ovocyte lors de la folliculogénèse par le biais de jonctions lacunaires et de facteurs paracrines pour une fonction reproductrice normale (Voronina, Lovasco et al. 2007). Un dysfonctionnement des GC dû à des

facteurs physiologiques ou environnementaux entraîne un développement désordonné des follicules ovariens et des ovocytes (Tatone, Amicarelli et al. 2008).

Lors du démarrage du développement folliculaire, les cellules de granulosa entrent en prolifération. Leur activité de prolifération atteint un maximum en fin de folliculogénèse basale, stade pendant lequel près de 100% des cellules sont en état de prolifération. Parallèlement, les cellules de granulosa synthétisent de nombreux facteurs de croissance (IGF, EGF, FGF, AMH) et des cytokines dont KIT ligand (KITLG). En particulier, la production d'AMH, faible à indétectable dans les follicules primaires, augmente dans les follicules pré-antraux pour atteindre un maximum en fin de folliculogénèse basale (Visser and Themmen 2005). Les récepteurs à la FSH apparaissent dans la granulosa des follicules primaires, leur nombre augmente légèrement et progressivement dans les follicules pré-antraux, reste stable dans les follicules antraux et enfin diminue au stade pré-ovulatoire. L'une des principales actions de la FSH est l'induction de l'expression de l'aromatase. La FSH induit également l'expression de la NADPH cytochrome P450 réductase, qui transfère les électrons à l'aromatase ainsi que l'hydroxy-delta-5-stéroïde déshydrogénase, 3 bêta et stéroïde delta-isomérase 2 (HSD3B2) qui convertit la dehydroepiandrosterone (Baltus, Menke et al.) en androstènedione. La déshydrogénase 17β-hydroxystéroïde de type 1 (HSD17B1), la 17β-HSD «œstrogénique» qui réduit l'œstrone en œstradiol. Des études sur des cellules de granulosa isolées de follicules pré-ovulatoires ont montré que la FSH, mais pas la LH, stimule la production d'œstrogène lorsque les cellules sont pourvues d'un substrat aromatisable (McNatty, Makris et al. 1979). Les cellules de la thèque humaine isolées ne produisent pas de quantités appréciables d'œstrogène (McNatty, Makris et al. 1979). L'activité de l'aromatase dans les cellules de granulosa est estimée au moins 700 fois plus élevée dans les grands follicules pré-ovulatoires que dans les cellules de la thèque associées (Strauss, Modi et al. 2014).

Les cellules de la granulosa murale dans le follicule antral ont la plus grande activité stéroïdogénique. De plus, les cellules murales de la granulosa dans le follicule pré-ovulatoire ont le plus haut niveau de récepteurs à la LH. Les cellules du cumulus expriment de faibles quantités d'aromatase, et leur contenu en récepteur LH et leur niveau de réponse à la LH sont sensiblement inférieurs à ceux de leurs homologues muraux. La FSH induit des récepteurs à la LH dans les cellules de granulosa du follicule pré-ovulatoire. En revanche, les niveaux d'ARNm du récepteur FSH (*FSHR*) diminuent dans les cellules de la granulosa à mesure que le diamètre folliculaire augmente. Par conséquent, aux derniers stades de la maturation folliculaire, la LH peut prendre le

relais de la fonction de la FSH pour propulser la maturation folliculaire (Sullivan, Stewart-Akers et al. 1999). Le follicule « choisi » pour ovuler synthétise l'œstradiol en quantités importantes entraînant le passage de cette hormone dans la circulation systémique. L'asymétrie dans la sécrétion ovarienne des œstrogènes liée à l'émergence du follicule dominant est détectable dès le 5^{ème} au 7^{ème} jour du cycle œstral (van Dessel, Schipper et al. 1996). Les concentrations d'œstradiol intra-folliculaires et en circulation sont directement corrélées à la taille folliculaire et sont maximales à la fin de la phase folliculaire (van Dessel, Schipper et al. 1996). Simultanément, ces cellules de granulosa deviennent sensibles à la LH (apparition et augmentation considérable des récepteurs à la LH (Fig.6) (Monniaux, Caraty et al. 2009).

Les cellules du cumulus prolifèrent après la poussée de LH et sont actives dans la production d'une matrice extracellulaire composée d'hyaluronane, de protéoglycanes et de protéines de liaison aux protéoglycanes lorsqu'elles sont stimulées par les prostaglandines générées en réponse au stimulus ovulatoire. L'élaboration de cette matrice conduit à l'expansion pré-ovulatoire du complexe cumulus-ovocyte qui semble indispensable à l'ovulation. Les profils d'expression différentiels des récepteurs à la prostaglandine E permettent aux sous-populations de cellules de la granulosa de répondre uniquement à la PGE2 pendant l'ovulation (Huang and Wells 2010). En fin de cycle ovarien, durant la décharge ovulatoire, la LH se fixe sur ses récepteurs situés à la surface des cellules de granulosa, induisant l'augmentation des taux intracellulaires d'AMPc et d'inositol phosphate. Ceci active la *Protein Kinase CAMP-Activated Catalytic* (PRKAC) qui induit une multitude de phosphorylations et d'activations de facteurs de transcription (CREB, SP1) qui contrôlent l'expression de gènes cibles (*CYP19A1*, *CYP17A1* sont inhibés et *STAR*, *CYP11A* *HSD3B2* sont activés). Cette cascade moléculaire se traduit par un effondrement de la sécrétion d'œstrogènes et d'androgènes et une augmentation du taux de progestérone (Monniaux, Caraty et al. 2009). Ainsi le pic pré-ovulatoire de LH induit d'importants changements fonctionnels dans les cellules de granulosa et de thèque du follicule pré-ovulatoire, conduisant à leur lutéinisation et à la formation du corps jaune (Monniaux, Caraty et al. 2009).

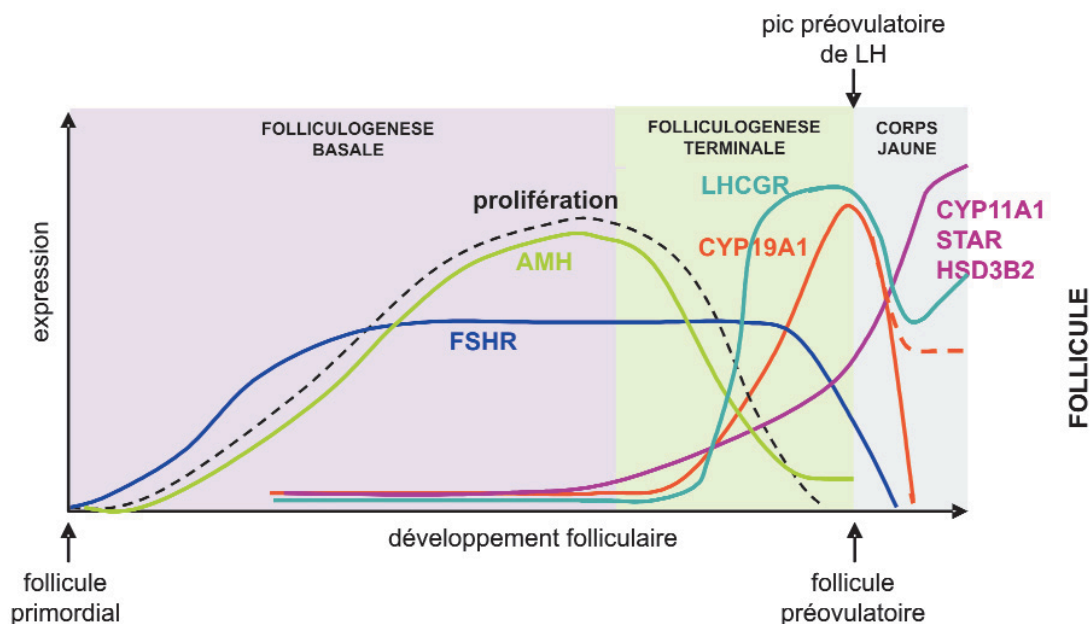


Figure 6. – Changements fonctionnels dans les cellules de granulosa au cours du développement folliculaire (Monniaux, Caraty et al. 2009).

Au cours de la folliculogénèse terminale, les cellules de granulosa perdent progressivement leur activité de prolifération et de synthèse d'AMH, et se différencient en cellules stéroïdogéniques par l'apparition et l'augmentation de l'expression des gènes *CYP11A1*, *Star*, *HSD3B2*, et surtout *CYP19A1* qui code pour l'enzyme aromatase, permettant la synthèse d'œstradiol à partir des androgènes d'origine thécale. L'œstradiol est l'hormone stéroïde clé produite par les cellules de la granulosa. La synthèse de cette hormone nécessite une relation de collaboration entre les cellules de la thèque entourant le follicule, qui produisent des androgènes (Déhydroépiandrostérone (DHEA), androstènediol, androstènedione, testostérone) en réponse à la LH, qui diffusent ensuite vers les cellules de la granulosa où ils sont convertis en œstrogènes (œstrone, œstradiol) par le cytochrome P450 aromatase (*CYP19A1*) en réponse à la FSH.

I.3. Rôles des gonadotrophines et des facteurs de croissances dans la folliculogénèse

I.3.1. Actions des gonadotrophines FSH et LH

Les principales hormones hypophysaires à effet sexuel ou gonadotrophines sont l'hormone folliculo-stimulante (FSH) et l'hormone lutéinisante (LH). La FSH favorise la cascade

d'événements qui assurent le développement de plusieurs follicules jusqu'à l'apparition d'un follicule dominant et la sécrétion d'œstrogènes alors que la LH active la cascade d'événements de signalisation qui se propagent dans tout le follicule pré-ovulatoire ovarien pour favoriser l'ovulation d'un ovule/ovocyte mature.

I.3.1.1. Les cascades de signalisation des gonadotrophines

En raison de l'interaction physique entre les récepteurs FSH (FSHR) et LH (LHR), les signaux intracellulaires délivrés par la LH au LHCGR peuvent être modulés par la présence de FSHR à la surface cellulaire, et vice versa, par la formation d'hétéromères de récepteurs. Par exemple, le FSHR co-exprimé sans ligand amplifie la signalisation médiée par $G\alpha_q$ initiée par LHCGR, tandis que le LHCGR peut inhiber la production d'AMPc dépendante de FSHR (Feng, Zhang et al. 2013, Jonas, Chen et al. 2018). La FSH et la LH exercent leurs effets en se liant à des récepteurs membranaires spécifiques. Après la liaison du ligand, les récepteurs subissent des changements conformationnels qui conduisent à l'activation d'un système effecteur. Les principaux effecteurs de la FSH et de la LH/hCG sont l'adénylate cyclase, lequel forme l'AMPc et les phospholipases (Catt 1991).

I.3.1.1.1. Les cascades de signalisation de la FSH

La FSH est une glycoprotéine jouant un rôle central dans la reproduction et le développement des mammifères. Dans l'ovaire, la FSH régule la folliculogénèse, la sélection des ovocytes et la synthèse des hormones stéroïdes sexuelles, préparant ainsi l'appareil reproducteur à la fécondation, à l'implantation et à la grossesse (Messinis, Messini et al. 2014). En règle générale, les protéines G sont directement activées par le récepteur FSH (FSHR), par séparation du dimère $\beta\gamma$ de la sous-unité α , qui agissent respectivement comme régulateurs d'enzymes intracellulaires, tels que les récepteurs kinases couplées aux protéines G (GRK), ou l'adénylyl cyclase, parmi beaucoup d'autres (Kahn and Gilman 1984, De Pascali, Tréfier et al. 2018). De plus, il a été démontré que le dimère $\beta\gamma$ était capable de moduler les cascades de signalisation intracellulaire (Federman, Conklin et al. 1992, Koch, Hawes et al. 1994). L'activation de la protéine G est suivie par la phosphorylation du FSHR au niveau intracellulaire, opérée par les GRK aboutissant à une association de récepteur avec les β -arrestines (Koch, Hawes et al. 1994, Krishnamurthy, Galet et al. 2003). Les β -arrestines sont des protéines d'échafaudage qui interviennent dans la désensibilisation, le recyclage et la signalisation indépendante de la protéine G par la *G-protein-*

coupled receptors (GPCR) (Crépieux, Poupon et al. 2017, De Pascali and Reiter 2018). Un autre partenaire qui interagit directement avec la FSHR est la protéine *Adapter protein containing Pleckstrin homology domain, Phosphotyrosine binding domain and Leucine zipper motif 1* (APPL1), qui est liée à l'activation de la voie anti-apoptotique PI3K/AKT et à la mobilisation des ions calcium (Thomas, Nechamen et al. 2011). APPL1 pourrait réguler la sélection du follicule dominant en médiant les effets anti-apoptotiques exercés par la FSH via l'inhibition de la phosphorylation de *forkhead homolog in rhabdomyosarcoma* (FOXO1a) (Nechamen, Thomas et al. 2004). Fait intéressant, APPL1 est impliquée dans la signalisation de l'AMPc exercée par l'activité des GPCR dans les compartiments endosomaux précoces, contribuant ainsi au codage spatial de la signalisation intracellulaire, comme le montre le LHCGR (Sposini, Jean-Alphonse et al. 2017). De même, la *GAIIP-interacting protein C terminus (GIPC)*, la *PDZ protein*, redirigent la FSHR vers des endosomes précoces, favorisant ainsi une activation des MAPK intracellulaires (Jean-Alphonse, Bowersox et al. 2014). Une autre protéine interagissant directement avec FSHR est la protéine adaptatrice 14-3-3 τ , qui peut entrer en contact avec le site d'interaction protéine-récepteur canonique G situé au niveau intracellulaire et permet l'activation de la voie AKT (Cohen, Nechamen et al. 2004, Dias, Mahale et al. 2010), (fig.7) (Casarini and Crépieux 2019).

Dans les gonades, la signalisation médiée par la FSH entraîne la transcription de gènes cibles, qui comprennent le LHCGR et d'autres gènes codant pour des récepteurs membranaires, des protéines kinases, des facteurs de croissance, des enzymes régulant la synthèse des stéroïdes, des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, la prolifération, la différenciation, l'apoptose et le rythme circadien (Sarit and Ada 2005, Perlman, Bouquin et al. 2006, Herndon, Law et al. 2016). Malgré la grande diversité des gènes cibles de la FSH, les effets de la stimulation gonadique par la FSH ont été définis comme à la fois prolifératifs et anti-apoptotiques en raison de l'impact positif sur la gamétogenèse (Hillier 2001, Plant and Marshall 2001) et sur la croissance de certaines cellules cancéreuses (Choi, Wong et al. 2007). Néanmoins, les fonctions pro-apoptotiques sont apparues comme une condition liée à la production de stéroïdes médiée par la FSH (Amsterdam, Sasson et al. 2003, Casarini, Reiter et al. 2016).

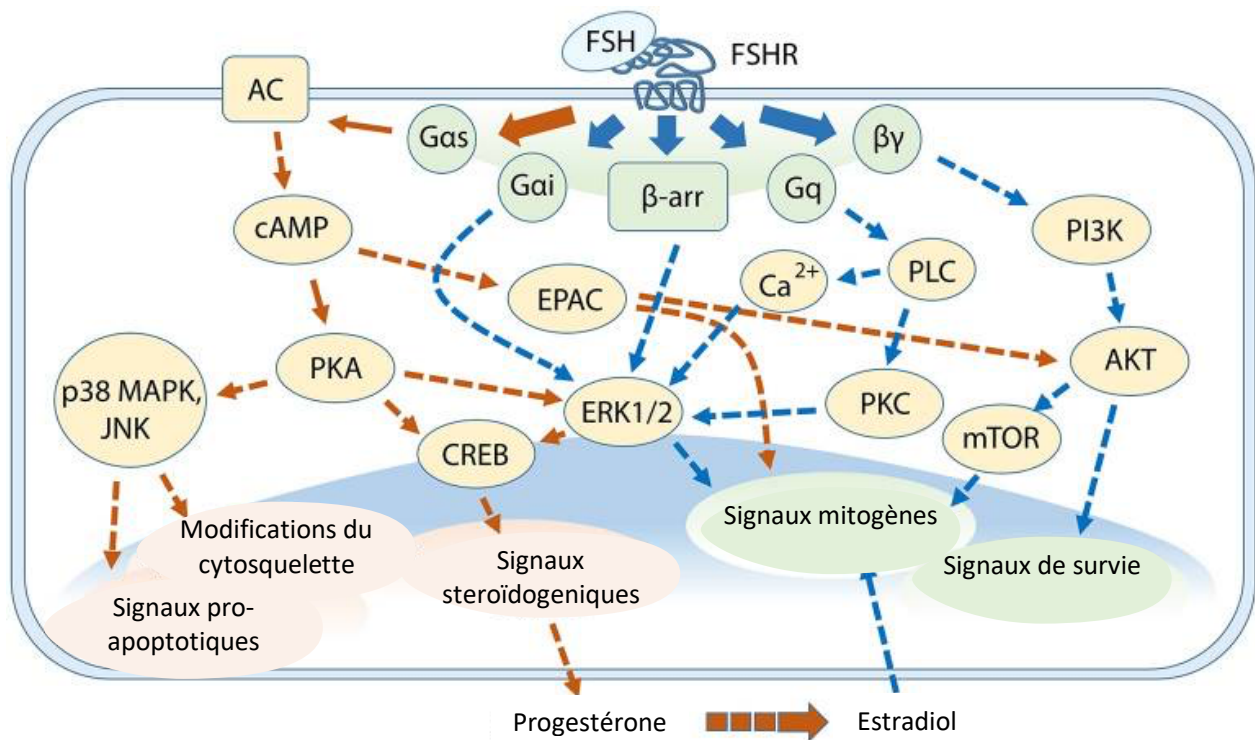


Figure 7. – Interférence entre les signaux stéroïdogeniques, de vie et de mort dépendants de la FSH dans les cellules de la granulosa. Modifiée de (Casarini and Crépieux 2019).

Les sous-unités de la protéine G et les β-arrestines médient l'activation de multiples voies de signalisation modulant différents événements en aval de ERK1/2. La signalisation liée à la protéine Gas/AMPC est représentée par des flèches orange tandis que les cascades de signalisation dépendant d'autres interactions intracellulaires FSHR sont indiquées par des flèches bleues. Les événements stéroïdogeniques sont principalement médiés par la voie AMPc/PKA, qui est liée à la signalisation MAPK14 (p38 MAPK), tandis que MAPK3/1 (ERK1/2) et AKT sont des acteurs clés pour l'activation des signaux mitogènes et de survie. Certaines voies ont été omises.

1.3.1.1.2. L'activation simultanément des voies pro et anti-apoptotiques par la FSH

Dans les cellules stéroïdogéniques, l'apoptose est précédée d'un arrondissement cellulaire, un changement conformationnel dépendant de l'AMPc et de p38MAPK (MAPK14), impliquant la dégradation des filaments d'actine (Amsterdam, Dantes et al. 1994, Schiffer, Keren-Tal et al. 1996) et qui peut être prévenu par un blocage sélectif de la PKA (Maizels, Cottom et al. 1998). PKA et p38MAPK peuvent être activées par la FSH d'une manière dose-dépendante, entraînant des réarrangements cytosquelettiques et des changements de forme (Casarini and Crépieux 2019). Ces données suggèrent que la FSH conserve à la fois le potentiel pro et anti-apoptotique, exercé respectivement via les MAPK14 et MAPK3/1, et cette double action de la FSH offre un point de vue intéressant sur le fonctionnement des gonadotrophines (Casarini and Crépieux 2019). D'une part, l'hormone induit la synthèse d'hormones stéroïdes via la voie AMPc/PKA, comme condition préalable à la croissance et à la production des gamètes (Di Giacomo, Camaioni et al. 2016). Cependant, la cascade de signalisation stéroïdogénique est liée à des signaux pro-apoptotiques se produisant via MAPK14, qui sont activés simultanément et nécessaires pour la régulation de la synthèse des stéroïdes (Yu, Han et al. 2005, Inagaki, Otsuka et al. 2009). Cette diaphonie a été décrite dans la lignée cellulaire surrénalienne de souris Y1, où l'activation de MAPK14 a un impact négatif sur la phosphorylation de CREB et l'activité de StAR, inhibant la synthèse des stéroïdes induite par la FSH (Li, Zhou et al. 2017). D'autre part, les signaux de survie sont transmis par le biais de la signalisation PKA / MAPK3/1, contrebalançant l'effet pro-apoptotique et, dans une certaine mesure, inhibant même la stéroïdogénèse (Amsterdam, Hanoch et al. 2002). Bien que des études supplémentaires doivent être menées pour résoudre complètement cette question, certains indices suggèrent que le mécanisme moléculaire dépendant de la FSH sous-jacent au destin cellulaire peut dépendre de la concentration et de la persistance de l'AMPc aux niveaux intracellulaires (Casarini and Crépieux 2019). En effet, les signaux prolifératifs pourraient être prédominants à des niveaux d'expression de FSHR relativement faibles (Casarini, Reiter et al. 2016), en raison de l'activation préférentielle de la signalisation MAPK3/1 par les β -arrestines (Tranchant, Durand et al. 2011, Casarini, Reiter et al. 2016). Des taux d'AMPc intracellulaires relativement élevés et persistants dus à une déplétion de la β -arrestine ou à une surexpression de FSHR entraînent l'activité de la caspase 3 et l'apoptose (Casarini, Reiter et al. 2016) et ce

mécanisme pourrait contribuer à réguler la sélection des follicules dominants ovariens (Casarini, Santi et al. 2018).

Dans les cellules de granulosa, la surexpression de FSHR est liée à une régulation à la hausse des gènes pro-apoptotiques et à une mort cellulaire accrue, par rapport aux cellules exprimant des taux de FSHR relativement bas (Sasson, Dantes et al. 2003). Ainsi, il est possible que les signaux prolifératifs exercés via la voie MAPK3/1 ne soient pas suffisants pour contrer le stimulus pro-apoptotique au cours de la phase folliculaire basale/pré-antrale, le moment où l'expression de FSHR atteint des niveaux maximaux (Jeppesen, Kristensen et al. 2012). Dans l'ovaire, cette situation doit être dynamique et transitoire, ainsi que la surexpression de FSHR (Jeppesen, Kristensen et al. 2012), spécifique au follicule et dépendant du stade, afin de coordonner la maturation d'un seul follicule atteignant l'ovulation tandis que les autres deviennent atrophiques. Ce mécanisme de régulation peut être juxtaposé à ce qui a été précédemment décrit dans les cellules de Sertoli, qui sont supposées être le correspondant masculin des cellules de la granulosa. Dans les cellules de Sertoli de rat de 5 jours, la voie MAPK3/1 est stimulée par la FSH lors du double couplage de FSHR à la fois aux protéines $G\alpha$ stimulatrices et aux protéines $G\alpha i$ inhibitrices, entraînant l'activation de la cycline D1 et la prolifération cellulaire (Crépieux, Marion et al. 2001). Au fur et à mesure que les cellules progressent tout au long du programme de différenciation, le traitement par la FSH est lié à une inhibition constante de MAPK3/1 et à une diminution de la prolifération cellulaire, tout en stabilisant progressivement PTEN (Dupont, Musnier et al. 2010). Ainsi, la voie de signalisation MAPK3/1 est un régulateur clé des signaux de vie et de mort induits par la FSH (Casarini and Crépieux 2019).

1.3.1.1.3. Les cascades de signalisation de la LH

La liaison de la LH à son récepteur, LHCGR, stimule des cascades de signalisation intracellulaire en activant, entre autres, l'adénylate cyclase causant une augmentation importante d'AMPc qui active la protéine kinase A (PKA) ainsi que les voies MAPK3/1 (ERK1/2) et protéine kinase C (PKC). À leur tour, les kinases PKA, MAPK3/1 et PKC activent des facteurs de transcription dont les plus importants sont CREB, C/EBP α/β , PGR et la famille des facteurs de transcription liée au *Transcription factor subunit AP-1* tel que JUN et *Finkel-Biskis-Jinkins osteosarcoma* (FOS). Les actions subséquentes de ces facteurs de transcription dans les CG et de la thèque induisent ou stimulent l'expression spécifique de plusieurs gènes qui contribuent à la

maturation du COC, de la réaction protéolytique associée au remodelage de la paroi folliculaire et de la lutéinisation des CG et de la thèque interne pour former le CL (Fig. 8) (Richards and Pangas 2010, Richards and Ascoli 2018, Robker, Hennebold et al. 2018).

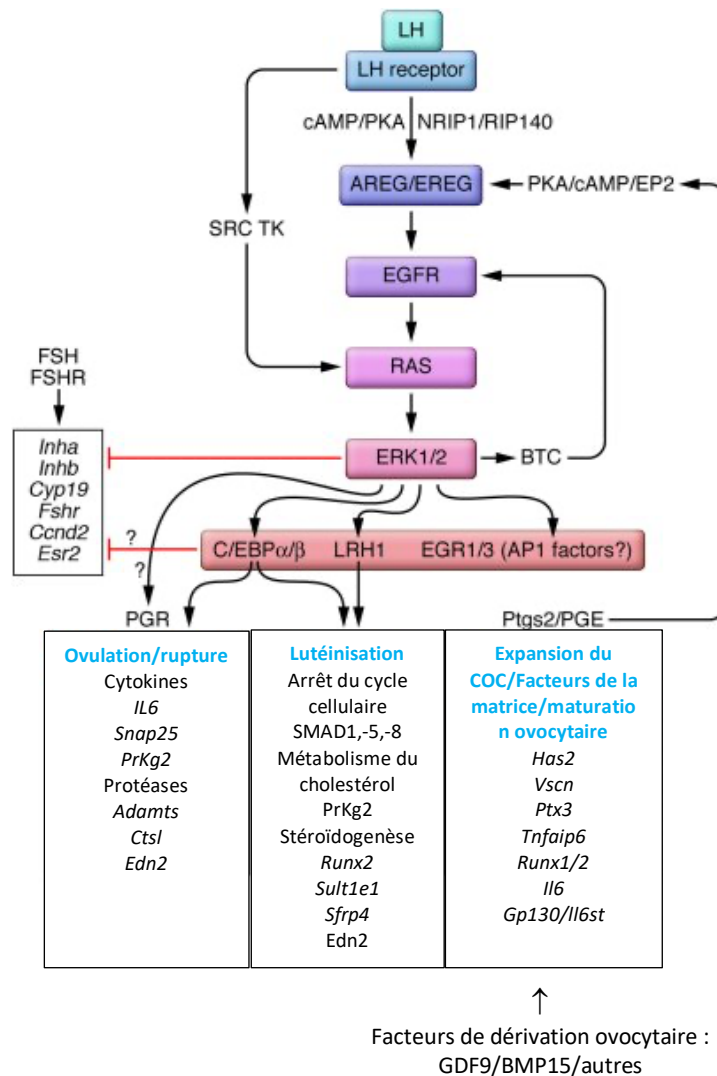


Figure 8. – La LH induit l'ovulation, l'expansion des COC, la maturation des ovocytes et la lutéinisation dans les follicules pré-ovulatoires. Modifiée de (Richards and Pangas 2010). Ces événements sont médiés par l'activation de la voie PKA et NRIP1 par la LH, qui induisent l'expression des facteurs de type EGF (AREG, EREG). AREG et/ou EREG activent à leur tour la cascade de signalisation EGFR, y compris RAS et ERK1/2. Cette hypothèse est basée sur les observations selon lesquelles lorsque ERK1 et ERK2 sont perturbés dans les cellules de la granulosa, des changements globaux se produisent dans les modèles d'expression génique qui contrôlent l'ovulation, l'expansion des COC, la reprise de la

méiose et la lutéinisation. De plus, l'activation de ERK1/2 est essentielle pour désactiver le programme d'expression génique régulé par la FSH qui contrôle les gènes essentiels à la croissance et à la différenciation des follicules pré-ovulatoires. C/EBP α et C/EBP β , NR5A2 (également connu sous le nom de LRH1), et peut-être PGR semblent être parmi les facteurs de transcription clés qui sont activés par la phosphorylation d'ERK1/2 et affectent l'ovulation et la lutéinisation. D'autres facteurs de transcription cibles d'ERK1/2 incluent les membres de la famille AP1 et EGR1/3, dont les fonctions spécifiques dans l'ovulation et la lutéinisation restent à définir. De plus, les facteurs dérivés des ovocytes tels que GDF9 et BMP15 affectent les fonctions des cellules du cumulus et de la granulosa d'une manière dépendante du stade. TK, tyrosine kinase.

I.3.1.2. La régulation de la croissance folliculaire par les gonadotrophines au cours du cycle œstral

Les vaches sont des animaux poly-œstraux et manifestent un comportement œstral tous les 21 jours environ. Le cycle œstral bovin est composé d'une phase folliculaire (pro-œstrus et œstrus) et d'une phase lutéale (met-œstrus et di-œstrus). Le cycle œstral est contrôlé par les hormones de l'hypothalamus (hormone libérant les gonadotrophines : GnRH), de l'hypophyse antérieure (FSH et LH), et des ovaires (progestérone, œstradiol et inhibines) et l'utérus (PGFF $_{2\alpha}$). Ces hormones fonctionnent grâce à un système de rétroaction positive et négative pour régir le cycle œstral bovin (Roche 1996). Le contrôle par la GnRH du cycle œstral est médié par ses actions sur l'hypophyse antérieure qui régule la sécrétion des gonadotrophines LH et FSH (Schally, Arimura et al. 1971). La FSH n'est stockée dans des granules sécrétoires de l'hypophyse que pendant de courtes périodes, tandis que la LH est stockée pendant de plus longues périodes au cours du cycle œstral (Farnworth 1995).

Pendant la phase folliculaire du cycle œstral, il existe un environnement hormonal de progestérone basale en raison de la régression du corps jaune (CL). L'augmentation des concentrations d'œstradiol (E $_2$), dérivée de la croissance rapide du follicule dominant pré-ovulatoire, concomitante à la diminution des concentrations circulantes de progestérone, induit une augmentation de la GnRH et permet d'afficher un œstrus comportemental pendant lequel les génisses/vaches sont sexuellement réceptives et se tiendront pour être montées (Frandsen, Wilke et al. 2009). Cette poussée pré-ovulatoire de GnRH induit une poussée coïncidente de LH et de FSH (Sunderland, Crowe et al. 1994). Ce n'est que lorsque les concentrations sériques de

progestérone sont basales et que la fréquence des impulsions de LH augmente à une par heure pendant 2 à 3 jours que le follicule ovule (Roche 1996). L'ovulation se produit 10 à 14 h après l'œstrus et est suivie de la phase lutéale du cycle œstral. Le début de la phase lutéale est également connu sous le nom de mét-œstrus et dure généralement 3 à 4 jours. Elle se caractérise par la formation du CL à partir du follicule ovulé effondré (*corpus haemorrhagicum*). Après l'ovulation, les concentrations de progestérone commencent à augmenter en raison de la formation du CL dans lequel les cellules de la granulosa et de la thèque du follicule ovulé sont lutéinisées et produisent de la progestérone prête pour l'établissement et le maintien de la gestation et/ou la reprise du cycle œstral (Niswender 1981). Pendant la phase de di-œstrus, les concentrations de progestérone restent élevées et des vagues récurrentes de développement folliculaire continuent d'être déclenchées par la libération de FSH par l'hypophyse antérieure. Cependant, ces follicules dominants qui se développent pendant la phase lutéale du cycle œstral n'ovulent pas, en raison d'une fréquence d'impulsion de LH inadéquate (Crowe and Mullen 2013).

I.3.1.3. La régulation de la maturation finale du follicule pré-ovulatoire et de l'ovulation par les gonadotrophines

La croissance, le développement et la maturation des follicules ovariens sont des processus fondamentaux pour une grande efficacité de reproduction chez les animaux de la ferme. Un nombre fixe de follicules primordiaux est établi au cours du développement fœtal, la croissance des follicules ovariens s'étalant sur une période de 3 à 4 mois et classée en stades indépendants des gonadotrophines et dépendants des gonadotrophines (Webb, Garnsworthy et al. 2004). La croissance folliculaire dépendante de la gonadotrophine chez l'espèce bovine se produit par vagues de 2 à 3 vagues par cycle œstral (Fig.9) (Rajakoski 1960, Savio, Keenan et al. 1988, Crowe and Mullen 2013).

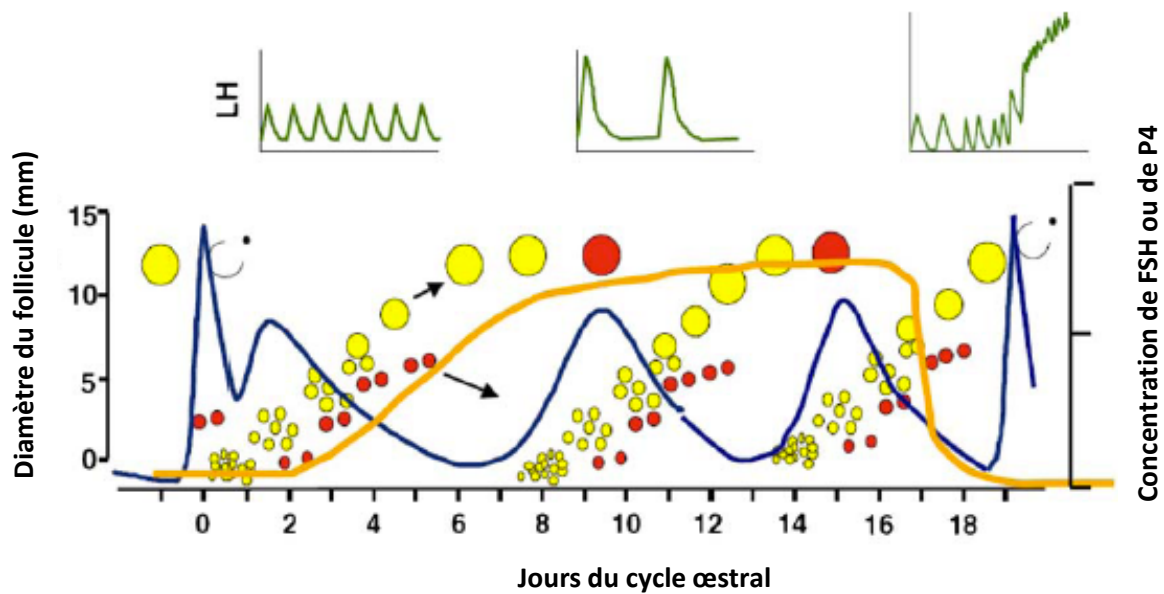


Figure 9. – Représentation schématique de sécrétions hormonales et de croissance des follicules ovariens au cours du cycle œstral chez l'espèce bovine. Modifiée de (Crowe and Mullen 2013).

Représentation schématique de la sécrétion de l'hormone folliculo-stimulante (FSH ; ligne bleue), de l'hormone lutéinisante (LH ; lignes vertes) et de la progestérone (P₄ ; ligne orange) ; et le modèle de croissance des follicules ovariens pendant le cycle œstral chez l'espèce bovine. Chaque vague de croissance folliculaire est précédée d'une augmentation transitoire des concentrations de FSH. Les follicules sains en croissance sont ombrés en jaune, les follicules atrophiques sont ombrés en rouge. Une augmentation des concentrations de LH et de FSH se produit au début de l'œstrus et induit l'ovulation. Le schéma de sécrétion des pouls de LH au cours d'une fenêtre de 8 h au début de la phase lutéale (fréquence plus élevée, amplitude moindre), de la phase mi-lutéale (fréquence moindre, amplitude moindre) et de la phase folliculaire (fréquence élevée, évoluant jusqu'au pic) est indiqué dans les encarts du panneau supérieur. Tiré de Forde N. et al, 2011 (Forde, Beltman et al. 2011).

Chaque vague de croissance implique l'émergence, la sélection et la dominance suivies d'une atresie ou d'une ovulation du follicule dominant. Comme mentionné ci-dessus, la FSH et la LH jouent un rôle important dans le développement du follicule ovarien. Les follicules sont impliqués dans les mécanismes de rétroaction positive et négative de l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique (HPG) par l'intermédiaire de l'œstradiol et des inhibines, suggérant que ces

hormones (œstradiol et inhibines) ont un rôle déterminant dans la régulation du cycle œstral des vaches (Crowe and Mullen 2013).

Le début du développement folliculaire dépendant des gonadotrophines se caractérise par l'émergence d'une cohorte folliculaire composée généralement de 5 à 20 follicules entre 3 à 5 mm et est corrélée à une augmentation transitoire des concentrations de FSH (Adams, Matteri et al. 1992, Sunderland, Crowe et al. 1994). Cela marque le début de la dépendance de la croissance folliculaire à la FSH (Ginther, Bergfelt et al. 2002) avec des récepteurs FSH localisés dans les cellules de la granulosa des follicules au jour 3 de la vague folliculaire (Camp, Rahal et al. 1991, Evans and Fortune 1997). Cela permet à la FSH d'exécuter les effets de signalisation requis en aval, notamment en favorisant la croissance et la prolifération cellulaires (Richards 1994, Richards, Russell et al. 1998). Ces augmentations transitoires des concentrations de FSH entraînent également une augmentation de l'activité enzymatique de l'aromatase (P450arom; CYP19A1), dans les cellules de la granulosa des follicules ovariens, qui convertit les androgènes en œstrogènes (Hillier 1994). Quand le follicule dominant est sélectionné dans la cohorte des follicules, son diamètre augmente (Gougeon and Lefèvre 1983). Cette augmentation de taille entraîne une augmentation des concentrations d'œstradiol et d'inhibine dans le liquide folliculaire (Hillier 1994). La dominance se produit lorsque le follicule sélectionné atteint 9 mm de diamètre, et il supprime activement la FSH, empêchant ainsi l'émergence d'autres vagues folliculaires jusqu'à ce que le follicule dominant subisse l'atrésie ou ovule. L'augmentation des concentrations d'œstradiol de concert avec l'inhibine sont les principaux signaux endocriniens qui suppriment les concentrations de FSH de l'hypophyse antérieure via une rétroaction négative réduisant la FSH aux concentrations basales (Adams, Matteri et al. 1992, Hillier 1994, Sunderland, Crowe et al. 1994).

Le follicule dominant sélectionné devient de plus en plus sensible à la LH et poursuit sa croissance face à la diminution des concentrations de FSH (Hillier 1994). Quel que soit le stade du cycle œstral au cours duquel les follicules se développent, le passage de la FSH à la dépendance à la LH se propage par la présence de récepteurs de la LH (LHCGR) sur les cellules de la granulosa (Adams, Matteri et al. 1992, Sunderland, Crowe et al. 1994, Xu, Garverick et al. 1995, Kulick, Kot et al. 1999). Les LHCGR sont localisés dans les cellules de la thèque et de la granulosa des follicules sains, à différents stades de développement folliculaire (Camp, Rahal et al. 1991). De plus, il a été montré que des augmentations transitoires des concentrations de LH circulantes produisent au moment de la sélection du follicule ou aux alentours du moment de la sélection

(Ginther, Beg et al. 2003), permettant au follicule dominant de continuer la production d'E₂ et de croître malgré la baisse des concentrations de FSH (Ireland and Roche 1983).

Au cours de la phase lutéale précoce, les impulsions de la LH sont plus faibles d'amplitude et de fréquence insuffisantes pour la maturation finale et l'ovulation subséquente du follicule (Rahe, Owens et al. 1980). Ainsi, les follicules dominants produits pendant la phase lutéale du cycle œstral subissent une atrophie, la production d'E₂ et d'inhibine diminue et supprime ce bloc de rétroaction négative vers l'hypothalamus/hypophyse; la sécrétion de FSH peut alors augmenter et une nouvelle vague folliculaire émerge. La production de fortes concentrations d'œstradiol est une caractéristique déterminante du follicule dominant (Ireland and Roche 1982, Ireland and Roche 1983), avant même les différences visibles de diamètre folliculaire; le follicule dominant putatif a de plus grandes concentrations d'œstradiol dans le liquide folliculaire par rapport aux autres follicules de sa cohorte (Adams, Matteri et al. 1992, Fortune 1994, Sunderland, Crowe et al. 1994, Mihm, Austin et al. 2000). La synthèse de l'œstradiol dépend de la production d'androgènes dans les cellules de la thèque et de l'aromatase ultérieure de ces androgènes en œstrogènes dans les cellules de la granulosa connue sous le nom de modèle à deux cellules/deux gonadotrophines (Fortune and Quirk 1988). La production d'œstradiol à partir de follicules en croissance dépend d'une fréquence d'impulsion de LH suffisante (Crowe, Enright et al. 2001, Crowe, Kelly et al. 2001). La liaison de la LH à ses récepteurs dans les cellules de la thèque entraîne la conversion du cholestérol en testostérone grâce à une série de réactions catalytiques (Dorrington, Moon et al. 1975). La testostérone, une fois produite dans les cellules de la thèque, se diffuse dans les cellules de la granulosa où elle est convertie en œstrogènes par l'enzyme aromatasase (Dorrington, Moon et al. 1975). L'œstradiol a non seulement un effet local sur le développement des follicules, mais il a également un rôle systémique via un mécanisme de rétroaction positive vers l'hypothalamus et l'hypophyse.

Pendant la phase folliculaire du cycle œstral, les concentrations de progestérone sont basales alors que les follicules produisent de plus en plus d'œstradiol. La grande quantité d'œstradiol produite par le follicule dominant pré-ovulatoire induit une poussée de GnRH à partir de l'hypothalamus provoquant le pic de LH avec une amplitude et une fréquence suffisantes pour stimuler la maturation finale et l'ovulation du follicule (Adams, Matteri et al. 1992, Sunderland, Crowe et al. 1994). L'augmentation des concentrations d'œstradiol induit également l'expression d'un comportement œstral, nécessaire pour un accouplement réussi (Ireland 1987).

I.3.1.4. Autres cascades de signalisation impliquées dans la folliculogénèse

1.3.1.4.1. Voie de signalisation WNT

La signalisation WNT est un système conservé au cours de l'évolution pour la communication cellule-cellule, qui est largement classé en fonction canonique [β -caténine (CTNNB1), également appelée signalisation WNT / β -caténine] et voies non canoniques (indépendantes de CTNNB1) : qui sont les voies de signalisation de la polarité cellulaire planaire (PCP) et de WNT/Ca²⁺ (Boerboom, Paquet et al. 2005, Lien and Fuchs 2014, Martin-Orozco, Sanchez-Fernandez et al. 2019, Sharma, Mir et al. 2021). Dix-neuf ligands WNT ont été identifiés et contribuent à divers processus tels que le développement, le contrôle des cellules souches et les maladies chez les animaux et l'être humain (Nusse and Clevers 2017, Wiese, Nusse et al. 2018). Alors que la signalisation canonique WNT médiée par WNT4 s'est avérée importante pour la détermination du sexe au cours du développement embryonnaire (Vainio, Heikkilä et al. 1999), la fonction de la signalisation WNT pendant la folliculogénèse postnatale reste incertaine (Habara, Logan et al. 2021). La signalisation WNT joue un rôle crucial dans plusieurs aspects de la fonction ovarienne (Boyer, Goff et al. 2010). Les souris femelles knock-out *Wnt4* spécifiques aux cellules de granulosa se sont avérées avoir une fertilité légèrement réduite ; il a été révélé que WNT4 est nécessaire au développement normal du follicule antral et peut agir en régulant les fonctions des cellules de la granulosa, y compris la stéroïdogénèse (Boyer, Lapointe et al. 2010). Les membres de la signalisation *Wnt* sont connus pour réguler la réponse du follicule ovarien aux gonadotrophines (Boyer, Goff et al. 2010, Lapointe and Boerboom 2011). Chez la vache, Il a été rapporté que la sélection folliculaire dominante était liée à la signalisation *Wnt* sous le contrôle de la FSH (Gupta, Folger et al. 2014). Cependant, WNT5A contrôle négativement la stéroïdogénèse des cellules de granulosa bovines stimulées par la FSH en supprimant l'activité de signalisation WNT canonique et en induisant la voie non canonique MAPK8/JUN (Abedini, Zamberlam et al. 2015). Plus récemment, il a été démontré que la R-spondine 2 dérivée des ovocytes (RSPO2) contribuait à l'activation de la signalisation WNT dans les cellules de granulosa (De Cian, Gregoire et al. 2020). RSPO2 est un agoniste WNT qui est sécrété de manière extracellulaire et améliore la signalisation WNT canonique (Kazanskaya, Glinka et al. 2004). La croissance des follicules s'est avérée altérée dans les ovaires avec une perte de la fonction RSPO2 dans les expériences de transplantation (De Cian, Gregoire et al. 2020). La signalisation WNT est impliquée avec d'autres facteurs importants tels que GDF9 (facteur de différenciation de croissance 9) (Dong, Albertini et

al. 1996) et BMP15 (protéine morphogénétique osseuse 15) (Dube, Wang et al. 1998) dans l'activation folliculaire primordiale. La signalisation canonique WNT joue un rôle permissif dans la transition des pré-cellules de granulosa vers les cellules de granulosa, qui est une étape essentielle pour soutenir la croissance des ovocytes (Habara, Logan et al. 2021). Plus récemment, une étude soutient que l'activation de la voie de signalisation WNT dans les cellules de granulosa (Fig.10) conduit à une augmentation de l'expression de l'ARNm de *CYP19A1* en réponse à un traitement du cuivre et du sélénium (Tej, Pulukuri et al. 2021).

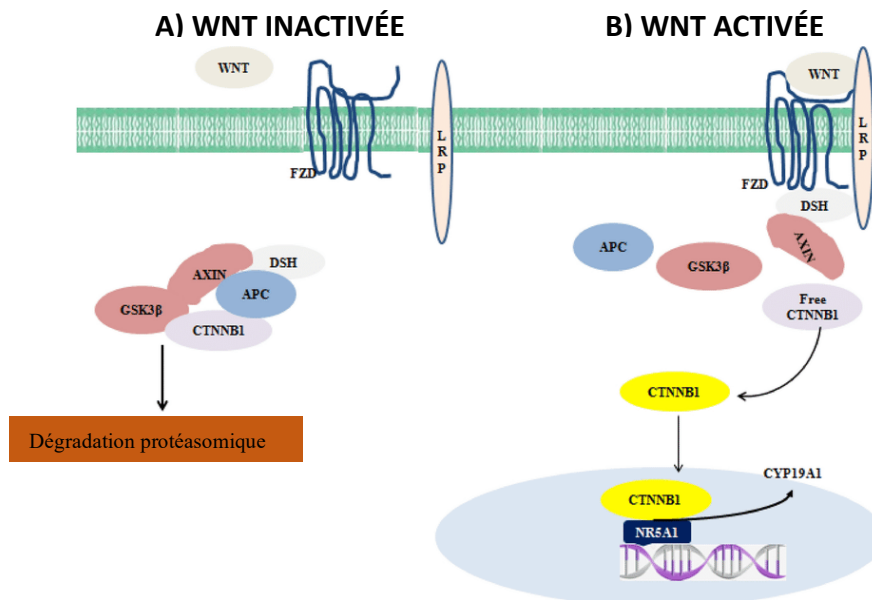


Figure 10. – Représentation schématique de la signalisation WNT dans les cellules de la granulosa ovarienne. Modifiée de (Tej, Pulukuri et al. 2021).

A) Signalisation WNT inactive : le complexe de destruction GSK3β/AXIN/APC phosphoryle CTNNB1 sur des sites spécifiques et le cible pour l'ubiquitination et la dégradation protéosomale. B) Signalisation WNT active : les WNT se lient à leur complexe corécepteur FZD/LRP correspondant qui recrute le DSH et le complexe de destruction au récepteur, laissant ainsi CTNNB1 libre. CTNNB1 se transloque vers le noyau et se lie au facteur de transcription NR5A1 pour favoriser la transcription de CYP19A1. WNT winglesstype mouse mammary tumor integration family of glucoproteins, LRP low density lipoprotein receptor-related protein, FZD Frizzled, DSH dishevelled, APC adenomatous polyposis coli, GSK3β glycogen synthase kinase 3b, CTNNB1 b-catenin, FOXO1a forkhead box O1, NR5A1 nuclear receptor 5A1, CYP19A1 cytochrome P450, family 19, subfamily a, polypeptide 1

1.3.1.4.2. Voie de signalisation Hippo

Les rôles de la voie de signalisation Hippo sont bien établis dans la détermination du destin cellulaire, la différenciation et la prolifération au cours du développement embryonnaire et postnatal, ainsi que dans l'homéostasie tissulaire (Gomez, Gomez et al. 2014, Piccolo, Dupont et al. 2014). La voie canonique Hippo consiste en une cascade de kinases qui sert finalement à réguler les co-régulateurs transcriptionnels fonctionnellement redondants de YAP et WW-containing transcription regulator 1 (WWTR1, également connu sous le nom de TAZ). En réponse à des signaux extracellulaires tels que l'établissement de contacts cellule-cellule, les protéines kinases mammifères STE20-like 1 et -2 (MST1, MST2) sont activées et phosphorylent les grandes kinases homologues suppresseurs de tumeurs 1 et -2 (LATS1, LATS2), qui à leur tour phosphorylent YAP et TAZ. Lors de la phosphorylation, YAP et TAZ sont soit retenues dans le cytoplasme via leur association avec les protéines 14-3-3, soit dégradées par la machinerie protéosomale cellulaire. Lorsque la cascade de signalisation Hippo est inactive, YAP et TAZ non phosphorylés s'accumulent dans le noyau et forment des complexes avec des facteurs de transcription pour réguler la transcription des gènes impliqués dans la croissance, la survie et la prolifération cellulaire (Gomez, Gomez et al. 2014, Piccolo, Dupont et al. 2014, Levasseur, Paquet et al. 2017). Parmi ces gènes, les plus décrits sont CYR61, CTGF, ANKRD1, REG, AXL et MYC (Zarka, Haÿ et al. 2022).

Plusieurs données dans la littérature indiquent l'implication de la voie de signalisation Hippo dans la physiologie ovarienne. Chez l'espèce bovine, il a été démontré que le traitement avec de la vertéporfine et des siRNA ciblant YAP1 ou TAZ a révélé un rôle critique pour ces co-activateurs transcriptionnels dans la prolifération des cellules de granulosa (Plewes, Hou et al. 2019). En outre, l'inactivation de YAP1 dans les cellules de granulosa a inhibé la biosynthèse d'œstradiol induite par l'hormone folliculo-stimulante (FSH) (Plewes, Hou et al. 2019). Les données indiquent que les co-activateurs de transcription de la voie Hippo YAP/TAZ jouent un rôle important dans la prolifération des cellules de granulosa et la synthèse d'œstradiol, deux processus nécessaires au maintien du développement normal des follicules (Plewes, Hou et al. 2019). Chez la souris, l'hormone lutéinisante (LH) induit la phosphorylation de LATS1 et YAP et que cette dernière

s'effectue par l'action de la protéine kinase A (PKA). De plus, en absence de Yap/Taz, la LH est incapable d'induire la transcription de ses gènes cibles (*Areg*, *Egfr*) et que ceci serait dû, au moins en partie, à la perte de l'expression du gène codant pour le récepteur à la LH (*Lhcgr*). L'inhibition pharmacologique de l'activité de YAP a perturbé le développement du follicule ovarien de souris *in vitro* et *in vivo* (Lv, He et al. 2019). L'inactivation de Yap1 induite par le promoteur *Foxl2* dans les cellules de granulosa ovariennes a entraîné une augmentation de l'apoptose des cellules, une diminution du nombre de corps jaunes, une réduction de la taille des ovaires et une sous-fertilité chez les souris transgéniques (Lv, He et al. 2019). Cependant, l'inactivation de Yap1 induite par le promoteur *Cyp19a1* dans les cellules différenciées de granulosa des follicules pré-ovulatoires et les cellules lutéales des corps jaunes n'a eu aucun effet sur la morphologie et la fertilité ovariennes (Lv, He et al. 2019).

Les composants Hippo régulent les médiateurs critiques de la fonction des cellules de la granulosa. FOXL2 est phosphorylé par LATS1 et que cette phosphorylation améliore la répression transcriptionnelle du gène *StAR*, un gène marqueur de différenciation des cellules de la granulosa (Pisarska, Kuo et al. 2010). *Areg*, un autre gène cible direct de la voie Hippo (identifié dans les cellules épithéliales mammaires) est responsable de l'expansion du cumulus et la maturation des ovocytes (Zhang, Ji et al. 2009). L'inactivation conditionnelle du gène cible direct de la voie Hippo (*Ctgf*), a révélé qu'il est nécessaire au développement normal des follicules, à l'ovulation et à la lutéolyse (Nagashima, Kim et al. 2011).

Plusieurs travaux ont mis en évidence une intégration profonde de YAP/TAZ dans la voie Wnt qui explique mécaniquement les chevauchements étendus entre la biologie Wnt et YAP/TAZ (Azzolin, Panciera et al. 2014, Lien and Fuchs 2014, Martin-Orozco, Sanchez-Fernandez et al. 2019, Sharma, Mir et al. 2021). Cela est dû au fait que les protéines effectrices de ces voies, β -caténine et YAP/TAZ, interagissent directement entre elles et leur stabilité est dépendante du complexe de destruction Wnt (Figure 4) (Azzolin, Panciera et al. 2014).

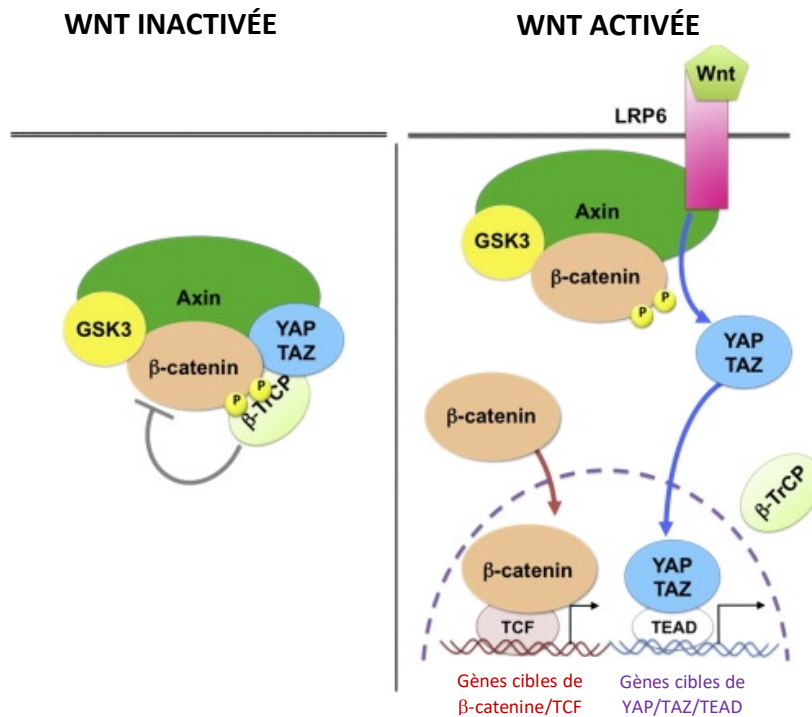


Figure 11. – Modèle l'incorporation de YAP/TAZ dans le complexe de destruction de la β -caténine. Modifié de (Azzolin, Panciera et al. 2014).

YAP/TAZ sont séquestrés dans le cytoplasme dans le complexe de destruction de la β -caténine. YAP/TAZ cytoplasmique s'associent à l'Axine et sont nécessaires au recrutement de β -TrCP dans le complexe. Ainsi, dans les cellules "Wnt OFF", YAP/TAZ sont critiques pour la dégradation de la β -caténine, et l'épuisement de YAP/TAZ conduit à l'activation des réponses transcriptionnelles β -caténine/TCF.

I.3.2. Modulation du cycle œstral par les facteurs de croissance

Les facteurs produits par l'ovaire jouent un rôle dans la régulation du cycle œstral, soit indirectement en modifiant la synthèse de l'œstradiol, soit via des mécanismes de rétroaction négative directe vers l'hypothalamus et l'hypophyse antérieure.

La superfamille du facteur de croissance analogue à l'insuline (IGF) composée de ses deux ligands IGF-I et IGF-II (Rinderknecht and Humbel 1978, Spicer and Echterkamp 1995), de deux récepteurs IGFR-I et IGFR-II (Hammond, Mondschein et al. 1991), et de nombreuses protéines et protéases de liaison (IGFBP 1-6 et protéine plasmatique A associée à la grossesse: PAPP-A) sont responsables de la biodisponibilité de l'IGF-I dans le follicule ovarien. La biodisponibilité de l'IGF-

I contribue à la croissance, à la prolifération et à la capacité stéroïdogénique du futur follicule dominant (Mihm, Austin et al. 2000, Rivera and Fortune 2003, Canty, Boland et al. 2006), affectant indirectement le mécanisme de rétroaction négative induit par l'œstradiol vers l'hypothalamus et l'hypophyse. Ceci, en plus de l'acquisition précoce des récepteurs à la LH par la couche cellulaire de la granulosa du follicule en cours de sélection, est considéré comme le principal mécanisme facilitant le processus de sélection du follicule (Lucy 2007).

La superfamille du *Transforming Growth Factor beta* (TGF β) contient plus de 30 protéines structurellement apparentées, y compris des ligands (TGF, AMH, inhibines, activines et *Bone morphogenetic protein* : BMP), des récepteurs (TGFRI et II, kinases de type récepteur d'activine ; *Anaplastic lymphoma kinase* : ALK), des récepteurs accessoires (TGF-RIII) et des molécules de signalisation en aval (*Small mothers against decapentaplegic* : SMADS). Les membres du ligand de cette superfamille ont d'abord été identifiés dans le liquide folliculaire par leur modulation de la sécrétion de la FSH (Knight and Glister 2006). L'activine peut augmenter la production d'œstradiol dans le liquide folliculaire (Knight and Glister 2003) tandis que la follistatine entrave les effets stéroïdogéniques positifs des activines, qui peuvent tous deux (activine et follistatine) modifier le mécanisme de rétroaction de l'œstradiol sur l'hypothalamus et l'hypophyse (Phillips and de Kretser 1998). Les inhibiteurs détectés dans les cellules de granulosa des animaux de la ferme jouent un rôle dans la suppression de la FSH sécrétée par l'hypophyse antérieure et régulent également le cycle œstral (Findlay, Drummond et al. 2002).

I.3.3. Modulation du cycle œstral en période post-partum

La santé du follicule est déterminée par une série de facteurs endocrines, paracrines et autocrines. Bien que les hormones gonadotrophines pituitaires LH et FSH soient des éléments clés du développement folliculaire, leurs actions sont influencées par divers facteurs de croissance et hormones. Plusieurs travaux ont démontré que les cytokines ont des effets fonctionnels sur les tissus reproducteurs (Bukovsky and Presl 1979, Espey 1980, Gérard, Caillaud et al. 2004, Smolikova, Mlynarcikova et al. 2012) avec un rôle potentiel dans les processus du développement folliculaire, de l'ovulation et de la fonction du corps jaune (Liu, Youngquist et al. 2009, Ndiaye, Poole et al. 2012). Une caractéristique commune à la plupart des tissus et cellules reproductifs, y compris les cellules de granulosa, est la présence de cytokines impliquées dans la régulation de la fonction de reproduction (Pangas 2007, Orsi 2008, Orsi and Tribe 2008). Plus précisément, le

liquide folliculaire ovarien contient diverses protéines, telles que des cytokines et d'autres peptides, en plus des stéroïdes (Field, Dasgupta et al. 2014). Les cytokines sont de petites protéines de signalisation solubles, mieux connues pour leurs propriétés immunorégulatrices, mais également pour contrôler la prolifération, la différenciation et la fonction cellulaires (Orsi 2008, Orsi and Tribe 2008). Les cytokines comprennent les interleukines (ILs), les *colony-stimulating factors* (CSF), les *Tumor necrosis factors* (TNF), les *Transforming Growth Factors* (TGF) et d'autres peptides produits par une myriade de types de cellules. Les ILs sont principalement synthétisés par les lymphocytes, les monocytes, les macrophages et les cellules endothéliales, mais également par les cellules de granulosa du follicule ovarien (Pangas 2007, Field, Dasgupta et al. 2014, Salmassi, Fattahi et al. 2017, Stassi, Baravalle et al. 2018). Certaines ILs créent un environnement immuno-permissif et embryotrope qui soutient plusieurs aspects de la reproduction (Pangas 2007, Orsi and Tribe 2008).

Cependant, l'implication et le mode d'action des ILs dans le développement folliculaire et la fertilité au cours de la période post-partum n'a pas été entièrement élucidée. Stassi et collègues ont montré qu'une altération de l'expression des cytokines, notamment IL1, IL4, IL6, IL8 et TNF α pouvait contribuer à la persistance folliculaire et à l'échec de l'ovulation chez les vaches présentant des kystes folliculaires (Stassi, Baravalle et al. 2017, Stassi, Baravalle et al. 2018). Dans une autre étude, il a été montré que les cytokines pro-inflammatoires TNF α et IL6 inhibent la production d'androgènes et régulent négativement l'expression de marqueurs pour les cellules de la thèque interne (Samir, Glister et al. 2017).

Des études ont démontré un lien entre les membres de la famille des protéines Tribbles et certaines ILs, par exemple l'importance de l'axe de signalisation TRIB2-MAPK pour l'expression de l'IL6 (Jiang, Wei et al. 2020). Il a été aussi rapporté que TRIB2 agirait comme une molécule pro-apoptotique qui induit l'apoptose des cellules principalement d'origine hématopoïétique et son expression serait induite en absence de IL2 dans les lymphocytes T (Lin, Lee et al. 2007). Les protéines TRIB seraient donc impliquées dans la modulation des principales voies de signalisation inflammatoires incluant les voies MAPK mais aussi la voie PI3K (Johnston, Basatvat et al. 2015).

Le pic de LH termine la croissance folliculaire initiée par la FSH et initie la cascade de gènes impliqués dans l'ovulation et la lutéinisation. Ainsi, l'expression de plusieurs gènes est induite ou augmentée suite au pic de LH alors que l'expression d'autres gènes est inhibée ou régulée à la

baisse. Parmi les gènes induits dans les cellules de la granulosa figurent EREG, AREG et BTC (Park, Su et al. 2004) qui lient leur récepteur situé sur les cellules de granulosa et induisent la transcription d'autres gènes comme Has2, PTGS2 et TNFAIP6 (Shimada, Hernandez-Gonzalez et al. 2006) essentiels pour l'expansion du cumulus. Une étude réalisée dans notre laboratoire a rapporté des gènes dont l'expression était inhibée ou réduite dans les CG bovines récoltées de follicules ovulatoires suite au pic de LH ou l'injection d'hCG (Ndiaye, Fayad et al. 2005). Parmi ces gènes, tribbles pseudokinase-2 (TRIB2) a été identifié en tant que gène réprimé par la LH/hCG pour la première fois toutes espèces confondues. Toutefois la fonction de TRIB2 dans les CG était jusqu'à maintenant inconnue.

I.4. Les molécules tribbles

I.4.1. Membres de la famille tribbles

La famille des protéines tribbles (TRIB) est composée de TRIB1, TRIB2 et TRIB3 qui font partie de la superfamille des protéines sérine/thréonine kinases. Le gène *tribbles* a été identifié pour la première fois chez la drosophile comme un régulateur du cycle cellulaire au cours du développement grâce à sa capacité à promouvoir la dégradation protéasomique de Slbo et de String, orthologues, respectivement, de *CCAAT-enhancer-binding proteins (C/EBP)* et de *Cell division cycle 25 (CDC25)* chez les mammifères (Grosshans and Wieschaus 2000). Les *Tribbles* des mammifères présentent des similarités à la protéine « Tribbles » initialement caractérisée chez la drosophile (Mata, Curado et al. 2000, Seher and Leptin 2000). Les gènes *Tribbles* sont bien conservés dans toute la lignée métazoaire (Dobens Jr and Bouyain 2012). Parmi les protéines Tribbles humaines, TRIB1 et TRIB2 partagent 71% d'homologie, TRIB1 et TRIB3, 53%, et TRIB2 et TRIB3 partagent 54% d'homologie (Yokoyama and Nakamura 2011). Les Tribbles exercent de multiples fonctions et leur expression dépend des tissus (Yokoyama and Nakamura 2011, Lohan and Keeshan 2013, Johnston, Basatvat et al. 2015, Nakamura 2015). Les pseudokinases TRIB1, TRIB2 et TRIB3 sont des médiateurs de signalisation à multiples facettes contrôlant ainsi des processus biologiques fondamentaux, y compris la prolifération et la survie des cellules, dans des conditions physiologiques et pathologiques (Basatvat, Carter et al. 2015, Eyers, Keeshan et al. 2017).

Les membres de la famille TRIB sont des pseudokinases sérine/thréonine. Ils fonctionnent comme d'importants médiateurs de signalisation et des sous-unités d'échafaudage par la liaison et

la modulation de plusieurs molécules de signalisation, y compris les kinases, les phosphatases, les facteurs de transcription et les composants du système ubiquitine-protéasome (Wang, Zhang et al. 2013). Fonctionnellement, les pseudokinases TRIB partagent : 1) un domaine PEST, dans leurs régions N-terminales, qui médie la dégradation des protéines ; 2) un domaine Trib qui est homologue aux protéines sérine/thréonine kinases mais n'a pas de fonction catalytique ; 3) un site *constitutive photomorphogenesis 1* (COP1) permettant aux protéines clés d'être ciblées vers le protéasome pour la dégradation et enfin 4) un site de liaison MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)/ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) Kinase 1 (MEK1) qui module l'activité MAPK (Fig.10) (Hua, Mu et al. 2011, Dobens Jr. and Bouyain 2012, Eysers, Keeshan et al. 2017, Richmond and Keeshan 2020). Dans leur rôle de médiateurs de signalisation et de protéines d'échafaudage, les TRIB entraînent des changements dans la stabilité et l'activité des protéines, ce qui a un impact sur divers processus cellulaires tels que la prolifération, la différenciation, le cycle cellulaire et la mort cellulaire.

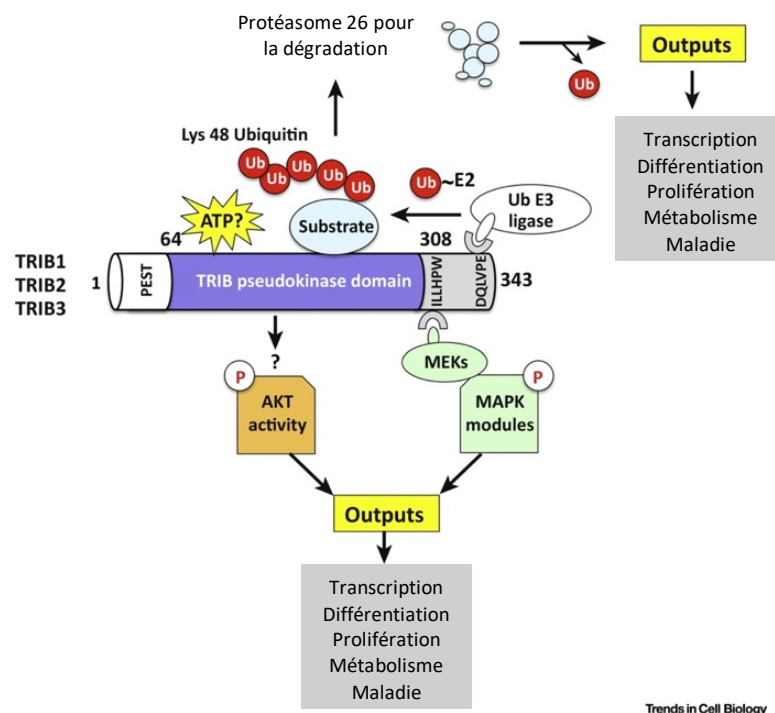


Figure 12. – Caractéristiques de signalisation classique des tribbles modifiée de (Eysers, Keeshan et al. 2017).

Les protéines TRIB2 partagent une région PEST dans le domaine N-terminal qui médie la dégradation pour contrôler le renouvellement des protéines. Un domaine pseudokinase sérine/thréonine dépourvu d'activité kinase canonique qui sert comme région d'échafaudage pour les protéines substrat, tandis que la région C-terminale qui contient des motifs de liaison pour MEK1 et COP1, médie respectivement la voie MAPK et l'ubiquitine ligase E3. Des interactions avec AKT ont été démontrées; cependant, les mécanismes précis de régulation d'AKT ne sont pas clairs et varient selon les TRIB.

I.4.2. Tribbles pseudokinase 2 (TRIB2)

I.4.2.1. Mode d'action de TRIB2

TRIB2 a d'abord été identifié chez la drosophile comme bloqueur de mitose qui régule le développement des embryons et des cellules germinales (Großhans and Wieschaus 2000). En l'absence d'activité kinase, TRIB2 fonctionne comme une protéine d'échafaudage pour réguler différentes voies de signalisation dans les processus biologiques fondamentaux tels que la prolifération et l'apoptose ainsi que dans des conditions pathologiques, y compris le cancer et même dans la résistance aux médicaments (Sakai, Miyajima et al. 2016, Do, Park et al. 2017, Kritsch, Hoffmann et al. 2017, Salomé, Magee et al. 2018). La protéine TRIB2 oscille pendant les phases du cycle cellulaire et induit le renouvellement des protéines nucléaires de la phosphatase à double spécificité et du régulateur mitotique positif du cycle cellulaire CDC25C (Liang, Paredes et al. 2016). TRIB2, tout comme les autres Tribbles, est un régulateur nouvellement reconnu de l'hémopoïèse normale et maligne (Liang, Rishi et al. 2013, Stein, Mack et al. 2015). Alors que les niveaux de TRIB2 sont faibles dans les cellules myéloïdes à l'état d'équilibre (Liang, Rishi et al. 2013), il a été démontré que TRIB2 régule l'activation et les fonctions inflammatoires des monocytes et macrophages humains (Eder, Guan et al. 2008, Deng, James et al. 2009, Wei, Rosenberg et al. 2012). Des travaux chez la souris ont montré que Trib2 est nécessaire au développement normal des cellules T et des érythroïdes (Liang, O'Connor et al. 2016, Lin, Yang-Yen et al. 2016). Il a été également démontré que Trib2 interagit avec différentes MAPK kinases (MAPKK), telles que MEK1 et MKK7, et favorise ou inhibe l'activation en cascade de MAPK dans des contextes cellulaires distincts (Eder, Guan et al. 2008, Yokoyama, Kanno et al. 2010). Trib2 a été identifié chez la souris comme un régulateur central des voies de signalisation du stress médié par p38 et le contrôle du cycle cellulaire de la leucémie (Hou, Guo et al. 2018).

I.4.2.2. Régulation de l'expression de TRIB2

Les protéines Tribbles semblent avoir des fonctions redondantes et non chevauchantes (Mayoral-Varo, Jiménez et al. 2021). La régulation et la signalisation de TRIB2 dépendent du type cellulaire et du contexte physiologique (Rishi, Hannon et al. 2014, Mayoral-Varo, Jiménez et al. 2021). Il a été décrit que TRIB2 est exprimé de manière cyclique au cours du cycle cellulaire, bien que le mécanisme sous-jacent reste à être établi (Rishi, Hannon et al. 2014, Liang, Paredes et al. 2016). L'activation ou la répression de TRIB2 peut se produire par différents moyens, notamment par les facteurs de transcription, par le biais de miARN ou en favorisant la dégradation de TRIB2 par le protéasome (Mayoral-Varo, Jiménez et al. 2021).

I.4.2.2.1. Voies de signalisation régulant l'expression de TRIB2

L'expression de TRIB2 a été contrôlée par des voies de signalisation telles que Récepteur Toll-like 5 (TLR5), Wnt/ β -caténine/TCF4 et p70S6K/Smurf1/ β -TRCP (Mayoral-Varo, Jiménez et al. 2021). Tandis que la stimulation du ligand TLR5 induit l'expression de TRIB2, TRIB2 agit par un feedback négatif sur l'action de TLR5 en inhibant NF- κ B en aval de *TNF receptor-associated factor 6* (TRAF6) dans l'épithélium du côlon chez les humains et souris (Wei, Rosenberg et al. 2012). La voie Wnt/ β -caténine/TCF4 favorise l'expression de TRIB2 dans les cellules cancéreuses du foie (Wang, Park et al. 2013). Dans ce cas également, TRIB2 produit une rétroaction négative par la dégradation du *Transcription factor 4* (TCF4) et de la β -caténine à travers la région de liaison de la ligase E3 de TRIB2 par l'ubiquitination (Xu, Tong et al. 2014). Au niveau protéique, TRIB2 a été régulée par dégradation protéasomique via p70S6K/Smurf1/ β -TRCP dans les cellules hépatiques humaines (Qiao, Zhang et al. 2013, Wang, Zhang et al. 2013). Mayoral-Varo et al., 2021 ont répertorié les facteurs de transcription qui ont été directement impliqués dans la régulation de TRIB2 dans différents types cellulaires (tableau 2) (Mayoral-Varo, Jiménez et al. 2021).

Tableau 2. – Résumé des facteurs de transcription régulant l'expression de TRIB2.

Facteur de Transcription	Régulation	Type cellulaire	Espèce
TAL1	Positive	Leucémie aiguë lymphoblastique (LAL)	Humaine
NOTCH1	Positive	Leucémie aiguë lymphoblastique (LAL)	
Smad3	Positive	Adénocarcinome pulmonaire	
PITX1	Positive	Leucémie aiguë lymphoblastique (LAL)	
TCF	Positive	Cellules cancéreuses du foie	
FoxA	Positive	Cellules cancéreuses du foie	
E2A	Négative	Leucémie aiguë lymphoblastique (LAL)	
E2F1	Positive	Leucémie aigüe myéloïde (LAM)	Souris
C/EBP α -p30	Positive	Leucémie aigüe myéloïde (LAM)	
Mesi1	Positive	Leucémie aigüe myéloïde (LAM)	
FOG-1	Positive	Moelle osseuse	
GATA-1	Positive	Moelle osseuse	
C/EBP α -p42	Négative	Leucémie aigüe myéloïde (LAM)	

Tableau tiré et adapté de (Mayoral-Varo, Jiménez et al. 2021)

1.4.2.2.2. Micro-ARN régulant l'expression de TRIB2

Les microARN (miRNA), constitués d'une vingtaine de nucléotides, sont des régulateurs post-transcriptionnels (Bartel 2009). Leur appariement à un ARN messager (ARNm) cible peut conduire à l'inhibition de sa traduction ou à sa dégradation, selon le degré de complémentarité entre la séquence du miARN et celle de son ARNm cible (Huntzinger and Izaurralde 2011). Plusieurs micro-ARN ont été décrits dans la régulation de TRIB2. Le cluster hsa-miR-99b/let-7e/miR-125a régule à la baisse l'expression de TRIB2 et améliore ainsi l'activation de STAT3 en raison de l'augmentation du signal ERK et l'activation de la kinase Jun en liant les protéines MAPK, MKK7 et MEK1 dans les monocytes (Hildebrand, Eberle et al. 2018). miR-511 et miR-1297 (Zhang, Chi et al. 2012) et let-7 (Wang, Sun et al. 2013) inhibent la prolifération dans l'adénocarcinome du poumon en supprimant l'expression de TRIB2 et par conséquent l'augmentation de l'expression de C/EBP α . De même, miR-206 et miR-140 suppriment la prolifération des cellules d'adénocarcinome pulmonaire et les métastases via une réduction de la phospho-Smad3/Smad3, qui régulent à la

baisse TRIB2 (Zhang, Yan et al. 2016). D'autre part, miR-505 à travers l'inhibition de Zinc finger E-box binding homeobox 1 antisense 1 (ZEB1-AS1), régule positivement l'expression de TRIB2 dans les cellules pancréatiques (Wei, Lu et al. 2020).

L'étude des mécanismes qui régulent TRIB2 au cours du cycle cellulaire pourraient éclairer la façon dont sa dérégulation conduit à maladies telles que le cancer (Mayoral-Varo, Jiménez et al. 2021).

I.4.2.3. TRIB2 dans les pathologies

Actuellement, le rôle de TRIB2 dans le cancer reste controversé. TRIB2 est surexprimé dans la leucémie myéloïde aiguë humaine (LMA) et accélère la progression de la LMA via l'inactivation de C/EBP α (Keeshan, He et al. 2006). Dans le cancer du foie, TRIB2 fonctionne comme une protéine adaptatrice et favorise la stabilisation de la protéine associée au co-activateur de la transcription YAP à travers la ligase d'ubiquitine E3 β TrCP, contribuant ainsi à la prolifération et à la transformation des cellules cancéreuses (Wang, Park et al. 2013). De plus, l'inhibition de TRIB2 dans les cellules HepG2 a inhibé la transcription du facteur de croissance du tissu conjonctif (*CTGF*) et de la protéine contenant le domaine de répétition de l'ankyrine 1 (*ANKRD1*), deux gènes cibles de la protéine YAP (Zhao, Ye et al. 2008, Dupont, Morsut et al. 2011). En revanche, Mara et al. ont rapporté que TRIB2 pourrait contrer la résistance à la chimiothérapie et la propagation de la leucémie myéloïde via l'activation de p38 (Salomé, Magee et al. 2018). Dans le cancer du foie, TRIB2 inhibe la signalisation Wnt en régulant la dégradation de facteurs clés, tels que β TrCP, COP1 et Smurf1 (Xu, Tong et al. 2014, Salomé, Magee et al. 2018). Une étude du cancer du sang a rapporté une existence de corrélation entre une expression élevée de TRIB2 et le facteur anti apoptotique BCL2 (O'Connor, Yalla et al. 2018), ce qui confère une sensibilité au vénétoclax mimétique BH3 (Cang, Iragavarapu et al. 2015), un nouvel agent émergent pour le traitement du cancer du sang, et mettant en évidence le potentiel de TRIB2 en tant que biomarqueur prédictif de la réponse au traitement chez les patients atteints de cancer du sang. Dans le cancer colorectal (CRC), il a été rapporté qu'une expression élevée de TRIB2 était corrélée à un pire résultat clinique (Hill, Madureira et al. 2017). Une autre a démontré que TRIB2 bloque la sénescence cellulaire du CRC par interaction avec AP4 pour réguler à la baisse l'expression de p21. Par conséquent, TRIB2 pourrait être une cible potentielle pour le traitement du CRC (Hou, Guo et al. 2018).

Une autre étude a démontré que l'expression de la protéine kinase kinase kinase 1 activée par un mitogène (MAP3K1) a une forte corrélation avec TRIB2 dans le Glioblastome (GBM),

tumeur primitive du cerveau la plus fréquente et la plus agressive avec un mauvais pronostic des patients atteints de cette maladie (Wang, Zuo et al. 2020). Il a été démontré également que l'expression élevée de TRIB2 et l'expression de MAP3K1 étaient associées à une résistance au temozolomide (TMZ) et à la radiothérapie (Wang, Zuo et al. 2020). Enfin, cette étude conclut que l'élévation combinée de TRIB2 et MAP3K1 pourrait être de nouveaux biomarqueurs pronostiques et des cibles thérapeutiques potentielles pour évaluer la malignité et les résultats à long terme de la GBM (Wang, Zuo et al. 2020). Il a été rapporté récemment que Trib2 confère une résistance au traitement du cancer de la prostate par l'enzalutamide via un mécanisme impliquant une plasticité cellulaire accrue et un changement de lignée (Monga, Adrianto et al. 2021).

I.4.2.4. TRIB2 dans la reproduction

Les données d'études de protéines de la famille Tribbles en général et plus particulièrement de TRIB2 dans les follicules ovariens des mammifères sont très limitées et leur fonction dans les cellules ovariennes était encore inconnue. L'étude portant sur les cellules folliculaires entourant les ovocytes avant et après la maturation méiotique chez différentes espèces a révélé *TRIB2* parmi les gènes régulés positivement dans les follicules matures de la vache, la souris et des amphibiens (*Xenopus*), inférant son implication dans les fonctions cellulaires granulosa/cumulus pendant la maturation ovocytaire (Charlier, Montfort et al. 2012). Dans nos études antérieures utilisant l'analyse du transcriptome, nous avons montré que TRIB2 *in vivo* était régulé à la baisse pendant la période péri-ovulatoire dans les cellules de granulosa bovines suite au pic de la LH ou l'injection d'hCG (Ndiaye et al., 2005). Un résultat similaire de baisse de TRIB2 dans les cellules de granulosa a aussi été observé 6 heures après le pic de LH (Assidi, Dieleman et al. 2010). Bien que les fonctions biologiques connues de TRIB2 dans le follicule soient limitées, au regard de ces observations ainsi que des données récentes de notre laboratoire suggèrent que TRIB2 modulerait les voies de signalisation en réponse aux signaux extracellulaires entrants qui incluent les hormones et les facteurs de croissance.

CHAPITRE II: HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

II.1. Problématique et hypothèse

II.1.1. Problématique

Du fait de la variété des facteurs impliqués et de leur très probable interaction lors de la croissance folliculaire et l'ovulation, des questions majeures concernant les processus de la folliculogénèse et de l'ovulation demeurent encore non résolues. Il est donc nécessaire d'améliorer notre compréhension des mécanismes physiologiques et moléculaires impliqués lors de ces divers processus afin de mieux saisir les phénomènes associés au succès de la reproduction chez les animaux domestiques ayant un impact économique.

Tel que mentionné plus haut, le début du développement folliculaire chez la vache dépendant des gonadotrophines, se caractérise par l'émergence d'une cohorte folliculaire et est corrélée à une augmentation transitoire des concentrations de FSH. Cela permet à la FSH d'exécuter les effets de signalisation requis en aval, notamment en favorisant la croissance et la prolifération cellulaires. Suite au pic de LH, la transcription de gènes cibles impliqués dans la croissance d'un follicule dominant est rapidement diminuée ou inhibée alors que la LH augmente ou induit l'expression de gènes impliqués dans l'ovulation et la lutéinisation. Ces observations démontrent l'importance d'études sur la fonction des gènes au cours des dernières étapes du développement folliculaire et de l'ovulation pour mieux comprendre l'activité ovarienne. À cette fin, notre laboratoire a identifié et caractérisé le gène TRIB2 exprimé de façon différentielle dans les follicules dominants bovins. Cependant, le rôle exact de TRIB2 dans la fonction des CG et ses effets sur les voies de signalisation impliquées dans la croissance folliculaire restaient à être défini.

II.1.2. Hypothèse

Sur la base des données antérieures de notre laboratoire et de la revue de littérature, nous avons posé l'hypothèse que TRIB2 jouerait un rôle important dans la fonction des cellules de la granulosa au cours des étapes finales du développement folliculaire. Pour vérifier cette hypothèse, les objectifs ci-dessous ont été développés.

II.2. Objectifs

Afin de vérifier l'hypothèse de la présente recherche, les objectifs sont :

Objectif 1 : étudier la fonction de TRIB2 dans les cellules de granulosa (CG)

Dans cet objectif 1, les objectifs spécifiques sont :

- 1- Analyser la régulation de l'expression de TRIB2 par RT-qPCR et western blot dans les CG prélevées de follicules à différents stades de développement et dans les extraits de paroi folliculaires (thèque interne et CG) de follicules ovulatoires à différentes heures post-hCG;
- 2- Vérifier l'effet de la FSH sur l'expression de TRIB2 dans les CG en culture;
- 3- Étudier les effets de l'inhibition et de la surexpression de TRIB2 dans les CG en utilisant la technologie CRISPR/CAS9 et le système pQE.

Objectif 2 : Identifier les protéines partenaires cibles de TRIB2

Les objectifs spécifiques sont :

- 1- Identifier les protéines partenaires avec lesquelles TRIB2 pourrait potentiellement interagir dans les CG par l'approche double hybride chez la levure;
- 2- Analyser la régulation de l'expression génique des partenaires de TRIB2 dans les CG lors du développement folliculaire;
- 3- Évaluer les effets de l'inhibition ou la surexpression de TRIB2 sur ses partenaires dans les CG en culture.

Objectif 3 : Analyser le profil d'expression d'ILs

- 1- Étudier l'expression et la régulation de différents récepteurs IL et IL dans la GC à différents stades du développement folliculaire ;
- 2- Analyser les changements du profil d'expression d'ILs cibles pendant la période post-partum.
- 3- Annexe : analyser l'expression de TRIB2 durant la période post-partum

CHAPITRE III: PREMIER ARTICLE

Résumé des résultats de l'article 1

Les travaux de cet article nous ont permis de démontrer la régulation et la fonction de TRIB2 dans les cellules de granulosa des follicules ovariens bovins. Les analyses RT-qPCR ont montré la plus grande expression de l'ARNm de TRIB2 dans la GC de DF par rapport à OF ($P < 0,0001$) et une diminution significative de l'expression de l'ARNm de TRIB2 de 6h à 24h post-hCG par rapport à 0h ($P < 0,001$). *In vitro*, l'inhibition de TRIB2 a entraîné une augmentation de la prolifération des CG et de l'expression de CYP19A1 ($P < 0,05$). Les analyses Western blot ont démontré une réduction des niveaux de phosphorylation de ERK1/2 (MAPK3/1) et p38MAPK (MAPK14) suite à l'inhibition de TRIB2, tandis que la surexpression de TRIB2 a augmenté p-ERK1/2 et p-p38MAPK ($P < 0,05$). Ces résultats démontrent que TRIB2 module les MAPK dans les CG affectant ainsi leur prolifération, la stéroïdogénèse et possiblement le développement final du follicule.

Functional effects of Tribbles Homolog 2 (TRIB2) in bovine ovarian granulosa cells

Aly Warma, Kalidou Ndiaye

Contributions des auteurs : Dans le cadre de cet article, j'ai réalisé la collecte, l'analyse et l'interprétation des données ainsi que la rédaction du manuscrit en collaboration avec Kalidou Ndiaye. Le résumé de la technologie CRISPR/Cas9 utilisée pour étudier la fonction de TRIB2 se trouve en annex1.1

Remerciements : Nous remercions Dr Jacques G. Lussier pour ses conseils et suggestions sur ce travail et pour ses commentaires critiques.

L'article est publié dans la revue *Biology of Reproduction*, Volume 102, Issue 6, June 2020, Pages 1177–1190, <https://doi.org/10.1093/biolre/ioaa030>

Title: Functional effects of Tribbles Homolog 2 (TRIB2) in bovine ovarian granulosa cells

Running title: TRIB2 regulates granulosa cells function

Summary sentence: TRIB2, which is predominantly expressed in bovine granulosa cells of dominant follicles as compared to ovulatory follicles, positively modulates MAPK signaling in granulosa cells and regulates granulosa cells proliferation and activity.

Keywords: TRIB2, ovary, granulosa cells, proliferation, CRISPR/Cas9, MAPK.

Authors: Aly Warma¹, Kalidou Ndiaye^{1,*}

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

Grant support: This work was supported by a Discovery Grant (#RGPIN/4516-2018) from Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to KN. The funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Conference presentation: Presented in part at the 2019 Experimental Biology meeting, 6-9 April 2019, Orlando, Florida.

*To whom correspondence should be addressed: Kalidou Ndiaye: Centre de recherche en reproduction et fertilité (CRRF), Département de biomédecine vétérinaire, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada;
E-mail: k.ndiaye@umontreal.ca; Tel. (450) 773-8521, ext. 8287.

III.1. Abstract

Tribbles homolog (TRIB) 1, 2 and 3 represent atypical members of the serine/threonine kinase superfamily. We previously identified *TRIB2* as a differentially expressed gene in granulosa cells of bovine preovulatory follicles. The current study aimed to further investigate *TRIB2* regulation and study its function in the ovary. Granulosa cells (Lv, He et al.) were collected from follicles at different developmental stages: small antral follicles (SF), dominant follicles at day 5 of the estrous cycle (DF) and hCG-induced ovulatory follicles (OF). RT-qPCR analyses showed greater expression of *TRIB2* in GC of DF as compared to OF and a significant downregulation of *TRIB2* steady-state mRNA amounts by hCG/LH, starting at 6 hours through 24 hours post-hCG as compared to 0 hour. Specific anti-*TRIB2* polyclonal antibodies were generated, and western blot analysis confirmed *TRIB2* downregulation by hCG at the protein level. *In vitro* studies showed that FSH stimulates *TRIB2* expression in GC. Inhibition of *TRIB2* using CRISPR/Cas9 resulted in a significant increase in *PCNA* expression and an increase in steroidogenic enzyme *CYP19A1* expression, while *TRIB2* overexpression tended to decrease GC proliferation. *TRIB2* inhibition also resulted in a decrease in transcription factors *CTGF* and *ANKRD1* expression, while *TRIB2* overexpression increased *CTGF* and *ANKRD1*. Additionally, western blot analyses showed reduction in ERK1/2 (MAPK3/1) and p38MAPK (MAPK14) phosphorylation levels following *TRIB2* inhibition, while *TRIB2* overexpression increased p-ERK1/2 and p-p38MAPK. These results provide evidence that *TRIB2* modulates MAPK signaling in GC and that *TRIB2* could act as a regulator of GC proliferation and function, which could affect steroidogenesis during follicular development.

III.2. Introduction

During the processes of follicular growth and ovulation, steroidogenic cells including granulosa cells play a crucial role in the maturation and release of the oocyte. Granulosa cells in particular contribute to steroid hormone synthesis, oocyte maturation, and corpus luteum formation after ovulation (Knight and Glister 2001, Rosenfeld, Wagner et al. 2001, Eppig, Wigglesworth et al. 2002, Richards and Ascoli 2018). Many factors such as follicle-stimulating hormone (FSH) receptors in small and growing follicles, luteinizing hormone (LH) receptors in ovulatory follicles

and growth factors that affect follicular growth and ovulation are produced by granulosa cells (Fortune, Rivera et al. 2001, Ginther, Beg et al. 2001). The control of GC proliferation and function is therefore complex and depends on the precise regulation of specific target genes transcription. This control is particularly essential for normal follicular development as it affects the physiological state of the dominant preovulatory follicle. For instance, transcription of target genes that control the growth of a dominant follicle is rapidly downregulated or silenced in GC as a result of LH-mediated increases in intracellular signaling (Rosenfeld, Wagner et al. 2001, Ndiaye, Fayad et al. 2005, Ndiaye, Castonguay et al. 2016), while the preovulatory follicle displays an array of genes induced by the LH surge or hCG injection (Sayasith, Bouchard et al. 2008, Sayasith, Sirois et al. 2013, Lussier, Diouf et al. 2017).

We previously identified TRIB2, a Tribbles homolog (TRIB) member, as differentially expressed in granulosa cells of dominant follicles and downregulated by hCG in ovulatory follicles (Ndiaye, Fayad et al. 2005). TRIB2 was first cloned as canine C5FW from a thyroid cDNA library and was stimulated by thyrotropin (Wilkin, Suarez-Huerta et al. 1997). The family of TRIB proteins is composed of TRIB1, TRIB2 and TRIB3, which are part of the superfamily of serine/threonine kinase proteins and the pseudokinase family of proteins (Mata, Curado et al. 2000, Seher and Leptin 2000). TRIB family members play fundamental roles in cell cycle, proliferation, and differentiation (Yokoyama and Nakamura 2011, Lohan and Keeshan 2013, Johnston, Basatvat et al. 2015, Nakamura 2015). They act as adapters or scaffolds in signaling pathways (Hegedus, Czibula et al. 2006) and have similarities to the "tribble" protein initially characterized in *Drosophila* with a crucial role in mitosis (Mata, Curado et al. 2000, Seher and Leptin 2000). Tribbles family members share a Trib domain, which is homologous to protein serine/threonine kinases but lacks a catalytic function; a COP1 site allowing key proteins to be targeted to the proteasome for degradation, and a MEK1 binding site that modulates MAPK activity (Dobens and Bouyain 2012). Thus, TRIB members could act as modulators of substrate ubiquitination and facilitate the assembly and regulation of signaling pathways within various signaling networks such as the C/EBP α transcription factor, AKT and ERK networks (Liu, Tan et al. 2013, Das, Sebo et al. 2014, Eyers, Keeshan et al. 2017). The Tribbles proteins could therefore interact and modulate the activity of signal transduction pathways in a number of physiological and pathological processes including cell division and migration, tissue homeostasis, inflammation, and carcinogenesis in

different tissues (Lohan and Keeshan 2013, Basatvat, Carter et al. 2015, Hill, Madureira et al. 2017).

The regulation of several cellular processes depends on the control of cascades of Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) (Peter and Dhanasekaran 2003, Fan and Sun 2004, Tamura, Nakagawa et al. 2004). Numerous studies have reported that members of Tribbles homolog proteins control MAPK activity (Kiss-Toth, Bagstaff et al. 2004, Guan, Shuaib et al. 2016, Eysers, Keeshan et al. 2017). As recently reviewed (Eysers, Keeshan et al. 2017), TRIB proteins can regulate intracellular cell signaling through canonical MAPK and AKT modules. In *Drosophila*, Tribbles controls string/CDC25 phosphatase that is required for the progression of G2 cell cycle stage into mitosis (Mata, Curado et al. 2000, Seher and Leptin 2000). Specifically, loss of TRIB2 in *Drosophila* is associated with increased proliferation, whereas overexpression slows the cell cycle and alters fertility (Mata, Curado et al. 2000, Seher and Leptin 2000). Moreover, TRIB2 induction has been demonstrated in canine thyroid follicle cells following activation of the mitogenic pathways (Wilkin, Suarez-Huerta et al. 1997). In bovine species, it has been shown that Tribbles expression in cumulus cells was related to oocyte maturation (Brisard, Chesnel et al. 2014). More recently, TRIB2 was found to be an important regulator of embryonic stem (ES) cells self-renewal and pluripotency induction during the reprogramming process (Do, Park et al. 2017). However, Tribbles family members have not been studied in granulosa cells of the ovarian follicles of mammals and their function in granulosa cells is still unknown. The objectives of this study were therefore to investigate the expression and regulation of TRIB2 and other tribbles members at different stages of follicular development and determine TRIB2 function in the ovary. We report here the gonadotropin regulation of TRIB2 mRNA and protein expression during follicular development, its function in ovarian granulosa cells using *in vivo* and *in vitro* experiments as well as TRIB2 effects on MAPK pathways in granulosa cells.

III.3. Materials and Methods

III.3.1. Cloning and characterization of TRIB2

TRIB2 was characterized from a differential hybridization screening of a subtracted cDNA library using the suppression subtractive hybridization approach (Ndiaye, Fayad et al. 2005). We established and analyzed a granulosa cell-cDNA library from day 5 dominant preovulatory follicles

and the cDNA clone corresponding to TRIB2 was identified as differentially expressed in these day 5 dominant follicles. Bovine TRIB2 cDNA was amplified by PCR and entirely characterized by sequencing (accession #NM_178317) (Ndiaye, Fayad et al. 2005).

III.3.2. Experimental animal models

The experimental protocol was reviewed and approved by the Animal Ethics Committee of the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Montreal and the cows were cared for in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines (CCAC 2009). The animals had *ad libitum* access to food and water. The regulation of TRIB2 expression was analyzed during follicular development and ovulation using an *in vivo* model previously characterized (Ndiaye, Fayad et al. 2005, Ndiaye, Castonguay et al. 2016). Estrous cycles of 18 normal cycling dairy cows were synchronized with one injection of prostaglandin F₂ alpha (PGF_{2α}; 25mg, im; Lutalyse, Upjohn, Kalamazoo, MI) given in the presence of a corpus luteum, and ovarian follicular development was monitored by daily transrectal ultrasonography. Following estrous synchronization, cows were randomly assigned to the day 5 dominant follicle group (DF, n = 4), or the hCG-induced ovulatory follicle group (OF, n = 4). In the DF group, the ovary bearing the DF on the morning of day 5 of the estrous cycle (day 0 = day of estrus) was obtained by ovariectomy (via colpotomy) as previously reported (Ndiaye, Fayad et al. 2005) and follicles were dissected into separate isolates of GC and theca cells (TC). The DF was defined as > 8mm in diameter and growing while subordinate follicles were either static or regressing. The OF were obtained following an injection of 25mg of PGF_{2α} (Lutalyse) on day 7 to induce luteolysis, thereby promoting the development of the dominant follicle of the first follicular wave into a preovulatory follicle. An ovulatory dose of hCG (3000 IU, iv; APL, Ayerst Lab, Montréal, QC) was injected 36 h after the induction of luteolysis, and the ovary bearing the hCG-induced OF was collected by ovariectomy 24 hours post-hCG injection for GC and TC isolation. The 10 remaining cows were treated similar to cows in the OF group and ovulatory follicles were then collected at 0, 6, 12, 18 and 24 hours post-hCG injection (n = 2 cows/time point) for follicular walls isolation (FW; theca interna with attached mural granulosa cells) (Filion, Bouchard et al. 2001), and stored at -70°C. Additionally, GC were collected from 2 to 4mm small antral follicles (SF) obtained from slaughterhouse ovaries, and a total of three pools of 20 SF were prepared. Corpora lutea (CL; n =

3) were collected at day 5 of the estrous cycle from the same cows used for DF sampling and frozen in liquid nitrogen, then stored at -70°C .

III.3.3. mRNA expression analysis

Expression and regulation of *TRIB2* as well as *TRIB1* and *TRIB3* mRNA was analyzed by RT-qPCR during follicular development and following hCG injection using specific primers (Table 1). Total RNA was extracted from bovine GC collected from follicles at different developmental stages (SF, DF, OF) and CL, and from FW collected at 0, 6, 12, 18, and 24 hours post-hCG injection as previously published (Ndiaye, Carriere et al. 2015). Samples referred to as 0 hour are samples collected from day 7 dominant follicles. Total RNA (1 μg) from each sample were reverse transcribed using the SMART PCR cDNA synthesis technology (BD Biosciences Clontech, Mississauga, ON) according to the manufacturer's procedure and as previously published (Fayad, Levesque et al. 2004). RT-qPCR experiments were performed using SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad) following the manufacturer's protocol. RT-qPCR data were analyzed using the Livak method ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$) (Livak and Schmittgen 2001) with *RPL19* used as reference gene (Crookenden, Walker et al. 2017). In addition, cDNA samples from GC at 0h and 24 hours following the endogenous LH surge were used to analyze *TRIB2* regulation by PCR. The PCR products were analyzed in a 1.5% agarose gel with *GAPDH* as reference.

III.3.4. Production of polyclonal anti-bovine *TRIB2* antibodies

A *TRIB2* fragment corresponding to amino acids Arg¹⁵⁴ to Thr³³⁷ (Molecular weight = 20.8kDa) located at the carboxy-terminal end of the bovine *TRIB2* was used to generate a glutathione S-transferase fusion protein (GST Gene Fusion System; GE Healthcare Life Sciences) to produce specific anti-*TRIB2* polyclonal antibodies as previously described (Ndiaye, Carriere et al. 2015). A set of forward and reverse primers were designed to generate the *TRIB2* fragment by PCR using the Expand High Fidelity polymerase (Roche Molecular Biochemicals) according to the manufacturer's protocol. The fragment was isolated after electrophoresis, digested with appropriate restriction enzymes and cloned into the pGEX-2T vector (Amersham Pharmacia Biotech) in frame with the GST coding region. Protease-deficient *E. coli* BL-21 (Amersham Pharmacia Biotech) were transformed with the *TRIB2*/pGEX-2T construct and expression of recombinant *TRIB2*/GST fusion protein was induced with 0.1mM isopropyl-1-thio- β -D-

galactopyranoside (IPTG) for 6 hours. Proteins from bacterial extracts were obtained after sonication and the TRIB2/GST fusion protein was purified by affinity on glutathione-Sepharose beads (Amersham Pharmacia Biotech) and digested with thrombin (10units/1 mg of fusion protein) to release the TRIB2 fragment. The proteins were resolved by one-dimensional SDS-PAGE, stained with coomassie blue, and transferred on nitrocellulose membrane (0.45 μ m Hybond C; Amersham Pharmacia Biotech). The TRIB2 band (MW = 20.8kDa) was properly cut and used to immunize a rabbit as previously described (Brule, Rabahi et al. 2000, Bedard, Brule et al. 2003). Preceding immunization, the identity of the purified TRIB2 fragment was verified by mass spectrometry (Eastern Quebec Proteomics Center, Laval University, Quebec, Canada). Polyclonal antibodies against bovine TRIB2 were validated by western blot analysis using a GST-affinity purified recombinant TRIB2 fragment and then used in western blot analyses of total protein extracts from *in vivo* samples.

III.3.5. Cell extracts and Western blot analyses with anti-TRIB2 antibodies

Granulosa cells from SF, DF, and OF and from CL were obtained as described above and homogenized in M-PER buffer (Thermo Fisher Scientific) supplemented with complete protease inhibitors (Sigma Aldrich) as described by the manufacturer's protocol, and centrifuged at 16,000 x g for 10 min at 4°C. Protein concentrations were determined from the recovered supernatant according to Bradford method (Bradford 1976) (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad Lab, Mississauga, ON, Canada). Western blot analyses were performed as previously described (Bedard, Brule et al. 2003). Samples (20 μ g of proteins) were resolved by one-dimensional denaturing Novex Tris-glycine gels (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) and electrophoretically transferred to polyvinylidene difluoride membranes (PVDF; Thermo Fisher Scientific). Membranes were incubated with the polyclonal anti-bovine TRIB2 antibodies (1:2000). Immunoreactive proteins were visualized by incubation with horseradish peroxidase-linked donkey anti-rabbit secondary antibody (1:20 000 dilution) and the enhanced chemiluminescence system, ECL plus (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's protocol followed by revelation using the ChemiDoc XRS+ system (Bio-Rad). β -actin was used as reference protein with anti- β -actin antibodies purchased from Immune Biosolutions (Sherbrooke, QC Canada) and used at a dilution of 1:1000.

III.3.6. *In vitro* experiments

Ovaries were obtained from the slaughterhouse and GC were collected from follicles (< 8 mm in diameter) and cultured either in 96-well plates (proliferation assay; n = 3 independent experiments with triplicate wells for each treatment) or in 24-well plates (gene expression analysis; n = 3 independent experiments with duplicate wells for each treatment) in DMEM/F12 medium supplemented with L-glutamine (2 mM), sodium bicarbonate (0.084%), bovine serum albumin (BSA; 0.1%), HEPES (20 mM), sodium selenite (4 ng/ml), transferrin (5 µg/ml), insulin (10 ng/ml), non-essential amino acids (1 mM), androstenedione (100 nM), penicillin (100 IU) and streptomycin (0.1 mg/ml) as previously published (Portela, Zamberlam et al. 2011, Benoit, Warma et al. 2019). Cells were seeded at a density of 0.01×10^6 and 0.05×10^6 cells for 96-well plates and 24-well plates, respectively. For FSH treatment, culture medium was supplemented with insulin (10ng/ml) for 2 days, then with a medium containing FSH (1ng/ml) and insulin (10ng/ml) for 4 days. FSH used in culture was purchased from Sigma (cat. # F4021-10UG). Cells were incubated at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere with media changed every 48 hours. To assess effects of FSH treatment on GC, expression of *TRIB2* mRNA as well as steroidogenic gene *CYP19A1* were analyzed by RT-qPCR. Cell proliferation was measured using the CellTiter Proliferation and Viability Assays (Promega) kit, and proliferating cell nuclear antigen (*PCNA*) was also evaluated by RT-qPCR analyses.

III.3.7. Functional studies

To study the function of *TRIB2* in GC of ovarian follicles, we used the CRISPR/Cas9 approach to inhibit *TRIB2* and the pQE TriSystem His-Strep2 to overexpress *TRIB2* in granulosa cells.

III.3.7.1. CRISPR-Cas9 experiments

The CRISPR/Cas9 technology was used through the guide-it CRISPR/Cas9 system (Clontech) for the cloning and expression of target single guide RNAs (sgRNAs) for *TRIB2* inhibition in GC. Four sgRNAs were designed and their efficiency was tested prior to transfection experiments using the Guide-it sgRNA *in vitro* transcription and Screening System (Clontech). DNA templates containing sgRNA-encoding sequences under the control of T7 promoter were generated by PCR, *in vitro* transcribed, and purified. Cleavage templates for screening the purified

sgRNAs were produced by amplification of DNA fragments that contain the *TRIB2* sequence. A cleavage reaction on these templates was performed using the purified sgRNAs with the recombinant Cas9 nuclease (Clontech). The efficiency of cleavage reactions was analyzed on agarose gel followed by densitometry. A sgRNA was identified and used for cloning into the pGuide-it-ZsGreen1 vector for plasmid construct and transfection of GC using the Xfect transfection kit (Clontech) as previously reported (Benoit, Warma et al. 2019). GC were collected from slaughterhouse ovaries and cultured in 24-well plates at a density of 0.05×10^6 cells in DMEM/F12 supplemented as described above ($n = 3$ independent experiments with duplicate wells for each treatment). Nanoparticle complexes from the Xfect transfection kit were applied to GC and incubated for 9 hours at 37°C then removed and replaced with complete growth medium. Transfected GC along with control GC (transfection with empty vector or no transfection) remained in culture for six days with media replacement every two days. Cells were collected for total RNA and protein extraction for RT-qPCR and Western blot analyses. *TRIB2* inhibition was confirmed by RT-qPCR. The effects of CRISPR/Cas9-induced *TRIB2* inhibition were assessed by analyzing the expression of proliferation marker, *PCNA*, as well as the expression of steroidogenic gene *CYP19A1* and transcription factors connective tissue growth factor (*CTGF*) and ankyrin repeat domain-containing protein 1 (*ANKRD1*). These two transcription factors were previously shown as targets downstream of *TRIB2* (Wang, Park et al. 2013). The effects of *TRIB2* inhibition on MAPK pathways were also verified by analyzing phosphorylation levels of ERK1/2 (also known as MAPK3/1) and p38MAPK (also known as MAPK14). Protein samples extracted from *in vivo* GC using day 5 DF, day 7 DF and 12, 18 and 24h post-hCG were used to analyze phosphorylation levels of ERK1/2 and p38MAPK. Western blot analyses were performed as described above for *TRIB2* using 100ng of proteins. The following antibodies were used for western blotting: anti-p38MAPK (D13E1), anti-phospho-p38 (D3F9), anti-p44/42 (137F5), anti-phospho-p44/42 (D13.14.4E). Antibodies used to immunoblot MAPK signaling were from Cell Signaling Technology (New England BioLabs Ltd.; Whitby, ON, Canada) and anti- β -actin antibody used as reference was from Immune Biosolutions (Sherbrooke, QC Canada).

III.3.7.2. Overexpression experiments

For overexpression experiments, the *TRIB2* open reading frame (ORF) was amplified by PCR using the Advantage 2 polymerase mix (Clontech) with *TRIB2*_ORF primers (Table 1)

amplifying the entire 1032 bp open reading frame. The TRIB2 PCR fragment was purified and cloned into pQE-TriSystem His-Strep2 vector (Qiagen). The final pQE2-TRIB2 construct was used to transfect GC using the Xfect transfection kit (Clontech Laboratories, Inc.) according to the manufacturer's protocol. *TRIB2* overexpression was confirmed by RT-qPCR analysis. The effects of TRIB2 overexpression were assessed by measuring GC proliferation using the CellTiter assay kit (Promega) and analyzing mRNA expression for target genes *CTGF* and *ANKRD1*.

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

Gene Names		Primer sequence (5'-3')*	Accession no.	AS (bp)
RPL19	Fwd	gaccaatgaaatcgccaatgc	NM_001040516	154
	Rv	acctatacccatatgacctgcc		
TRIB1	Fwd	gttctgcattctcgaccacat	NM_001101105	140
	Rv	tgtaccaggtccaagacag		
TRIB2	Fwd	ttgggtatttctgtccctga	NM_178317	237
	Rv	acgtgtcacctacccaaaaa		
TRIB2_ORF	Fwd	atgaacatacacaggctctacc	NM_178317	1032
	Rv	gttaaagaaagggtccaaggt		
TRIB3	Fwd	actaccctccaggactcag	NM_001076103	278
	Rv	ttctcctcctcctctgcttc		
PCNA	Fwd	aagccactccactgtctccta	NM_001034494	207
	Rv	ttaagtgtgtgctggcatctc		
CYP19A1	Fwd	gaggaggtctgcaatgacttg	NM_174305	167
	Rv	ggtttgagaaggagagcttgc		
CTGF	Fwd	gaccacagagtggagtgccta	AF000137	231
	Rv	tatgtcttcctgctggtgcag		
ANKRD1	Fwd	aaacggacagctcttcacaga	NM_001034378	210
	Rv	ccgagtgtctgagcaacttacc		

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

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

III.3.8. Statistical analysis

Values for *TRIB2* and other target genes mRNA were normalized with those of the reference gene *RPL19*. Homogeneity of variance between groups was verified by O'Brien and Brown-Forsythe tests. Corrected values of gene specific mRNA levels were compared between follicular or CL groups by one-way ANOVA. When ANOVA indicated a significant difference ($P < 0.05$), the

Tukey-Kramer test was used for multiple comparison of individual means among SF, DF, OF and CL, and for *in vitro* experiments, whereas the Dunnett test ($P < 0.05$) was used to compare different time points post-hCG injection with 0 hour as control. Statistical analyses were performed using Prism software 6.0 for Macintosh (GraphPad). RT-qPCR Data are presented as normalized amounts of respective genes relative to $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

III.4. Results

III.4.1. TRIB2 regulation during follicular development

RT-qPCR results revealed strongest expression of *TRIB2* mRNA in GC from DF while *TRIB2* expression was downregulated by hCG since it was significantly decreased in OF and in the CL (Fig. 1A; $P < 0.0001$). Moreover, expression of *TRIB2* was significantly increased in DF as compared to SF samples (Fig. 1A; $P < 0.05$). Because the group of SF samples were obtained from slaughterhouse ovaries, atretic follicles are likely to be present in this group, which could affect *TRIB2* expression as compared to healthy, steroidogenic follicles. Analysis of the temporal expression of *TRIB2* at different times post-hCG injection showed a significant decrease in *TRIB2* steady-state mRNA expression in FW as early as 6 hours post-hCG and remained downregulated through 24 hours post-hCG injection as compared to 0 hour (Fig. 1B; $P < 0.0001$). Furthermore, the endogenous luteinizing hormone (LH) surge model confirmed the downregulation of *TRIB2* mRNA 24 hours post-LH as compared to 0 hour (Fig. 1C).

III.4.2. TRIB2 is downregulated by hCG at the protein level during follicular development

Polyclonal antibodies were generated against *TRIB2* and validated by western blot analyses. The polyclonal anti-*TRIB2* antibodies recognized the GST-affinity purified recombinant *TRIB2* fragment migrating at a molecular weight of 20.8 kDa (Fig. 1D). In addition, total protein extracts of GC from SF, DF, OF, and from CL were analyzed by western blot using these anti-*TRIB2* antibodies. The results showed that the anti-bovine *TRIB2* antibodies recognized the native, full-length *TRIB2* protein migrating at a molecular weight of 38.5 kDa (Fig. 1E). The results demonstrated a stronger expression of *TRIB2* in granulosa cells of DF and SF while *TRIB2* was

absent in OF 24 hours post-hCG injection as well as in the CL (Fig. 1E), reflecting *TRIB2* downregulation by hCG/LH observed at the mRNA level.

III.4.3. *TRIB2* expression in granulosa cells vs. theca cells

In order to verify the contribution of theca cells in *TRIB2* expression, *TRIB2* mRNA abundance was analyzed in GC and TC. RT-qPCR results showed that *TRIB2* is predominantly expressed in GC as compared to TC in day 5 dominant follicles (Fig. 2A; $P < 0.001$). In contrast, *TRIB2* expression was significantly downregulated in GC of ovulatory follicles and remains at low levels in TC (Fig. 2A). Although *TRIB2* expression was weak in TC, it was stronger in TC from DF than in TC from OF (Fig. 2A; $P < 0.05$). *CYP17A1* was analyzed as a marker for TC and as expected was present in TC and absent in GC from day 5 dominant follicles (Fig. 2B; $P < 0.001$) but was reduced in OF (Fig. 2B). These results suggest that TC contribution to *TRIB2* expression in the ovary is very limited as compared to GC.

III.4.4. Tribbles mRNA are differently regulated during follicular development

Since *TRIB1* and *TRIB3* belong to the tribbles family of proteins along with *TRIB2* and share some sequence similarities, we analyzed the regulation of their expression as compared to *TRIB2*. RT-qPCR analyses showed that *TRIB1* and *TRIB3* mRNA expression are differently regulated compared to *TRIB2*. *TRIB1* steady-state mRNA expression was strongest in the OF as compared to SF, DF, and the CL (Fig. 3A; $P < 0.0001$) and was stronger in SF than in DF (Fig. 3A; $P < 0.05$). In contrast, *TRIB3* mRNA expression was strongest in the CL as compared to the different stages of follicular development (Fig. 3B; $P < 0.0001$). Among the different groups of follicles, *TRIB3* expression was stronger in the OF as compared to SF and DF (Fig. 3B; $P < 0.05$).

III.4.5. FSH stimulates *TRIB2* mRNA expression

Cultured granulosa cells were treated with FSH and collected after 6 days in culture. RT-qPCR analyses revealed that FSH treatment significantly increased *TRIB2* mRNA expression (Fig. 4A; $P < 0.05$). FSH treatment also induced production of steroidogenic enzyme *CYP19A1* mRNA (Fig. 4B; $P < 0.05$), which is known to stimulate estradiol synthesis and promote follicular growth (Fortune, Rivera et al. 2001, Michalovic, Currin et al. 2018). Additionally, FSH treatment increased

expression of cell proliferation marker *PCNA* mRNA (Fig 4C; $P < 0.05$). Accordingly, GC proliferation was increased following FSH stimulation (Fig. 4D; $P < 0.05$).

III.4.6. Functional studies

Four sgRNA sequences were synthesized and tested against *TRIB2* sequence from GC. A sgRNA with 96.1% efficiency at directing Cas9-mediated cleavage of *TRIB2* was identified and used for cloning into the pGuide-it vector for plasmid construct and transfection of bovine GC. RT-qPCR analyses confirmed *TRIB2* inhibition via CRISPR/Cas9 as compared to control and empty vector (Fig. 5A; $P < 0.001$). Effects of *TRIB2* silencing on cell proliferation and target genes expression were analyzed. Results showed that *TRIB2* silencing led to a significant increase in *PCNA* expression in GC (Fig 5C; $P < 0.05$) and FSH treatment further increased *PCNA* abundance as compared to control and *TRIB2*-inhibited cells without FSH (Fig 5C; $P < 0.05$). Similarly, *CYP19A1* expression was significantly increased when *TRIB2* was silenced through CRISPR/Cas9 (Fig 5C; $P < 0.05$). However, the combination of *TRIB2* inhibition and FSH treatment decreased *CYP19A1* expression as compared to *TRIB2* inhibition alone (Fig 5C; $P < 0.05$) suggesting that FSH might stimulate somewhat *TRIB2* expression, which leads to decreased *CYP19A1* expression compared to *TRIB2* inhibition in the absence of FSH. Expression of *CYP19A1* was still stronger in GC with the combination of *TRIB2* inhibition and FSH treatment as compared to the control (Fig 5C; $P < 0.05$). For overexpression experiments, *TRIB2* overexpression was confirmed by RT-qPCR, which showed a significant increase of *TRIB2* as compared to control and empty vector (Fig. 5B; $P < 0.01$). *TRIB2* overexpression tended to decrease GC proliferation (Fig. 5D; $P = 0.08$). However, addition of FSH did not significantly stimulate GC proliferation when *TRIB2* was overexpressed (Fig. 5D).

III.4.7. *TRIB2* affects target transcription factors expression

We analyzed the expression of transcription factors *CTGF* and *ANKRD1* in GC following either *TRIB2* inhibition through CRISPR/Cas9 or overexpression via the pQE system. *TRIB2* silencing resulted in a significant decrease in *CTGF* (Fig. 6A; $P < 0.05$) relative mRNA abundance, while *TRIB2* overexpression increased *CTGF* (Fig. 6A; $P < 0.05$). A similar decrease was observed for *ANKRD1* in *TRIB2*-knock down granulosa cells (Fig. 6B; $P < 0.01$) while *TRIB2* overexpression increased *ANKRD1* mRNA expression (Fig. 6B; $P < 0.01$). Furthermore, FSH treatment

significantly inhibited *CTGF* (Fig. 6A; $P<0.05$) and *ANKRD1* (Fig. 6B; $P<0.05$) mRNA expression even in TRIB2-overexpressed cells suggesting a regulation of *CTGF* and *ANKRD1* by FSH independent of TRIB2.

III.4.8. TRIB2 positively modulates ERK1/2 and p38MAPK phosphorylation in granulosa cells

Western blot analyses using GC from the *in vivo* experimental model revealed that phosphorylation levels of ERK1/2 (Fig. 7A and B) and p38MAPK (Fig. 7C and D) were significantly reduced following hCG injection and subsequent TRIB2 downregulation. TRIB2 downregulation in GC post-hCG injection is shown in figure 4B. For both ERK1/2 and p38MAPK, reduction of phosphorylation levels was significant at 12h post-hCG through 24h post-hCG (Figs. 7B and 7D; $P<0.05$). In contrast, total ERK1/2 and p38MAPK significantly increased in post-hCG samples with a maximum at 18h post-hCG followed by a reduction at 24h (Fig. 7E and F; $P<0.05$). Additionally, *in vitro* experiments showed increased p-ERK1/2 (Figs. 8A and B) and p-p38MAPK (Figs. 8C and D) abundance when TRIB2 was overexpressed in granulosa cells as compared to control cells ($P<0.05$). This was concomitant with a decrease in total ERK1/2 and p38MAPK forms (Figs. 8E and F; $P<0.05$). These results show that TRIB2 positively modulates ERK1/2 and p38MAPK phosphorylation levels in ovarian granulosa cells.

III.5. Discussion

The Tribbles family is one of the pseudokinases containing non-catalytic putative kinase regions in its structure (Sakai, Miyajima et al. 2016, Eyers, Keeshan et al. 2017). Instead, the Tribbles proteins act as scaffold proteins, which bind their substrates to localize them to or from their functions (Sakai, Miyajima et al. 2016). Moreover, Tribbles gene expression was shown to be tissue- and cell-specific (Sung, Francis et al. 2006, Hegedus, Czibula et al. 2007). *TRIB2* in particular was shown to be rapidly induced by mitogens, is expressed in a cell-specific manner and mostly located in the cytoplasm of several cell types (Sung, Francis et al. 2006, Hegedus, Czibula et al. 2007). The current study describes for the first time the regulation of Tribbles genes expression in granulosa cells of ovarian follicles during follicular development. Our data provide evidence that TRIB2 is a potent regulator of granulosa cells proliferation and that it could affect steroidogenesis and MAPK pathways in these reproductive cells. TRIB2 has been reported as a

cell cycle brake, which is essential for a balanced proliferation of different cell types as previously shown in developing murine thymocytes (Liang, O'Connor et al. 2016). Loss of TRIB2 caused developing thymocytes to be highly proliferative suggesting that TRIB2 negatively regulates cell cycle entry/exit and hence the cell division kinetics of these thymocytes (Liang, O'Connor et al. 2016). In our study, TRIB2 appears to negatively regulate granulosa cells proliferation as inhibition of TRIB2 via CRISPR/Cas9 increased *PCNA* expression in GC, which is associated with cell proliferation, while TRIB2 overexpression tended to reduce GC proliferation. Cumulatively these observations suggest that TRIB2 could modulate granulosa cells proliferation and follicular growth during the final stages of follicular development leading up to ovulation. However, it is possible that TRIB2 could positively or negatively modulate granulosa cells proliferation depending on the status of the follicles, thereby stimulating GC proliferation in small follicles and inhibiting proliferation in large preovulatory follicles. The regulation of *TRIB2* described in the *in vivo* results suggest that TRIB2 might be associated with reduced granulosa cells proliferation and is consistent with the *in vitro* results. More specifically, TRIB2 overexpression and the subsequent decrease in proliferation can be correlated with the strongest *TRIB2* expression in GC of dominant follicle, which express LHr allowing a dependency shift from FSH to LH, as previously reviewed (Fortune, Rivera et al. 2001) and the initiation of GC differentiation. In this regard, TRIB2 might be related to limiting GC proliferation in dominant follicles.

We showed that, contrary to *TRIB2*, *TRIB1* expression was upregulated in mature follicles following hCG injection in agreement with previously reported data using follicular cells surrounding the oocytes before and after meiotic maturation in different species (Charlier, Montfort et al. 2012). *TRIB1* may therefore be involved in granulosa/cumulus cells function during oocyte maturation. Conversely, our data showed that *TRIB3* expression was strongest in the corpus luteum as compared to all stages of follicular development suggesting a role for *TRIB3* in granulosa cells differentiation into luteal cells or in the function of the corpus luteum. *TRIB1* as well as *TRIB3* were also shown to be upregulated during the ovulatory period in cumulus cells, whereas *TRIB2* was downregulated during the same period (Brisard, Chesnel et al. 2014). We have previously shown that *TRIB2* expression was downregulated in bovine granulosa cells from hCG-induced ovulatory follicles (Ndiaye, Fayad et al. 2005), which is confirmed in the current study and is similar to previous studies (Charlier, Montfort et al. 2012, Brisard, Chesnel et al. 2014). The

differences in regulation of Tribbles members expression in granulosa cells during follicular development indicate that they may have different roles either in the final follicular growth, the ovulation process or in corpus luteum formation and function. Consequently, TRIB1 or TRIB3 may not compensate the absence of TRIB2 in TRIB2-knock down granulosa cells. Overall, our study shows for the first time that TRIB2 expression in ovarian granulosa cells is significantly inhibited by LH/hCG both at the mRNA and protein levels, while FSH stimulates *TRIB2* expression. Similarly, *TRIB2* expression was up-regulated by thyroid stimulating-hormone (Jurtshuk) in canine thyroid cells (Wilkin, Suarez-Huerta et al. 1997). These observations support the conclusion that TRIB2 is hormonally regulated and that these hormones control TRIB2 ability to affect target genes function.

The selection of a dominant follicle is driven by a series of proliferation and apoptotic events (Liu, Zhang et al. 2019), with FSH and LH directly controlling maturation of the cumulus-oocyte complexes and ovulation. In mice, FSH acts on GC to promote their proliferation and differentiation into a preovulatory stage and contributes to the oocyte's meiotic competency (Chesnel and Eppig 1995) and in bovine, FSH induces estradiol production by GC (Plewes, Hou et al. 2019). These observations are consistent with FSH inducing *CYP19A1* expression in GC as demonstrated in this study and previously reported in bovine GC (Michalovic, Currin et al. 2018) as well as in human GC tumor cell line (Fu, Lv et al. 2014). These results are also consistent with FSH stimulating GC proliferation and concomitantly increasing *PCNA* expression as reported in this study. LH then induces the expression of various genes and promotes ovulation and differentiation of granulosa and theca cells into luteal cells (O'Shea, Rodgers et al. 1989, Shrestha, Lukasik et al. 2015, Lussier, Diouf et al. 2017, Benoit, Warma et al. 2019, Wohlres-Viana, Arashiro et al. 2019). In GC, FSH stimulates ERK signaling pathway (Donaubauer, Law et al. 2016), which plays a predominant role in the ovulatory response to LH in preovulatory GC (Fan, Liu et al. 2009). Consequently, the processes of oocyte maturation and ovulation depend on FSH and LH and require activation of mitogen-activated protein kinase in GC.

Tribbles family members have been shown to interact with different MAPK kinases (MAPKK), such as MEK1 and MKK7, and to either promote or inhibit MAPK cascade activation in distinct cellular contexts (Eder, Guan et al. 2008, Yokoyama, Kanno et al. 2010). They are also known to be associated with MAPK signaling and are required for the activation of ERK, JNK and

p38MAPK (Yokoyama, Kanno et al. 2010, Wei, Rosenberg et al. 2012, Wang, Park et al. 2013). For instance, the absence of TRIB2 led to enhanced T-cell leukemic transformation associated with impaired MAPK signaling (Liang, O'Connor et al. 2016). Moreover, Tribbles regulate cell proliferation via different pathways as reported for TRIB1 in different cell types (Dugast, Kiss-Toth et al. 2013) and for TRIB2 in tumor cells (Keeshan, He et al. 2006, Sung, Guan et al. 2007). TRIB1 exerts its biological functions through binding to signaling proteins of the MAPKK level of the MAPK pathway, therefore eliciting a regulatory role in the function of this pathway, which mediates proliferation, apoptosis and differentiation in cells (Dugast, Kiss-Toth et al. 2013). We have shown in this study that TRIB2 could act as a regulator of granulosa cells proliferation and function probably by modulating signaling pathways in response to signals such as FSH or LH. Our *in vitro* data showed that inhibition of TRIB2 led to decreased p38MAPK abundance and reduced phosphorylation levels of p38MAPK. We have shown that TRIB2 inhibition also resulted in decreased phosphorylation levels of ERK1/2. In contrast, TRIB2 overexpression resulted in increased levels of phospho-ERK1/2 and phospho-p38MAPK. Moreover, data from *in vivo* experiments show similar results with decreased phosphorylation levels for ERK1/2 and p38MAPK after hCG injection and subsequent TRIB2 downregulation. These data suggest a reduced activity of p38MAPK and ERK1/2 and an alteration of MAPK signaling in granulosa cells due to a lack of TRIB2, consistent with previous studies reporting inhibition of the ERK and p38MAPK signaling pathways following TRIB2 downregulation (Ma, Zhou et al. 2018, Salome, Magee et al. 2018). Although TRIB2 would not lead to direct phosphorylation of p38MAPK or ERK1/2, since it is a pseudokinase, it may act as a regulator of MAPK pathway activation in granulosa cells as shown in numerous other studies where TRIB2 modulates MAPK signaling (Eder, Guan et al. 2008, Yokoyama, Kanno et al. 2010, Wei, Rosenberg et al. 2012, Liang, O'Connor et al. 2016), which can be linked to cell proliferation and cancer (Wagner and Nebreda 2009). In a recent study, TRIB2 deficiency was shown to accelerate cell proliferation and promote survival in leukemic cells, in addition of leading to impaired MAPK activation (Salome, Magee et al. 2018).

TRIB2 is also known as a putative regulator of cancer-associated signaling and survival through AKT pSer473 modulation (Hill, Madureira et al. 2017). Hence, TRIB2 expression is significantly increased in tumor tissues from patients, correlating with an increased

phosphorylation of AKT, a key signaling protein in cell proliferation, survival and metabolism pathways (Hill, Madureira et al. 2017). Our results have shown a likely correlation between TRIB2 and MAPK signaling in granulosa cells since lack of TRIB2 resulted in decreased phosphorylation of p38MAPK and ERK1/2. Thus, it appears that TRIB2 could function to control granulosa cells proliferation through MAPK modulation and could control an efficient activation of p38MAPK in agreement with previously reported data (Salome, Magee et al. 2018). Importantly, members of p38MAPK family act in a cell context-specific and cell type-specific manner to mediate signals that affect proliferation, differentiation, survival, and migration. This outcome implies that TRIB isoform levels relative to the levels of key partners may dictate tissue-specific effects as was shown for TRIB3 (Kiss-Toth, Bagstaff et al. 2004). However, from this study, inhibition of TRIB2 seem to be associated with GC proliferation while TRIB2 overexpression tended to reduce GC proliferation as shown in the *in vitro* data.

It has also been reported that TRIB2 affects other pathways since TRIB2 knockdown in HepG2 cells inhibited the transcription of CTGF and ANKRD1, known as target genes of the transcriptional coactivator Yes-associated protein (Bhat, Uppada et al.) (Zhao, Ye et al. 2008, Dupont, Morsut et al. 2011). Moreover, TRIB2 was shown to associate with and inhibit the transcriptional activity of CCAAT/enhancer-binding protein alpha (C/EBP α) (Keeshan, He et al. 2006, Dedhia, Keeshan et al. 2010), while overexpression of TRIB2 induces acute myelogenous leukemia in mice through inactivation of C/EBP α (Keeshan, He et al. 2006). We analyzed the expression of *CTGF* and *ANKRD1* in our model using GC and found that *TRIB2* inhibition via CRISPR/Cas9 led to decreased abundance of *CTGF* and *ANKRD1* and that TRIB2 overexpression led to increased expression of *CTGF* and *ANKRD1* in accordance with previously reported data (Keeshan, He et al. 2006, Zhao, Ye et al. 2008, Dedhia, Keeshan et al. 2010, Dupont, Morsut et al. 2011, Grandinetti, Stevens et al. 2011). In addition, FSH inhibited *CTGF* and *ANKRD1* expression confirming previous studies (Harlow, Davidson et al. 2002) and suggesting that FSH would negatively affect these two factors independent of TRIB2. Together, these findings show CTGF and ANKRD1 as effectors downstream of TRIB2 in granulosa cells, likely via YAP as previously reported in other cell models (Harlow, Davidson et al. 2002, Grandinetti, Stevens et al. 2011, Wang, Park et al. 2013).

Findings from this study suggest that TRIB2 could act as a modulator of GC proliferation in accordance with previous studies, which showed Tribbles acting as a proliferation brake by controlling String/CDC25 phosphatase activity (Johnston 2000, Mata, Curado et al. 2000, Seher and Leptin 2000), thereby coordinating mitosis and morphogenesis. Cumulatively, our observations also suggest that TRIB2 would modulate MAPK signaling pathways and provide a link between a proliferative status of granulosa cells and TRIB2 in developing follicles, which may prove relevant for follicular growth and oocyte maturation. Consequently, TRIB2 may play a key role in coordinating GC proliferation and function prior to ovulation. More specifically, TRIB2 might be necessary for efficient activation of MAPK signaling as well as expression of transcription factors in GC of small growing follicles. In dominant follicles, TRIB2 would likely limit GC proliferation and promote instead LH receptors expression, oocyte maturation and initiation of GC differentiation. Following the LH surge, TRIB2 is downregulated for the ovulation and CL formation processes.

Acknowledgments: The authors thank Dr. Jacques G. Lussier for advice and suggestions on this work and for critical comments.

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

III.6. References

- Basatvat, S., D. A. Carter, E. Kiss-Toth, and A. Fazeli. 2015. 'Tribbles role in reproduction', *Biochem Soc Trans*, 43: 1116-21.
- Bedard, J., S. Brule, C. A. Price, D. W. Silversides, and J. G. Lussier. 2003. 'Serine protease inhibitor-E2 (SERPINE2) is differentially expressed in granulosa cells of dominant follicle in cattle', *Mol Reprod Dev*, 64: 152-65.
- Benoit, G., A. Warma, J. G. Lussier, and K. Ndiaye. 2019. 'Gonadotropin regulation of ankyrin-repeat and SOCS-box protein 9 (ASB9) in ovarian follicles and identification of binding partners', *PLoS One*, 14: e0212571.
- Bhat, Ajaz A., Srijayaprakash Uppada, Iman W. Achkar, Sheema Hashem, Santosh K. Yadav, Muralitharan Shanmugakonar, Hamda A. Al-Naemi, Mohammad Haris, and Shahab Uddin. 2019. 'Tight Junction Proteins and Signaling Pathways in Cancer and Inflammation: A Functional Crosstalk', *Frontiers in Physiology*, 9.
- Bradford, M. M. 1976. 'A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding', *Anal Biochem*, 72: 248-54.
- Brisard, D., F. Chesnel, S. Elis, A. Desmarchais, L. Sanchez-Lazo, M. Chasles, V. Maillard, and S. Uzbekova. 2014. 'Tribbles expression in cumulus cells is related to oocyte maturation and fatty acid metabolism', *J Ovarian Res*, 7: 44.
- Brule, S., F. Rabahi, R. Faure, J. F. Beckers, D. W. Silversides, and J. G. Lussier. 2000. 'Vacuolar system-associated protein-60: a protein characterized from bovine granulosa and luteal cells that is associated with intracellular vesicles and related to human 80K-H and murine beta-glucosidase II', *Biol Reprod*, 62: 642-54.
- CCAC. 2009. 'Guidelines on the care and use of farm animals in research, teaching and testing. Ottawa, ON: CCAC.'
- Charlier, C., J. Montfort, O. Chabrol, D. Brisard, T. Nguyen, A. Le Cam, L. Richard-Parpaillon, F. Moreews, P. Pontarotti, S. Uzbekova, F. Chesnel, and J. Bobe. 2012. 'Oocyte-somatic cells interactions, lessons from evolution', *BMC Genomics*, 13: 560.
- Chesnel, F., and J. J. Eppig. 1995. 'Synthesis and accumulation of p34cdc2 and cyclin B in mouse oocytes during acquisition of competence to resume meiosis', *Mol Reprod Dev*, 40: 503-8.
- Crookenden, M. A., C. G. Walker, B. Kuhn-Sherlock, A. Murray, V. S. R. Dukkupati, A. Heiser, and J. R. Roche. 2017. 'Technical note: Evaluation of endogenous control gene expression in bovine neutrophils by reverse-transcription quantitative PCR using microfluidics gene expression arrays', *J Dairy Sci*, 100: 6763-71.
- Das, R., Z. Sebo, L. Pence, and L. L. Dobens. 2014. 'Drosophila tribbles antagonizes insulin signaling-mediated growth and metabolism via interactions with Akt kinase', *PLoS One*, 9: e109530.
- Dedhia, P. H., K. Keeshan, S. Uljon, L. Xu, M. E. Vega, O. Shestova, M. Zaks-Zilberman, C. Romany, S. C. Blacklow, and W. S. Pear. 2010. 'Differential ability of Tribbles family members to promote degradation of C/EBPalpha and induce acute myelogenous leukemia', *Blood*, 116: 1321-8.

- Do, E. K., J. K. Park, H. C. Cheon, Y. W. Kwon, S. C. Heo, E. J. Choi, J. K. Seo, I. H. Jang, S. C. Lee, and J. H. Kim. 2017. 'Trib2 regulates the pluripotency of embryonic stem cells and enhances reprogramming efficiency', *Exp Mol Med*, 49: e401.
- Dobens, L. L., Jr., and S. Bouyain. 2012. 'Developmental roles of tribbles protein family members', *Dev Dyn*, 241: 1239-48.
- Donaubauer, E. M., N. C. Law, and M. E. Hunzicker-Dunn. 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: 19701-12.
- Dugast, E., E. Kiss-Toth, J. P. Soulillou, S. Brouard, and J. Ashton-Chess. 2013. 'The Tribbles-1 protein in humans: roles and functions in health and disease', *Curr Mol Med*, 13: 80-5.
- Dupont, S., L. Morsut, M. Aragona, E. Enzo, S. Giulitti, M. Cordenonsi, F. Zanconato, J. Le Digabel, M. Forcato, S. Bicciato, N. Elvassore, and S. Piccolo. 2011. 'Role of YAP/TAZ in mechanotransduction', *Nature*, 474: 179-83.
- Eder, K., H. Guan, H. Y. Sung, J. Ward, A. Angyal, M. Janas, G. Sarmay, E. Duda, M. Turner, S. K. Dower, S. E. Francis, D. C. Crossman, and E. Kiss-Toth. 2008. 'Tribbles-2 is a novel regulator of inflammatory activation of monocytes', *Int Immunol*, 20: 1543-50.
- Eppig, J. J., K. Wigglesworth, and F. L. Pendola. 2002. 'The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 2890-4.
- Eyers, P. A., K. Keeshan, and N. Kannan. 2017. 'Tribbles in the 21st Century: The Evolving Roles of Tribbles Pseudokinases in Biology and Disease', *Trends Cell Biol*, 27: 284-98.
- Fan, H. Y., Z. Liu, M. Shimada, E. Sterneck, P. F. Johnson, S. M. Hedrick, and J. S. Richards. 2009. 'MAPK3/1 (ERK1/2) in ovarian granulosa cells are essential for female fertility', *Science*, 324: 938-41.
- Fan, H. Y., and Q. Y. Sun. 2004. 'Involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals', *Biol Reprod*, 70: 535-47.
- Fayad, T., V. Levesque, J. Sirois, D. W. Silversides, and J. G. Lussier. 2004. 'Gene expression profiling of differentially expressed genes in granulosa cells of bovine dominant follicles using suppression subtractive hybridization', *Biol Reprod*, 70: 523-33.
- Filion, F., N. Bouchard, A. K. Goff, J. G. Lussier, and J. Sirois. 2001. 'Molecular cloning and induction of bovine prostaglandin E synthase by gonadotropins in ovarian follicles prior to ovulation in vivo', *J Biol Chem*, 276: 34323-30.
- Fortune, J. E., G. M. Rivera, A. C. Evans, and A. M. Turzillo. 2001. 'Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle', *Biol Reprod*, 65: 648-54.
- Fu, D., X. Lv, G. Hua, C. He, J. Dong, S. M. Lele, D. W. Li, Q. Zhai, J. S. Davis, and C. Wang. 2014. 'YAP regulates cell proliferation, migration, and steroidogenesis in adult granulosa cell tumors', *Endocr Relat Cancer*, 21: 297-310.
- Ginther, O. J., M. A. Beg, D. R. Bergfelt, F. X. Donadeu, and K. Kot. 2001. 'Follicle selection in monovular species', *Biol Reprod*, 65: 638-47.
- Grandinetti, K. B., T. A. Stevens, S. Ha, R. J. Salamone, J. R. Walker, J. Zhang, S. Agarwalla, D. G. Tenen, E. C. Peters, and V. A. Reddy. 2011. 'Overexpression of TRIB2 in human lung cancers contributes to tumorigenesis through downregulation of C/EBPalpha', *Oncogene*, 30: 3328-35.

- Guan, H., A. Shuaib, D. D. Leon, A. Angyal, M. Salazar, G. Velasco, M. Holcombe, S. K. Dower, and E. Kiss-Toth. 2016. 'Competition between members of the tribbles pseudokinase protein family shapes their interactions with mitogen activated protein kinase pathways', *Sci Rep*, 6: 32667.
- Harlow, C. R., L. Davidson, K. H. Burns, C. Yan, M. M. Matzuk, and S. G. Hillier. 2002. 'FSH and TGF-beta superfamily members regulate granulosa cell connective tissue growth factor gene expression in vitro and in vivo', *Endocrinology*, 143: 3316-25.
- Hegedus, Z., A. Czibula, and E. Kiss-Toth. 2006. 'Tribbles: novel regulators of cell function; evolutionary aspects', *Cell Mol Life Sci*, 63: 1632-41.
- . 2007. 'Tribbles: a family of kinase-like proteins with potent signalling regulatory function', *Cell Signal*, 19: 238-50.
- Hill, R., P. A. Madureira, B. Ferreira, I. Baptista, S. Machado, L. Colaco, M. Dos Santos, N. Liu, A. Dopazo, S. Ugurel, A. Adrienn, E. Kiss-Toth, M. Isbilen, A. O. Gure, and W. Link. 2017. 'TRIB2 confers resistance to anti-cancer therapy by activating the serine/threonine protein kinase AKT', *Nat Commun*, 8: 14687.
- Johnston, J., S. Basatvat, Z. Ilyas, S. Francis, and E. Kiss-Toth. 2015. 'Tribbles in inflammation', *Biochem Soc Trans*, 43: 1069-74.
- Johnston, L. A. 2000. 'The trouble with tribbles', *Curr Biol*, 10: R502-4.
- Jurtshuk, P., Jr. 1996. 'Bacterial Metabolism.' in th and S. Baron (eds.), *Medical Microbiology* (Galveston (TX)).
- Keeshan, K., Y. He, B. J. Wouters, O. Shestova, L. Xu, H. Sai, C. G. Rodriguez, I. Maillard, J. W. Tobias, P. Valk, M. Carroll, J. C. Aster, R. Delwel, and W. S. Pear. 2006. 'Tribbles homolog 2 inactivates C/EBPalpha and causes acute myelogenous leukemia', *Cancer Cell*, 10: 401-11.
- Kiss-Toth, E., S. M. Bagstaff, H. Y. Sung, V. Jozsa, C. Dempsey, J. C. Caunt, K. M. Oxley, D. H. Wyllie, T. Polgar, M. Harte, A. O'Neill L, E. E. Qwarnstrom, and S. K. Dower. 2004. 'Human tribbles, a protein family controlling mitogen-activated protein kinase cascades', *J Biol Chem*, 279: 42703-8.
- Knight, P. G., and C. Glistler. 2001. 'Potential local regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary', *Reproduction*, 121: 503-12.
- Liang, K. L., C. O'Connor, J. P. Veiga, T. V. McCarthy, and K. Keeshan. 2016. 'TRIB2 regulates normal and stress-induced thymocyte proliferation', *Cell Discov*, 2: 15050.
- Liu, Y. H., K. A. Tan, I. W. Morrison, J. R. Lamb, and D. J. Argyle. 2013. 'Macrophage migration is controlled by Tribbles 1 through the interaction between C/EBPbeta and TNF-alpha', *Vet Immunol Immunopathol*, 155: 67-75.
- Liu, Y. X., Y. Zhang, Y. Y. Li, X. M. Liu, X. X. Wang, C. L. Zhang, C. F. Hao, and S. L. Deng. 2019. 'Regulation of follicular development and differentiation by intra-ovarian factors and endocrine hormones', *Front Biosci (Landmark Ed)*, 24: 983-93.
- Livak, K. J., and T. D. Schmittgen. 2001. 'Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method', *Methods*, 25: 402-8.
- Lohan, F., and K. Keeshan. 2013. 'The functionally diverse roles of tribbles', *Biochem Soc Trans*, 41: 1096-100.

- Lussier, J. G., M. N. Diouf, V. Levesque, J. Sirois, and K. Ndiaye. 2017. 'Gene expression profiling of upregulated mRNAs in granulosa cells of bovine ovulatory follicles following stimulation with hCG', *Reprod Biol Endocrinol*, 15: 88.
- Ma, X., X. Zhou, H. Qu, Y. Ma, Z. Yue, W. Shang, P. Wang, S. Xie, Y. Li, and Y. Sun. 2018. 'TRIB2 knockdown as a regulator of chemotherapy resistance and proliferation via the ERK/STAT3 signaling pathway in human chronic myelogenous leukemia K562/ADM cells', *Oncol Rep*, 39: 1910-18.
- Mata, J., S. Curado, A. Ephrussi, and P. Rorth. 2000. 'Tribbles coordinates mitosis and morphogenesis in *Drosophila* by regulating string/CDC25 proteolysis', *Cell*, 101: 511-22.
- Michalovic, L., L. Currin, K. Gutierrez, A. M. Bellefleur, W. G. Glanzner, Y. Schuermann, M. P. de Macedo, R. C. Bohrer, N. Dicks, R. Lopez, M. Taibi, E. Madogwe, A. St-Yves, R. G. Mondadori, J. Gourdon, C. Vigneault, H. Baldassarre, and V. Bordinon. 2018. 'Granulosa cells of prepubertal cattle respond to gonadotropin signaling and upregulate genes that promote follicular growth and prevent cell apoptosis', *Mol Reprod Dev*, 85: 909-20.
- Nakamura, T. 2015. 'The role of Trib1 in myeloid leukaemogenesis and differentiation', *Biochem Soc Trans*, 43: 1104-7.
- Ndiaye, K., P. D. Carriere, J. Sirois, D. W. Silversides, and J. G. Lussier. 2015. 'Differential expression of lysosome-associated protein transmembrane-4 beta (LAPTM4B) in granulosa cells of ovarian follicles and in other bovine tissues', *J Ovarian Res*, 8: 12.
- Ndiaye, K., A. Castonguay, G. Benoit, D. W. Silversides, and J. G. Lussier. 2016. 'Differential regulation of Janus kinase 3 (JAK3) in bovine preovulatory follicles and identification of JAK3 interacting proteins in granulosa cells', *J Ovarian Res*, 9: 71.
- Ndiaye, K., T. Fayad, D. W. Silversides, J. Sirois, and J. G. Lussier. 2005. 'Identification of downregulated messenger RNAs in bovine granulosa cells of dominant follicles following stimulation with human chorionic gonadotropin', *Biol Reprod*, 73: 324-33.
- O'Shea, J. D., R. J. Rodgers, and M. J. D'Occhio. 1989. 'Cellular composition of the cyclic corpus luteum of the cow', *J Reprod Fertil*, 85: 483-7.
- Peter, A. T., and N. Dhanasekaran. 2003. 'Apoptosis of granulosa cells: a review on the role of MAPK-signalling modules', *Reprod Domest Anim*, 38: 209-13.
- Plewes, M. R., X. Hou, P. Zhang, A. Liang, G. Hua, J. R. Wood, A. S. Cupp, X. Lv, C. Wang, and J. S. Davis. 2019. 'Yes-associated protein 1 is required for proliferation and function of bovine granulosa cells in vitro', *Biol Reprod*, 101: 1001-17.
- Portela, V. M., G. Zamberlam, P. B. Goncalves, J. F. de Oliveira, and C. A. Price. 2011. 'Role of angiotensin II in the periovulatory epidermal growth factor-like cascade in bovine granulosa cells in vitro', *Biol Reprod*, 85: 1167-74.
- Richards, J. S., and M. Ascoli. 2018. 'Endocrine, Paracrine, and Autocrine Signaling Pathways That Regulate Ovulation', *Trends Endocrinol Metab*, 29: 313-25.
- Rosenfeld, C. S., J. S. Wagner, R. M. Roberts, and D. B. Lubahn. 2001. 'Intraovarian actions of oestrogen', *Reproduction*, 122: 215-26.
- Sakai, S., C. Miyajima, C. Uchida, Y. Itoh, H. Hayashi, and Y. Inoue. 2016. 'Tribbles-Related Protein Family Members as Regulators or Substrates of the Ubiquitin-Proteasome System in Cancer Development', *Curr Cancer Drug Targets*, 16: 147-56.

- Salome, M., A. Magee, K. Yalla, S. Chaudhury, E. Sarrou, R. J. Carmody, and K. Keeshan. 2018. 'A Trib2-p38 axis controls myeloid leukaemia cell cycle and stress response signalling', *Cell Death Dis*, 9: 443.
- Sayasith, K., N. Bouchard, M. Dore, and J. Sirois. 2008. 'Regulation of bovine tumor necrosis factor- α -induced protein 6 in ovarian follicles during the ovulatory process and promoter activation in granulosa cells', *Endocrinology*, 149: 6213-25.
- Sayasith, K., J. Sirois, and J. G. Lussier. 2013. 'Expression, regulation, and promoter activation of Vanin-2 (VNN2) in bovine follicles prior to ovulation', *Biol Reprod*, 89: 98.
- Seher, T. C., and M. Leptin. 2000. 'Tribbles, a cell-cycle brake that coordinates proliferation and morphogenesis during *Drosophila* gastrulation', *Curr Biol*, 10: 623-9.
- Shrestha, K., K. Lukasik, A. Baufeld, J. Vanselow, U. Moallem, and R. Meidan. 2015. 'Regulation of ovulatory genes in bovine granulosa cells: lessons from siRNA silencing of PTGS2', *Reproduction*, 149: 21-9.
- Sung, H. Y., S. E. Francis, D. C. Crossman, and E. Kiss-Toth. 2006. 'Regulation of expression and signalling modulator function of mammalian tribbles is cell-type specific', *Immunol Lett*, 104: 171-7.
- Sung, H. Y., H. Guan, A. Czibula, A. R. King, K. Eder, E. Heath, S. K. Suvarna, S. K. Dower, A. G. Wilson, S. E. Francis, D. C. Crossman, and E. Kiss-Toth. 2007. 'Human tribbles-1 controls proliferation and chemotaxis of smooth muscle cells via MAPK signaling pathways', *J Biol Chem*, 282: 18379-87.
- Tamura, M., Y. Nakagawa, H. Shimizu, N. Yamada, T. Miyano, and H. Miyazaki. 2004. 'Cellular functions of mitogen-activated protein kinases and protein tyrosine phosphatases in ovarian granulosa cells', *J Reprod Dev*, 50: 47-55.
- Wagner, E. F., and A. R. Nebreda. 2009. 'Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development', *Nat Rev Cancer*, 9: 537-49.
- Wang, J., J. S. Park, Y. Wei, M. Rajurkar, J. L. Cotton, Q. Fan, B. C. Lewis, H. Ji, and J. Mao. 2013. 'TRIB2 acts downstream of Wnt/TCF in liver cancer cells to regulate YAP and C/EBP α function', *Mol Cell*, 51: 211-25.
- Wei, S. C., I. M. Rosenberg, Z. Cao, A. S. Huett, R. J. Xavier, and D. K. Podolsky. 2012. 'Tribbles 2 (Trib2) is a novel regulator of toll-like receptor 5 signaling', *Inflamm Bowel Dis*, 18: 877-88.
- Wilkin, F., N. Suarez-Huerta, B. Robaye, J. Peetermans, F. Libert, J. E. Dumont, and C. Maenhaut. 1997. 'Characterization of a phosphoprotein whose mRNA is regulated by the mitogenic pathways in dog thyroid cells', *Eur J Biochem*, 248: 660-8.
- Wohlres-Viana, S., E. K. N. Arashiro, T. P. Minare, C. A. C. Fernandes, J. G. V. Grazia, L. G. B. Siqueira, M. A. Machado, and J. H. M. Viana. 2019. 'Differential expression of LHCGR and its isoforms is associated to the variability in superovulation responses of Gir cattle', *Theriogenology*, 126: 68-74.
- Yokoyama, T., Y. Kanno, Y. Yamazaki, T. Takahara, S. Miyata, and T. Nakamura. 2010. 'Trib1 links the MEK1/ERK pathway in myeloid leukemogenesis', *Blood*, 116: 2768-75.
- Yokoyama, T., and T. Nakamura. 2011. 'Tribbles in disease: Signaling pathways important for cellular function and neoplastic transformation', *Cancer Sci*, 102: 1115-22.

Zhao, B., X. Ye, J. Yu, L. Li, W. Li, S. Li, J. Yu, J. D. Lin, C. Y. Wang, A. M. Chinnaiyan, Z. C. Lai, and K. L. Guan. 2008. 'TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control', *Genes Dev*, 22: 1962-71.

Figure legends

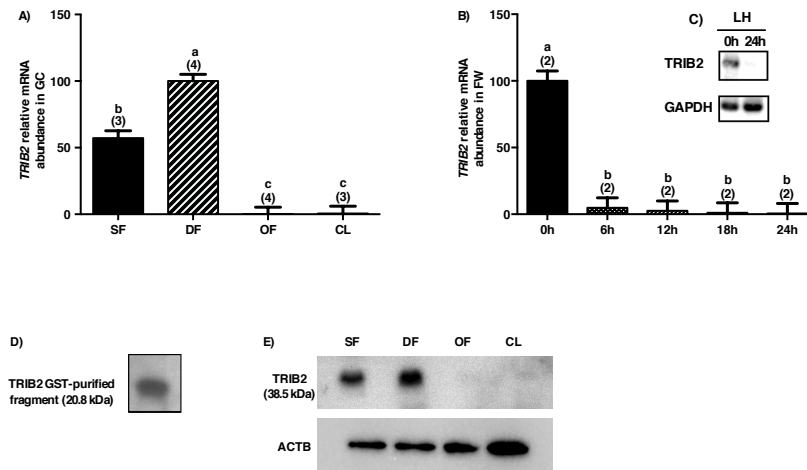


Figure 1. – *TRIB2* mRNA and protein expression and regulation in bovine GC

Total RNA extracts of GC from small follicles (SF), day 5 dominant follicles (DF), ovulatory follicles (OF), and corpus luteum at day 5 (CL) were analyzed by RT-qPCR for *TRIB2* expression with *RPL19* used as reference. A) *TRIB2* mRNA expression was strongest in DF and was significantly decreased in OF and the CL ($P < 0.0001$). In addition, expression of *TRIB2* was significantly increased in DF as compared to SF samples (Fig. 1A; $P < 0.05$). B) *TRIB2* mRNA regulation was analyzed in hCG-induced follicular walls (FW) isolated from OF at 0, 6, 12, 18 and 24 hours (h) post-hCG injection. *TRIB2* mRNA was significantly reduced in FW starting at 6h post-hCG through 24h post-hCG as compared to 0h ($P < 0.0001$). C) Gel analysis of *TRIB2* mRNA regulation by endogenous luteinizing hormone (LH). Similar to hCG, a decrease in *TRIB2* expression was observed 24h after the endogenous LH surge as compared to 0h. RT-qPCR data are presented as normalized *TRIB2* abundance relative to DF $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (A) or to 0h $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (B), and the number of independent samples per group is indicated in parenthesis. Different letters denote

samples that differ significantly. D) A TRIB2 fragment corresponding to amino acids Arg¹⁵⁴ to Thr³³⁷ (Molecular weight = 20.8kDa) located at the carboxy-terminal end of the bovine TRIB2 was used to generate polyclonal anti-TRIB2 antibodies. The polyclonal antibodies recognized the GST-affinity purified recombinant TRIB2 fragment. E) Total protein extracts of GC from SF, DF, OF, and CL were analyzed by western blot using anti-TRIB2 antibodies. The strongest TRIB2 protein expression was observed in the DF while TRIB2 was absent in OF and CL, reflecting its regulation at the mRNA level.

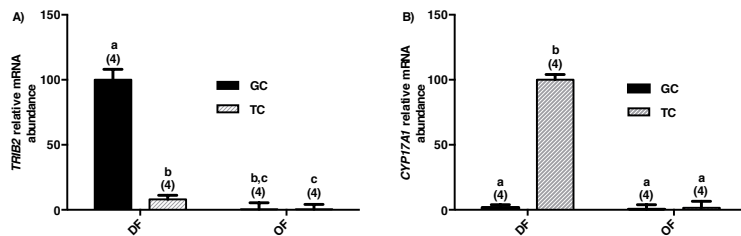


Figure 2. – *TRIB2* mRNA expression and regulation in bovine TC

Total RNA was extracted from theca cells of DF (n = 4) and OF (n = 4) and *TRIB2* mRNA expression was analyzed by RT-qPCR with RPL19 as reference. *CYP17A1* expression was also analyzed as a marker for TC. A) In the DF, *TRIB2* was considerably abundant in GC as compared to TC (P<0.001). In the OF, *TRIB2* was significantly downregulated by hCG in GC and remains weak in TC. *TRIB2* expression was stronger in TC from DF than in TC from OF (P<0.05). B) As TC marker, *CYP17A1* was expressed in TC as compared to GC in the DF samples (P<0.001), while *CYP17A1* was reduced in the OF both in GC and TC. the number of independent samples per group is indicated in parenthesis. Different letters denote samples that differ significantly.

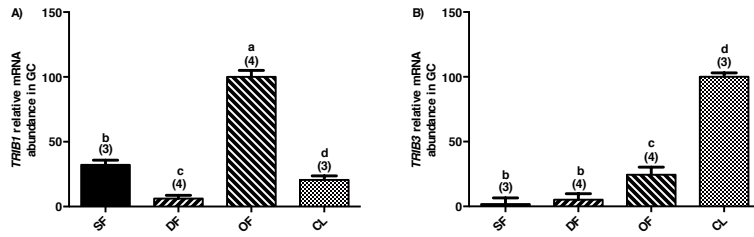


Figure 3. – *TRIB1* and *TRIB3* mRNA expression and regulation in bovine follicles.

Total RNA extracts of GC from SF, DF, OF, and day 5 CL were analyzed by RT-qPCR for *TRIB1* and *TRIB3* with *RPL19* used as reference. A) *TRIB1* mRNA expression was strongest in OF as compared to DF, SF and CL ($P < 0.0001$) and stronger in SF than in DF ($P < 0.05$). B) *TRIB3* expression was significantly stronger in the CL as compared to SF, DF and OF ($P < 0.0001$) and was stronger in the OF as compared to SF and DF ($P < 0.05$). RT-qPCR data are presented as normalized *TRIB1* or *TRIB3* abundance relative to, respectively, OF $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (A) and CL $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (B). The number of independent samples per group is indicated in parenthesis. Different letters denote samples that differ significantly.

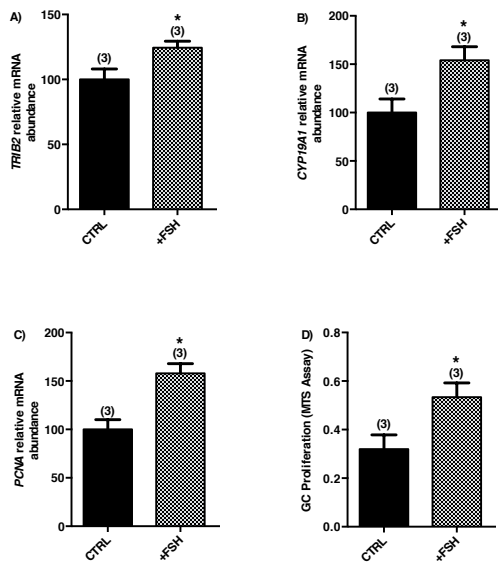


Figure 4. – Effects of FSH on *TRIB2*, *CYP19A1* and *PCNA* mRNA expression and GC proliferation.

A), B) and C) GC were cultured and treated with or without FSH as described under materials and methods. Cells were collected after six days in culture and total RNA was extracted from samples and analyzed by RT-qPCR for *TRIB2*, *CYP19A1* and *PCNA* expression with *RPL19* as reference. FSH stimulated *TRIB2* (A), *CYP19A1* (B) and *PCNA* (C) mRNA expression in GC. RT-qPCR data are presented as gene abundance relative to CTRL $2^{-\Delta\Delta Ct}$. The number of independent samples per group is indicated in parenthesis. *indicates significant difference ($P < 0.05$). D) Bovine GC were collected from follicles and cultured as described under materials and methods. GC were seeded in 96-well plates, incubated at $37^{\circ}\text{C}/5\% \text{CO}_2$, and proliferation was measured using the CellTiter assay kit. The CellTiter substrate was added for 3 hours before measuring absorbance at 490 nm. FSH stimulated GC proliferation ($P < 0.05$). CTRL, control.

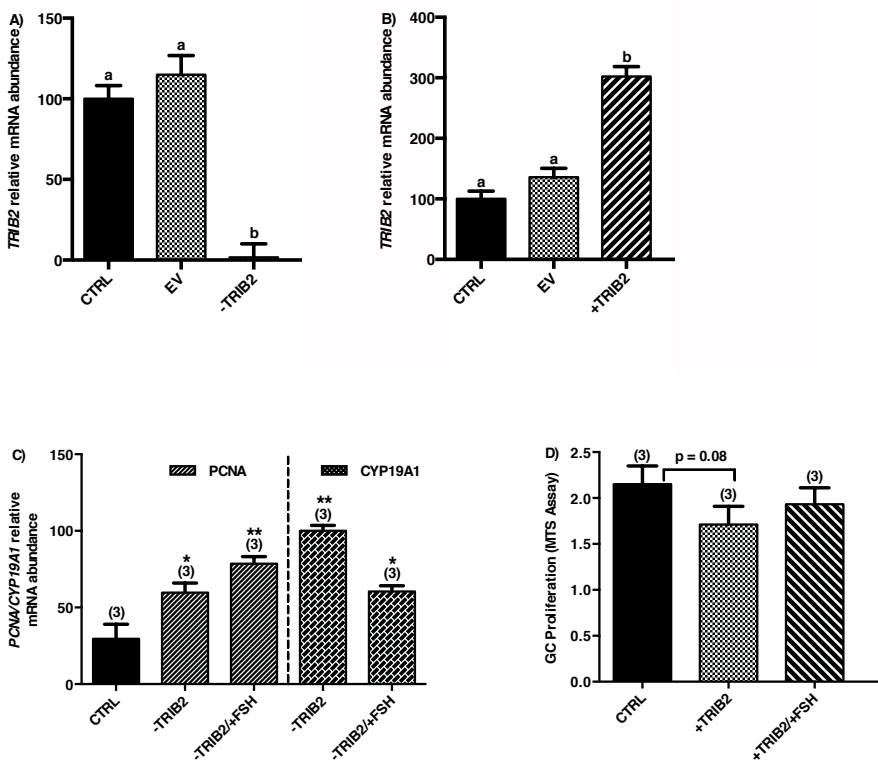


Figure 5. – Effects of TRIB2 inhibition and overexpression.

A) A sgRNA with 96.1% efficiency at directing Cas9-mediated cleavage of *TRIB2* mRNA was identified as described under materials and methods. TRIB2 knock-down was confirmed by RT-qPCR showing that *TRIB2* was significantly reduced in via CRISPR/Cas9 as

compared to the control and empty vector ($P < 0.0001$). B) The pQE-Trisystem was used to overexpress TRIB2 in GC as described under materials and methods. *TRIB2* overexpression in GC was confirmed by RT-qPCR as compared to control and empty vector ($P < 0.01$). C) mRNA expression of *PCNA* and *CYP19A1* in TRIB2-inhibited GC: Total RNA was extracted from cultured GC following CRISPR/Cas9-induced inhibition of TRIB2. Samples were analyzed by RT-qPCR for *PCNA* and *CYP19A1* mRNA expression and relative amounts were normalized with *RPL19*. *PCNA* expression was significantly increased in CRISPR/Cas9-induced inhibition of TRIB2 as compared to the control ($P < 0.05$) and FSH treatment further increased *PCNA* ($P < 0.05$). Steroidogenic gene *CYP19A1* expression was also increased when TRIB2 was inhibited as compared to control ($P < 0.05$), while addition of FSH in TRIB2-inhibited GC led to a reduction in *CYP19A1* expression as compared to TRIB2 inhibition alone. RT-qPCR data are presented as *PCNA* and *CYP19A1* abundance relative to CTRL $2^{-\Delta\Delta Ct}$. The number of independent samples per group is indicated in parenthesis. *indicates significant difference ($P < 0.05$). D) Proliferation assay of GC with TRIB2 overexpression: Bovine GC were cultured in 96-well plates at $37^{\circ}\text{C}/5\% \text{CO}_2$ and transfected with pQE-TRIB2 plasmid construct or the empty vector followed by proliferation measurement using the CellTiter assay kit. The CellTiter substrate was added for 3 hours before measuring absorbance at 490 nm. TRIB2 overexpression tended to decrease GC proliferation ($p = 0.08$). Addition of FSH did not change GC proliferation level when TRIB2 was overexpressed. CTRL, control; EV, empty vector.

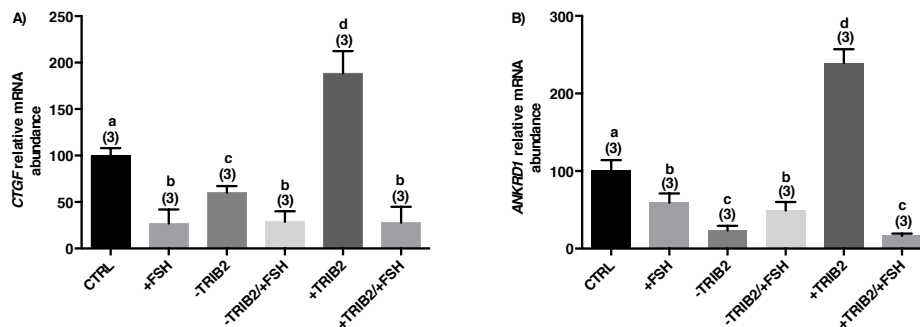


Figure 6. – Effects of TRIB2 inhibition and overexpression on *CTGF* and *ANKRD1* mRNA expression in GC.

Total RNA was extracted from cultured GC following CRISPR/Cas9-induced inhibition of TRIB2 or pQE-driven overexpression of TRIB2 with or without FSH treatment. Samples were analyzed by RT-qPCR for *CTGF* and *ANKRD1* mRNA expression and relative amounts were normalized with *RPL19*. A) *CTGF* expression significantly decreased in CRISPR/Cas9-induced inhibition of TRIB2 as compared to the control while TRIB2 overexpression resulted in increased *CTGF* expression. B) Similar results were observed for *ANKRD1* with decreased amounts in TRIB2-inhibited cells and increased amounts in TRIB2-overexpressed cells. For both *CTGF* and *ANKRD1*, FSH significantly reduced relative mRNA expression even in TRIB2-overexpressed cells. RT-qPCR data are presented as normalized *CTGF* or *ANKRD1* abundance relative to CTRL $2^{-\Delta\Delta Ct}$. The number of independent samples per group is indicated in parenthesis. Different letters denote samples that differ significantly ($P < 0.05$).

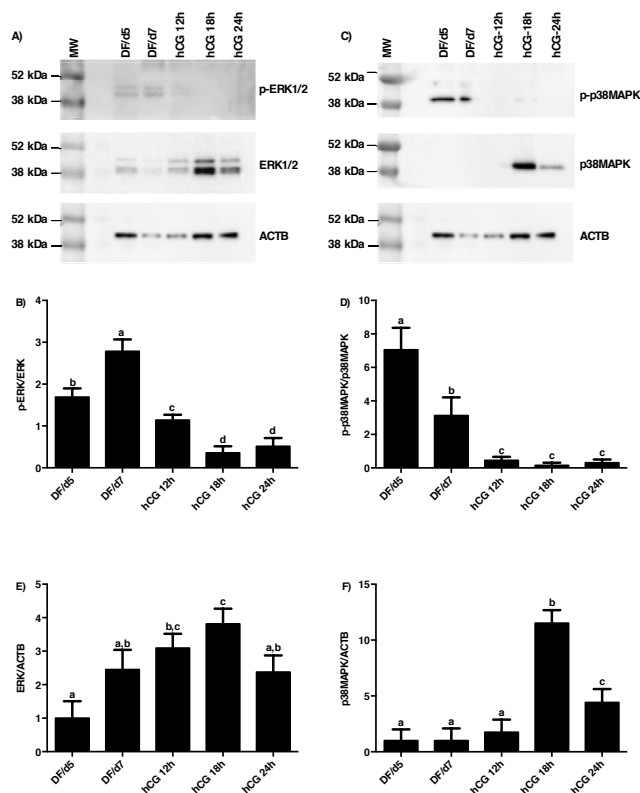


Figure 7. – In vivo analyses of ERK1/2 and p38MAPK phosphorylation levels post-hCG injection.

Total proteins were extracted from granulosa cells of dominant follicles at day 5 (DF/d5), dominant follicles at day 7 (DF/d7) and from granulosa cells 12h (hCG 12), 18h (hCG 18) and 24h (hCG 24)

post-hCG injection. Phosphorylation levels of ERK1/2 measured as ratio of pERK/total ERK (B) and of p38MAPK measured as ratio of p-p38MAPK/total p38MAPK (D) were significantly reduced in hCG-induced GC ($P<0.05$), while total ERK1/2 measured as ERK/ACTB (E) and total p38MAPK measured as p38MAPK/ACTB (F) increased in the same samples ($P<0.05$). Data are mean \pm SEM of two replicates. Different letters denote samples that differ significantly ($P<0.05$). ACTB, beta actin.

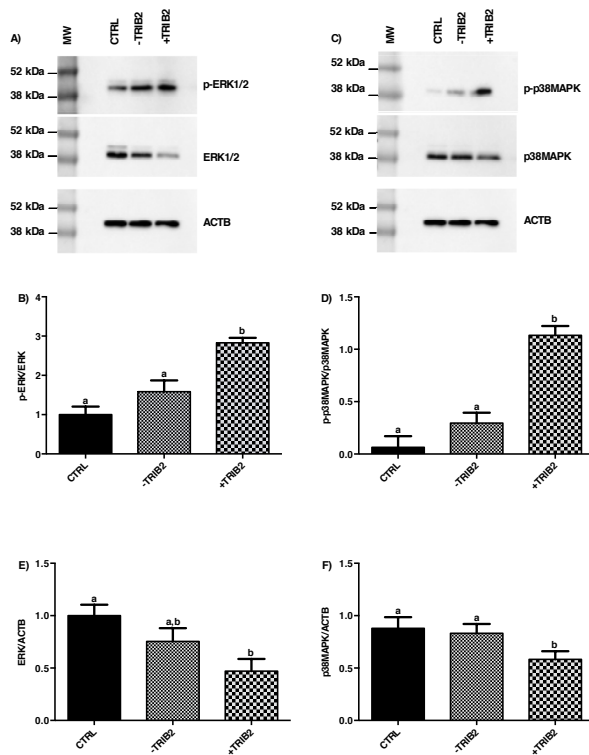


Figure 8. – In vitro analyses of ERK1/2 and p38MAPK phosphorylation levels.

Total proteins were extracted from cultured granulosa cells following CRISPR/Cas9-induced inhibition of TRIB2 or pQE-driven overexpression of TRIB2. Phosphorylation of ERK1/2 (A) and p38MAPK (C) was measured by Western blot analysis. TRIB2 overexpression resulted in markedly increased pERK1/2 (B) and p-p38MAPK (D) levels ($P<0.05$). Concomitantly, total forms of ERK1/2 (E) and p38MAPK (F) decreased in TRIB2-overexpressed GC ($P<0.05$). CTRL, control; ACTB, beta actin.

CHAPITRE IV: DEUXIÈME ARTICLE

Résumé des résultats de l'article 2

Les travaux de cet article ont permis d'identifier et de confirmer CALM1, INHBA, INPPL1, NT5E, SCD, SDHB et RAB14 comme partenaires de liaison de TRIB2 dans les CG. Les analyses RT-PCR ont montré que tous ces partenaires sont présents dans le follicule dominant mais sont régulés différemment au cours du développement folliculaire. L'expression de *INPPL1* et *INHBA* a été diminuée dans les CG suite à l'inhibition de TRIB2 via CRISPR-Cas9 et augmentée suite à la surexpression de TRIB2 ($P < 0,05$) tandis que *NT5E* et *SDHB* ont été augmentés après l'inhibition de TRIB2 ($P < 0,05$). *CALM1* était augmenté après la surexpression de TRIB2 alors que l'expression de *RAB14* a augmenté suite à l'inhibition et la surexpression de TRIB2 ($P < 0,05$). La régulation de ces partenaires par TRIB2 suggère un rôle crucial de TRIB2 dans divers processus biologiques dans les CG et une preuve que TRIB2 pourrait agir en tant que régulateur de gènes effecteurs cibles pendant le développement folliculaire.

Tribbles Pseudokinase 2 (TRIB2) Regulates Expression of Binding Partners in Bovine Granulosa Cells

Aly Warma , Jacques G. Lussier and Kalidou Ndiaye

Contributions des auteurs : Dans le cadre de cet article, j'ai réalisé la collecte, l'analyse et l'interprétation des données ainsi que la rédaction du manuscrit en collaboration avec Kalidou Ndiaye et Jacques G. Lussier. Le résumé de l'approche double hybride (Y2H) utilisée pour identifier les partenaires de TRIB2 se trouve en annexe 1.2

L'article est publié dans la revue *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;
22(4):1533. <https://doi.org/10.3390/ijms22041533>

Tribbles Pseudokinase 2 (TRIB2) Regulates Expression of Binding Partners in Bovine Granulosa Cells

Aly Warma ¹, Jacques G. Lussier ¹ and Kalidou Ndiaye ^{1,*}

¹ Département de Biomédecine Vétérinaire, Centre de Recherche en Reproduction et Fertilité (CRRF), Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, 3200 Rue Sicotte, St-Hyacinthe, QC J2S 2M2, Canada; aly.warma@umontreal.ca (A.W.); jacques.lussier@umontreal.ca (J. G.L.)

* Correspondence: k.ndiaye@umontreal.ca; Tel.: 450-773-8521 (ext. 8287)

Citation: Warma, A.; Lussier, J.G.; Ndiaye, K. Tribbles Pseudokinase 2 (TRIB2) Regulates Expression of Binding Partners in Bovine Granulosa Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Received: 14 January 2021

Accepted: 29 January 2021

Published: 3 February 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

IV.1. Abstract

Members of the Tribbles (TRIBs) family of pseudokinases are critical components of intracellular signal transduction pathways in physiological and pathological processes. TRIBs, including TRIB2, have been previously shown as signaling mediators and scaffolding proteins regulating numerous cellular events such as proliferation, differentiation and cell death through protein stability and activity. However, the signaling network associated with TRIB2 and its binding partners in granulosa cells during ovarian follicular development is not fully defined. We previously reported that TRIB2 is differentially expressed in growing dominant follicles while downregulated in ovulatory follicles following the luteinizing hormone (LH) surge or human chorionic gonadotropin (hCG) injection. In the present study, we used the yeast two-hybrid screening system and *in vitro* coimmunoprecipitation assays to identify and confirm TRIB2 interactions in granulosa cells (GCs) of dominant ovarian follicles (DFs), which yielded individual candidate binding partners including calmodulin 1 (CALM1), inhibin subunit beta A (INHBA), inositol polyphosphate phosphatase-like 1 (INPPL1), 5'-nucleotidase ecto (NT5E), stearyl-CoA desaturase (SCD), succinate dehydrogenase complex iron sulfur subunit B (SDHB) and Ras-associated protein 14 (RAB14). Further analyses showed that all TRIB2 binding partners are expressed in GCs of dominant follicles but are differentially regulated throughout the different stages of follicular development. CRISPR/Cas9-driven inhibition along with pQE-driven overexpression of TRIB2 showed that TRIB2 differently regulates expression of binding partners, which reveals the importance of TRIB2 in the control of gene expression linked to various biological processes such as proliferation, differentiation, cell migration, apoptosis, calcium signaling and metabolism. These data provide a larger view of potential TRIB2-regulated signal transduction pathways in GCs and provide strong evidence that TRIB2 may act as a regulator of target genes during ovarian follicular development.

Keywords: TRIB2; granulosa cells; yeast two-hybrid; INPPL1; INHBA; RAB14; CALM1; NT5E; SCD; CRISPR/Cas9

IV.2. Introduction

The Tribbles family of serine/threonine pseudokinases include TRIB1, TRIB2 and TRIB3, which represent atypical members of the serine/threonine kinase superfamily [1–4] and are homologues of the *Drosophila* pseudokinase “Tribbles” [5,6]. Pseudokinase proteins play critical nonenzymatic roles in the regulation of diverse cellular processes and have been associated with numerous key biological pathways [7]. Although they lack canonical phosphotransferase activity, pseudokinases play important roles as signal transduction mediators and protein scaffolds promoting degradation or stability of their target substrates. Instead of direct phosphorylation of target proteins, Tribbles interact with various signaling molecules and transcription factors and act as adaptors in signaling pathways for important cellular functions and neoplastic transformations [8,9]. Functionally, Tribbles pseudokinases share a PEST domain, which mediates protein degradation in the N-terminal region, a Trib domain that is homologous to protein serine/threonine kinases but lacks a catalytic function, a constitutive photomorphogenesis 1 (COP1) site allowing key proteins to be targeted to the proteasome for degradation, and a MAPK (mitogen-activated protein kinase)/ERK (extracellular signal-regulated kinase) Kinase 1 (MEK1) binding site that modulates MAPK activity [7,10]. The MEK1 and COP1 binding sites located at the C-terminal region facilitate, respectively, TRIB-mediated modulation of the MAPK/ERK signal transduction pathway through increased ERK phosphorylation, and proteasomal degradation by interacting with COP1 E3 ubiquitin ligase [7,11,12]. Tribbles family members can therefore modulate the ubiquitin–proteasome system, thereby stabilizing protein substrates as previously shown with TRIB3 [13]. Specifically, TRIB3 inhibits ubiquitylation and degradation of promyelocytic leukemia protein (PML) in acute promyelocytic leukemia progression by repressing proteasome recruitment and interaction with PML and by inhibiting the ubiquitin proteasome system activity [13]. As for TRIB2 in particular, it was also associated with ERK signaling pathway in ovarian granulosa cells as increased ERK1/2 phosphorylation was observed in TRIB2-overexpressed cells [14].

TRIB2 mRNA was shown to be rapidly induced by mitogens with a short half-life and expressed in a cell-specific manner [1–4]. In *Drosophila*, Tribbles controls string/CDC25 phosphatase that is required for the progression of G2 cell cycle stage into mitosis. Loss of TRIB2 in *Drosophila* is associated with increased proliferation, whereas overexpression slows the cell cycle and alters fertility [5]. Furthermore, TRIB2 binds to and facilitates the degradation of C/EBP- α in a process

proposed to be a key feature of TRIB2-induced acute myelogenous leukemia [15]. TRIB2 as well as other TRIB members control hematopoietic cell development and regulate cellular function via protein interactions and regulation of the activity and degradation of target proteins. Various studies have reported proteins interacting with TRIB2, including COP1 [12], C/EBP α [15], C/EBP β [16], MEK1 [17], MKK7 [2] and AKT1/2 [18]. Moreover, it was shown that TRIB members regulate signal transduction pathways including the Ras-Raf-MEK-ERK MAPK pathway in both normal and malignant cells [19]. These reports indicate that TRIB members are involved in numerous cellular processes, could regulate the expression of target genes in different cell types including reproductive cells and control various cellular processes.

We previously reported the regulation of the expression of Tribbles genes in granulosa cells of ovarian follicles during follicular development [14]. Overall, the expression of genes in the bovine preovulatory follicle assures its growth but abrogates the development of other potentially ovulatory follicles through atresia. During the processes of follicular development and ovulation, steroidogenic cells, including granulosa cells, play a crucial role in the maturation and release of the oocyte with timely production of steroid hormones and growth factors that affect the fate of the ovarian follicle. A proper regulation of granulosa cells activity is therefore crucial in order to sustain follicular and oocyte growth for reproductive success. However, despite the fact that a large number of genes have been identified through the sequencing of the bovine genome, the biological functions and signaling mechanisms of many genes in granulosa cells have still not been fully investigated. In light of this, to identify novel TRIB2 interacting partners in granulosa cells and better understand TRIB2 association with various pathways, we used a yeast two-hybrid (Y2H) system to screen a cDNA library of granulosa cells obtained from dominant follicles. Subsequent manipulations of TRIB2 expression via CRISPR/Cas9 inhibition and pQE overexpression were performed to elucidate the effects of TRIB2 in the regulation of interacting binding partners in granulosa cells identified through the Y2H screening.

IV.3. Materials and Methods

IV.3.1. Experimental Animal Model and *In Vivo* Sample Preparations

The regulation of *TRIB2* expression as well as mRNA of binding partners was studied during follicular development using samples from an *in vivo* model previously characterized [23].

Following estrous synchronization with PGF_{2α}, normal cycling cows were randomly assigned to a dominant follicle group (DF, $n = 4$), or an ovulatory hCG-induced follicle group (OF, $n = 4$). In the DF group, the ovary bearing the DF on the morning of day 5 of the estrous cycle (day 0 = day of estrus) was obtained by ovariectomy. The DF was defined as ≥ 8 mm in diameter and growing, while subordinate follicles were either static or regressing. The OFs were obtained following an injection of 25 mg of PGF_{2α} on day 7 to induce luteolysis, thereby promoting the development of the DF of the first follicular wave into a preovulatory follicle. An ovulatory dose of hCG (3000 IU, iv) was injected 36 h after the induction of luteolysis, and ovaries bearing the hCG-induced OFs were collected by ovariectomy 24 h post-hCG. Immediately following ovariectomy, follicles were dissected into separate isolates of granulosa cells [23] and stored at -70 °C. Additionally, granulosa cells (GCs) were collected from 2 to 4 mm small follicles (SFs), obtained from slaughterhouse ovaries, and a total of three pools of twenty SFs each were prepared. Corpora lutea (CL, $n = 3$) were obtained at day 5 of the estrous cycle and dissected from the ovarian stroma, frozen in liquid nitrogen, and stored at -70 °C. The experimental protocol was reviewed and approved by the Animal Ethics Committee of the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Montreal on July 16, 2018 (project identification code: 18-Rech-1959). Cows were cared for in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines [76].

IV.3.2. *In Vitro* Samples Preparation

4.2.1. Inhibition and Overexpression Experiments.

The CRISPR/Cas9 technology was used through the guide-it CRISPR/Cas9 system (Takara Bio) for the cloning and expression of target single guide RNAs (sgRNAs) for *TRIB2* inhibition in GCs as previously reported [14]. A sgRNA with 96.1% efficiency at directing Cas9-mediated cleavage of *TRIB2* mRNA was identified and used for cloning into the pGuide-it-ZsGreen1 vector for plasmid construct and transfection of GCs using the Xfect transfection kit (Takara Bio, Mountain View, CA, USA) as previously reported [14,77]. GCs were collected from slaughterhouse ovaries and cultured in 24-well plates at a density of 5×10^4 cells in DMEM/F12 supplemented with L-glutamine (2 mM), sodium bicarbonate (0.084%), bovine serum albumin (BSA; 0.1%), HEPES (20 mM), sodium selenite (4 ng/mL), transferrin (5 μ g/mL), insulin (10 ng/mL), nonessential amino acids (1 mM), androstenedione (100 nM), penicillin (100 IU) and streptomycin (0.1 mg/mL) ($n = 3$ independent experiments with duplicate wells for each treatment). Nanoparticle complexes from

the Xfect transfection kit were applied to GCs and incubated for 9 h at 37 °C and then removed and replaced with complete growth medium. Transfected GCs along with control GCs (transfection with empty vector or no transfection) remained in culture for six days with media replacement every two days. Cells were collected for total RNA extraction for RT-qPCR analyses. Additionally, TRIB2 was overexpressed in GCs as previously reported using the pQE-TriSystem His-Strep2 vector (Qiagen, Toronto, Ontario, Canada) [14]. *TRIB2* inhibition and overexpression were confirmed by RT-qPCR. The effects of CRISPR/Cas9-induced *TRIB2* inhibition pQE-driven *TRIB2* overexpression were assessed by analyzing the expression of mRNA of corresponding binding partners: *CALM1*, *INHBA*, *INPPL1*, *NT5E*, *SCD*, *SDHB* and *RAB14*.

IV.3.3. Yeast Two-Hybrid Assay

IV.3.3.1. Material and Media Legend

The materials and media used for the yeast two-hybrid assay have been previously reported [21,77].

4.3.2. *TRIB2* Constructs for Bait Preparation.

A *TRIB2* construct was generated by PCR amplification of bovine *TRIB2* (NM_178317.3) using primers that amplify the entire PEST domain in the N-terminal region and a portion of the Trib domain, which is homologous to protein serine/threonine kinases but lacks a catalytic function. The PCR products were purified and cloned in frame to the GAL4-DNA binding domain into the pGBKT7 vector to produce a bait plasmid using the Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System (Takara Bio, Mountain View, CA, USA) as previously described [80]. The bait plasmid (pGBKT7-*TRIB2*) was used to transform Y2HGold yeast strains and was referred to as Y2HGold[pGBKT7-*TRIB2*]. Appropriate controls to verify toxicity and autoactivation of constructs were conducted as previously reported [21,77].

IV.3.3.2. Generation of GC-cDNA Library and Construction of the Two-Hybrid Prey Library

A bovine granulosa cells cDNA prey library (GC-cDNA) from dominant follicles was prepared in Y187 yeast strain using the pGADT7-Rec vector. cDNAs were expressed as fusion to the GAL4 activating domain using the Matchmaker library construction and screening kit (Takara Bio User manual PT4085-1) as previously described [21]. Total RNA was isolated from GCs of dominant

follicles and used to generate cDNA with Oligo dT (CDSIII) primers. Competent Y187 yeast cells were prepared and co-transformed with pGADT7-Rec plasmid and cDNAs from GCs of dominant follicles. The transformed yeast cells, referred to as Y187(pGADT7-GC) library, were plated, collected after a 5-day incubation at 30 °C and stored as previously reported [21].

IV.3.3.3. Two-Hybrid Library Screening Using Yeast Mating

The screening procedure was performed as previously reported by our laboratory [21]. Briefly, Y2HGold yeast cells carrying the baits plasmids (Y2HGold(pGBKT7-TRIB2)) were mated with Y187 yeast harboring the bovine GC-cDNA library (Y187(pGADT7-GC)). Target prey plasmids responsible for the activation of reporter genes were rescued, isolated and characterized by sequencing. Nucleic acid sequences were verified for the presence of an open reading frame fused in frame to the *GAL4* AD sequence and were compared to those in GenBank to identify binding partners.

IV.3.3.4. Co-IP Confirmation of Protein Interactions

Physical interactions between TRIB2 and candidate partners were confirmed by *in vitro* coimmunoprecipitation assay using the Matchmaker Co-IP system (Takara Bio). Plasmid constructs containing TRIB2 and potential prey partners were used to co-transfect HEK 293 cells using the CalPhos Mammalian transfection kit (Takara Bio) as recommended by the manufacturer. The potential prey partners tested were calmodulin 1 (CALM1), inhibin subunit beta A (INHBA), inositol polyphosphate phosphatase-like 1 (INPPL1), 5'-nucleotidase ecto (NT5E), stearyl-CoA desaturase (SCD), succinate dehydrogenase complex iron sulfur subunit B (SDHB) and member RAS oncogene family (RAB14). Cell lysates were prepared and physical interactions between TRIB2 and prey proteins were validated and quantified using the ProLabel enzyme complementation assay through the ProLabel detection kit II (Takara Bio, cat. # 631629) as per the manufacturer's guidelines. Briefly, lysis/complementation buffer was added to each well to be assayed and a volume of the lysate was transferred to a 96-well plate followed by the addition of the substrate. After incubation for 1 h, luminescent signals were recorded every 5 min for 1 h using a SpectraMax i3 Multi-Mode microplate reader (Molecular Devices). Relative luminescence units were plotted as a function of time in order to quantify the relative importance of protein interactions.

IV.3.3.5. Regulation of TRIB2 Partners during Follicular Development

Expression and regulation of TRIB2 partners during follicular development and following hCG injection was analyzed by RT-qPCR using total RNA extracted from bovine GCs collected from follicles at different developmental stages (SFs, DFs, OFs) and CL. Relative mRNA expressions of *CALM1*, *INHBA*, *INPPL1*, *NT5E*, *SCD*, *SDHB* and *RAB14* were quantified using specific primers (Table 2), and the results were analyzed using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method [78].

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

Gene Names	Primer Sequences (5'–3')*	Accession #	AS (bp)
CALM1	Fwd: AGGAAGCTTTCTCCCTGTTTG; Rv: TCCTCTTCACTGTCGGTGTCT	XM_024997842.1	214
INHBA	Fwd: TTGATATCGGAGAAGGTGGTG; Rv: CCCCCTCCTCTTCTTTCTTCT	XM_024990466.1	190
INPPL1	Fwd: GTGACCATACCCCATGACATC; Rv: GGACGTACTGACATGGCTGAT	NM_001191176.2	207
NT5E	Fwd: GGTCCAGTAAAAAGGCTCCAC; Rv: GTCTCCACCACTGACAAGGAA	NM_174129.4	250
SCD	Fwd: GTGGAGTCACCGAACCTACAA; Rv: GGAACCCTTTTCTTTGACAGC	NM_173959.4	229
SDHB	Fwd: AACTGTGGTCCTATGGTGCTG; Rv: CACATACATGTGTGGCAGAGG	NM_001040483.1	207
RAB14	Fwd: CAAGGAATCTCACCAATCCAA; Rv: AGCCTCAAGGAAAGCATCTTC	NM_001130754.1	179
RPL19	Fwd: GACCAATGAAATCGCCAATGC; Rv: ACCTATACCCATATGCCTGCC	NM_001040516	154

Abbreviations: AS, amplicon size (base pairs); Fwd, forward primer; Rv, reverse primer. * All primers were designed and validated by the authors. Each primer was used at a final concentration of 600nM.

IV.3.3.6. TRIB2 Effects on Expression of Binding Partners

Total RNA from in vitro samples was extracted from GCs at day 6 of culture following CRISPR/Cas9-induced inhibition or pQE1-induced overexpression of TRIB2. Specific *TRIB2* and

TRIB2 binding partner PCR primers were used as presented in Table 2. The relative mRNA expressions of *TRIB2* and other targets were calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [81] with *RPL19* as reference gene.

IV.3.4. Statistical Analysis

Data are presented as mean \pm SEM from three or more independent experiments. Different samples or treatments were compared using one-way analysis of variance (ANOVA). When ANOVA indicated a significant difference ($p < 0.05$), the Tukey–Kramer test was used for multiple comparisons of individual means among SFs, DFs, OFs and CL, and for in vitro experiments. Statistical analyses were performed using Prism software v9 for macOS (GraphPad). RT-qPCR data are presented as normalized amounts of respective genes relative to $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

IV.4. Results

IV.4.1. Yeast Two-Hybrid (Y2H) Screening Revealed Potential TRIB2

Partners in Granulosa

Cells

To identify TRIB2 binding partners in granulosa cells, a Y2H screening was performed. The Y2HGold yeast strain was transformed either with pGBKT7 empty vector as control or the plasmid construct containing TRIB2 (pGBKT7-TRIB2) and was spread on selective media to verify for toxicity and autoactivation analyses. The pGBKT7-TRIB2 construct was not toxic to the Y2HGold yeast strain and TRIB2 did not, by itself, activate the transcription of reporter and selection genes (*AUR-C*, *ADE2*, *HIS3*, and *MEL1*) since no colonies grew when TRIB2 construct was plated in the presence of aureobasidin A antibiotic. Mating of the Y2HGold[pGBKT7-TRIB2] construct with the Y187[pGADT7-GC-cDNA] library resulted in the presence of zygotes, which indicated potential interactions between the bait (TRIB2) and prey proteins contained in the dominant follicle granulosa cells (GCs)-cDNA library. Potential positive yeast colonies were used to test for the presence or absence of a cDNA insert. The presence of a cDNA insert indicated a true positive, suggesting a potential partner for TRIB2, while the absence of an insert indicated a false positive. Plasmids from positive colonies were purified from yeast colonies containing an insert, amplified

by PCR and sequenced. Sequence analyses from the Y2H screening of the dominant follicle GC-cDNA library resulted in the identification of seven TRIB2 binding partners in GCs.

Tableau 2. – List of potential binding partners of Tribbles 2 (TRIB2).

Plasmids were purified from true positive yeast colonies, amplified by PCR and sequenced. Sequences were analyzed for identity and resulted in 7 different proteins potentially interacting with TRIB2.

Partners	Accession #	Freq.	Ident. (%)	E-value	UniProt ID	Description
CALM1	NM_001242572.1	1	99	0.0	P62157	B.T. Calmodulin 1
INHBA **	NM_174363.2	6	99	0.0	P07995	B.T. Inhibin subunit beta A
INPPL1 **	NM_001191176.2	1	99	0.0	E1BBJ7	B.T. Inositol polyphosphate phosphatase-like 1
NT5E	NM_174129.4	1	92	0.0	Q05927	B.T. 5'-nucleotidase ecto
SCD	NM_173959.4	1	99	0.0	Q9TT94	B. T. Stearoyl-CoA desaturase
SDHB	NM_001040483.1	1	99	0.0	Q3T189	B.T. Succinate dehydrogenase complex iron sulfur subunit B
RAB14	NM_001130754.1	1	99	0.0	Q3ZBG1	B.T. RAB14, member RAS oncogene family

Accession number of the best match found following nucleotide sequence comparison via BLAST search in GenBank. Freq., frequency of cDNA clone identification from yeast two-hybrid prey library; Ident. (%), identity: represents homology estimates of bovine prey cDNA fragments with nucleotide sequences in GenBank database; B.T., *Bos taurus*. ** Partners whose physical interactions with TRIB2 were further confirmed by coimmunoprecipitation and Western blotting.

IV.4.2. TRIB2 Physically Interacts with its Binding Partners Identified with Y2H Screening

TRIB2 binding partners identified in this study are calmodulin 1 (CALM1), inhibin subunit beta A (INHBA), inositol polyphosphate phosphatase-like 1 (INPPL1, also known as SH2-containing

inositol 5' -phosphatase 2 (SHIP2)), 5'-nucleotidase ecto (NT5E), stearoyl-CoA desaturase (SCD), succinate dehydrogenase complex iron sulfur subunit B (SDHB), and RAS-associated protein 14 (RAB14). In order to further confirm Y2H results in a mammalian cell model, physical interactions between TRIB2 and candidate partners were analyzed *in vitro* using HEK 293 cells followed by coimmunoprecipitation and ProLabel enzyme complementation assay. Using this assay, relative luminescence signals of TRIB2 interaction with its partners were compared to a reference positive interaction, an experimental control and a negative control. Similar to the positive control, all relative luminescent unit signals of TRIB2 binding partners were significantly increased as compared to the experimental and negative controls, confirming a physical interaction with TRIB2 (Figure 1A). After 60 min of incubation with the substrate, induction of ProLabel enzymatic activity in HEK cells co-transfected with TRIB2 and each TRIB2 partner increased by at least 2.3-fold as compared to the experimental control (Figure 1A). As reference, induction of ProLabel enzymatic activity increased in the positive control by 4.7-fold, by 9.2-fold with INHBA, which displayed the strongest ProLabel activity as a result of interacting with TRIB2 and by 2.3-fold with INPPL1, which induced the weakest ProLabel enzymatic activity as compared to the experimental control.

Further confirmation analyses were performed using co-immunoprecipitation (IP) followed by Western blotting using antibodies against INPPL1 and INHBA. These two partners were chosen based on the complementation assay results showing the weakest and strongest luminescence data for INPPL1 and INHBA, respectively. Following co-transfection of HEK cells with constructs of TRIB2 and either INPPL1 or INHBA, protein extracts were subjected to co-IP with anti-AcGFP antibodies followed by Western blot analyses with anti-INPPL1 or anti-INHBA. The results confirmed the presence of INPPL1 protein migrating at around 50kDa in the sample subjected to co-IP while the protein extracts sample not subjected to co-IP showed the full size of INPPL1 migrating at around 160kDa (Figure 1B, left panel). An additional band at around 100kDa was also observed in the sample subjected to co-IP along with the 50kDa band. This result suggests that INPPL1/SHIP2 could undergo cleavage to generate an active 50kDa form from the 160kDa form either prior or following interaction with TRIB2. A similar 51kDa form of INPPL1/SHIP2 was previously reported and proposed to be the phosphorylated form of INPPL1 [20]. As expected, an empty vector used as negative control did not show any presence of INPPL1 protein expression

(Figure 1B); however, the corpus luteum (CL) used as positive control did not show any INPPL1 protein presence either, although it was shown to express the strongest amount of *INPPL1* mRNA. Likewise, INHBA was observed following Western blotting at around 50kDa in the sample subjected to co-IP as well as in small follicle sample (SF) (Figure 1B, right panel). In the protein extracts sample not subjected to co-IP, INHBA was present at the expected size of 44kDa, while the empty vector showed no INHBA protein (Figure 1B).

IV.4.3. TRIB2 Partners Are Differentially Regulated during Follicular Development

In order to investigate the regulation of TRIB2 binding partners' expressions during follicular development, total RNA extracts of bovine granulosa cells from small follicles (SF), day-5 dominant follicles (DF), ovulatory follicles (OF) isolated 24 h posthuman chorionic gonadotropin (hCG) and day-5 corpora lutea (CL) were analyzed by RT-qPCR for *CALMI*, *INHBA*, *INPPL1*, *NT5E*, *SCD*, *SDHB* and *RAB14* using specific primers. Corresponding mRNA for all partners was present in dominant follicles with varying abundance. *CALMI* expression was strong in SFs, DFs and CL while downregulated in OFs (Figure 2A; $p < 0.05$). *INHBA* expression was strongest in DF and significantly weaker in SF and even so in OF and CL (Figure 2B; $p < 0.01$). *INHBA* expression was still stronger in SF as compared to OF and CL (Figure 2B; $p < 0.05$). This result confirms previously reported data regarding INHBA regulation during follicular development and its importance in follicular growth [21]. There was no significant difference in *INPPL1* expression between SF and DF while *INPPL1* was significantly stronger in OFs and CL as compared to DFs and SFs, displaying a gradual increase from SF through CL (Figure 2C; $p < 0.05$), indicating a possible INPPL1 role in tissue growth and maintenance. There was no significant difference in *INPPL1* expression between OFs and CL (Figure 2C). For *NT5E*, steady-state mRNA expression was significantly stronger in OFs as compared to SFs and DFs (Figure 2D; $p < 0.01$) and to CL (Figure 2D; $p < 0.05$), while *NT5E* was stronger in CL as compared to SFs and DFs (Figure 2D; $p < 0.05$). This result suggests an active involvement of NT5E in the ovulation process or the initiation of granulosa cells differentiation into luteal cells. *SCD* expression was significantly stronger in the DFs than in any other stage of follicular development—namely, in SFs and OFs (Figure 2E; $p < 0.01$) and in the CL (Figure 2E; $p < 0.05$), supporting a role in the growth and maintenance of the dominant follicle. *SCD* downregulation in the OFs post-hCG injection was

followed by a significant increase in the CL, which was also stronger than in the SF (Figure 2E; $p < 0.01$), suggesting *SCD* importance in the function of CL. As for *SDHB*, its expression was stronger in the CL as compared to any stage of follicular development (Figure 2F; $p < 0.05$), while there was no difference among SF, DF and OF samples, suggesting a major role in corpus luteum function as well. *RAB14* increased significantly in DFs and OFs from SFs and decreased in the CL (Figure 2G; $p < 0.05$), indicating a role in the progression of follicular growth and the onset of ovulation. Overall, because these TRIB2 binding partners have been shown previously to have key functions in ovarian development (as detailed in the Discussion, below), their interactions with TRIB2 that we demonstrate here likely reveal a role in mediating TRIB2 regulation of ovarian development.

IV.4.4. Effects of TRIB2 Inhibition and Overexpression on its Binding Partners

To investigate the effects of TRIB2 inhibition and overexpression on its binding partners, total RNA was extracted from cultured granulosa cells at day 6 following CRISPR/Cas9-induced inhibition or pQE-induced overexpression of TRIB2. Inhibition and overexpression of TRIB2 were confirmed by RT-qPCR. The results confirmed TRIB2 downregulation via CRISPR/Cas9 (Figure 3A; $p < 0.01$), while TRIB2 was overexpressed using the pQE system (Figure 3B; $P < 0.01$). These data confirming TRIB2 inhibition and overexpression in our model were previously published [14]. Subsequent analyses demonstrated that TRIB2 inhibition did not change *CALM1* abundance while TRIB2 overexpression resulted in significant increase in *CALM1* abundance (Figure 4A; $p < 0.01$). For *INHBA* (Figure 4B) and *INPPL1* (Figure 4C), TRIB2 inhibition led to similar downregulation of their expression ($p < 0.05$). In contrast, TRIB2 overexpression resulted in increased expression of both *INHBA* (Figure 4B; $p < 0.05$) and *INPPL1* (Figure 4C; $p < 0.01$) suggesting a strong TRIB2 modulatory role on these binding partners. TRIB2 inhibition had a positive effect on *NT5E* (Figure 4D; $p < 0.05$) and *SDHB* (Figure 4F; $p < 0.001$) expression; however, there was no significant effect of TRIB2 overexpression in *NT5E* and *SDHB* relative abundance. As for *SCD* (Figure 4E), there was no effect either way following TRIB2 inhibition and overexpression. Finally, *RAB14* displayed a surprising result as both inhibition and overexpression of TRIB2 resulted in increased expression of *RAB14* (Figure 4G).

IV.5. Discussion

Tribbles pseudokinases act as scaffold proteins, which can bind their substrates and localize them to or from their functions [22]. Moreover, Tribbles gene expression was shown to be tissue- and cell-specific [3]. We previously reported the regulation of Tribbles genes expression in GCs of ovarian follicles during follicular development [23]. Further, our recent published data provided evidence that TRIB2 is a regulator of GC proliferation and that it could affect steroidogenesis and MAPK signaling pathways in these reproductive cells [14]. The current study describes, for the first time to our knowledge, TRIB2 protein interactions in granulosa cells using yeast two-hybrid screening and the effects of TRIB2 on binding partners regulation in the reproductive system using granulosa cells from ovarian follicles. These observations indicate that TRIB2 might be associated with controlling the activity of target genes involved in the growth and/or maintenance of the dominant follicle immediately prior to the ovulatory stage and ovulation. Moreover, the interactions between TRIB2 and binding partners could lead to various events including degradation or activation of target proteins resulting in gene expression changes and possibly contributing to follicular growth, differentiation of steroidogenic cells into luteal cells after ovulation and function of the corpus luteum.

We identified seven individual partners for TRIB2 in bovine granulosa cells and confirmed the interactions by *in vitro* coimmunoprecipitation followed by ProLabel enzymatic complementation assay and Western blotting. Among TRIB2 partners in GCs, INHBA is known to be expressed in dominant follicles and participates actively in the establishment of the dominant or preovulatory follicles. We showed that INHBA interacts with TRIB2 in granulosa cells and its expression was significantly decreased in TRIB2-inhibited GCs while significantly increased in TRIB2-overexpressed GCs. Previous studies showed greatest expression for *INHBA* in estrogen active follicles [24,25] and an increase in activin-A protein secreted in follicular fluid [26]. Activin promotes granulosa cells proliferation and steroidogenesis and potentiates follicle-stimulating hormone (FSH) actions on granulosa cells by increasing *FSH receptor* expression [27,28], which underscores a key role for activin-A in the dominant follicle's development. Our data confirmed expression of *INHBA* mRNA in dominant follicles, in agreement with already published data. The interaction between TRIB2 and INHBA could participate in the activity of granulosa cells and in

the growth of the dominant follicles into the ovulatory stage, prior to the luteinizing hormone (LH) surge.

Another TRIB2 binding partner, Inositol polyphosphate phosphatase-like 1 (INPPL1), also known as SH2-containing inositol 5'-phosphatase 2 (SHIP2), is a negative regulator of insulin signaling since its inactivation in mice resulted in increased insulin sensitivity [29] in addition of mediating obesity resistance [30]. INPPL1/SHIP2 expression has been shown in cells of hematopoiesis origins as well as in spermatids of adult mice testis, suggesting a role in maintenance of hematopoietic lineage and spermatogenesis [31]. In our study, INPPL1 was expressed in granulosa cells of dominant follicles but was stronger in ovulatory follicles and even stronger in the corpus luteum, suggesting that INPPL1 could participate in the transition from dominant to preovulatory follicle and through the ovulation process to luteinization. These observations regarding INPPL1 expression and regulation throughout follicular growth and corpus luteum formation could also support a role for INPPL1 in tissue maintenance and development. INPPL1 expression was previously shown to be enhanced in cultured dog thyroid cells by thyroid-stimulating hormone and epidermal growth factor (EGF) [32]. Similarly, TRIB2 was shown to be induced by TSH as well in dog thyroid cells [1,33] suggesting a link between INPPL1 and TRIB2. We showed here that INPPL1 interacts with TRIB2 in granulosa cells and its expression was significantly decreased in TRIB2-inhibited GCs and significantly increased in TRIB2-overexpressed GCs.

INPPL1 has been suggested to act downstream of phosphoinositide-3' kinase (PI3K), which is a significant component of intracellular signaling mechanisms [34]. PI3K phosphorylates phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate to generate phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP3), which then activates several cellular enzymes, including protein kinase Akt, to regulate cell growth and survival [35]. INPPL1 is able to dephosphorylate the 5-position of PIP3 generated by the PI3-kinase, producing a new second messenger PI-3,4-bisphosphate (PI-3,4-P2) [36]. Irregular expression of INPPL1 may then disrupt the normal PI3K/Akt pathway, which has an important function in controlling cell proliferation and cell death as well as tumor development and progression [37]. Other studies have demonstrated a positive role of INPPL1 in EGF-induced Akt activation and cell migration in breast cancer cells [38]. Earlier studies indicated a positive association between INPPL1/SHIP2 expression and cell proliferation where EGF increases INPPL1 mRNA expression in thyrocytes [32]. In addition, INPPL1 protein expression correlates

with the EGFR expression in proliferating neurospheres involved in the EGF signaling pathway [39]. Overall, these observations combined with our findings support a role of INPPL1 as an effector downstream of TRIB2 in granulosa cells and that the interaction between TRIB2 and INPPL1 could play an important role in granulosa cells proliferation and participate in the growth of the dominant follicle into the ovulatory stage.

Calcium signaling activator calmodulin 1 (CALM1), another partner of TRIB2 in granulosa cells, is a ubiquitous Ca^{2+} receptor protein mediating a large number of signaling processes such as nerve growth, proliferation, inflammation, apoptosis, muscle contraction and intracellular movement in eukaryotic cells [40–43]. Upon binding of four Ca^{2+} ions, calmodulin undergoes conformational changes, allowing this complex to bind to and activate many enzymes including protein kinases, protein phosphatases, ion channels, Ca^{2+} pumps, nitric oxide synthase, inositol triphosphate kinase and cyclic nucleotide phosphodiesterase [44,45]. Since calmodulin binds Ca^{2+} in a cooperative fashion, small changes in cytosolic Ca^{2+} levels lead to large changes in the level of active calmodulin and its target proteins [46]. Of interest, CALM1 was shown to negatively regulate Ras activation and is therefore essential in the downregulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway following its activation [45]. Further, inhibition of calmodulin was shown to participate in inducing ERK activation [47]. The interaction shown here between CALM1 and TRIB2 could play a key role in modulating CALM1 effect in the Ras/ERK signaling pathway, which can affect proliferation of granulosa cells of the dominant follicle.

CALM1 expression was shown to be associated with ovarian cell survival while negatively affecting caspase-3 activation and apoptosis in patients with PCOS [48]. We have shown in this study that CALM1 expression is strong in granulosa cells of small follicles and in the growing dominant follicle, while it was downregulated by the luteinizing hormone in ovulatory follicles prior to ovulation. This result is consistent with previous studies and suggests a role of CALM1 in the proliferation of granulosa cells and follicular growth. We also showed that *CALM1* expression was significantly increased in TRIB2-overexpressed GCs, supporting the hypothesis of CALM1 playing an important role in the activity of granulosa cells and in the growth of the dominant follicle in the ovulatory stage. Our data showed that *CALM1* was also abundantly expressed in the corpus luteum, similar to the stages of small and dominant follicles, suggesting a role in the differentiation of steroidogenic cells into luteal cells and in luteal function. This is supported by the fact that

CALM1 was associated with the differentiation of osteoblasts and its downregulation resulted in the suppression of human osteoclasts differentiation [49,50]. Osteoclast differentiation was also induced through the activation of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinases (CaMKs) following receptor activation by NF-kappaB ligand [51]. However, the exact mechanism and effect of CALM1 in granulosa cells following interaction with TRIB2 remains to be further investigated. Ecto-5'-nucleotidase (NT5E) is a surface enzyme that is expressed on multiple cells [52]. It is primarily responsible for the dephosphorylation of extracellular adenosine monophosphate (AMP) released by distressed cells into adenosine, an important activator of Ras/Raf/ERK/MAPK and PI3K/Akt pathways [53]. Adenosine plays a major role in cell growth and proliferation [54], and apoptosis [55,56]. Our data demonstrated the expression of NT5E was significantly induced in the ovulatory follicles post-hCG, while its expression was minimal in early stages and preovulatory follicles, suggesting that NT5E might be induced by the LH surge and is likely involved in the ovulation process. NT5E was also observed in dominant follicles, although in much weaker amounts as compared to the ovulatory follicles and the corpus luteum, supporting the idea of a more significant role in the ovulation process, differentiation and luteal formation than in follicular growth. Since TRIB2 inhibition in cultured granulosa cells resulted in a significant increase in *NT5E*, it might indicate that TRIB2 negatively modulates NT5E, which would be consistent with a weak expression of *NT5E* in dominant follicles where TRIB2 is strongly expressed, in contrast with a strong expression of *NT5E* in ovulatory follicles where *TRIB2* expression was shown to be weak [14]. Further analyses would elucidate the mechanisms and signaling cascade affected by TRIB2 interaction with NT5E.

Stearoyl-coenzyme A desaturase (SCD), also named delta 9 desaturase, is a key lipogenic enzyme found in the endoplasmic reticulum and a rate-limiting enzyme in the biosynthesis of monounsaturated fatty acids from saturated fatty acids [57,58]. Saturated free fatty acids have a dose-dependent negative impact on oocyte developmental competence, while monounsaturated free fatty acids appear less harmful [59]. It was demonstrated that SCD inhibition in the presence of stearic acid significantly reduced the developmental competence of oocytes and increased the incidence of apoptosis in bovine cumulus cells [59]. It was also reported that cumulus cells can desaturate the potentially toxic stearic acid into oleic acid via SCD activity, providing a mechanistic insight into how the cumulus cells protect the oocyte against toxicity by saturated fatty acids [59].

Furthermore, it is known that the MAPK3/MAP1 and PIK3R1/Akt pathways are involved, respectively, in the IGF1- and FSH-induced SCD2 expression in rat ovary and that SCD2 can be involved in the regulation of follicular growth and/or oocyte maturation [60]. These reports are very much consistent with our findings that SCD is strongly expressed in the growing dominant follicle, which corroborates observations in our previous study [23] and are consistent with the status of the dominant follicle characterized by modifications necessary for oocyte growth and maturation. In contrast, SCD expression was abrogated in ovulatory follicles and upregulated in the corpus luteum, providing strong evidence of SCD involvement in follicular growth and corpus luteum formation and function. However, TRIB2 manipulations in cultured granulosa cells did not have any effects on SCD expression, suggesting that additional analyses are required to better define the pathways and biological processes affected by TRIB2 interaction with SCD in granulosa cells.

Finally, Ras-associated protein 14 (RAB14) was also identified as a binding partner of TRIB2 in the Y2H screening. RAB14 is a member of the RAS oncogene superfamily of small G-proteins involved in intracellular membrane trafficking and signal transduction [61]. RAB proteins are inactive when bound to GDP but turn to an active form when bound to GTP. Activated RAB proteins recruit effector proteins to the vesicle membrane and promote membrane trafficking [61]. The ability to switch between the GDP-bound inactive state and the GTP-bound active state allows the RAB proteins to function as cargo carriers to recruit or release molecules onto membranes in a specific compartment. More specifically, RAB14 is involved in membrane trafficking between the Golgi complex and endosomes and regulates apical targeting in polarized epithelial cells [62] as it interacts specifically with some apical targeting proteins [63]. Moreover, the family of RAB proteins plays numerous roles during development and progression of cancers [64–67]. RAB14, in particular, was associated with aggressiveness of ovarian cancer cells since it promoted cell proliferation through the Wnt signaling pathway [68].

It was shown that RAB14 interacts with cellular communication network factor 2/CCN family 2 (CCN2)/connective tissue growth factor (CTGF) through its IGFBP-like domain, indicating a regulation of intracellular membrane trafficking [69] since CCN2 is involved in many cellular functions including proliferation and differentiation of various types of cells [70–72]. RAB14 overexpression was also associated with increased growth rate, cell invasion and cell cycle

progression, while also increasing expression of cyclins involved in cell cycle progression such as cyclins D and E and CTGF in cell lung cancers [73]. It was proposed that RAB14 increased proliferation and invasion through the Yes-associated protein pathway [73]. Similarly, TRIB2 was also shown to affect CTGF since TRIB2 knockdown in HepG2 cells inhibited CTGF, which is known as a target gene of YAP [74,75]. In line with these findings, we previously demonstrated increased CTGF expression in TRIB2-overexpressed granulosa cells, while TRIB2 inhibition resulted in CTGF downregulation [14], suggesting that TRIB2 could regulate different cellular processes through target effectors and binding partners, such as RAB14, and affecting downstream signaling pathways including the YAP pathway.

Furthermore, our data showed expression of RAB14 in granulosa cells of ovarian follicles throughout follicular development, with the strongest expression observed in the stages of dominant and ovulatory follicles, which suggests that RAB14 might be associated with the growth and maintenance of the dominant follicle and involved in the transition to the ovulatory stages. Surprisingly, both TRIB2 inhibition and overexpression in granulosa cells resulted in significant increases in *RAB14* expression, which could be related to the RAB family's ability to switch between an inactive and active states and to their numerous roles in developing tissues. It is also conceivable that TRIB2 levels relative to the levels of this key partner may dictate tissue-specific effects as was shown for TRIB3, another Tribbles member [2]. Nonetheless, we provide evidence here that RAB14 interacts with TRIB2 and may play an important role in follicular development and ovulation in a pathway likely involving the YAP pathway, as previously suggested [73].

IV.6. Conclusion

We have identified TRIB2 interactions in granulosa cells of dominant follicles and demonstrated the effects of TRIB2 on its binding partners through manipulations of TRIB2 expression in cultured granulosa cells. Overall, the data reported here provide evidence that TRIB2 could regulate the expression of target genes and signaling pathways linked to cell proliferation and growth. Although the mechanisms by which TRIB2 regulate expression of binding partners was not elucidated in this study, the current findings serve as the basis for future studies targeting granulosa cells regulation during the preovulatory stage by using TRIB2-inhibited and -overexpressed granulosa cells to

identify pathways affected by TRIB2 and decipher their relevance in follicular development and activity of granulosa cells.

Author Contributions: Investigation, A.W., J.G.L. and K.N.; Visualization, A.W. and J.G.L.; Validation, A.W., J.G.L. and K.N.; formal analysis, A.W. and K.N.; Writing—Original Draft preparation, A.W. and J.G.L.; Methodology, A.W., J.G.L. and K.N.; Conceptualization, K.N.; Resources, K.N.; Writing—Review and Editing, K.N.; Supervision, K.N.; Project Administration, K.N.; Funding Acquisition, K.N. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by a Discovery Grant (#RGPIN/2018-04516) from Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to KN (April 1, 2018). The funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Institutional Review Board Statement: The experimental protocol was reviewed and approved by the Animal Ethics Committee of the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Montreal on July 16, 2018 (protocol approval number: 18-Rech-1959) and the cows were cared for in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: All data pertinent to this work are contained in the article or available upon request. For all requests, please contact Kalidou Ndiaye (k.ndiaye@umontreal.ca).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

IV.7. References

1. Wilkin, F.; Suarez-Huerta, N.; Robaye, B.; Peetermans, J.; Libert, F.; Dumont, J.E.; Maenhaut, C. Characterization of a phosphoprotein whose mRNA is regulated by the mitogenic pathways in dog thyroid cells. *Eur. J. Biochem. FEBS* 1997, *248*, 660–668, PMID:9342215.
2. Kiss-Toth, E.; Bagstaff, S.M.; Sung, H.Y.; Jozsa, V.; Dempsey, C.; Caunt, J.C.; Oxley, K.M.; Wyllie, D.H.; Polgar, T.; Harte, M.; et al. Human tribbles, a protein family controlling

- mitogen-activated protein kinase cascades. *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 42703–42708, doi:10.1074/jbc.M407732200, PMID:15299019.
3. Sung, H.Y.; Francis, S.E.; Crossman, D.C.; Kiss-Toth, E. Regulation of expression and signalling modulator function of mammalian tribbles is cell-type specific. *Immunol. Lett.* 2006, 104, 171–177, doi:10.1016/j.imlet.2005.11.010, PMID:16364454.
 4. Hegedus, Z.; Czibula, A.; Kiss-Toth, E. Tribbles: A family of kinase-like proteins with potent signalling regulatory function. *Cell. Signal.* 2007, 19, 238–250, doi:10.1016/j.cellsig.2006.06.010, PMID:16963228.
 5. Mata, J.; Curado, S.; Ephrussi, A.; Rorth, P. Tribbles coordinates mitosis and morphogenesis in *Drosophila* by regulating string/CDC25 proteolysis. *Cell* 2000, 101, 511–522, PMID:10850493.
 6. Seher, T.C.; Leptin, M. Tribbles, a cell-cycle brake that coordinates proliferation and morphogenesis during *Drosophila* gastrulation. *Curr. Biol. Cb* 2000, 10, 623–629, PMID:10837248.
 7. Richmond, L.; Keeshan, K. Pseudokinases: A tribble-edged sword. *FEBS J.* 2020, 287, 4170–4182, doi:10.1111/febs.15096, PMID:31621188.
 8. Yokoyama, T.; Nakamura, T. Tribbles in disease: Signaling pathways important for cellular function and neoplastic transformation. *Cancer Sci.* 2011, 102, 1115–1122, doi:10.1111/j.1349-7006.2011.01914.x, PMID:21338441.
 9. Wei, S.-C.; Rosenberg, I.M.; Cao, Z.; Huett, A.S.; Xavier, R.J.; Podolsky, D.K. Tribbles 2 (Trib2) is a novel regulator of toll-like receptor 5 signaling. *Inflamm. Bowel Dis.* 2012, 18, 877–888, doi:10.1002/ibd.22883, PMID:22271508.
 10. Dobens, L.L., Jr.; Bouyain, S. Developmental roles of tribbles protein family members. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 2012, 241, 1239–1248, doi:10.1002/dvdy.23822, PMID:22711497.
 11. Yokoyama, T.; Kanno, Y.; Yamazaki, Y.; Takahara, T.; Miyata, S.; Nakamura, T. Trib1 links the MEK1/ERK pathway in myeloid leukemogenesis. *Blood* 2010, 116, 2768–2775, doi:10.1182/blood-2009-10-246264, PMID:20610816.
 12. Keeshan, K.; Bailis, W.; Dedhia, P.H.; Vega, M.E.; Shestova, O.; Xu, L.; Toscano, K.; Uljon, S.N.; Blacklow, S.C.; Pear, W.S. Transformation by Tribbles homolog 2 (Trib2) requires both

- the Trib2 kinase domain and COP1 binding. *Blood* 2010, *116*, 4948–4957, doi:10.1182/blood-2009-10-247361, PMID:20805362.
13. Li, K.; Wang, F.; Cao, W.B.; Lv, X.X.; Hua, F.; Cui, B.; Yu, J.J.; Zhang, X.W.; Shang, S.; Liu, S.S.; et al. TRIB3 Promotes APL Progression through Stabilization of the Oncoprotein PML-RARalpha and Inhibition of p53-Mediated Senescence. *Cancer Cell* 2017, *31*, 697–710 e697, doi:10.1016/j.ccell.2017.04.006, PMID:28486108.
 14. Warma, A.; Ndiaye, K. Functional effects of Tribbles homolog 2 in bovine ovarian granulosa cells dagger. *Biol. Reprod.* 2020, *102*, 1177–1190, doi:10.1093/biolre/ioaa030, PMID:32159216.
 15. Keeshan, K.; He, Y.; Wouters, B.J.; Shestova, O.; Xu, L.; Sai, H.; Rodriguez, C.G.; Maillard, I.; Tobias, J.W.; Valk, P.; et al. Tribbles homolog 2 inactivates C/EBPalpha and causes acute myelogenous leukemia. *Cancer Cell* 2006, *10*, 401–411, doi:10.1016/j.ccr.2006.09.012, PMID:17097562.
 16. Naiki, T.; Saijou, E.; Miyaoka, Y.; Sekine, K.; Miyajima, A. TRB2, a mouse Tribbles ortholog, suppresses adipocyte differentiation by inhibiting AKT and C/EBPβ. *J. Biol. Chem.* 2007, *282*, 24075–24082.
 17. Eder, K.; Guan, H.; Sung, H.Y.; Ward, J.; Angyal, A.; Janas, M.; Sarmay, G.; Duda, E.; Turner, M.; Dower, S.K.; et al. Tribbles-2 is a novel regulator of inflammatory activation of monocytes. *Int. Immunol.* 2008, *20*, 1543–1550, doi:10.1093/intimm/dxn116, PMID:18952906.
 18. Du, K.; Herzig, S.; Kulkarni, R.N.; Montminy, M. TRB3: A tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver. *Science* 2003, *300*, 1574–1577, doi:10.1126/science.1079817, PMID:12791994.
 19. Kim, E.K.; Choi, E.J. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim. Biophys. Acta* 2010, *1802*, 396–405, doi:10.1016/j.bbadis.2009.12.009, PMID:20079433.
 20. Habib, T.; Hejna, J.A.; Moses, R.E.; Decker, S.J. Growth factors and insulin stimulate tyrosine phosphorylation of the 51C/SHIP2 protein. *J. Biol. Chem.* 1998, *273*, 18605–18609, doi:10.1074/jbc.273.29.18605, PMID:9660833.

21. Sakai, S.; Miyajima, C.; Uchida, C.; Itoh, Y.; Hayashi, H.; Inoue, Y. Tribbles-related protein family members as regulators or substrates of the ubiquitin-proteasome system in cancer development. *Curr. Cancer Drug Targets* 2016, *16*, 147–156.
22. Ndiaye, K.; Fayad, T.; Silversides, D.W.; Sirois, J.; Lussier, J.G. Identification of downregulated messenger RNAs in bovine granulosa cells of dominant follicles following stimulation with human chorionic gonadotropin. *Biol. Reprod.* 2005, *73*, 324–333, doi:10.1095/biolreprod.104.038026, PMID:15829623.
23. Fayad, T.; Lévesque, V.; Sirois, J.; Silversides, D.W.; Lussier, J.G. Gene expression profiling of differentially expressed genes in granulosa cells of bovine dominant follicles using suppression subtractive hybridization. *Biol. Reprod.* 2004, *70*, 523–533.
24. Sisco, B.; Hagemann, L.J.; Shelling, A.N.; Pfeffer, P.L. Isolation of genes differentially expressed in dominant and subordinate bovine follicles. *Endocrinology* 2003, *144*, 3904–3913, doi:10.1210/en.2003-0485, PMID:12933664.
25. Ginther, O.J.; Beg, M.A.; Bergfelt, D.R.; Kot, K. Activin A, estradiol, and free insulin-like growth factor I in follicular fluid preceding the experimental assumption of follicle dominance in cattle. *Biol. Reprod.* 2002, *67*, 14–19, PMID:12079994.
26. Hasegawa, Y.; Miyamoto, K.; Abe, Y.; Nakamura, T.; Sugino, H.; Eto, Y.; Shibai, H.; Igarashi, M. Induction of follicle stimulating hormone receptor by erythroid differentiation factor on rat granulosa cell. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988, *156*, 668–674, doi:10.1016/S0006-291X(88)80894-5.
27. Xiao, S.; Robertson, D.M.; Findlay, J.K. Effects of activin and follicle-stimulating hormone (FSH)-suppressing protein/follistatin on FSH receptors and differentiation of cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 1992, *131*, 1009–1016, doi:10.1210/endo.131.3.1505447, PMID:1505447.
28. Clement, S.; Krause, U.; Desmedt, F.; Tanti, J.F.; Behrends, J.; Pesesse, X.; Sasaki, T.; Penninger, J.; Doherty, M.; Malaisse, W.; et al. The lipid phosphatase SHIP2 controls insulin sensitivity. *Nature* 2001, *409*, 92–97, doi:10.1038/35051094, PMID:11343120.
29. Sleeman, M.W.; Wortley, K.E.; Lai, K.M.; Gowen, L.C.; Kintner, J.; Kline, W.O.; Garcia, K.; Stitt, T.N.; Yancopoulos, G.D.; Wiegand, S.J.; et al. Absence of the lipid phosphatase SHIP2

- confers resistance to dietary obesity. *Nat. Med.* 2005, *11*, 199–205, doi:10.1038/nm1178, PMID:15654325.
30. Liu, Q.; Shalaby, F.; Jones, J.; Bouchard, D.; Dumont, D.J. The SH2-containing inositol polyphosphate 5-phosphatase, ship, is expressed during hematopoiesis and spermatogenesis. *Blood* 1998, *91*, 2753–2759, PMID:9531585.
 31. Pesesse, X.; Deleu, S.; De Smedt, F.; Drayer, L.; Erneux, C. Identification of a second SH2-domain-containing protein closely related to the phosphatidylinositol polyphosphate 5-phosphatase SHIP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997, *239*, 697–700, doi:10.1006/bbrc.1997.7538, PMID:9367831.
 32. Wilkin, F.; Savonet, V.; Radulescu, A.; Petermans, J.; Dumont, J.E.; Maenhaut, C. Identification and characterization of novel genes modulated in the thyroid of dogs treated with methimazole and propylthiouracil. *J. Biol. Chem.* 1996, *271*, 28451–28457, PMID:8910471.
 33. Blunt, M.D.; Ward, S.G. Targeting PI3K isoforms and SHIP in the immune system: New therapeutics for inflammation and leukemia. *Curr. Opin. Pharm.* 2012, *12*, 444–451, doi:10.1016/j.coph.2012.02.015, PMID:22483603.
 34. Vanhaesebroeck, B.; Leever, S.J.; Ahmadi, K.; Timms, J.; Katso, R.; Driscoll, P.C.; Woscholski, R.; Parker, P.J.; Waterfield, M.D. Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu. Rev. Biochem.* 2001, *70*, 535–602, doi:10.1146/annurev.biochem.70.1.535, PMID:22483603.
 35. Rohrschneider, L.R.; Fuller, J.F.; Wolf, I.; Liu, Y.; Lucas, D.M. Structure, function, and biology of SHIP proteins. *Genes. Dev.* 2000, *14*, 505–520, PMID:10716940.
 36. Ichihara, Y.; Wada, T.; Soeda, Y.; Ishii, Y.; Sasahara, M.; Tsuneki, H.; Sasaoka, T. SH2-containing inositol 5'-phosphatase 2 selectively impairs hypothalamic insulin signalling and regulation of food intake in mice. *J. Neuroendocr.* 2013, *25*, 372–382, doi:10.1111/jne.12014, PMID:23286299.
 37. Prasad, N.K. SHIP2 phosphoinositol phosphatase positively regulates EGFR-Akt pathway, CXCR4 expression, and cell migration in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Int J Oncol* 2009, *34*, 97–105, PMID:19082482.

38. Sattler, M.; Verma, S.; Pride, Y.B.; Salgia, R.; Rohrschneider, L.R.; Griffin, J.D. SHIP1, an SH2 domain containing polyinositol-5-phosphatase, regulates migration through two critical tyrosine residues and forms a novel signaling complex with DOK1 and CRKL. *J. Biol. Chem.* 2001, *276*, 2451–2458, doi:10.1074/jbc.M006250200, PMID:11031258.
39. Berchtold, M.W.; Villalobo, A. The many faces of calmodulin in cell proliferation, programmed cell death, autophagy, and cancer. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Mol. Cell Res.* 2014, *1843*, 398–435, doi:10.1016/j.bbamcr.2013.10.021.
40. Persechini, A.; Moncrief, N.D.; Kretsinger, R.H. The EF-hand family of calcium-modulated proteins. *Trends Neurosci.* 1989, *12*, 462–467, doi:10.1016/0166-2236(89)90097-0, PMID:2479149.
41. Liu, Y.; Xu, Y.; Xiao, F.; Zhang, J.; Wang, Y.; Yao, Y.; Yang, J. Comprehensive Analysis of a circRNA-miRNA-mRNA Network to Reveal Potential Inflammation-Related Targets for Gastric Adenocarcinoma. *Mediat. Inflamm.* 2020, *2020*, 9435608, doi:10.1155/2020/9435608, PMID:32801999.
42. Wang, B.; Pan, L.; Wei, M.; Wang, Q.; Liu, W.W.; Wang, N.; Jiang, X.Y.; Zhang, X.; Bao, L. FMRP-Mediated Axonal Delivery of miR-181d Regulates Axon Elongation by Locally Targeting Map1b and Calm1. *Cell Rep.* 2015, *13*, 2794–2807, doi:10.1016/j.celrep.2015.11.057, PMID:26711345.
43. Finn, B.E.; Evenäs, J.; Drakenberg, T.; Waltho, J.P.; Thulin, E.; Forsén, S. Calcium-induced structural changes and domain autonomy in calmodulin. *Nat. Struct. Biol.* 1995, *2*, 777–783, doi:10.1038/nsb0995-777, PMID:7552749.
44. Agell, N.; Bachs, O.; Rocamora, N.; Villalonga, P. Modulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by Ca(2+), and calmodulin. *Cell. Signal.* 2002, *14*, 649–654, doi:10.1016/s0898-6568(02)00007-4, PMID:12020764.
45. Porter, J.A.; Yu, M.; Doberstein, S.K.; Pollard, T.D.; Montell, C. Dependence of calmodulin localization in the retina on the NINAC unconventional myosin. *Science* 1993, *262*, 1038–1042, doi:10.1126/science.8235618, PMID:8235618.
46. Villalonga, P.; Lopez-Alcala, C.; Bosch, M.; Chiloeches, A.; Rocamora, N.; Gil, J.; Marais, R.; Marshall, C.J.; Bachs, O.; Agell, N. Calmodulin binds to K-Ras, but not to H- or N-Ras,

and modulates its downstream signaling. *Mol. Cell. Biol.* 2001, 21, 7345–7354, doi:10.1128/MCB.21.21.7345-7354.2001, PMID:11585916.

47. Li, L.; Mo, H.; Zhang, J.; Zhou, Y.; Peng, X.; Luo, X. The Role of Heat Shock Protein 90B1 in Patients with Polycystic Ovary Syndrome. *PLoS ONE* 2016, 11, e0152837, doi:10.1371/journal.pone.0152837, PMID:27046189.
48. Morrison, N.A.; Day, C.J.; Nicholson, G.C. Dominant negative MCP-1 blocks human osteoclast differentiation. *J. Cell Biochem.* 2014, 115, 303–312, doi:10.1002/jcb.24663, PMID:23996571.
49. Toutenhoofd, S.L.; Foletti, D.; Wicki, R.; Rhyner, J.A.; Garcia, F.; Tolon, R.; Strehler, E.E. Characterization of the human CALM2 calmodulin gene and comparison of the transcriptional activity of CALM1, CALM2 and CALM3. *Cell Calcium.* 1998, 23, 323–338, doi:10.1016/s0143-4160(98)90028-8, PMID:9681195.
50. Yoon, S.H.; Ryu, J.; Lee, Y.; Lee, Z.H.; Kim, H.H. Adenylate cyclase and calmodulin-dependent kinase have opposite effects on osteoclastogenesis by regulating the PKA-NFATc1 pathway. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 2011, 26, 1217–1229, doi:10.1002/jbmr.310, PMID:21611964.
51. Wu, C.; Jin, X.; Tsueng, G.; Afrasiabi, C.; Su, A.I. BioGPS: Building your own mash-up of gene annotations and expression profiles. *Nucleic Acids Res.* 2016, 44, D313–D316, doi:10.1093/nar/gkv1104, PMID:26578587.
52. Schulte, G.; Fredholm, B.B. Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. *Cell. Signal.* 2003, 15, 813–827, doi:10.1016/S0898-6568(03)00058-5.
53. Burnstock, G. Purinergic signaling and vascular cell proliferation and death. *Arter. Thromb. Vasc. Biol.* 2002, 22, 364–373, doi:10.1161/hq0302.105360, PMID:11884276.
54. Abbracchio, M.P.; Ceruti, S.; Brambilla, R.; Franceschi, C.; Malorni, W.; Jacobson, K.A.; von Lubitz, D.K.; Cattabeni, F. Modulation of Apoptosis by Adenosine in the Central Nervous System: A Possible Role for the A3 Receptor. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1997, 825, 11–22.
55. Ohana, G.; Bar-Yehuda, S.; Barer, F.; Fishman, P. Differential effect of adenosine on tumor and normal cell growth: Focus on the A3 adenosine receptor. *J. Cell Physiol.* 2001, 186, 19–23, doi:10.1002/1097-4652(200101)186:1<19::Aid-jcp1011>3.0.Co;2-3, PMID:11147810.

56. Ntambi, J.M. The regulation of stearoyl-CoA desaturase (SCD). *Prog. Lipid Res.* 1995, 34, 139–150.
57. Enoch, H.G.; Catala, A.; Strittmatter, P. Mechanism of rat liver microsomal stearyl-CoA desaturase. Studies of the substrate specificity, enzyme-substrate interactions, and the function of lipid. *J. Biol. Chem.* 1976, 251, 5095–5103.
58. Aardema, H.; van Tol, H.T.A.; Wubbolts, R.W.; Brouwers, J.F.H.M.; Gadella, B.M.; Roelen, B.A.J. Stearoyl-CoA desaturase activity in bovine cumulus cells protects the oocyte against saturated fatty acid stress. *Biol. Reprod.* 2017, 96, 982–992, doi:10.1095/biolreprod.116.146159.
59. Moreau, C.I.; Froment, P.; Tosca, L.; Moreau, V.; Dupont, J.I. Expression and Regulation of the SCD2 Desaturase in the Rat Ovary. *Biol. Reprod.* 2006, 74, 75–87, doi:10.1095/biolreprod.105.044545.
60. Zerial, M.; McBride, H. Rab proteins as membrane organizers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2001, 2, 107–117.
61. Junutula, J.R.; De Mazière, A.M.; Peden, A.A.; Ervin, K.E.; Advani, R.J.; van Dijk, S.M.; Klumperman, J.; Scheller, R.H. Rab14 is involved in membrane trafficking between the Golgi complex and endosomes. *Mol. Biol. Cell* 2004, 15, 2218–2229.
62. Kitt, K.N.; Hernandez-Deviez, D.; Ballantyne, S.D.; Spiliotis, E.T.; Casanova, J.E.; Wilson, J.M. Rab14 regulates apical targeting in polarized epithelial cells. *Traffic* 2008, 9, 1218–1231, doi:10.1111/j.1600-0854.2008.00752.x, PMID:18429929.
63. Cheng, K.W.; Lahad, J.P.; Gray, J.W.; Mills, G.B. Emerging role of RAB GTPases in cancer and human disease. *Cancer Res.* 2005, 65, 2516–2519, doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0573, PMID:15805241.
64. Chia, W.J.; Tang, B.L. Emerging roles for Rab family GTPases in human cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 2009, 1795, 110–116, doi:10.1016/j.bbcan.2008.10.001, PMID:19425190.
65. Ho, J.R.; Chapeaublanc, E.; Kirkwood, L.; Nicolle, R.; Benhamou, S.; Leuret, T.; Allory, Y.; Southgate, J.; Radvanyi, F.; Goud, B. Deregulation of Rab and Rab effector genes in bladder cancer. *PLoS ONE* 2012, 7, e39469, doi:10.1371/journal.pone.0039469, PMID:22724020.

66. Ye, F.; Tang, H.; Liu, Q.; Xie, X.; Wu, M.; Liu, X.; Chen, B.; Xie, X. miR-200b as a prognostic factor in breast cancer targets multiple members of RAB family. *J. Transl. Med.* 2014, *12*, 17, doi:10.1186/1479-5876-12-17, PMID:24447584.
67. Hou, R.; Jiang, L.; Yang, Z.; Wang, S.; Liu, Q. Rab14 is overexpressed in ovarian cancers and promotes ovarian cancer proliferation through Wnt pathway. *Tumour. Biol.* 2016, doi:10.1007/s13277-016-5420-4, PMID:27718127.
68. Hoshijima, M.; Hattori, T.; Aoyama, E.; Nishida, T.; Kubota, S.; Kamioka, H.; Takigawa, M. Roles of Interaction between CCN2 and Rab14 in Aggrecan Production by Chondrocytes. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, *21*, 2769, doi:10.3390/ijms21082769.
69. Takigawa, M. CTGF/Hcs24 as a multifunctional growth factor for fibroblasts, chondrocytes and vascular endothelial cells. *Drug News Perspect.* 2003, *16*, 11–21, doi:10.1358/dnp.2003.16.1.829302, PMID:12682668.
70. Li, X.; Pongkitwitoon, S.; Lu, H.; Lee, C.; Gelberman, R.; Thomopoulos, S. CTGF induces tenogenic differentiation and proliferation of adipose-derived stromal cells. *J. Orthop. Res.* 2019, *37*, 574–582, doi:10.1002/jor.24248, PMID:30756417.
71. Chang, H.M.; Pan, H.H.; Cheng, J.C.; Zhu, Y.M.; Leung, P.C.K. Growth differentiation factor 8 suppresses cell proliferation by up-regulating CTGF expression in human granulosa cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2016, *422*, 9–17, doi:10.1016/j.mce.2015.11.009, PMID:26577677.
72. Zhang, J.; Zhao, X.; Luan, Z.; Wang, A. Rab14 Overexpression Promotes Proliferation and Invasion Through YAP Signaling in Non-Small Cell Lung Cancers. *Oncol. Targets Ther.* 2020, *13*, 9269–9280, doi:10.2147/OTT.S255644, PMID:32982313.
73. Dupont, S.; Morsut, L.; Aragona, M.; Enzo, E.; Giulitti, S.; Cordenonsi, M.; Zanconato, F.; Le Digabel, J.; Forcato, M.; Bicciato, S.; et al. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* 2011, *474*, 179–183, doi:10.1038/nature10137, PMID:21654799.
74. Zhao, B.; Ye, X.; Yu, J.; Li, L.; Li, W.; Li, S.; Yu, J.; Lin, J.D.; Wang, C.Y.; Chinnaiyan, A.M.; et al. TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control. *Genes Dev.* 2008, *22*, 1962–1971, doi:10.1101/gad.1664408, PMID:18579750.
75. CCAC. *Guidelines on the Care and Use of Farm Animals in Research, Teaching and Testing*; CCAC: Ottawa, ON, USA, 2009.

76. Benoit, G.; Warma, A.; Lussier, J.G.; Ndiaye, K. Gonadotropin regulation of ankyrin-repeat and SOCS-box protein 9 (ASB9) in ovarian follicles and identification of binding partners. *PLoS ONE* 2019, *14*, e0212571, doi:10.1371/journal.pone.0212571, PMID:30811458.
77. Ndiaye, K.; Castonguay, A.; Benoit, G.; Silversides, D.W.; Lussier, J.G. Differential regulation of Janus kinase 3 (JAK3) in bovine preovulatory follicles and identification of JAK3 interacting proteins in granulosa cells. *J. Ovarian Res.* 2016, *9*, 71, doi:10.1186/s13048-016-0280-5, PMID:27793176.
78. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 2001, *25*, 402–408.

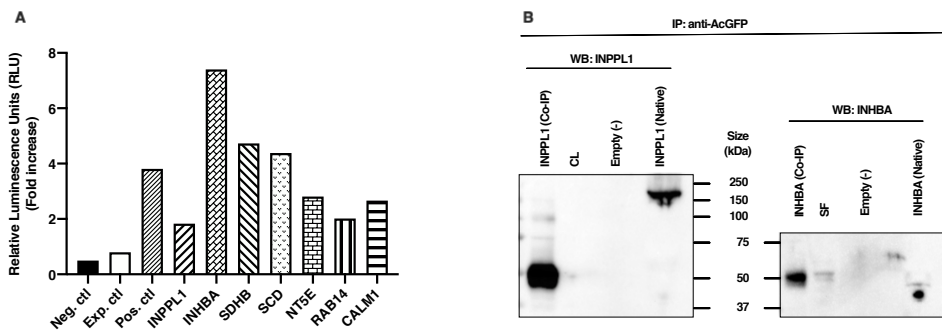


Figure 1. – Chemiluminescence analyses and confirmation of TRIB2 interaction with its binding partners by Coimmunoprecipitation and Western blot analyses.

(A) Chemiluminescence analyses and confirmation of TRIB2 interaction with its binding partners. Using the ProLabel enzyme complementation assay, luminescent signals (expressed in relative luminescent units (RLUs)) of TRIB2 interactions were compared to a positive interaction (Pos. ctrl) consisting of pAcGFP1-53 and ProLabel-T, to an experimental control (Exp. ctrl) consisting of

pAcGFP1-TRIB2 and ProLabel-empty vector, and a negative control (Neg. ctl). HEK cells were co-transfected with the respective plasmid constructs. Fold induction in ProLabel enzymatic activity was measured after 60 min of the substrate addition compared to the experimental control (fold increase ≥ 2.3 for all partners compared to Exp. ctl). (B) Coimmunoprecipitation and Western blot analyses confirmed TRIB2 interactions. Following HEK transfection with TRIB2 bait plasmid and appropriate inositol polyphosphate phosphatase-like 1 (INPPL1) or inhibin subunit beta A (INHBA) prey plasmids, protein extracts were subjected to co-immunoprecipitation (IP) and Western blotting using anti-INPPL1 and anti-INHBA. The results revealed the presence of INPPL1 (left panel) and INHBA (right panel) confirmed physical interaction with TRIB2.

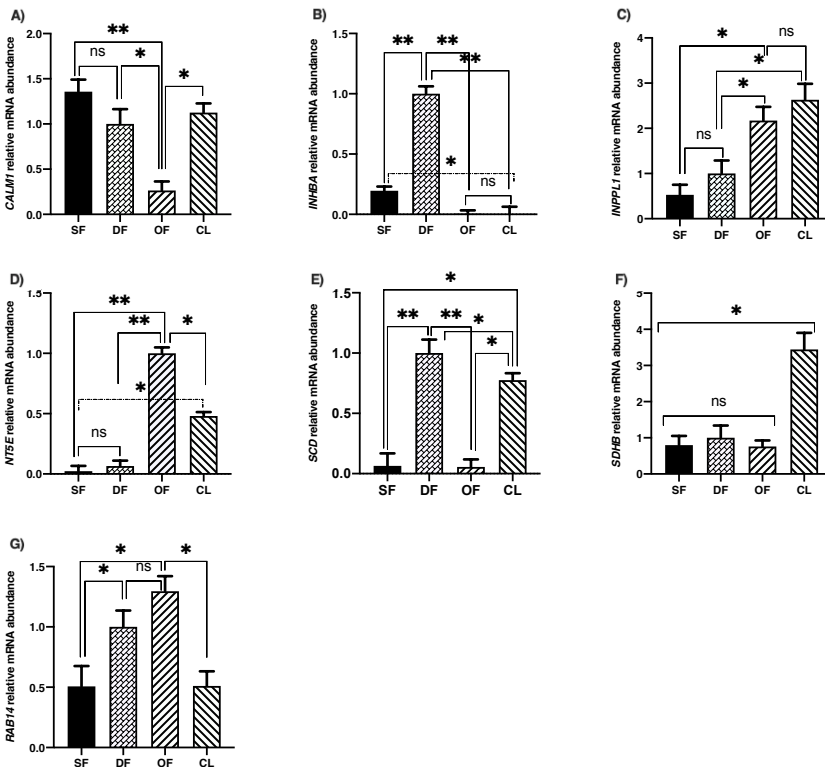


Figure 2. – Calmodulin 1 (*CALM1*), inhibin subunit beta A (*INHBA*), inositol polyphosphate phosphatase-like 1 (*INPPL1*), 5'-nucleotidase ecto (*NT5E*), stearyl-CoA desaturase (*SCD*), succinate dehydrogenase complex iron sulfur subunit B (*SDHB*) and Ras-associated protein 14 (*RAB14*) mRNA expressions in bovine granulosa cells.

Total RNA extracts of bovine granulosa cells from small follicles (SF; $n = 3$), dominant follicles (DF) obtained at day 5 of the estrous cycle ($n = 4$), ovulatory follicles (OF) isolated 24 h posthuman chorionic gonadotropin (hCG) ($n = 4$), and corpora lutea (CL) obtained at day 5 of the estrous cycle ($n = 3$) were analyzed by RT-qPCR for *CALMI*, *INHBA*, *INPPL1*, *NT5E*, *SCD*, *SDHB*, *RAB14* and *RPL19* (as reference gene) mRNA expression. *CALMI* (A), *INHBA* (B), *INPPL1* (C), *NT5E* (D), *SCD* (E), *SDHB* (F) and *RAB14* (G) relative amounts were normalized with respect to *RPL19* and the results are presented as least-square means \pm SEM. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

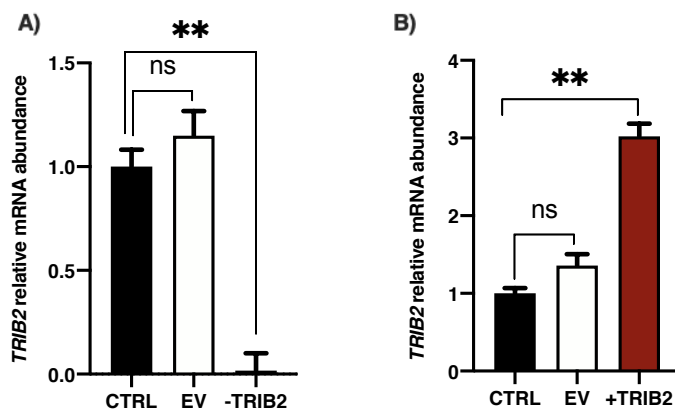


Figure 3. – Inhibition and overexpression of TRIB2 in granulosa cells (GCs).

(A) sgRNA with 96.1% efficiency at directing Cas9-mediated cleavage of *TRIB2* mRNA was identified as described in Materials and Methods and previously reported [14]. *TRIB2* knockdown was confirmed by RT-qPCR showing that *TRIB2* was significantly reduced in GCs via CRISPR/Cas9 as compared to the control and empty vector. (B) The pQE-Trisystem was used to overexpress *TRIB2* in GCs as described in Materials and Methods and previously reported [14]. *TRIB2* overexpression in GCs was confirmed by RT-qPCR as compared to control and empty vector. **, $p < 0.01$.

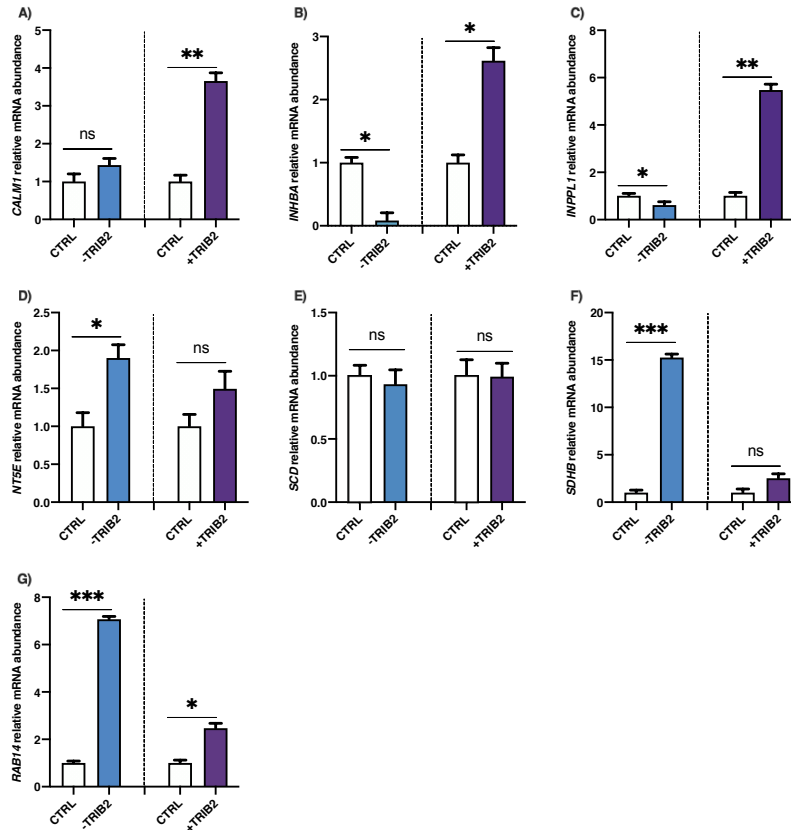


Figure 4. – Effects of TRIB2 inhibition and overexpression on *CALM1*, *INHBA*, *INPPL1*, *NT5E*, *SCD*, *SDHB* and *RAB14*.

TRIB2 manipulation (inhibition or overexpression) leads to significant changes in binding partners expression. *INPPL1* and *INHBA* mRNA were significantly decreased in TRIB2-inhibited GCs and significantly increased in TRIB2-overexpressed GCs. *CALM1* was also increased following TRIB2 overexpression but did not change following TRIB2 inhibition, while *NT5E* and *SDHB* were increased following TRIB2 inhibition but did not change following TRIB2 overexpression. *RAB14* was increased in TRIB2 inhibition and overexpression while there was no effect on *SCD* following TRIB2 manipulation. Relative amounts for *CALM1* (A), *INHBA* (B), *INPPL1* (C), *NT5E* (D), *SCD* (E), *SDHB* (F) and *RAB14* (G) were normalized with respect to *RPL19* and the results are presented as least-square means \pm SEM. *, $p < 0,05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

CHAPITRE V: TROISIÈME ARTICLE

Résumé des résultats de l'article 3

Les travaux du présent article 3 ont permis de déterminer la régulation de cytokines cibles pendant le développement folliculaire et durant la période post-partum. Nous avons rapporté que l'expression des récepteurs de cytokines analysés sont différemment régulés dans les CG durant le développement folliculaire et sont affectés par les niveaux de bêta hydroxybutyrate (BHB). En particulier, l'expression d'IL4R était plus élevée dans le follicule dominant alors que celle d'IL15R était élevée dans le follicule ovulatoire et l'expression d'IL21R était accrue dans le CL par rapport aux différents groupes de follicules, démontrant l'importance des cytokines correspondantes dans les stades spécifiques du développement folliculaire. En ce sens, nous avons également montré que TNF α ainsi que l'IL8, l'IL15 et l'IL23, toutes des cytokines pro-inflammatoires, étaient exprimés plus abondamment chez les vaches BHB⁺ (BHB > 1,4 mmol/L) que chez les vaches témoins (BHB⁻ < 1,2 mmol/L). Inversement, nous avons montré que l'expression de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL4 était altérée chez les vaches BHB⁺ en période post-partum par rapport aux vaches BHB⁻, suggérant que l'altération de certaines cytokines pourrait être associée à une anovulation prolongée en période post-partum. Ces observations aident à mieux comprendre les effets des niveaux élevés de BHB pendant la période post-partum sur la fonction ovarienne et l'activité des cellules de granulosa.

Une analyse complémentaire non incluse dans cette publication a démontré que l'expression de *TRIB2* était significativement réduite dans les cellules de granulosa provenant de vaches BHB⁺ comparées aux vaches BHB⁻. Cette réduction de *TRIB2* était concomitante avec celle d'ILs anti-inflammatoires suggérant une régulation possible de différentes cytokines par *TRIB2*. Les mécanismes sous-jacents aux modifications du profil d'expression des ILs, les effets possibles de ces ILs sur la fertilité ainsi que le rôle exact de *TRIB2* sur la régulation des ILs dans les CG nécessitent une étude plus approfondie.

Interleukins' expression profile changes in granulosa cells of preovulatory follicles during the postpartum period in dairy cows

Aly Warma, Marianne Descarreaux, Younes Chorfi, Raynald Dupras, Roxane Rémillard,

Kalidou Ndiaye

Contributions des auteurs : Dans le cadre de cet article, j'ai réalisé la collecte, l'analyse et l'interprétation des données ainsi que la rédaction du manuscrit en collaboration avec Kalidou Ndiaye et Roxane Rémillard. Marianne Descarreaux a effectué quelques analyse RT-PCR. Younès Chorfi a participé à l'élaboration du projet. Une analyse complémentaire non incluse dans cette publication de l'expression de *TRIB2* dans les cellules de granulosa provenant de vaches BHB⁺ comparées aux vaches BHB⁻ se trouve en annexe 2.

Remerciements: Nous remercions l'organisme subventionnaire MITACS

L'article est publié dans la revue Cytokine: X, Volume 2, Issue1, March 2020, 100022,
<https://doi.org/10.1016/j.cyttox.2020.100022>

Interleukins' expression profile changes in granulosa cells of preovulatory follicles during the postpartum period in dairy cows

Aly Warma^a, Marianne Descarreaux^a, Younes Chorfi^a, Raynald Dupras^b, Roxane Rémillard^b, Kalidou Ndiaye^{a,*}

^aCentre de recherche en reproduction et fertilité, Département de biomédecine vétérinaire, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, J2S 2M2, Canada

^bMediVet, Clinique vétérinaire Centre-du-Québec Inc., Notre-Dame-du-Bon-Conseil, Québec J0C 1A0 Canada

*Corresponding author: Kalidou Ndiaye, Centre de recherche en reproduction et fertilité (CRRF), Département de biomédecine vétérinaire, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada. Phone: 450 773-8521, ext. 8287; e-mail: k.ndiaye@umontreal.ca

The authors declare that they have no conflict of interest.

V.1. Abstract

The postpartum period in dairy cows is associated with a state of temporary negative energy balance and could induce functional changes into ovarian granulosa cells resulting in significant impact on the ovarian function and fertility. Yet, the regulation of interleukin receptors (ILRs) in GC as well as ILs expression profile during the postpartum period have not been fully investigated. We hypothesized that the postpartum period is associated with changes in ILs expression profile that could affect follicular development and ovulation rate. First, we aimed to investigate the expression and regulation of different IL and IL receptors in GC at different stages of follicular development and then analyse the changes in target ILs expression profile induced during the postpartum period. In the first objective, normal cycling cows were selected, and GC were collected from small follicles (SF), dominant follicles at day 5 of the estrous cycle (DF), and ovulatory follicles, 24 hours following hCG injection (OF). In the second objective, dairy cows between 50 and 70 days postpartum were randomly selected, and Beta-hydroxybutyrate (BHB) concentrations were measured in blood samples in order to assign cows to the BHB⁺ group (>1.4 mmol/L) or BHB⁻ group (<1.2 mmol/L). GC were collected from preovulatory follicles by transvaginal aspiration. Total RNA was extracted from GC of all groups for analysis of target ILs and ILRs expression. Steady-state mRNA levels of *IL4R* was strongest in the DF, while *IL15R* expression was greatest in the OF, and *IL21R* showed increased steady-state mRNA levels in the corpus luteum as compared to the different groups of follicles. Overall, expression of *IL1A*, *IL1B*, *IL8*, *IL15*, *IL23* and *TNF α* was stronger in OF as compared to DF, while *IL4* and *IL10* expression was stronger in SF than in DF. Similarly, expression of *IL1A*, *IL1B*, *IL8*, *IL15*, *IL23*, and *TNF α* were significantly stronger in GC of BHB⁺ cows than in the control, while *IL4* expression was significantly reduced in BHB⁺ as compared to control cows. We have established an *IL* expression profile, which suggest a correlation with BHB levels during the postpartum period. Additionally, we have demonstrated a differential regulation of target *ILRs* in GC at different stages of follicular development. Overall, these data provide a better understanding of the changes that could affect follicular development and ovulation during the postpartum period and lay the ground for further investigations.

Key words: dairy cow, granulosa cells, interleukin, postpartum, β -hydroxybutyrate

V.2. Introduction

It is documented that dairy cows' fertility has significantly declined over the past decades (Lucy 2001). Although the causes associated with declining fertility are diverse, the deficiency or absence of ovulation during the postpartum period represents a major problem that could contribute to this decline. About 40% of dairy cows in large productions display anestrus at 60 days postpartum (Opsomer, Grohn et al. 2000). This could be attributed in part to intense milk production, which represents a very important energy investment for cows resulting in a state of negative energy balance (Komaragiri and Erdman 1997, Opsomer, Grohn et al. 2000). The postpartum period has a significant impact on dairy cow fertility since it affects the microenvironment of the follicle and causes a delay in return to ovarian cyclicity, a reduction in the number of large follicles, and a high anovulation rate (Perry, Corah et al. 1991, Llewellyn, Fitzpatrick et al. 2007). When follicular growth is disrupted and the follicular environment altered, the oocyte quality is compromised leading to negative effects on the conception rate and gestation. Thus, investigations of factors that affect the health of the ovarian follicle and the oocyte, specifically factors originating from granulosa cells, are crucial for improving fertility.

Granulosa cells are a particularly important component of the follicle because they play a critical role in reproductive functions. They contribute to steroid hormone synthesis (Knight and Glister 2001) and are involved in the oocyte maturation and release (Eppig, Wigglesworth et al. 2002), and in the corpus luteum formation after ovulation (Rosenfeld, Wagner et al. 2001, Richards and Ascoli 2018). Therefore, the control of GC proliferation, differentiation, and function depends on precise regulation and activation of specific target genes. This regulation is essential for normal follicular development and timely production of paracrine factors as it affects the physiological state of a dominant preovulatory follicle. A common feature of most reproductive tissues and cells, including granulosa cells, is the presence of cytokines that are involved in the regulation of reproductive function (Patton, Kenny et al. 2006, Pangas 2007, Orsi and Tribe 2008). Specifically, the ovarian follicular fluid contains a variety of proteins such as cytokines and other peptides, in addition to steroids (Field, Dasgupta et al. 2013).

Cytokines are small, soluble signaling proteins that are better known for their immunoregulatory properties but are also known for controlling cell proliferation, differentiation, and function (Orsi 2008, Orsi and Tribe 2008). Cytokines include interleukins (ILs), colony-

stimulating factors (CSFs), Tumor necrosis factors (TNFs), Transforming growth factors (TGFs), and other peptides that are produced by a myriad of cell types. Interleukins are mainly synthesized by lymphocytes, monocytes, macrophages, and endothelial cells but also by granulosa cells of the ovarian follicle (Pangas 2007, Field, Dasgupta et al. 2013, Salmassi, Fattahi et al. 2017, Samir, Glister et al. 2017, Stassi, Baravalle et al. 2018). There is convincing evidence that cytokines, including interleukins (ILs), have functional effects on reproductive tissues affecting follicular development, ovulation, and the corpus luteum function (Bukovsky and Presl 1979, Espey 1980, Liu, Youngquist et al. 2009, Ndiaye, Poole et al. 2012). They create an immuno-permissive and embryotropic environment that supports multiple aspects of reproduction (Pangas 2007, Orsi and Tribe 2008). However, the involvement of ILs in follicular development and fertility during the postpartum period hasn't been fully investigated. Stassi et al. have recently shown that altered expression of cytokines including IL1 α , IL1 β , IL4, IL6, IL8 and TNF α may contribute to follicular persistence and ovulation failure in cattle with follicular cysts (Stassi, Baravalle et al. 2017, Stassi, Baravalle et al. 2018). In another study, it was shown that proinflammatory cytokines TNF α and IL6 suppress androgen production and downregulated the expression of markers for theca interna cells (Samir, Glister et al. 2017). Based on these reports and others (Gerard, Caillaud et al. 2004, Smolikova, Mlynarcikova et al. 2012), we analyzed the presence of ILs and target IL receptors in bovine granulosa cells during follicular development. Moreover, we analyzed the regulation of selected proinflammatory interleukins (IL1A, IL1B, IL8, IL15, IL21, IL23 and TNF α) and anti-inflammatory interleukins (IL4, IL10) during the postpartum period. We report here the differential regulation of ILRs in GC through follicular development and the association between the postpartum period in dairy cows and significant changes in the expression profile of ILs in GC. The identification of target ILs most affected by the postpartum period may provide new tools and

information for a better understanding of the pathways that control ovarian function.

V.3. Materials and Methods

V.3.1. Animal Model for Analysis of IL and IL Receptors Expression in Granulosa Cells

The experimental protocol was reviewed and approved by the Animal Ethics Committee of the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Montreal and the cows were cared for in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines (CCAC 2009). Expression of IL and target IL receptors were first analyzed in order to determine their regulation during follicular development and ovulation using an *in vivo* model previously characterized (Ndiaye, Fayad et al. 2005). Following estrous synchronization with PGF_{2α}, normal cycling crossbred heifers were randomly assigned to a dominant follicle group (DF, n = 4), or an ovulatory hCG-induced follicle group (OF, n = 4). The DF was collected at day 5 of the estrous cycle (day 0 = day of estrus) and was defined as ≥ 8 mm in diameter and growing while subordinate follicles were either static or regressing. The OF were obtained following an injection of 25mg of PGF_{2α} on day 7 to induce luteolysis, thereby promoting the development of the DF of the first follicular wave into a preovulatory follicle. An ovulatory dose of hCG (3000 IU, iv; APL, Ayerst Lab, Montréal, QC) was injected 36 hours after the induction of luteolysis, and ovaries bearing the hCG-induced OF were collected by ovariectomy 24 hours post-hCG. Immediately following collection, follicles were dissected into separate isolates of GC (Ndiaye, Fayad et al. 2005) and stored at -70°C. Granulosa cells and follicular fluid were collected from individual dominant follicles and pre-ovulatory hCG-induced follicles. Follicular fluid was first aspirated with a 21G needle, centrifuged (3,000 x g, 2 min, 4°C) and stored at -20°C whereas granulosa cell pellets were immediately frozen at -70°C. The granulosa cells still attached to the follicle wall were dislodged by gentle flushing with ice-cold HEPES-buffered DMEM into the follicle through a small incision in the follicle wall. The follicle washes were pooled and centrifuged (3,000 x g, 2 min, 4°C), the supernatant was discarded and the granulosa cells were immediately frozen at -70°C. Additionally, GC were collected from 2 to 4 mm small follicles (SF) obtained from slaughterhouse ovaries, and a total of three pools of twenty SF were prepared. CL at day 5 of the estrous cycle were obtained by

ovariectomy and were dissected from the ovarian stroma, frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C .

V.3.2. Animal Model for Analysis of ILs Expression Profile during the Postpartum Period

Lactating dairy cows between 50 and 70 days postpartum were selected and blood samples were collected from each cow and analyzed for BHB concentrations. Cows with BHB levels of at least 1.4 mmol/L were considered energy deficient and included in the BHB⁺ group (n = 20 cows), while a group of low BHB cows (BHB⁻; <1.2 mmol/L) was used as control (n = 20). Selected animals were synchronized, and follicular development was monitored by daily transrectal ultrasound. Using transvaginal aspiration, follicular fluid and GC from each cow were harvested from preovulatory follicles at ≥ 10 mm in diameter, and samples were collected in tubes containing RNAlater and processed for RNA extraction.

V.3.3. Total RNA Extraction and RT-qPCR Analysis

Total RNA was extracted from bovine GC collected from BHB⁺ and control follicles and from follicles at different developmental stages (SF, DF, OF) and CL described above using the TRIzol Plus RNA purification kit (Invitrogen). Reverse transcription and PCR were performed using the SMART (Switching Mechanism At 5'-end of RNA Transcript) technology (Clontech). The same amount of total RNA (250 ng) from each sample was used to synthesize the first-strand cDNA with the SuperScript III transcriptase (Invitrogen) followed by cDNA amplification by long-distance (LD)-PCR using the Advantage 2 Polymerase Mix (Clontech). Expression and regulation of *IL* and *IL* receptors (*ILR*) mRNA in GC during follicular development and postpartum period were analyzed by RT-qPCR using the SsoAdvanced Universal SYBR Green supermix (Clontech) following the manufacturer's instruction manual. Specific PCR primers for *IL4R*, *IL15R*, and *IL21R* and for *IL1A*, *IL1B*, *IL4*, *IL8*, *IL10*, *IL15*, *IL21*, *IL23* and *TNF α* were used (Table 6). *ILs* and *ILRs* mRNA relative abundance were calculated using the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method (Livak and Schmittgen 2001) with *RPL19* as reference gene. RT-qPCR data were presented as normalized *ILR* or *IL* amounts relative to $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$.

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

Gene Names		Primer sequence (5'–3')*	Accession no.	AS (bp)
RPL19	Fwd	gaccaatgaaatcgccaatgc	NM_001040516	154
	Rv	acctatacccatatgctctgcc		
IL4R	Fwd	tggtctgatggctactctg	NM_001075142	164
	Rv	cagctgtgggtctgagctcaa		
IL15R	Fwd	aggctccggaacacacatac	XM_010822356	197
	Rv	cacactctccatgctctcca		
IL21R	Fwd	accagtgcttttcacacc	NM_001193179	155
	Rv	ggacacctgcaaccatacct		
IL1A	Fwd	atctggaggaggcagtgaaat	NM_174092	201
	Rv	gcttttccagaagaagagga		
IL1B	Fwd	catggagaagctgaggaacag	NM_174093	169
	Rv	tctgtctggagtttgcactt		
IL4	Fwd	cccaaagaacacaactgaga	M77120	190
	Rv	tccaagaggtctttcagcgta		
IL8	Fwd	tgtgtgaagctgcagttctgt	BC103310	188
	Rv	ctgggggttaagcagacctc		
IL10	Fwd	gcactactctgttgctggtc	NM_174088	180
	Rv	taagctgtgcagttggctctt		
IL15	Fwd	gtgcaagtctcccaaacag	U42433	170
	Rv	tcgtaactccaggagaaagca		
IL21	Fwd	tgctgatggtcatcttctct	NM_198832	182
	Rv	gaccgctcacagtgtctctt		
IL23	Fwd	ctggagtgcacacctaccaat	NM_001205688	229
	Rv	gccatttgggagtagagaagg		
TNFα	Fwd	gtcaacatctgtctgccatc	NM_173966.3	186
	Rv	aaagtagacctgcccagactc		

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

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

V.3.4. Total protein extraction and western blot analysis

Granulosa cells from BHB⁺ and control follicles were obtained as described above and homogenized in M-PER buffer (Thermo Fisher Scientific) supplemented with complete protease inhibitors (Sigma Aldrich) as described by the manufacturer's protocol, and centrifuged at 16,000 x g for 10 min at 4°C. Protein concentrations were determined from the recovered supernatant according to Bradford method (Bradford 1976) (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad Lab,

Mississauga, ON, Canada). Western blot analyses were performed as previously described (Bedard, Brule et al. 2003). Samples (150ng of proteins) were resolved by one-dimensional denaturing Novex Tris-glycine gels (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) and electrophoretically transferred to polyvinylidene difluoride membranes (PVDF; Thermo Fisher Scientific). Membranes were incubated with anti-IL4 and anti-IL15 antibodies (Cedarlane Laboratories Ltd., Burlington, ON Canada) at concentrations of 1.5µg/ml. Immunoreactive proteins were visualized by incubation with horseradish peroxidase-linked anti-goat secondary antibody (1:10000 dilution) and the enhanced chemiluminescence system, ECL plus (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's protocol followed by revelation using the ChemiDoc XRS+ system (Bio-Rad). β-actin was used as reference protein with anti-β-actin antibodies purchased from Immune Biosolutions (Sherbrooke, QC Canada) and used at a dilution of 1:1000.

V.3.5. Statistical Analyses

Relative amounts of target genes mRNA were normalized with those of the reference gene *GAPDH*. Homogeneity of variance between groups was verified by O'Brien and Brown-Forsythe tests. Corrected values of gene specific mRNA levels were compared between follicular or CL groups by one-way analysis of variance (ANOVA). When ANOVA indicated a significant difference ($P < 0.05$), the Tukey-Kramer test was used for multiple comparison of individual means among SF, DF, OF and CL, whereas the Student t-test ($P < 0.05$) was used to compare the BHB⁺ group of cows to the control group. Statistical analyses were performed using GraphPad prism 5.0 software.

V.4. Results and discussion

The dynamic nature of follicular development and the presence of the oocyte in the follicular fluid, surrounded by granulosa and internal theca cells, make the follicles an excellent model for uncovering changes in the IL and ILRs receptors expression profile based on the animal status, and provide better understanding of the IL roles in follicular development and oocyte maturation. In this regard, we demonstrated the expression of target IL receptors in GC with differential regulation throughout the follicular development and in the CL. For *IL4R*, the greatest steady-state mRNA amounts were observed in granulosa cells (GC) of the dominant follicle (DF)

as compared to GC of small follicles (SF), ovulatory follicles (OF) and corpus luteum (CL) (Fig. 1A; $P < 0.05$). In contrast, *IL15R* showed significantly greater expression in the OF than in DF, SF and CL (Fig. 1B, $P < 0.001$). For *IL21R*, there was an increase within the CL as compared to the different groups of follicles (Fig. 1C; $P < 0.05$). Among the different groups of follicles, *IL21R* mRNA expression was greater in DF and OF as compared to SF (Fig. 1A; $P < 0.01$).

While steady-state mRNA levels of *IL4R* were stronger in the dominant follicle, *IL15R* expression was greatest in the ovulatory follicle, and *IL21R* showed increased steady-state mRNA levels in the CL as compared to the different groups of follicles, suggesting that these cytokine receptors might be hormonally-regulated. *IL15R* was significantly induced by hCG injection (Fig. 1B) while *IL4R* expression was reduced in GC post-hCG injection, and *IL21R* was more abundant in the CL. These differences in regulation of interleukin receptors could also be caused by different cell types within tissues specially in the CL, which contains a large proportion of leucocytes, in addition of luteinized granulosa and theca cells. Nevertheless, the results suggest that these receptors would activate different targets upon cytokines binding and they could play significant roles in signaling pathways controlling either granulosa cells (GC) proliferation and function, ovulation or formation of the CL. We have previously shown that the expression of several genes was dramatically reduced in the ovulatory follicle following the LH surge or hCG injection (Lussier, Diouf et al. 2017, Benoit, Warma et al. 2019). Cytokines whose receptors are induced by LH/hCG, such as the pro-inflammatory cytokine *IL15* shown in this study, may be involved in various biological processes such as the ovulation process but could also hinder GC proliferation and follicular growth. Conversely, *IL4R*, which is expressed at greater amounts in GC of dominant follicle would mediate *IL4*'s possible actions in promoting GC proliferation and steroidogenic activity. Indeed, decreased *IL4* amounts during the postpartum period could indicate that *IL4* promotes cell proliferation as previously shown in lymphocytes (Dohmann, Wagner et al. 2000), or oocyte maturation and ovulation (Assou, Anahory et al. 2006, Papacleovoulou, Critchley et al. 2011). Interestingly, *IL4* was found overexpressed during oocyte maturation along with other growth factors (Assou, Anahory et al. 2006) supporting the assumption that *IL4* plays a role in the production of a competent oocyte. Therefore, a significant decrease in *IL4* expression during the postpartum period as shown in our study could contribute to limited GC proliferation and delayed

oocyte maturation resulting in a prolonged anovulation period. Moreover, our data agree with previous reports demonstrating that alteration of IL4 expression contributed to follicle persistence and ovulation failure in cows with ovarian cysts (Stassi, Baravalle et al. 2018).

We analyzed the expression of different proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in granulosa cells during follicular development and found a differential regulation for target cytokines. Of interest, steady-state mRNA expression of *IL1A* was strongest in the OF as compared to SF, DF and the CL (Fig. 2A; $P < 0.05$), while *IL1B* relative expression was strongest in OF and SF as compared to DF (Fig. 2B; $P < 0.05$). Expression of *IL8* (Fig. 2D) and *TNF α* (Fig. 2I) was strongest in the SF as compared to other groups of follicles and the CL. Moreover, *IL8* and *TNF α* expression was still stronger in the OF than in the DF (Fig. 2D and Fig. 2I, respectively; $P < 0.05$). Expression of *IL4* (Fig. 2C) and *IL10* (Fig. 2E) was strongest in SF as compared to DF. However, *IL10* expression was stronger in OF than in the DF (Fig. 2E, $P < 0.05$). As for *IL15*, relative mRNA expression was more abundant in the OF and the CL as compared to the DF (Fig. 2F). *IL21* relative expression was stronger in SF as compared to DF, OF and CL (Fig. 2G; $P < 0.05$), while *IL23* was strongest in SF and OF as compared to DF (Fig. 2H; $P < 0.05$). Overall, these results are in line with the status of the follicles since pro-inflammatory cytokines analyzed are more abundantly present in the ovulatory follicle as compared to the dominant follicle and that the ovulation process is similar to an inflammatory response (Espey 1980, Robker, Hennebold et al. 2018, Duffy, Ko et al. 2019). The LH surge triggers several LH-induced signaling cascades associated with inflammation and leads to the release of the oocyte during ovulation. Granulosa cells are one of the first cells to respond to LH with a dramatic change in gene expression as previously reported (Lussier et al., 2017; Benoit et al., 2019). These changes also include induction of mediators of inflammatory processes such as cytokines as shown for most of the pro-inflammatory cytokines analyzed in this study.

In the second part of this study, our results show that the expression of pro-inflammatory interleukins such as *IL1A* (Fig. 3A; $P < 0.05$), *IL1B* (Fig. 3B; $P < 0.05$), *IL23* (Fig. 3H; $P < 0.05$), *TNF α* (Fig. 3I; $P < 0.05$), and most notably *IL8* (Fig. 3D; $P < 0.001$) and *IL15* (Fig. 3F; $P < 0.001$) was significantly induced during the postpartum period (BHB⁺ group) as compared to the control group. However, steady-state mRNA levels for the other analyzed pro-inflammatory cytokines, such as

IL21 (Fig. 3G) did not change significantly between the two groups suggesting that these particular ILs might not affect bovine fertility during the postpartum period. Among the anti-inflammatory interleukins that were analyzed, *IL4* was significantly reduced during the postpartum period in BHB⁺ cows as compared to the control group (Fig. 3C; P<0.01), while the steady-state mRNA levels of *IL10* did not significantly change (Fig. 3E). Western blot analyses showed protein expression of IL4 and IL15 as differentially regulated similar to their mRNA expression. IL4 was relatively reduced in the postpartum period as compared to the control although there was no significant difference between the two groups, while IL15 tended to be induced in postpartum cows (Fig. 4).

Quantitative PCR analyses of *IL4R*, *IL15R* and *IL21R* during the post-partum period revealed greatest steady-state mRNA amounts in granulosa cells from BHB⁺ cows as compared to controls cows for all three receptors (Fig. 5A, B and C; P<0.05). Significant expression of IL15R and IL21R in BHB⁺ granulosa cells correlates well with the regulation of the corresponding pro-inflammatory cytokines IL15 and IL21 in BHB⁺ granulosa cells as shown in figure 3 where IL15 was significantly increased in BHB⁺ as compared to control (Fig. 3F), while IL21 was expressed in BHB⁺ similar to the control (Fig. 3G). Conversely, IL4R was significantly increased in BHB⁺ granulosa cells while IL4 expression was stronger in the control as compared to BHB⁺ (Fig. 3C). Although IL4 is considered an anti-inflammatory cytokine (Zhou, Yang et al. 2019), it can regulate a variety of biological responses by binding to specific IL4Rs expressed by a wide range of cell types (Doucet, Brouty-Boye et al. 1998, van der Velden, Naber et al. 1998, Fukuda, Fujitsu et al. 2002). Additionally, IL4R can form two complexes consisting of two classes of IL4Rs with a type I IL4R and a type II IL4R (Gessner and Rollinghoff 2000), suggesting that increased IL4R in BHB⁺ cows could mean that IL4 may induce different actions in granulosa cells or IL4R could serve for the signaling of other cytokines such as IL13 as previously shown (Miloux, Laurent et al. 1997).

Our study shows that the postpartum period is associated with changes in the expression profile of various ILs that could result in functional changes in steroidogenic cells, particularly granulosa cells, leading to negative effects on follicular development and ovulation rate. Because

the health and maturation of the oocyte is closely dependent on the proper development of the follicle and the function of GC, the identification of target ILs directly induced during the postpartum period suggest that these ILs might affect the ovarian function and dairy cows' fertility. Of interest, among the ILs analyzed, *IL15* was one of the two most significantly induced interleukins during the postpartum period supporting the idea of a negative role for IL15 in follicular development and oocyte maturation. Similarly, it was shown in women that increased IL15 concentrations in the follicular fluid are adversely related with the size of follicles and oocyte maturity (Spanou, Kalogiannis et al. 2018) and could also negatively affect IVF-embryo transfer outcome (Vujisic, Lepej et al. 2006). These data correlate well with our findings and may suggest that increased expression of IL15 during the postpartum period could delay oocyte maturation and ovulation, therefore contributing to a prolonged anovulation state. Our own data strongly support a correlation between increased expression of IL15/IL15R and the absence of ovulation in postpartum dairy cows. Alternately, IL15 could be considered as a potential marker for lactation performance (Wei, Yee et al. 2011), and its expression profile and regulation also support the idea that IL15 might be involved in other cellular mechanisms including inflammation as previously suggested (Ripley, Shoup et al. 2004).

The present observations provide an insight into the regulation of target cytokines during follicular development and during the post-partum period. Since one of the causes of decreased fertility during the post-partum period could be a prolonged anovulatory status, it is of interest to analyze and understand the exact regulation of these cytokines. It has been shown that cows with delayed ovulation or anovulation during post-partum period had greater concentrations of inflammatory cytokines such as TNF α as compared to ovulated cows (Sina, Dirandeh et al. 2018). In agreement with these data, we have shown that TNF α as well as IL8, IL15 and IL23, all inflammatory cytokines, were expressed more abundantly in BHB⁺ cows than in control cows. Conversely, we have shown that expression of anti-inflammatory cytokines such as IL4 was altered in BHB⁺ post-partum cows as compared to BHB⁻ cows suggesting that alteration of certain cytokines could be associated with prolonged anovulation. These findings are also consistent with previously reported data (Stassi, Baravalle et al. 2018), which together are evidence that a different regulation or alteration of cytokines during the post-partum period could contribute to ovulation failure. Overall, these observations help better understand the effects of high BHB levels during

the postpartum period on the ovarian function and granulosa cells activity, although the mechanisms underlying the changes in ILs expression profile and their possible effects on fertility require further investigation.

V.5. Conclusion

In this study, the expression profile of target ILs in GC was established during the postpartum period in dairy cows. Of interest, we have shown anti-inflammatory IL4 and pro-inflammatory IL8 and IL15 as the interleukins most significantly altered and induced, respectively, during the postpartum period. In addition, we showed ILRs to be differentially regulated in GC at different developmental stages of the ovarian follicles. Future investigations will determine whether these changes are correlated with reduced ovulation rate and whether they affect negatively dairy cows' fertility during the postpartum period.

Acknowledgements

This work was supported by a MITACS Acceleration Grant to KN in partnership with MediVet Inc. (Quebec, Canada) and by a Grant from Fonds du Centenaire (Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal). The authors declare that they have no conflict of interest.

V.6. References

- Assou, S., T. Anahory, V. Pantesco, T. Le Carrouer, F. Pellestor, B. Klein, L. Reyftmann, H. Dechaud, J. De Vos and S. Hamamah (2006). "The human cumulus--oocyte complex gene-expression profile." *Hum Reprod* 21(7): 1705-1719.
- Bedard, J., S. Brule, C. A. Price, D. W. Silversides and J. G. Lussier (2003). "Serine protease inhibitor-E2 (SERPINE2) is differentially expressed in granulosa cells of dominant follicle in cattle." *Mol Reprod Dev* 64(2): 152-165.
- Benoit, G., A. Warma, J. G. Lussier and K. Ndiaye (2019). "Gonadotropin regulation of ankyrin-repeat and SOCS-box protein 9 (ASB9) in ovarian follicles and identification of binding partners." *PLoS One* 14(2): e0212571.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Bukovsky, A. and J. Presl (1979). "Ovarian function and the immune system." *Med Hypotheses* 5(4): 415-436.
- CCAC (2009). "Guidelines on the care and use of farm animals in research, teaching and testing. Ottawa, ON: CCAC."
- Dohmann, K., B. Wagner, D. W. Horohov and W. Leibold (2000). "Expression and characterisation of equine interleukin 2 and interleukin 4." *Vet Immunol Immunopathol* 77(3-4): 243-256.
- Doucet, C., D. Brouty-Boye, C. Pottin-Clemenceau, C. Jasmin, G. W. Canonica and B. Azzarone (1998). "IL-4 and IL-13 specifically increase adhesion molecule and inflammatory cytokine expression in human lung fibroblasts." *Int Immunol* 10(10): 1421-1433.
- Duffy, D. M., C. Ko, M. Jo, M. Brannstrom and T. E. Curry (2019). "Ovulation: Parallels With Inflammatory Processes." *Endocr Rev* 40(2): 369-416.
- Eppig, J. J., K. Wigglesworth and F. L. Pendola (2002). "The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(5): 2890-2894.
- Espey, L. L. (1980). "Ovulation as an inflammatory reaction--a hypothesis." *Biol Reprod* 22(1): 73-106.
- Field, S. L., T. Dasgupta, M. Cummings and N. M. Orsi (2013). "Cytokines in ovarian folliculogenesis, oocyte maturation and luteinisation." *Mol Reprod Dev*.
- Fukuda, K., Y. Fujitsu, N. Kumagai and T. Nishida (2002). "Characterization of the interleukin-4 receptor complex in human corneal fibroblasts." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43(1): 183-188.
- Gerard, N., M. Caillaud, A. Martoriati, G. Goudet and A. C. Lalmanach (2004). "The interleukin-1 system and female reproduction." *J Endocrinol* 180(2): 203-212.
- Gessner, A. and M. Rollinghoff (2000). "Biologic functions and signaling of the interleukin-4 receptor complexes." *Immunobiology* 201(3-4): 285-307.
- Knight, P. G. and C. Glister (2001). "Potential local regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary." *Reproduction* 121(4): 503-512.
- Komaragiri, M. V. and R. A. Erdman (1997). "Factors affecting body tissue mobilization in early lactation dairy cows. 1. Effect of dietary protein on mobilization of body fat and protein." *J Dairy Sci* 80(5): 929-937.

- Liu, Z., R. S. Youngquist, H. A. Garverick and E. Antoniou (2009). "Molecular mechanisms regulating bovine ovarian follicular selection." *Mol Reprod Dev* 76(4): 351-366.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method." *Methods* 25(4): 402-408.
- Llewellyn, S., R. Fitzpatrick, D. A. Kenny, J. J. Murphy, R. J. Scaramuzzi and D. C. Wathes (2007). "Effect of negative energy balance on the insulin-like growth factor system in pre-recruitment ovarian follicles of post partum dairy cows." *Reproduction* 133(3): 627-639.
- Lucy, M. C. (2001). "Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end?" *J Dairy Sci* 84(6): 1277-1293.
- Lussier, J. G., M. N. Diouf, V. Levesque, J. Sirois and K. Ndiaye (2017). "Gene expression profiling of upregulated mRNAs in granulosa cells of bovine ovulatory follicles following stimulation with hCG." *Reprod Biol Endocrinol* 15(1): 88.
- Lv, X., C. He, C. Huang, H. Wang, G. Hua, Z. Wang, J. Zhou, X. Chen, B. Ma, B. Timm, V. Maclin, J. Dong, B. Rueda, J. Davis and C. Wang (2019). "Timely expression and activation of YAP1 in granulosa cells is essential for ovarian follicle development." *The FASEB Journal* 33: fj.201900179RR.
- Miloux, B., P. Laurent, O. Bonnin, J. Lupker, D. Caput, N. Vita and P. Ferrara (1997). "Cloning of the human IL-13R alpha1 chain and reconstitution with the IL4R alpha of a functional IL-4/IL-13 receptor complex." *FEBS Lett* 401(2-3): 163-166.
- Ndiaye, K., T. Fayad, D. W. Silversides, J. Sirois and J. G. Lussier (2005). "Identification of downregulated messenger RNAs in bovine granulosa cells of dominant follicles following stimulation with human chorionic gonadotropin." *Biol Reprod* 73(2): 324-333.
- Ndiaye, K., D. H. Poole, S. Walusimbi, M. J. Cannon, K. Toyokawa, S. W. Maalouf, J. Dong, P. Thomas and J. L. Pate (2012). "Progesterone effects on lymphocytes may be mediated by membrane progesterone receptors." *J Reprod Immunol* 95(1-2): 15-26.
- Opsomer, G., Y. T. Grohn, J. Hertl, M. Coryn, H. Deluyker and A. de Kruif (2000). "Risk factors for post partum ovarian dysfunction in high producing dairy cows in Belgium: a field study." *Theriogenology* 53(4): 841-857.
- Orsi, N. M. (2008). "Cytokine networks in the establishment and maintenance of pregnancy." *Hum Fertil (Camb)* 11(4): 222-230.
- Orsi, N. M. and R. M. Tribe (2008). "Cytokine networks and the regulation of uterine function in pregnancy and parturition." *J Neuroendocrinol* 20(4): 462-469.
- Pangas, S. A. (2007). "Growth factors in ovarian development." *Semin Reprod Med* 25(4): 225-234.
- Papacleovoulou, G., H. O. Critchley, S. G. Hillier and J. I. Mason (2011). "IL1alpha and IL4 signalling in human ovarian surface epithelial cells." *J Endocrinol* 211(3): 273-283.
- Patton, J., D. A. Kenny, J. F. Mee, F. P. O'Mara, D. C. Wathes, M. Cook and J. J. Murphy (2006). "Effect of milking frequency and diet on milk production, energy balance, and reproduction in dairy cows." *J Dairy Sci* 89(5): 1478-1487.
- Perry, R. C., L. R. Corah, R. C. Cochran, W. E. Beal, J. S. Stevenson, J. E. Minton, D. D. Simms and J. R. Brethour (1991). "Influence of dietary energy on follicular development, serum gonadotropins, and first postpartum ovulation in suckled beef cows." *J Anim Sci* 69(9): 3762-3773.

- Richards, J. S. and M. Ascoli (2018). "Endocrine, Paracrine, and Autocrine Signaling Pathways That Regulate Ovulation." *Trends Endocrinol Metab* 29(5): 313-325.
- Ripley, D., B. Shoup, A. Majewski and N. Chegini (2004). "Differential expression of interleukins IL-13 and IL-15 in normal ovarian tissue and ovarian carcinomas." *Gynecol Oncol* 92(3): 761-768.
- Robker, R. L., J. D. Hennebold and D. L. Russell (2018). "Coordination of Ovulation and Oocyte Maturation: A Good Egg at the Right Time." *Endocrinology* 159(9): 3209-3218.
- Rosenfeld, C. S., J. S. Wagner, R. M. Roberts and D. B. Lubahn (2001). "Intraovarian actions of oestrogen." *Reproduction* 122(2): 215-226.
- Salmassi, A., A. Fattahi, M. Nouri, J. Hedderich and A. G. Schmutzler (2017). "Expression of mRNA and protein of IL-18 and its receptor in human follicular granulosa cells." *J Endocrinol Invest* 40(4): 447-454.
- Samir, M., C. Glister, D. Mattar, M. Laird and P. G. Knight (2017). "Follicular expression of pro-inflammatory cytokines tumour necrosis factor-alpha (TNFalpha), interleukin 6 (IL6) and their receptors in cattle: TNFalpha, IL6 and macrophages suppress thecal androgen production in vitro." *Reproduction* 154(1): 35-49.
- Sina, M., E. Dirandeh, H. Deldar and B. Shohreh (2018). "Inflammatory status and its relationships with different patterns of postpartum luteal activity and reproductive performance in early lactating Holstein cows." *Theriogenology* 108: 262-268.
- Smolikova, K., A. Mlynarcikova and S. Scsukova (2012). "Role of interleukins in the regulation of ovarian functions." *Endocr Regul* 46(4): 237-253.
- Spanou, S., D. Kalogiannis, E. Zapanti, M. Gazouli, I. A. Sfontouris, C. Siristatidis and G. Mastorakos (2018). "Interleukin 15 concentrations in follicular fluid and their effect on oocyte maturation in subfertile women undergoing intracytoplasmic sperm injection." *J Assist Reprod Genet* 35(6): 1019-1025.
- Stassi, A. F., M. E. Baravalle, E. M. Belotti, A. N. Amweg, E. Angeli, M. M. L. Velazquez, F. Rey, N. R. Salvetti and H. H. Ortega (2018). "Altered expression of IL-1beta, IL-1RI, IL-1RII, IL-1RA and IL-4 could contribute to anovulation and follicular persistence in cattle." *Theriogenology* 110: 61-73.
- Stassi, A. F., M. E. Baravalle, E. M. Belotti, F. Rey, N. C. Gareis, P. U. Diaz, F. M. Rodriguez, C. J. Leiva, H. H. Ortega and N. R. Salvetti (2017). "Altered expression of cytokines IL-1alpha, IL-6, IL-8 and TNF-alpha in bovine follicular persistence." *Theriogenology* 97: 104-112.
- van der Velden, V. H., B. A. Naber, A. F. Wierenga-Wolf, R. Debets, H. F. Savelkoul, S. E. Overbeek, H. C. Hoogsteden and M. A. Versnel (1998). "Interleukin 4 receptors on human bronchial epithelial cells. An in vivo and in vitro analysis of expression and function." *Cytokine* 10(10): 803-813.
- Vujisic, S., S. Z. Lepej, I. Emedi, R. Bauman, A. Remenar and M. K. Tiljak (2006). "Ovarian follicular concentration of IL-12, IL-15, IL-18 and p40 subunit of IL-12 and IL-23." *Hum Reprod* 21(10): 2650-2655.
- Wei, J., C. Yee, P. Ramanathan, L. J. Bendall and P. Williamson (2011). "Variation in immunophenotype of lactating mice." *J Reprod Immunol* 89(2): 178-184.
- Zhou, W. J., H. L. Yang, J. Shao, J. Mei, K. K. Chang, R. Zhu and M. Q. Li (2019). "Anti-inflammatory cytokines in endometriosis." *Cell Mol Life Sci* 76(11): 2111-2132.

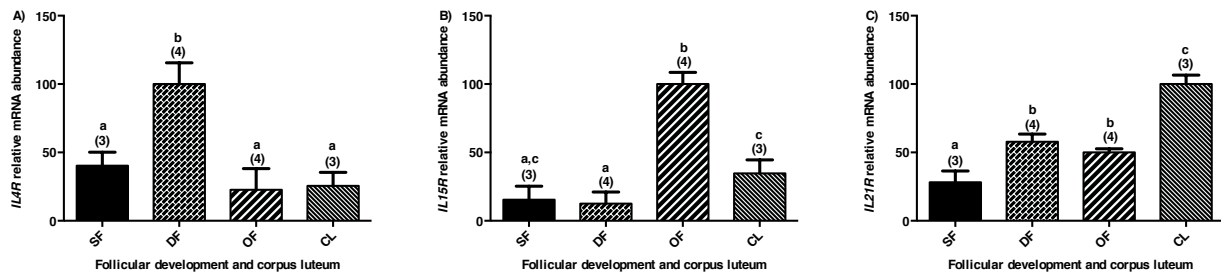


Figure 1. – Expression of target interleukin receptors in bovine granulosa cells during follicular development.

Total RNA extracts of GC from SF, DF, OF, and CL were analyzed by RT-qPCR for different interleukin receptors mRNA expression. Expression of IL4R (A) was greatest in DF as compared to SF, OF and CL ($P < 0.05$). IL15R expression (B) was significantly greater in OF as compared to SF, DF and CL ($P < 0.001$), while IL21R (F) mRNA expression were greatest in the CL as compared to the different groups of follicles. Relative mRNA expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method with RPL19 as reference gene. Different letters denote samples that differ significantly ($P < 0.05$).

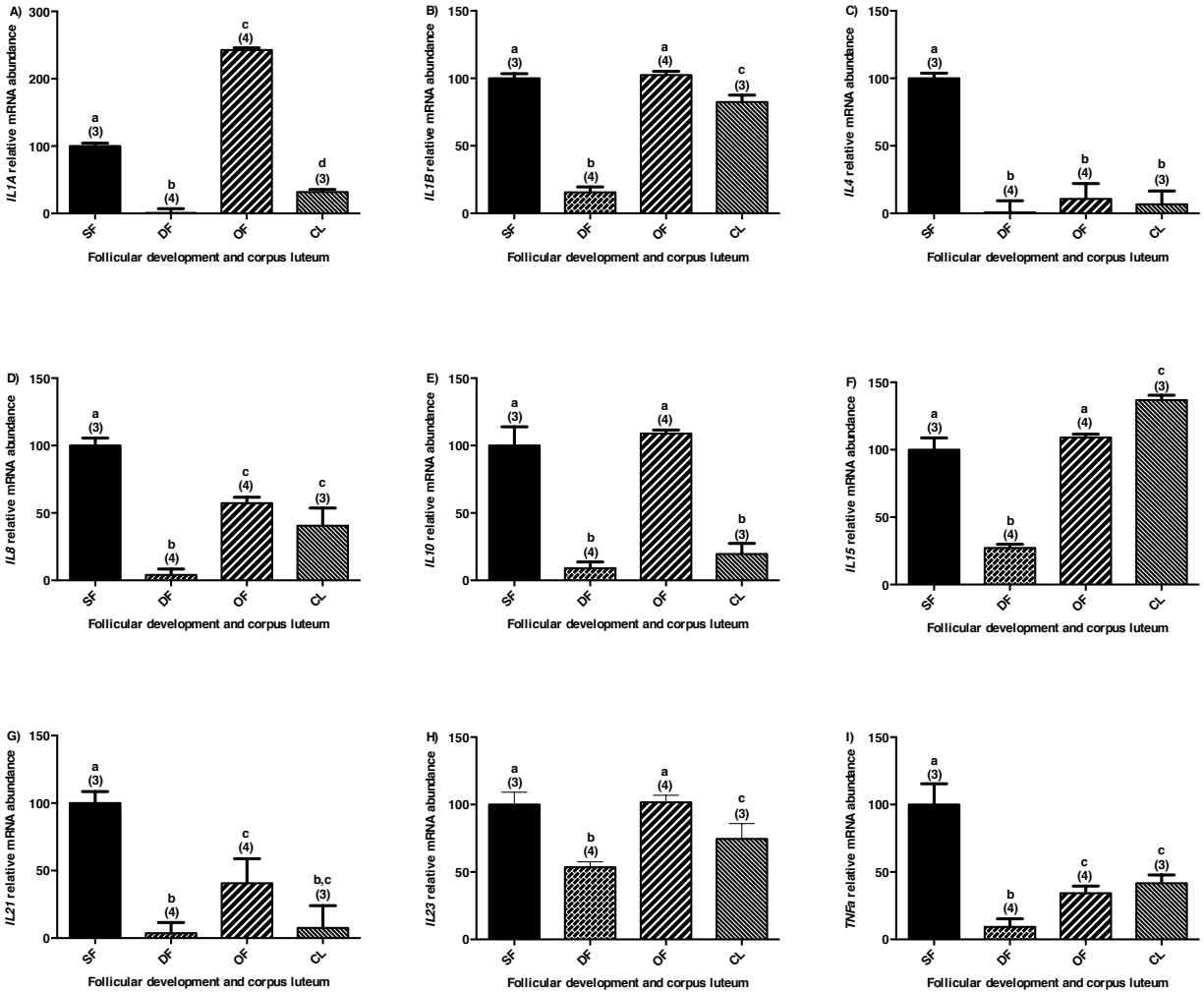


Figure 2. – Expression of target interleukins in bovine granulosa cells during follicular development.

Total RNA extracts of GC from SF, DF, OF, and CL were analyzed by RT-qPCR for different interleukin mRNA expression. IL1A (A), IL1B (B), IL8 (D), IL15 (F), IL21 (G), IL23 (H) and TNFα (I) mRNA expression were greatest in the OF as compared to the DF. Expression of IL4 (C) was greatest in SF as compared to DF, OF and CL ($P < 0.001$), while IL10 expression (E) was significantly greater in SF and OF as compared to DF and CL ($P < 0.001$). Relative mRNA expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method with RPL19 as reference gene. Different letters denote samples that differ significantly ($P < 0.05$).

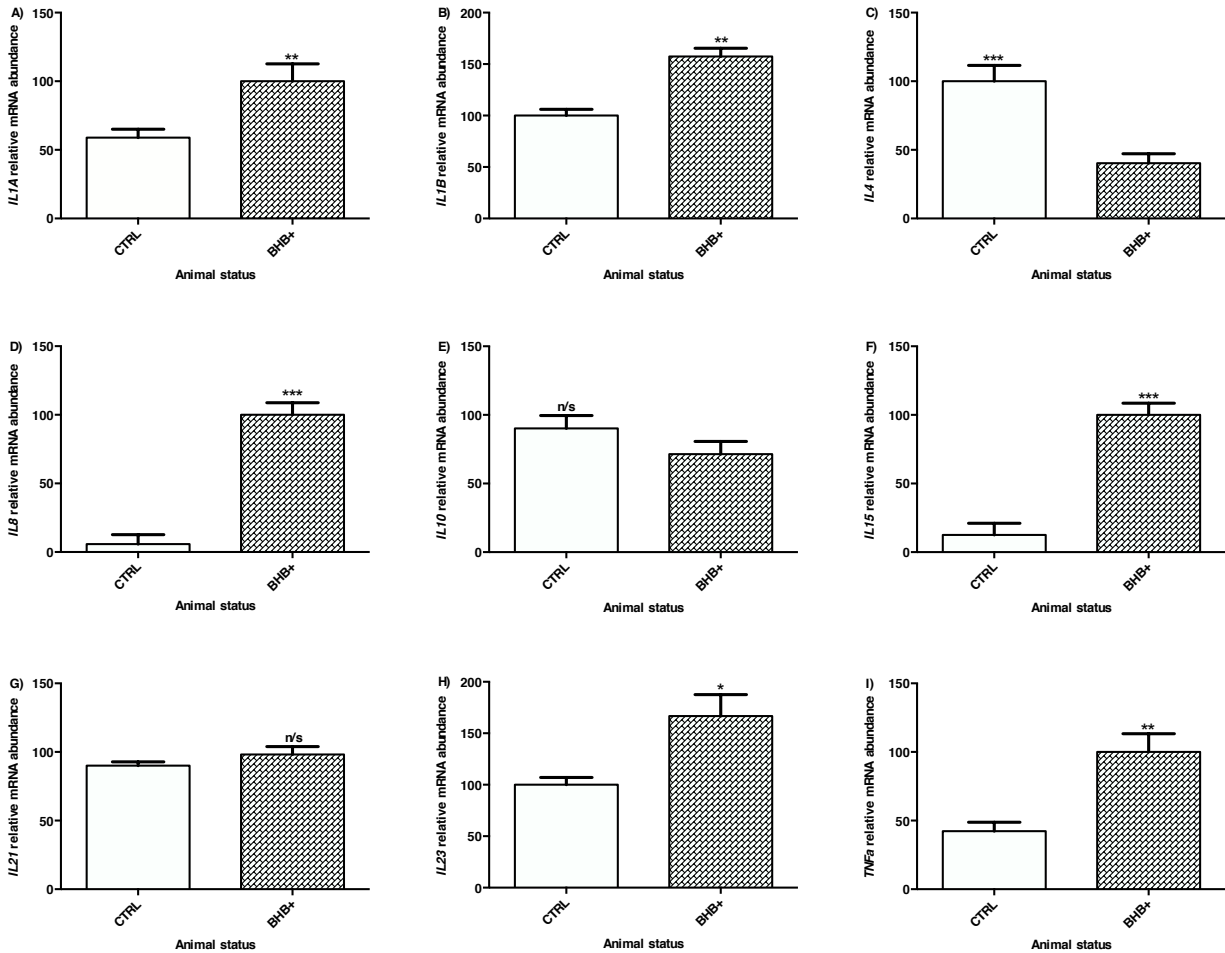


Figure 3. – Expression profile of target interleukins in bovine granulosa cells during the postpartum period.

Total RNA was extracted from GC of either postpartum cows with high BHB levels (BHB⁺) or low BHB (CTRL) and analyzed by RT-qPCR for different interleukin mRNA expression. *IL1A* (A), *IL1B* (B), *IL8* (D), *IL15* (F), *IL23* (H) and *TNFα* (I) were significantly induced during the postpartum period (BHB⁺ group) as compared to the control group. There was no difference for *IL21* mRNA expression between BHB⁺ and control groups (G). *IL4* (C) was significantly reduced during the postpartum period (BHB⁺ group) as compared to the control group, while there was no difference in *IL10* expression between the two groups (E). mRNA relative expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method with *RPL19* as reference gene. Bars marked with asterisks are significantly different from the control group (P<0.05). n/s, non-significant.

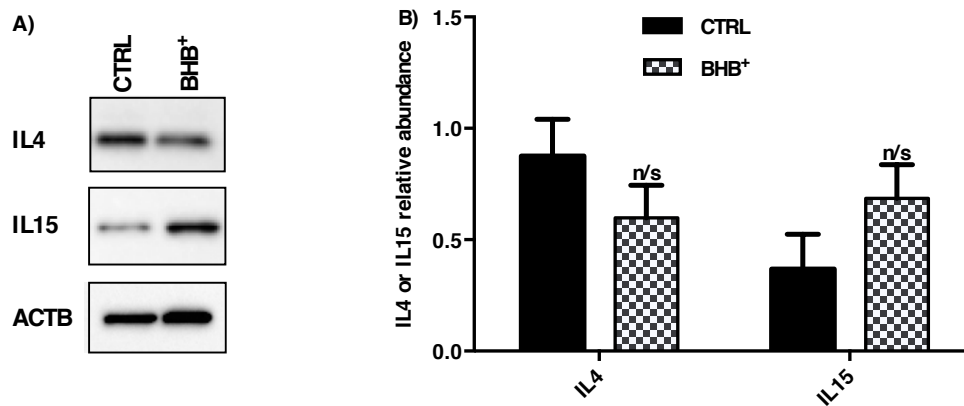


Figure 4. – Western blot analysis of IL4 and IL15 expression during the postpartum period. Total proteins were extracted from GC of BHB⁺ and control cows and analyzed using anti-IL4 and anti-IL15 antibodies. Abundance of IL4 and IL15 were measured as ratios of IL4/ACTB and IL15/ACTB, respectively. IL4 was relatively less abundant in BHB⁺ than in control GC while IL15 tended to be induced in BHB⁺ compared to the control (N = two replicates). CTRL, control; ACTB, beta actin; n/s, non-significant as compared to CTRL.

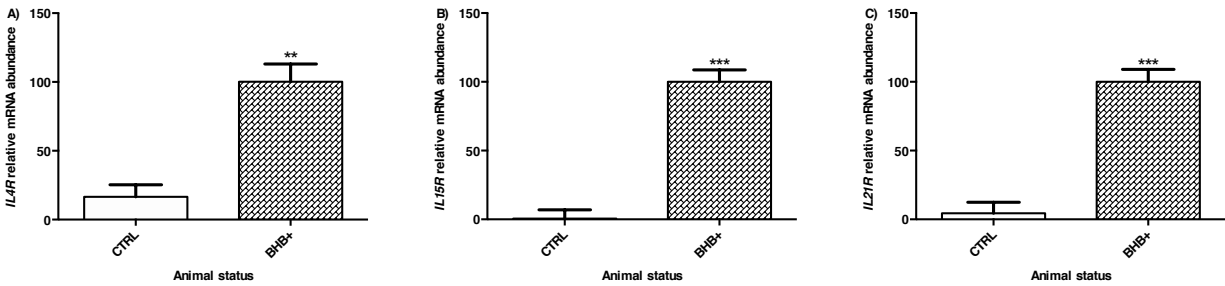


Figure 5. – Expression profile of target interleukins receptors in bovine granulosa cells during the postpartum period.

Total RNA was extracted from GC of either postpartum cows with high BHB levels (BHB⁺) or low BHB (CTRL) and analyzed by RT-qPCR for different interleukin receptors mRNA expression. *IL4R* (A), *IL15R* (B), and *IL21R* (C) were significantly induced during the postpartum period (BHB⁺ group) as compared to the control group. mRNA relative expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method with *RPL19* as reference gene. Bars marked with asterisks are significantly different from the control group ($P < 0.05$).

**CHAPITRE VII: DISCUSSION GÉNÉRALE,
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

VII.1. Discussion générale

Au cours des processus de croissance folliculaire et d'ovulation, les cellules stéroïdogéniques, y compris les cellules de la granulosa (CG), jouent un rôle crucial dans la maturation et la libération de l'ovocyte. Les CG contribuent en particulier à la synthèse des hormones stéroïdes, à la maturation des ovocytes et à la formation du corps jaune après l'ovulation (Knight and Glistler 2001, Rosenfeld, Wagner et al. 2001, Eppig, Wigglesworth et al. 2002, Richards and Ascoli 2018). Le contrôle de la prolifération et de la fonction des CG est donc complexe et dépend de la régulation précise de la transcription de gènes cibles spécifiques. Ce contrôle est particulièrement essentiel pour le développement folliculaire normal car il affecte l'état physiologique du follicule pré-ovulatoire. Les CG deviennent plus sensibles à la FSH et montrent un taux de prolifération plus élevé une fois qu'un follicule dominant est sélectionné (Rosenfeld, Wagner et al. 2001, Ndiaye, Fayad et al. 2005, Ndiaye, Castonguay et al. 2016), tandis que le follicule pré-ovulatoire affiche un tableau de gènes induits par le pic de LH ou l'injection d'hCG (Sayasith, Bouchard et al. 2008, Sayasith, Sirois et al. 2013, Lussier, Diouf et al. 2017). Notre laboratoire a identifié TRIB2 comme étant exprimé différemment dans les CG de follicules dominants et régulé à la baisse par l'hCG dans les follicules ovulatoires (Ndiaye, Fayad et al. 2005). Cependant, aucune étude n'avait été menée dans les follicules ovariens afin d'évaluer la fonction de TRIB2.

Les travaux effectués dans cette thèse ont mis en évidence l'importance physiologique de TRIB2 dans les CG au cours du développement folliculaire. Tout d'abord, nous avons démontré que TRIB2 est principalement exprimée dans les CG de follicules dominants par rapport aux follicules ovulatoires et que TRIB2 est régulé par la FSH et la LH. Nous avons également mis en évidence dans cette thèse que TRIB2 module positivement la signalisation MAPK dans les CG et régule la prolifération et l'activité des CG en modulant l'expression d'enzymes stéroïdogéniques dans un modèle de cellules de granulosa en culture. Enfin, nous avons identifié et confirmé des partenaires cibles de TRIB2 dans les CG et démontré que TRIB2 régule différemment l'expression de ces partenaires, révélant l'importance de TRIB2 dans le contrôle de l'expression génique liée à divers processus biologiques tels que la prolifération, la différenciation, la migration cellulaire, l'apoptose, la signalisation calcique et le métabolisme.

Nos études *in vivo* ont démontré que l'expression de TRIB2 était significativement régulée à la baisse par l'hCG aussi bien au niveau du ARN messager que de la protéine et ce résultat était confirmé avec le pic de LH endogène. Ces observations soutiennent l'hypothèse que TRIB2 serait impliqué dans le développement folliculaire correspondant aux stades de recrutement des petits follicules et de sélection du follicule dominant. Ces résultats suggèrent aussi que la signalisation de TRIB2 doit être inhibée ou réduite dans le follicule au stade péri-ovulatoire suivant le pic de LH afin de permettre l'initiation du processus ovulatoire. En effet, il a été démontré que LH pourrait inhiber l'induction de gènes impliqués dans la régulation des événements péri-ovulatoires (*EGRI*, *C/EBPβ*) (Sayasith, Brown et al. 2006), à la maturation des ovocytes (*AREG*) et à l'expansion du cumulus (*PTX3*, *TNFAIP6*) (Shimada, Hernandez-Gonzalez et al. 2006) ainsi que les gènes nécessaires à la rupture folliculaire (*ADAMTS1* ET *PTGS2*) (Su, Nyegaard et al. 2006, Fan, Liu et al. 2009, Siddappa, Beaulieu et al. 2015). Les analyses *in vitro* ont montré que, contrairement à la LH, la FSH a augmenté l'expression de TRIB2 dans les cellules de granulosa. Ce résultat est consistant avec les études antérieures ayant rapporté que l'expression de TRIB2 était régulée à la hausse par la *thyroid stimulating-hormone* (TSH) dans les cellules thyroïdiennes canines (Wilkin, Suarez - Huerta et al. 1997). Bien que le mécanisme par lequel la FSH stimule TRIB2 ne soit pas déterminé, il pourrait être impliquer dans les voies de signalisation MAPK ou Akt menant à une activation et un développement folliculaires adéquats. Des effets de la FSH sur la phosphorylation de MAPK3/1 et Akt ont en effet été rapportés dans des cellules ovariennes en culture (Tepekoy and Akkoyunlu 2016). Ces observations nous permettent de conclure que les gonadotrophines (FSH et LH) modulent l'expression de TRIB2 et peuvent contrôler la capacité de TRIB2 à affecter des gènes cibles dans les cellules de la granulosa au cours du développement folliculaire.

Les analyses d'inhibition et de surexpression suggèrent que TRIB2 modulerait la prolifération des CG et possiblement la croissance folliculaire au cours des dernières étapes du développement folliculaire menant à l'ovulation. Cependant, il est possible que TRIB2 puisse moduler positivement ou négativement la prolifération des cellules de granulosa en fonction de l'état des follicules, stimulant ainsi la prolifération des CG dans les petits follicules et inhibant la prolifération dans le follicule pré-ovulatoire. La régulation de TRIB2 décrite dans nos résultats *in vivo* suggère que TRIB2 pourrait être associée à une prolifération réduite des CG en concordance avec les résultats *in vitro*. Plus spécifiquement, la surexpression de TRIB2 et la diminution

subséquente de la prolifération peuvent être corrélées avec la plus forte expression de TRIB2 dans les CG du follicule dominant, qui exprime le récepteur à la LH (LHCGR) permettant un changement de dépendance de la FSH à la LH, et l'initiation de la différenciation des CG comme précédemment décrit (Fortune, Rivera et al. 2001). À cet égard, TRIB2 pourrait être lié à la limitation de la prolifération des CG dans le follicule dominant. La modulation de la prolifération par TRIB2 a été rapportée dans plusieurs études précédentes chez différentes espèces. Il a été démontré que la perte de TRIB2 a entraîné une forte prolifération des thymocytes en développement, ce qui suggère que TRIB2 régule négativement l'entrée ou la sortie du cycle cellulaire et donc la cinétique de division cellulaire de ces thymocytes (Liang, O'Connor et al. 2016). Chez la drosophile, la perte de TRIB2 a été associée à une prolifération accrue, tandis que la surexpression ralentissait le cycle cellulaire en contrôlant l'activité de la phosphatase String/CDC25 et altérant la fertilité (Mata, Curado et al. 2000, Seher and Leptin 2000). TRIB2 a été ainsi considéré comme un frein au cycle cellulaire, ce qui serait essentiel pour une prolifération équilibrée de différents types de cellules (Seher and Leptin 2000, Liang, O'Connor et al. 2016). Salomé et al. (Salomé, Magee et al. 2018) ont rapporté que TRIB2 pourrait contrer la résistance à la chimiothérapie et la propagation de la leucémie myéloïde via l'activation de p38 dans le cancer du foie. Par ailleurs, TRIB2 est surexprimé dans la leucémie myéloïde aiguë humaine (LMA) et accélère la progression de la LMA via l'inactivité de C/EBP α (Keeshan, He et al. 2006). Dans le cancer du foie, TRIB2 fonctionne comme une protéine adaptatrice et favorise la stabilisation de la protéine associée au co-activateur de la transcription YAP à travers la ligase d'ubiquitine E3 β TrCP, contribuant ainsi à la prolifération et à la transformation des cellules cancéreuses (Wang, Park et al. 2013).

La phase finale du développement folliculaire menant à la sélection d'un follicule dominant est conduite par une série d'événements de prolifération et d'apoptose (Liu, Zhang et al. 2019) avec la FSH et la LH contrôlant directement la maturation des complexes cumulus-ovocyte et l'ovulation. La FSH agit spécifiquement sur les CG au sein des follicules ovariens pour favoriser leur prolifération au stade pré-ovulatoire et contribue à la compétence méiotique de l'ovocyte (Chesnel and Eppig 1995). La FSH stimule la voie de signalisation MAPK qui joue un rôle prédominant dans la réponse ovulatoire à la LH dans les CG pré-ovulatoires (Fan, Liu et al. 2009, Donaubaer, Law et al. 2016). Donc, les processus de maturation et d'ovulation des ovocytes dépendent de la FSH et de la LH et nécessitent l'activation de MAPK dans les cellules de la

granulosa. La famille MAPK3/1 classique (p42/44 MAPK) est connue pour être un point de contrôle intracellulaire pour la mitose cellulaire (Zhang and Liu 2002). Dans les cellules ovariennes, une activation bi-phasique de MAPK à la phase G1 était corrélée à la capacité d'entrer en phase S (Tamemoto, Kadowaki et al. 1992). L'interférence avec les composants de la voie de signalisation MAPK3/1, notamment RAF-1 ou ERK1 a produit une inhibition significative de la prolifération cellulaire (Pages, Lenormand et al. 1993, Seger and Krebs 1995). Au contraire, la stimulation de l'activité MAPK3/1 a entraîné une augmentation de la prolifération cellulaire (Pages, Lenormand et al. 1993, Seger and Krebs 1995). Ces données démontrent que la cascade MAPK3/1 joue un rôle central dans le contrôle de la progression du cycle cellulaire. De plus, MAPK14 ou p38 semble jouer plusieurs rôles majeurs notamment dans l'apoptose, la différenciation, la survie, la prolifération, le développement, l'inflammation et d'autres réponses au stress (Takenaka, Moriguchi et al. 1998, Nebreda and Porras 2000). L'activité MAPK14 est aussi requise dans l'arrêt du cycle cellulaire induit par Cdc42 à G1/S (Takenaka, Moriguchi et al. 1998, Nebreda and Porras 2000). Ce rôle inhibiteur peut être médié par l'inhibition de l'expression de la cycline D1 (Takenaka, Moriguchi et al. 1998, Nebreda and Porras 2000). Récemment, il a été rapporté que MAPK14 était impliqué dans divers processus de différenciation des cellules vertébrées tels que les adipocytes, les cardiomyocytes, les chondroblastes, les érythroblastes, les myoblastes et les neurones (Nebreda and Porras 2000).

En lien avec la signalisation MAPK, il a été démontré que les membres de la famille TRIB interagissent avec différentes MAPK kinases (MAPKK), telles que MEK1 et MKK7, et favorisent ou inhibent l'activation en cascade de MAPK dans des contextes cellulaires distincts (Eder, Guan et al. 2008, Yokoyama, Kanno et al. 2010). Les TRIB sont également connus pour être associés à la signalisation MAPK et sont nécessaires pour l'activation de MAPK3/1, JNK et MAPK14 (Yokoyama, Kanno et al. 2010, Wei, Rosenberg et al. 2012, Wang, Park et al. 2013). Nos analyses *in vitro* ont démontré que l'inhibition de TRIB2 entraîne une diminution de l'abondance de MAPK14 ainsi qu'une réduction des niveaux de phosphorylation de MAPK14. Nous avons également montré que l'inhibition de TRIB2 entraîne une diminution des niveaux de phosphorylation de MAPK3/1. En revanche, la surexpression de TRIB2 a entraîné une augmentation des niveaux de phosphorylation de MAPK3/1 et MAPK14. Les expériences *in vivo* ont montré des résultats similaires avec une diminution des niveaux de phosphorylation pour

MAPK3/1 et MAPK14 24h après injection d'hCG coïncidant avec la régulation à la baisse de TRIB2. Ces données suggèrent une relation entre l'activité réduite de MAPK3/1 et MAPK14 et la réduction drastique de TRIB2 dans les CG 24h post-hCG. Ces données sont également en accord avec les études précédentes rapportant l'inhibition des voies de signalisation MAPK3/1 et MAPK14 à la suite d'une régulation négative de TRIB2 (Ma, Zhou et al. 2018, Salomé, Magee et al. 2018). Bien que TRIB2 ne conduise pas à la phosphorylation directe MAPK3/1 ou MAPK14, puisqu'il s'agit d'une pseudokinase, il pourrait agir comme un régulateur de l'activation de la voie MAPK dans les CG comme le montrent de nombreuses autres études où TRIB2 module la signalisation MAPK (Eder, Guan et al. 2008, Yokoyama, Kanno et al. 2010, Wei, Rosenberg et al. 2012, Liang, O'Connor et al. 2016) qui peut être liée à la prolifération cellulaire et au cancer (Wagner and Nebreda 2009). Dans une de ces études (Liang, O'Connor et al. 2016), l'absence de TRIB2 a conduit à une transformation leucémique des lymphocytes T associée à une altération de la signalisation MAPK. Dans une autre étude, le déficit en TRIB2 a entraîné l'accélération de la prolifération cellulaire et favorisé la survie dans les cellules leucémiques, en plus de conduire à une activation altérée de MAPK (Salomé, Magee et al. 2018).

L'ensemble de nos résultats révèle pour la première fois que TRIB2 pourrait agir comme un régulateur de la prolifération des CG et fonctionner probablement en modulant les voies de signalisation notamment les MAPK en réponse à des signaux tels que la FSH ou la LH.

Nos études ont également permis l'identification de protéines partenaires de TRIB2 dans les CG de follicules dominants incluant CALM1, INHBA, INPPL1/SHIP2, NT5E, SCD, SDHB, et RAB14. L'interaction de TRIB2 avec chaque partenaire identifié a été confirmée par co-immunoprécipitation *in vitro* et par un test de complémentation enzymatique permettant de mesurer la luminescence générée par l'interaction entre les protéines partenaires. Une grande variété d'interactions de TRIB2 a été décrite dans diverses études et divers contextes cellulaires en utilisant des techniques de criblage d'interaction par affinité ou la méthode double-hybride. Par exemple, alors que TRIB2 interagit avec NF- κ B dans les cellules épithéliales (Wei, Rosenberg et al. 2012), il interagit avec OCT4 dans les cellules souches embryonnaires, bien que la région structurale exacte de TRIB2 responsable de cette interaction soit encore insaisissable (Do, Park et al. 2017). Une récente revue a résumé les multiples interactions de TRIB2 dans un contexte de maladie (Mayoral-Varo, Jiménez et al. 2021). Dans le cancer colorectal, TRIB2 interagit avec la protéine

AP4 via le domaine pseudokinase (Hou, Guo et al. 2018). De même, il a été démontré que TRIB2 se lie à C/EBP- α et facilite sa dégradation dans un processus proposé comme étant une caractéristique clé de la leucémie myéloïde aiguë induite par TRIB2 (Keeshan, He et al. 2006). TRIB2 ainsi que d'autres membres de la famille TRIB contrôlent le développement des cellules hématopoïétiques et régulent la fonction cellulaire via des interactions protéiques et la régulation de l'activité et de la dégradation de protéines cibles. Cependant, notre étude est la première qui a rapporté des partenaires de TRIB2 dans les cellules reproductrices et plus spécifiquement les CG. Les interactions entre TRIB2 et ces partenaires de liaison pourraient conduire à divers événements, y compris la dégradation ou l'activation de protéines cibles entraînant des changements d'expression génique et éventuellement contribuant à la croissance folliculaire, la différenciation des cellules stéroïdogéniques en cellules lutéales après l'ovulation et la fonction du corps jaune. En effet, la manipulation de TRIB2 soit par inhibition ou surexpression affecte différemment les partenaires. L'expression de INPPL1 et INHBA était diminuée dans les CG à la suite de l'inhibition de TRIB2 et augmentée à la suite de la surexpression de TRIB2 tandis que NT5E et SDHB étaient augmentés après l'inhibition de TRIB2. CALM1 était augmentée à la suite de la surexpression de TRIB2 alors que RAB14 était augmentée à la suite de l'inhibition et la surexpression de TRIB2. Le réseau de signalisation associé à TRIB2 et à ses partenaires de liaison dans les cellules de granulosa au cours du développement folliculaire ovarien n'est pas entièrement défini. Cependant, les résultats de cette thèse combinés à celles de la littérature suggèrent que TRIB2 peut être impliqué dans différentes voies de signalisations au sein des cellules de granulosa. Par exemple, CALM1 régule positivement l'activation de la voie Ras/Raf/MEK/ERK dans les cellules de granulosa lutéinisées (Stocco, Lau et al. 2002), et la famille des TRIB a été classée parmi les pseudokinases sérine/thréonine dont le domaine pseudokinase est similaire au site actif des kinases canoniques CAMK (protéine kinase dépendante du calcium/calmoduline). L'interaction trouvée dans cette étude entre CALM1 et TRIB2 pourrait jouer un rôle clé dans la modulation de l'effet de CALM1 dans la voie de signalisation Ras/ERK, ce qui peut affecter la prolifération des cellules de granulosa du follicule dominant.

Pareillement, RAB14 a été identifiée comme un partenaire de liaison de TRIB2. RAB14 est membre de la superfamille des oncogènes RAS de petites protéines G qui sont inactives lorsqu'elles sont liées au GDP, mais se transforment en une forme active lorsqu'elles sont liées au GTP. Les

protéines RAB activées recrutent des protéines effectrices vers la membrane vésiculaire et favorisent le trafic membranaire (Zerial and McBride 2001). L'analyse de l'expression de RAB14 *in vivo* a démontré la plus forte expression de RAB14 aux stades de follicules dominants et ovulatoires, ce qui suggère que RAB14 pourrait être associé à la croissance et au maintien du follicule dominant et impliqué dans la transition vers le stade ovulatoire. Mais étonnamment, dans notre modèle *in vitro* de culture de CG, l'inhibition et la surexpression de TRIB2 ont entraîné une augmentation significative de l'expression de RAB14, ce qui pourrait être lié à la capacité de la famille RAB à basculer entre un état inactif et actif et à ses nombreux rôles dans le développement des tissus. Fait intéressant, il a été montré que RAB14 interagit avec le cellular communication network factor 2/CCN family 2 (CCN2) /connective tissue growth factor (CTGF) à travers son domaine de type IGFBP, indiquant une régulation du trafic de membrane intracellulaire (Hoshijima, Hattori et al. 2020) alors que plusieurs études antérieures ont démontré l'implication de CCN2 dans de nombreuses fonctions cellulaires, y compris la prolifération et la différenciation de divers types de cellules (Takigawa 2003, Chang, Pan et al. 2016, Li, Pongkitwitoon et al. 2019). La surexpression de RAB14 était également associée à la croissance cellulaire, de l'invasion cellulaire et de la progression du cycle cellulaire, tout en augmentant également l'expression des cyclines impliquées dans la progression du cycle cellulaire telles que les cyclines D et E et l'expression de CTGF dans les cancers du poumon cellulaire (Zhang, Zhao et al. 2020). Les auteurs cette étude ont proposé que RAB14 augmente la prolifération et l'invasion par la voie YAP (Zhang, Zhao et al. 2020). De même, TRIB2 s'est également avéré affecter CTGF puisque la diminution de TRIB2 dans les cellules HepG2 a inhibé CTGF, qui est connu comme un gène cible de YAP (Zhao, Ye et al. 2008, Dupont, Morsut et al. 2011).

Nos résultats démontrent également que l'inhibition de TRIB2 via CRISPR/Cas9 entraînait une diminution de l'abondance de CTGF ainsi que ANKRD1, un autre gène cible de YAP et que la surexpression de TRIB2 entraînait une augmentation de l'expression de CTGF et ANKRD1 conformément aux données précédemment rapportées (Keeshan, He et al. 2006, Zhao, Ye et al. 2008, Dedhia, Keeshan et al. 2010, Dupont, Morsut et al. 2011, Grandinetti, Stevens et al. 2011). Il a été démontré que YAP est activée par les stéroïdes sexuels dans les cellules de granulosa des follicules au stade secondaire/pré-antral et pourrait contribuer à la croissance folliculaire avant d'être inactivée par la LH au moment de l'ovulation (Zhang, George et al. 2011). Conformément

à ces résultats, nous pouvons fortement suggérer que l'interaction de TRIB2 avec RAB14 peut jouer un rôle important dans le développement folliculaire notamment la prolifération, la différenciation, l'activité des CG et l'ovulation via une voie impliquant probablement la voie Hippo, comme précédemment suggéré dans d'autres modèles cellulaires (Harlow, Davidson et al. 2002, Grandinetti, Stevens et al. 2011, Wang, Park et al. 2013, Zhang, Zhao et al. 2020).

Par ailleurs, dans les études cancérologiques, un lien étroit a été rapporté entre les voies de signalisation Hippo et Wnt (Azzolin, Panciera et al. 2014, Lien and Fuchs 2014, Martin-Orozco, Sanchez-Fernandez et al. 2019, Sharma, Mir et al. 2021) d'une part, et entre TRIB2 et les voies Hippo et Wnt (Zhao, Ye et al. 2008, Dupont, Morsut et al. 2011, Wang, Park et al. 2013) d'autre part. En effet, les trois effecteurs, β -caténine (voie Wnt), YAP et TAZ (voie Hippo), sont impliqués dans la régulation de l'ubiquitination médiée par β TrCP (Azzolin, Zanconato et al. 2012, Sharma, Mir et al. 2021). Dans des conditions où la voie Wnt est inactive, YAP/TAZ se lie au complexe de destruction et recrute β TrCP, favorisant ainsi la dégradation de la β -caténine (Azzolin, Panciera et al. 2014) (Azzolin et al., 2014). De même, la β -caténine phosphorylée par GSK3 β peut se lier à TAZ et initier son ubiquitination (Azzolin, Zanconato et al. 2012). Dans le contexte du carcinome hépatocellulaire, TRIB2 s'est révélé un effecteur en aval et un régulateur en amont de la signalisation Wnt. TRIB2 est spécifiquement activé par les effecteurs de la voie Wnt (TCF4 et β -caténine) dans la lignée cellulaire HepG2 (Wang, Park et al. 2013). En revanche, Trib2 avec son ubiquitine ligase E3 associée β TrCP, COP1 et SMURF1, conduit à l'ubiquitination et à la dégradation de TCF4 et de β -caténine et diminue ainsi l'activité Wnt (Xu, Tong et al. 2014, Fang, Zekiy et al. 2021). Plus important encore, Trib2 interagit avec β TrCP pour accélérer la stabilisation de la protéine YAP (voie Hippo) et favorise la prolifération des cellules cancéreuses du foie (Wang, Park et al. 2013). En reproduction, les membres de la signalisation Wnt sont connus pour réguler la réponse du follicule ovarien aux gonadotrophines (Boyer, Goff et al. 2010, Lapointe and Boerboom 2011). Chez la vache, Il a été rapporté que la sélection du follicule dominant était liée à la signalisation Wnt sous le contrôle de la FSH (Gupta, Folger et al. 2014). Cependant, WNT5A contrôle négativement la stéroïdogenèse des cellules de granulosa bovines stimulées par la FSH en supprimant l'activité de signalisation WNT canonique et en induisant la voie non canonique MAPK8/JUN (Abedini, Zamberlam et al. 2015). Dans cette thèse, nous avons trouvé que la FSH stimule l'expression de TRIB2 et un effet négatif de TRIB2 sur la prolifération et l'activité des CG

en modulant l'expression d'enzymes stéroïdogéniques (CYP19A1) dans les cellules de granulosa bovines en culture. Il est possible que la FSH puisse agir sur TRIB2 à travers la voie WNT avec un feedback de TRIB2 sur la voie WNT canonique à travers la voie WNT non canonique pour réguler la prolifération et la stéroïdogénèse des cellules de granulosa. Mais également, nous pouvons suggérer que TRIB2 favorise la stabilisation de la protéine YAP en agissant sur la voie WNT comme démontré dans le cancer du foie (Wang, Park et al. 2013), ce qui expliquerait l'augmentation et la diminution des gènes cibles (CTGF et ANKRD1) de la voie Hippo obtenues, respectivement suite à la surexpression et l'inhibition de TRIB2 dans les cellules de granulosa en culture (article 1). À cet effet, TRIB2 peut être un lien intéressant entre les voies Hippo et WNT dans les cellules de granulosa.

Nous avons aussi identifié INPPL1 comme partenaire de TRIB2 dans les cellules de granulosa. INPPL1 est un régulateur négatif de la signalisation de l'insuline puisque son inactivation chez la souris a entraîné une augmentation de la sensibilité à l'insuline (Clément, Krause et al. 2001). Il a été aussi démontré que INPPL1 agit en aval de la phosphoinositide-3-kinase (PI3K), qui est un composant important des mécanismes de signalisation intracellulaire (Blunt and Ward 2012). PI3K phosphoryle le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate pour générer le phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP3), qui active ensuite plusieurs enzymes cellulaires, dont la protéine kinase Akt, pour réguler la croissance et la survie des cellules (Vanhaesebroeck, Leevers et al. 2001). INPPL1 est capable de déphosphoryler la position 5 de PIP3 générée par la PI3-kinase, produisant un nouveau second messager PI-3,4-bisphosphate (PI-3,4-P2) (Rohrschneider, Fuller et al. 2000). Une expression irrégulière d'INPPL1 peut alors perturber la voie normale PI3K/Akt, qui a une fonction importante dans le contrôle de la prolifération et de la mort cellulaires ainsi que dans le développement et la progression de tumeurs (Ichihara, Wada et al. 2013). D'autres études ont également démontré un rôle positif d'INPPL1 dans l'activation d'Akt induite par EGF dans les cellules cancéreuses du sein et dans les neurosphères (Sattler, Verma et al. 2001, Prasad 2009). A travers ces données nous pouvons suggérer que TRIB2 pourrait agir sur la voie Akt par l'interaction avec INPPL1 pour réguler la croissance et la survie des cellules de granulosa.

Cette thèse a permis d'établir un profil des interleukines présentes dans les CG durant la période post-partum et en fonction des niveaux de bêta hydroxybutyrate (BHB). Bien que cette

étude à son début n'eût pas inclus une analyse de la régulation de TRIB2 chez les vaches en post-partum, les analyses complémentaires ont toutefois révélé un lien possible entre la réduction de TRIB2 et la présence d'interleukines pro-inflammatoires chez les vaches avec un taux élevé de BHB. Similairement, la réduction de l'expression de TRIB2 observée dans notre modèle *in vivo* de CG de follicules ovulatoires suite à l'injection d'hCG ou le pic de LH était aussi bien corrélée avec l'induction d'ILs pro-inflammatoires dont l'IL15 dans ces follicules post-hCG. Cependant, la forte expression de TRIB2 dans les follicules dominants était concomitante avec une forte expression d'ILs anti-inflammatoires telle que l'IL4 et une faible expression d'ILs pro-inflammatoires. Les mécanismes de contrôle régulant la fonction du système immunitaire inné peuvent être essentiels pour des événements reproductifs réussis (Basatvat, Carter et al. 2015). Les trois membres de la famille TRIB, Trib1, Trib2 et Trib3, ont été signalés comme des régulateurs du système immunitaire inné en interagissant avec les voies de signalisation du facteur nucléaire kappa-B (NF-KB) médiées par le récepteur de type péage (TLR) (Ostertag, Jones et al. 2010, Smith, Moran et al. 2011). NF-KB est un groupe de facteurs de transcription clés qui contrôlent l'expression de diverses cytokines, chimiokines, facteurs de croissance et molécules d'adhésion liés à l'immunité innée et à différents processus inflammatoires (Ghosh and Karin 2002). TRIB2 s'est également avéré réguler négativement la voie de signalisation NF-KB stimulée par le ligand TLR5 (Wei, Rosenberg et al. 2012). Wei et al., ont démontré que Trib2 peut agir comme un facteur anti-inflammatoire et peut affecter les deux bras effecteurs de la signalisation TLR5 ; la voie de la protéine kinase activée par les mitogènes (MAPK) et les voies NF-KB de manière opposée (Wei, Rosenberg et al. 2012). D'autre part, le traitement siTrib2 du même type cellulaire a augmenté l'activité luciférase de NF-KB en réponse à la flagelline (Wei, Rosenberg et al. 2012). Par ailleurs il a été démontré que la protéine à motif tripartite (TRIM) joue un rôle important dans la pathogenèse du "oral squamous cell carcinoma" (OSCC) (Jaworska, Wlodarczyk et al. 2020). TRIM via la modulation de l'axe de signal TRIB2-MAPK peut favoriser une expression anormale de l'interleukine-6 (IL-6) et perturber l'équilibre TH1/TH2 [interféron-gamma (IFN- γ) et IL-4] dans les cellules T (Jiang, Wei et al. 2020). Malgré le fait que nos analyses n'aient pas évalué les mécanismes établissant le lien entre TRIB2 et ces ILs, les observations seraient consistantes avec un rôle de TRIB2 dans la régulation de voies de signalisation inflammatoires associées à l'ovulation.

L'ensemble des données de cette thèse nous amènent à suggérer que TRIB2 pourrait agir via plusieurs voies de signalisation dont les voies MAPK, AKT, Hippo et WNT ou d'autres voies pour réguler la prolifération et l'activité ovarienne notamment la stéroïdogénèse selon le stade folliculaire. Les données suggèrent également que la régulation de TRIB2 à la baisse par la LH/hCG serait nécessaire pour initier les voies de signalisation dont celles inflammatoires menant à l'ovulation. Des études supplémentaires seront nécessaires pour identifier et élucider les détails des différents liens entre TRIB2 et les effecteurs potentiels impliqués dans les cascades de signalisations dans les cellules de granulosa.

VII.2. Conclusions

Les résultats obtenus dans le cadre de cette thèse ont permis de mettre en avant pour la première fois le rôle de TRIB2 dans la reproduction, plus précisément dans les cellules de granulosa de l'ovaire chez un mammifère. Les travaux effectués dans cette thèse ont également permis d'identifier pour la première fois des partenaires de liaison de TRIB2 dans un système reproductif et caractérisé la régulation de TRIB2 et de ses partenaires au cours du développement folliculaire ovarien suite à la stimulation à l'hCG ou LH. De plus, nos résultats *in vitro* ont démontré la régulation de ces partenaires par TRIB2 et les effets de TRIB2 sur la prolifération et l'activité des CG; ce qui supporte un rôle crucial de TRIB2 dans les processus biologiques et une preuve solide que TRIB2 pourrait agir en tant que régulateur des effecteurs cibles pendant le développement folliculaire incluant certaines interleukines cibles. Nos recherches ont donc permis de positionner TRIB2 comme une protéine qui pourrait être impliquée dans plusieurs voies de signalisation indispensables à la régulation et à l'activité des CG au cours du développement folliculaire. De nouvelles recherches pourront être menées afin d'approfondir les mécanismes mis en jeu par TRIB2 dans ces voies au sein des cellules de granulosa mais également dans d'autres types cellulaires. Les connaissances des mécanismes physiologiques de TRIB2, de ses partenaires et cibles potentielles au cours du développement folliculaire et l'ovulation permettent, d'une part, d'améliorer notre compréhension de la physiologie de l'ovaire et, d'autre part, fournir de nouvelles cibles moléculaires pour mieux contrôler la fonction ovarienne et améliorer la fertilité.

VII.3. Perspectives

Afin de mieux comprendre les voies de signalisation affectées par TRIB2 dans les CG, il serait intéressant, d'une part, d'évaluer en détail les expressions protéiques des autres kinases activées par la FSH et LH notamment PI3K/AKT, PKA, PKC ainsi que la phosphorylation de leurs facteurs de transcription CREB1, NR5A1, SP1 par western blot dans les expériences suite à l'inhibition ou la surexpression de TRIB2 dans les CG. D'autre part, plusieurs expérimentations additionnelles de cultures de CG pourraient être réalisées afin de vérifier par analyses western blot l'expression de TRIB2 et de ses différents partenaires dans les CG après l'inactivation des différents composants des voies de signalisation de FSH et LH.

L'identification des cibles transcriptionnelles de TRIB2 par séquençage d'ARN a été réalisée. Les résultats générés démontrent la présence de centaines de gènes candidats dont les quantités d'ARNm diffèrent significativement dans les groupes de surexpression et d'inhibition comparés au contrôle. Les analyses en cours permettront de confirmer la régulation de certains gènes sélectionnés par qPCR et définir les processus biologiques spécifiques ou des cascades de signalisation associées aux gènes sous le contrôle de TRIB2.

L'inhibition de TRIB2 a entraîné une diminution de l'expression des facteurs de transcription CTGF et ANKRD1, tandis que la surexpression de TRIB2 a augmenté CTGF et ANKRD1. CTGF et ANKRD1 sont des facteurs de transcription de la voie Hippo et il a été démontré que YAP est activée par les stéroïdes sexuels dans les cellules de granulosa des follicules au stade secondaire/pré-antral et pourrait contribuer à la croissance folliculaire avant d'être inactivée par la LH au moment de l'ovulation (Zhang, George et al. 2011). Il sera donc intéressant d'investiguer davantage par analyses western dans les expériences d'inhibition et de surexpressions de TRIB2, l'expression des principaux éléments de la voie de signalisation Hippo notamment les MST1/2 (*mammalian sterile twenty-like 1 et 2*), SAV1 (Salvador family WW domain containing protein 1), LATS1/2 (*Large tumor suppressor 1 et 2*), MOB1 (Mps one binder 1) et YAP/TAZ qui forment la cascade de kinases permettant d'activer les facteurs de transcription CTGF et ANKRD1. Les résultats de ces analyses généreront plus d'information sur TRIB2 par rapport à la cascade de signalisation de la voie Hippo dans la régulation de la prolifération et de la stéroïdogenèse des cellules de granulosa.

De plus, les mécanismes par lesquels TRIB2 régule l'expression des partenaires de liaison n'a pas été élucidé dans cette étude. Les résultats actuels pourraient servir de base aux futures études ciblant la régulation des cellules de granulosa pendant la phase pré-ovulatoire en utilisant des cellules de granulosa dans lesquelles TRIB2 est soit inhibé ou surexprimé pour identifier les voies affectées par TRIB2 et établir leur pertinence dans le développement folliculaire et l'activité des cellules de granulosa.

En outre le motif peptidique structurel C-terminal DQXVP [D/E] des TRIB soutient une association directe avec les ligases d'ubiquitine E3, y compris COP1, qui spécifie les chaînes d'ubiquitine liées à K48 dans des substrats tels que C/EBP α , régulant ainsi la stabilité du facteur de transcription via le système d'ubiquitination et le protéasome. Il a été démontré que TRIB2 se lie à C/EBP- α et facilite sa dégradation dans un processus proposé comme étant une caractéristique clé de la leucémie myéloïde aiguë induite par TRIB2 (Keeshan, He et al. 2006). En ce sens, plusieurs expérimentations additionnelles pourraient se greffer aux présents travaux notamment la vérification par analyse western de l'expression protéique des différents partenaires de TRIB2 dans les CG et l'analyse du taux d'ubiquitination de ces partenaires suite à l'inhibition et à la surexpression de TRIB2 par CRISPR/Cas9 et le système pQE, respectivement.

Enfin, hormis l'INHBA, il y'a peu de données sur les partenaires de TRIB2 identifiés dans ces travaux de thèse dans la littérature en lien avec la reproduction. A cet effet, des études pourraient être effectuées afin d'élucider la fonction et les voies de signalisation de chacune des partenaires de TRIB2 dans la reproduction, précisément au niveau des cellules de granulosa.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abedini, A., G. Zamberlam, D. Boerboom and C. A. Price (2015). "Non-canonical WNT5A is a potential regulator of granulosa cell function in cattle." Mol Cell Endocrinol **403**: 39-45.

Adams, G. P., R. Matteri, J. Kastelic, J. Ko and O. Ginther (1992). "Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers." Reproduction **94**(1): 177-188.

Aerts, J. M. and P. E. Bols (2010). "Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species. Part I: Folliculogenesis and pre-antral follicle development." Reprod Domest Anim **45**(1): 171-179.

Aerts, J. M. and P. E. Bols (2010). "Ovarian follicular dynamics. A review with emphasis on the bovine species. Part II: Antral development, exogenous influence and future prospects." Reprod Domest Anim **45**(1): 180-187.

Akison, L. K., S. A. Robertson, M. B. Gonzalez, J. S. Richards, C. W. Smith, D. L. Russell and R. L. Robker (2018). "Regulation of the ovarian inflammatory response at ovulation by nuclear progesterone receptor." Am J Reprod Immunol **79**(6): e12835.

Albamonte, M. I., M. S. Albamonte, R. M. Bou-Khair, L. Zuccardi and A. D. Vitullo (2019). "The ovarian germinal reserve and apoptosis-related proteins in the infant and adolescent human ovary." Journal of Ovarian Research **12**(1): 22.

Alila, H. W. and W. Hansel (1984). "Origin of different cell types in the bovine corpus luteum as characterized by specific monoclonal antibodies." Biol Reprod **31**(5): 1015-1025.

Amsterdam, A., A. Dantes and M. Liscovitch (1994). "Role of phospholipase-D and phosphatidic acid in mediating gonadotropin-releasing hormone-induced inhibition of preantral granulosa cell differentiation." Endocrinology **135**(3): 1205-1211.

Amsterdam, A., T. Hanoch, A. Dantes, K. Tajima, J. F. Strauss III and R. Seger (2002). "Mechanisms of gonadotropin desensitization." Molecular and cellular endocrinology **187**(1-2): 69-74.

Amsterdam, A., R. Sasson, I. Keren-Tal, D. Aharoni, A. Dantes, E. Rimon, A. Land, T. Cohen, Y. Dor and L. Hirsh (2003). "Alternative pathways of ovarian apoptosis: death for life." Biochemical pharmacology **66**(8): 1355-1362.

Araújo, V. R., M. O. Gastal, J. R. Figueiredo and E. L. Gastal (2014). "In vitro culture of bovine preantral follicles: a review." Reproductive Biology and Endocrinology **12**(1): 78.

Asselin, E., A. K. Goff, H. Bergeron and M. A. Fortier (1996). "Influence of sex steroids on the production of prostaglandins F₂ alpha and E₂ and response to oxytocin in cultured epithelial and stromal cells of the bovine endometrium." Biol Reprod **54**(2): 371-379.

Assidi, M., S. J. Dieleman and M.-A. Sirard (2010). "Cumulus cell gene expression following the LH surge in bovine preovulatory follicles: potential early markers of oocyte competence." Reproduction **140**(6): 835.

Assou, S., T. Anahory, V. Pantesco, T. Le Carrou, F. Pellestor, B. Klein, L. Reyftmann, H. Dechaud, J. De Vos and S. Hamamah (2006). "The human cumulus--oocyte complex gene-expression profile." Hum Reprod **21**(7): 1705-1719.

Azzolin, L., T. Panciera, S. Soligo, E. Enzo, S. Bicciato, S. Dupont, S. Bresolin, C. Frasson, G. Basso, V. Guzzardo, A. Fassina, M. Cordenonsi and S. Piccolo (2014). "YAP/TAZ Incorporation in the β -Catenin Destruction Complex Orchestrates the Wnt Response." Cell **158**(1): 157-170.

Azzolin, L., F. Zanconato, S. Bresolin, M. Forcato, G. Basso, S. Bicciato, M. Cordenonsi and S. Piccolo (2012). "Role of TAZ as mediator of Wnt signaling." Cell **151**(7): 1443-1456.

Baltus, A. E., D. B. Menke, Y. C. Hu, M. L. Goodheart, A. E. Carpenter, D. G. de Rooij and D. C. Page (2006). "In germ cells of mouse embryonic ovaries, the decision to enter meiosis precedes premeiotic DNA replication." Nat Genet **38**(12): 1430-1434.

Bao, R.-M., K. Hayakawa, M. Moniruzzaman, H. Taketsuru and T. Miyano (2011). "FOXO3 Knockdown Accelerates Development of Bovine Primordial Follicles." The Journal of reproduction and development **57**: 475-480.

Bartel, D. P. (2009). "MicroRNAs: target recognition and regulatory functions." Cell **136**(2): 215-233.

Basatvat, S., D. A. Carter, E. Kiss-Toth and A. Fazeli (2015). "Tribbles role in reproduction." Biochem Soc Trans **43**(5): 1116-1121.

Basatvat, S., D. A. L. Carter, E. Kiss-Toth and A. Fazeli (2015). "Tribbles role in reproduction." Biochemical Society Transactions **43**(5): 1116-1121.

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

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

Bhat, A. A., S. Uppada, I. W. Achkar, S. Hashem, S. K. Yadav, M. Shanmugakonar, H. A. Al-Naemi, M. Haris and S. Uddin (2019). "Tight Junction Proteins and Signaling Pathways in Cancer and Inflammation: A Functional Crosstalk." Frontiers in Physiology **9**(1942).

Billig, H., S. Y. Chun, K. Eisenhauer and A. J. Hsueh (1996). "Gonadal cell apoptosis: hormone-regulated cell demise." Hum Reprod Update **2**(2): 103-117.

Blunt, M. D. and S. G. Ward (2012). "Targeting PI3K isoforms and SHIP in the immune system: new therapeutics for inflammation and leukemia." Curr Opin Pharmacol **12**(4): 444-451.

Boerboom, D., M. Paquet, M. Hsieh, J. Liu, S. P. Jamin, R. R. Behringer, J. Sirois, M. M. Taketo and J. S. Richards (2005). "Misregulated Wnt/ β -catenin signaling leads to ovarian granulosa cell tumor development." Cancer research **65**(20): 9206-9215.

Boyer, A., A. K. Goff and D. Boerboom (2010). "WNT signaling in ovarian follicle biology and tumorigenesis." Trends in Endocrinology & Metabolism **21**(1): 25-32.

Boyer, A., A. K. Goff and D. Boerboom (2010). "WNT signaling in ovarian follicle biology and tumorigenesis." Trends Endocrinol Metab **21**(1): 25-32.

Boyer, A., É. Lapointe, X. Zheng, R. G. Cowan, H. Li, S. M. Quirk, F. J. DeMayo, J. S. Richards and D. Boerboom (2010). "WNT4 is required for normal ovarian follicle development and female fertility." The FASEB Journal **24**(8): 3010-3025.

Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.

Brisard, D., F. Chesnel, S. Elis, A. Desmarchais, L. Sanchez-Lazo, M. Chasles, V. Maillard and S. Uzbekova (2014). "Tribbles expression in cumulus cells is related to oocyte maturation and fatty acid metabolism." J Ovarian Res **7**: 44.

Brownstein, M. J., J. T. Russell and H. Gainer (1980). "Synthesis, transport, and release of posterior pituitary hormones." Science **207**(4429): 373-378.

Brule, S., F. Rabahi, R. Faure, J. F. Beckers, D. W. Silversides and J. G. Lussier (2000). "Vacuolar system-associated protein-60: a protein characterized from bovine granulosa and luteal cells that is associated with intracellular vesicles and related to human 80K-H and murine beta-glucosidase II." Biol Reprod **62**(3): 642-654.

Brunet, S. and B. Maro (2005). "Cytoskeleton and cell cycle control during meiotic maturation of the mouse oocyte: integrating time and space." Reproduction **130**(6): 801-811.

Bukovsky, A. and J. Presl (1979). "Ovarian function and the immune system." Med Hypotheses **5**(4): 415-436.

Bukovsky, A. and J. Presl (1979). "Ovarian function and the immune system." Medical Hypotheses **5**(4): 415-436.

Camp, T. A., J. O. Rahal and K. E. Mayo (1991). "Cellular localization and hormonal regulation of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger RNAs in the rat ovary." Molecular Endocrinology **5**(10): 1405-1417.

Cang, S., C. Iragavarapu, J. Savooji, Y. Song and D. Liu (2015). "ABT-199 (venetoclax) and BCL-2 inhibitors in clinical development." Journal of hematology & oncology **8**(1): 129.

Cannon, M. J., M. G. Petroff and J. L. Pate (2003). "Effects of Prostaglandin F₂ α and Progesterone on the Ability of Bovine Luteal Cells to Stimulate T Lymphocyte Proliferation1." Biology of Reproduction **69**(2): 695-700.

Canty, M. J., M. P. Boland, A. C. Evans and M. A. Crowe (2006). "Alterations in follicular IGFBP mRNA expression and follicular fluid IGFBP concentrations during the first follicle wave in beef heifers." Anim Reprod Sci **93**(3-4): 199-217.

Cargnello, M. and P. P. Roux (2011). "Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases." Microbiology and molecular biology reviews : MMBR **75**(1): 50-83.

Casarini, L. and P. Crépieux (2019). "Molecular Mechanisms of Action of FSH." Frontiers in endocrinology **10**: 305-305.

Casarini, L. and P. Crépieux (2019). "Molecular Mechanisms of Action of FSH." Frontiers in Endocrinology **10**(305).

Casarini, L., E. Reiter and M. Simoni (2016). " β -arrestins regulate gonadotropin receptor-mediated cell proliferation and apoptosis by controlling different FSHR or LHCGR intracellular signaling in the hGL5 cell line." Molecular and cellular endocrinology **437**: 11-21.

Casarini, L., D. Santi, M. Simoni and F. Potì (2018). "'Spare' luteinizing hormone receptors: facts and fiction." Trends in Endocrinology & Metabolism **29**(4): 208-217.

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

Catt, K. (1991). "Gonadotropic hormones: biosynthesis, secretion, receptors and actions." Reproductive endocrinology: 105-155.

CCAC (2009). "Guidelines on the care and use of farm animals in research, teaching and testing. Ottawa, ON: CCAC."

Cecconi, S. and R. Colonna (1996). "Influence of granulosa cells and of different somatic cell types on mammalian oocyte development in vitro." Zygote **4**(4): 305-307.

Chagas, L. M., J. J. Bass, D. Blache, C. R. Burke, J. K. Kay, D. R. Lindsay, M. C. Lucy, G. B. Martin, S. Meier, F. M. Rhodes, J. R. Roche, W. W. Thatcher and R. Webb (2007). "Invited review: New perspectives on the roles of nutrition and metabolic priorities in the subfertility of high-producing dairy cows." J Dairy Sci **90**(9): 4022-4032.

Chang, H.-M., H.-H. Pan, J.-C. Cheng, Y.-M. Zhu and P. C. Leung (2016). "Growth differentiation factor 8 suppresses cell proliferation by up-regulating CTGF expression in human granulosa cells." Molecular and cellular endocrinology **422**: 9-17.

Charlier, C., J. Montfort, O. Chabrol, D. Brisard, T. Nguyen, A. Le Cam, L. Richard-Parpaillon, F. Moreews, P. Pontarotti and S. Uzbekova (2012). "Oocyte-somatic cells interactions, lessons from evolution." Bmc Genomics **13**(1): 560.

Charlier, C., J. Montfort, O. Chabrol, D. Brisard, T. Nguyen, A. Le Cam, L. Richard-Parpaillon, F. Moreews, P. Pontarotti, S. Uzbekova, F. Chesnel and J. Bobe (2012). "Oocyte-somatic cells interactions, lessons from evolution." BMC Genomics **13**: 560.

Chen, Y., W. Yang, X. Shi, C. Zhang, G. Song and D. Huang (2020). "The Factors and Pathways Regulating the Activation of Mammalian Primordial Follicles in vivo." Frontiers in Cell and Developmental Biology **8**(1018).

Chesnel, F. and J. J. Eppig (1995). "Synthesis and accumulation of p34cdc2 and cyclin B in mouse oocytes during acquisition of competence to resume meiosis." Mol Reprod Dev **40**(4): 503-508.

Choi, J.-H., A. S. Wong, H.-F. Huang and P. C. Leung (2007). "Gonadotropins and ovarian cancer." Endocrine reviews **28**(4): 440-461.

Choi, Y. and A. Rajkovic (2006). "Genetics of early mammalian folliculogenesis." Cell Mol Life Sci **63**(5): 579-590.

Clément, S., U. Krause, F. Desmedt, J.-F. Tanti, J. Behrends, X. Pesesse, T. Sasaki, J. Penninger, M. Doherty and W. Malaisse (2001). "The lipid phosphatase SHIP2 controls insulin sensitivity." Nature **409**(6816): 92-97.

Cohen, B. D., C. A. Nechamen and J. A. Dias (2004). "Human follitropin receptor (FSHR) interacts with the adapter protein 14-3-3 τ ." Molecular and cellular endocrinology **220**(1-2): 1-7.

Cohen-Fredarow, A., A. Tadmor, T. Raz, N. Meterani, Y. Addadi, N. Nevo, I. Solomonov, I. Sagi, G. Mor, M. Neeman and N. Dekel (2014). "Ovarian dendritic cells act as a double-edged pro-ovulatory and anti-inflammatory sword." Mol Endocrinol **28**(7): 1039-1054.

Colledge, W. H., M. B. L. Carlton, G. B. Udy and M. J. Evans (1994). "Disruption of c-mos causes parthenogenetic development of unfertilized mouse eggs." Nature **370**: 65.

Cottom, J., L. M. Salvador, E. T. Maizels, S. Reierstad, Y. Park, D. W. Carr, M. A. Davare, J. W. Hell, S. S. Palmer and P. Dent (2003). "Follicle-stimulating hormone activates extracellular signal-regulated kinase but not extracellular signal-regulated kinase kinase through a 100-kDa phosphotyrosine phosphatase." Journal of Biological Chemistry **278**(9): 7167-7179.

Crépieux, P., S. Marion, N. Martinat, V. Fafeur, Y. Le Vern, D. Kerboeuf, F. Guillou and E. Reiter (2001). "The ERK-dependent signalling is stage-specifically modulated by FSH, during primary Sertoli cell maturation." Oncogene **20**(34): 4696-4709.

Crépieux, P., A. Poupon, N. Langonné-Gallay, E. Reiter, J. Delgado, M. H. Schaefer, T. Bourquard, L. Serrano and C. Kiel (2017). "A comprehensive view of the β -arrestinome." Frontiers in endocrinology **8**: 32.

Crookenden, M. A., C. G. Walker, B. Kuhn-Sherlock, A. Murray, V. S. R. Dukkipati, A. Heiser and J. R. Roche (2017). "Technical note: Evaluation of endogenous control gene expression in bovine neutrophils by reverse-transcription quantitative PCR using microfluidics gene expression arrays." J Dairy Sci **100**(8): 6763-6771.

Crowe, M., W. Enright, M. Boland and J. Roche (2001). "Follicular growth and serum follicle-stimulating hormone (FSH) responses to recombinant bovine FSH in GnRH-immunized anoestrous heifers." ANIMAL SCIENCE-GLASGOW- **73**(1): 115-122.

Crowe, M. and M. Mullen (2013). Regulation and Function of Gonadotropins Throughout the Bovine Oestrous Cycle: 143-154.

Crowe, M. A., P. Kelly, M. A. Driancourt, M. P. Boland and J. F. Roche (2001). "Effects of follicle-stimulating hormone with and without luteinizing hormone on serum hormone concentrations, follicle growth, and intrafollicular estradiol and aromatase activity in gonadotropin-releasing hormone-immunized heifers." Biol Reprod **64**(1): 368-374.

Czieselsky, K., M. Prescott, R. Porteous, P. Campos, J. Clarkson, F. J. Steyn, R. E. Campbell and A. E. Herbison (2016). "Pulse and Surge Profiles of Luteinizing Hormone Secretion in the Mouse." Endocrinology **157**(12): 4794-4802.

D'Aurora, M., S. Sperduti, G. Di Emidio, L. Stuppia, P. G. Artini and V. Gatta (2016). "Inside the granulosa transcriptome." Gynecol Endocrinol **32**(12): 951-956.

Da Silva-Buttkus, P., G. S. Jayasooriya, J. M. Mora, M. Mobberley, T. A. Ryder, M. Baithun, J. Stark, S. Franks and K. Hardy (2008). "Effect of cell shape and packing density on granulosa cell proliferation and formation of multiple layers during early follicle development in the ovary." Journal of cell science **121**(23): 3890-3900.

Das, R., Z. Sebo, L. Pence and L. L. Dobens (2014). "Drosophila tribbles antagonizes insulin signaling-mediated growth and metabolism via interactions with Akt kinase." PLoS One **9**(10): e109530.

De Cian, M.-C., E. P. Gregoire, M. Le Rolle, S. Lachambre, M. Mondin, S. Bell, C. J. Guigon, A.-A. Chassot and M.-C. Chaboissier (2020). "R-spondin2 signaling is required for oocyte-driven intercellular communication and follicular growth." Cell Death & Differentiation **27**(10): 2856-2871.

De Pascali, F. and E. Reiter (2018). " β -arrestins and biased signaling in gonadotropin receptors." Minerva ginecologica **70**(5): 525-538.

De Pascali, F., A. Tréfier, F. Landomiel, V. Bozon, G. Bruneau, R. Yvinec, A. Poupon, P. Crépieux and E. Reiter (2018). "Follicle-stimulating hormone receptor: advances and remaining challenges." International review of cell and molecular biology **338**: 1-58.

Dedhia, P. H., K. Keeshan, S. Uljon, L. Xu, M. E. Vega, O. Shestova, M. Zaks-Zilberman, C. Romany, S. C. Blacklow and W. S. Pear (2010). "Differential ability of Tribbles family members to promote degradation of C/EBPalpha and induce acute myelogenous leukemia." Blood **116**(8): 1321-1328.

Deng, J., C. H. James, L. Patel, A. Smith, K. G. Burnand, H. Rahmoune, J. R. Lamb and B. Davis (2009). "Human tribbles homologue 2 is expressed in unstable regions of carotid plaques and regulates macrophage IL-10 in vitro." Clinical Science **116**(3): 241-248.

Di Giacomo, M., A. Camaioni, F. G. Klinger, R. Bonfiglio and A. Salustri (2016). "Cyclic AMP-elevating agents promote cumulus cell survival and hyaluronan matrix stability, thereby prolonging the time of mouse oocyte fertilizability." Journal of Biological Chemistry **291**(8): 3821-3836.

Dias, J. A., S. D. Mahale, C. A. Nechamen, O. Davydenko, R. M. Thomas and A. Ulloa-Aguirre (2010). "Emerging roles for the FSH receptor adapter protein APPL1 and overlap of a putative 14-3-3 τ interaction domain with a canonical G-protein interaction site." Molecular and cellular endocrinology **329**(1-2): 17-25.

Dierich, A., M. R. Sairam, L. Monaco, G. M. Fimia, A. Gansmuller, M. LeMeur and P. Sassone-Corsi (1998). "Impairing follicle-stimulating hormone (FSH) signaling in vivo: targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance." Proceedings of the National Academy of Sciences **95**(23): 13612-13617.

diZerega, G. S. and G. D. Hodgen (1981). "Folliculogenesis in the primate ovarian cycle." Endocr Rev **2**(1): 27-49.

Do, E., J. Park, H. Cheon, Y. Kwon, S. Heo, E. Choi, J. Seo, I.-H. Jang, S. C. Lee and J. Kim (2017). "Trib2 regulates the pluripotency of embryonic stem cells and enhances reprogramming efficiency." Experimental & Molecular Medicine **49**: e401.

Do, E. K., J. K. Park, H. C. Cheon, Y. W. Kwon, S. C. Heo, E. J. Choi, J. K. Seo, I. H. Jang, S. C. Lee and J. H. Kim (2017). "Trib2 regulates the pluripotency of embryonic stem cells and enhances reprogramming efficiency." Experimental & molecular medicine **49**(11): e401-e401.

Do, E. K., J. K. Park, H. C. Cheon, Y. W. Kwon, S. C. Heo, E. J. Choi, J. K. Seo, I. H. Jang, S. C. Lee and J. H. Kim (2017). "Trib2 regulates the pluripotency of embryonic stem cells and enhances reprogramming efficiency." Exp Mol Med **49**(11): e401.

Dobens Jr, L. L. and S. Bouyain (2012). "Developmental roles of tribbles protein family members." Developmental Dynamics **241**(8): 1239-1248.

Dobens Jr., L. L. and S. Bouyain (2012). "Developmental roles of tribbles protein family members." Developmental Dynamics **241**(8): 1239-1248.

Dobens, L. L., Jr. and S. Bouyain (2012). "Developmental roles of tribbles protein family members." Dev Dyn **241**(8): 1239-1248.

Dohmann, K., B. Wagner, D. W. Horohov and W. Leibold (2000). "Expression and characterisation of equine interleukin 2 and interleukin 4." Vet Immunol Immunopathol **77**(3-4): 243-256.

Donaubauer, E. M., N. C. Law and M. E. Hunzicker-Dunn (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**(37): 19701-19712.

Dong, J., D. F. Albertini, K. Nishimori, T. R. Kumar, N. Lu and M. M. Matzuk (1996). "Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis." Nature **383**(6600): 531-535.

Dorrington, J. H., Y. S. Moon and D. T. Armstrong (1975). "Estradiol-17beta biosynthesis in cultured granulosa cells from hypophysectomized immature rats; stimulation by follicle-stimulating hormone." Endocrinology **97**(5): 1328-1331.

Doucet, C., D. Brouty-Boye, C. Pottin-Clemenceau, C. Jasmin, G. W. Canonica and B. Azzarone (1998). "IL-4 and IL-13 specifically increase adhesion molecule and inflammatory cytokine expression in human lung fibroblasts." Int Immunol **10**(10): 1421-1433.

Downs, S. M., D. L. Coleman, P. F. Ward-Bailey and J. J. Eppig (1985). "Hypoxanthine is the principal inhibitor of murine oocyte maturation in a low molecular weight fraction of porcine follicular fluid." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(2): 454-458.

Driancourt, M. A. (2001). "Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction." Theriogenology **55**(6): 1211-1239.

Driancourt, M. A. and L. P. Cahill (1984). "Preovulatory follicular events in sheep." J Reprod Fertil **71**(1): 205-211.

Drion, P., J. Beckers, C. Hanzen, J. Houtain, F. Ectors and P. Lonergan (1997). "Follicular and lutean growth regulation. 1: Folliculogenesis and atresia [ruminants]." Summa (Italy).

Dube, J. L., P. Wang, J. Elvin, K. M. Lyons, A. J. Celeste and M. M. Matzuk (1998). "The bone morphogenetic protein 15 gene is X-linked and expressed in oocytes." Molecular endocrinology **12**(12): 1809-1817.

Duffy, D. M., C. Ko, M. Jo, M. Brannstrom and T. E. Curry (2019). "Ovulation: Parallels With Inflammatory Processes." Endocr Rev **40**(2): 369-416.

Dugast, E., E. Kiss-Toth, J. P. Soulillou, S. Brouard and J. Ashton-Chess (2013). "The Tribbles-1 protein in humans: roles and functions in health and disease." Curr Mol Med **13**(1): 80-85.

Dupont, J., A. Musnier, J. Decourtye, T. Boulo, C. Lécureuil, H. Guillou, S. Valet, S. Fouchécourt, J.-L. Pitetti and S. Nef (2010). "FSH-stimulated PTEN activity accounts for the lack of FSH mitogenic effect in prepubertal rat Sertoli cells." Molecular and cellular endocrinology **315**(1-2): 271-276.

Dupont, S., L. Morsut, M. Aragona, E. Enzo, S. Giulitti, M. Cordenonsi, F. Zanconato, J. Le Digabel, M. Forcato and S. Bicciato (2011). "Role of YAP/TAZ in mechanotransduction." Nature **474**(7350): 179-183.

Dupont, S., L. Morsut, M. Aragona, E. Enzo, S. Giulitti, M. Cordenonsi, F. Zanconato, J. Le Digabel, M. Forcato, S. Bicciato, N. Elvassore and S. Piccolo (2011). "Role of YAP/TAZ in mechanotransduction." Nature **474**(7350): 179-183.

Eder, K., H. Guan, H. Y. Sung, J. Ward, A. Angyal, M. Janas, G. Sarmay, E. Duda, M. Turner and S. K. Dower (2008). "Tribbles-2 is a novel regulator of inflammatory activation of monocytes." International immunology **20**(12): 1543-1550.

Eder, K., H. Guan, H. Y. Sung, J. Ward, A. Angyal, M. Janas, G. Sarmay, E. Duda, M. Turner, S. K. Dower, S. E. Francis, D. C. Crossman and E. Kiss-Toth (2008). "Tribbles-2 is a novel regulator of inflammatory activation of monocytes." Int Immunol **20**(12): 1543-1550.

Eppig, J. J. (2001). "Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals." Reproduction **122**(6): 829-838.

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

Erickson, G., D. Magoffin, C. Dyer and C. Hofeditz (1985). "The ovarian androgen producing cells: a review of structure/function relationships." Endocrine Reviews **6**: 371-399.

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

Espey, L. L. and J. S. Richards (2002). "Temporal and spatial patterns of ovarian gene transcription following an ovulatory dose of gonadotropin in the rat." Biol Reprod **67**(6): 1662-1670.

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

Eyers, P. A., K. Keeshan and N. Kannan (2017). "Tribbles in the 21st Century: The Evolving Roles of Tribbles Pseudokinases in Biology and Disease." Trends Cell Biol **27**(4): 284-298.

Eyers, P. A., K. Keeshan and N. Kannan (2017). "Tribbles in the 21st century: the evolving roles of tribbles pseudokinases in biology and disease." Trends in cell biology **27**(4): 284-298.

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

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

Fan, H. Y. and Q. Y. Sun (2004). "Involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals." Biol Reprod **70**(3): 535-547.

Fang, Y., A. O. Zekiy, F. Ghaedrahmati, A. Timoshin, M. Farzaneh, A. Anbiyaiee and S. E. Khoshnam (2021). "Tribbles homolog 2 (Trib2), a pseudo serine/threonine kinase in tumorigenesis and stem cell fate decisions." Cell Communication and Signaling **19**(1): 41.

Farnworth, P. G. (1995). "Gonadotrophin secretion revisited. How many ways can FSH leave a gonadotroph?" J Endocrinol **145**(3): 387-395.

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

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

Federman, A. D., B. R. Conklin, K. A. Schrader, R. R. Reed and H. R. Bourne (1992). "Hormonal stimulation of adenylyl cyclase through G i-protein $\beta\gamma$ subunits." Nature **356**(6365): 159-161.

Feng, X., M. Zhang, R. Guan and D. L. Segaloff (2013). "Heterodimerization between the lutropin and follitropin receptors is associated with an attenuation of hormone-dependent signaling." Endocrinology **154**(10): 3925-3930.

Fernandes-Alnemri, T., G. Litwack and E. S. Alnemri (1994). "CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme." J Biol Chem **269**(49): 30761-30764.

Ferreira-Dias, G. and D. J. Skarzynski (2008). "Some aspects of regulation of luteal function and luteolysis in equine corpora lutea." Pferdeheilkunde **24**(1): 10.

Field, S. L., T. Dasgupta, M. Cummings and N. M. Orsi (2013). "Cytokines in ovarian folliculogenesis, oocyte maturation and luteinisation." Mol Reprod Dev.

Field, S. L., T. Dasgupta, M. Cummings and N. M. Orsi (2014). "Cytokines in ovarian folliculogenesis, oocyte maturation and luteinisation." Mol Reprod Dev **81**(4): 284-314.

Filion, F., N. Bouchard, A. K. Goff, J. G. Lussier and J. Sirois (2001). "Molecular cloning and induction of bovine prostaglandin E synthase by gonadotropins in ovarian follicles prior to ovulation in vivo." J Biol Chem **276**(36): 34323-34330.

Findlay, J. K., A. E. Drummond, M. L. Dyson, A. J. Baillie, D. M. Robertson and J. F. Ethier (2002). "Recruitment and development of the follicle; the roles of the transforming growth factor-beta superfamily." Mol Cell Endocrinol **191**(1): 35-43.

Fitzpatrick, S. L. and J. Richards (1994). "Identification of a cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate-response element in the rat aromatase promoter that is required for transcriptional activation in rat granulosa cells and R2C leydig cells." Molecular endocrinology **8**(10): 1309-1319.

Forde, N., M. E. Beltman, P. Lonergan, M. Diskin, J. F. Roche and M. A. Crowe (2011). "Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle." Anim Reprod Sci **124**(3-4): 163-169.

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

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

Fortune, J. E. and S. M. Quirk (1988). "REGULATION OF STEROIDOGENESIS IN BOVINE PREOVULATORY FOLLICLES." Journal of Animal Science **66**(suppl_2): 1-8.

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

Frandsen, R. D., W. L. Wilke and A. D. Fails (2009). Anatomy and physiology of farm animals, John Wiley & Sons.

Fu, D., X. Lv, G. Hua, C. He, J. Dong, S. M. Lele, D. W. Li, Q. Zhai, J. S. Davis and C. Wang (2014). "YAP regulates cell proliferation, migration, and steroidogenesis in adult granulosa cell tumors." Endocr Relat Cancer **21**(2): 297-310.

Fu, L., M. Zhang, K. Mastrantoni, M. Perfetto, S. Wei and J. Yao (2016). "Bovine Lhx8, a Germ Cell-Specific Nuclear Factor, Interacts with Figla." PLOS ONE **11**(10): e0164671.

Fukuda, K., Y. Fujitsu, N. Kumagai and T. Nishida (2002). "Characterization of the interleukin-4 receptor complex in human corneal fibroblasts." Invest Ophthalmol Vis Sci **43**(1): 183-188.

Gerard, N., M. Caillaud, A. Martoriati, G. Goudet and A. C. Lalmanach (2004). "The interleukin-1 system and female reproduction." J Endocrinol **180**(2): 203-212.

Gérard, N., M. Caillaud, A. Martoriati, G. Goudet and A. C. Lalmanach (2004). "The interleukin-1 system and female reproduction." J Endocrinol **180**(2): 203-212.

Gessner, A. and M. Rollinghoff (2000). "Biologic functions and signaling of the interleukin-4 receptor complexes." Immunobiology **201**(3-4): 285-307.

Ghosh, S. and M. Karin (2002). "Missing pieces in the NF- κ B puzzle." cell **109**(2): S81-S96.

Ginther, O., D. Bergfelt, M. Beg and K. Kot (2002). "Role of low circulating FSH concentrations in controlling the interval to emergence of the subsequent follicular wave in cattle." Reproduction **124**(4): 475-482.

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

Ginther, O. J., M. A. Beg, F. X. Donadeu and D. R. Bergfelt (2003). "Mechanism of follicle deviation in monovular farm species." Anim Reprod Sci **78**(3-4): 239-257.

Ginther, O. J., K. Kot, L. J. Kulick and M. C. Wiltbank (1997). "Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle." Theriogenology **48**(1): 75-87.

Goddard, I., S. Bauer, A. Gougeon, F. Lopez, N. Giannetti, C. Susini, M. Benahmed and S. Krantic (2001). "Somatostatin inhibits stem cell factor messenger RNA expression by Sertoli cells and stem cell factor-induced DNA synthesis in isolated seminiferous tubules." Biology of reproduction **65**(6): 1732-1742.

Gomez, M., V. Gomez and A. Hergovich (2014). "The Hippo pathway in disease and therapy: cancer and beyond." Clin Transl Med **3**: 22.

Gong, J. G., T. Bramley and R. Webb (1991). "The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian function in heifers: follicular populations and peripheral hormones." Biol Reprod **45**(6): 941-949.

Gougeon, A. (2010). Human ovarian follicular development: from activation of resting follicles to preovulatory maturation. Annales d'endocrinologie, Elsevier.

Gougeon, A. (2010). "Human ovarian follicular development: From activation of resting follicles to preovulatory maturation." Annales d'Endocrinologie **71**(3): 132-143.

Gougeon, A. (2011). "Régulation de l'initiation de la croissance folliculaire." Gynécologie Obstétrique & Fertilité **39**(9): 511-513.

Gougeon, A., A. Delangle, N. Arouche, M. Stridsberg, J. P. Gotteland and E. Loumaye (2010). "Kit ligand and the somatostatin receptor antagonist, BIM-23627, stimulate in vitro resting follicle growth in the neonatal mouse ovary." Endocrinology **151**(3): 1299-1309.

Gougeon, A. and B. Lefèvre (1983). "Evolution of the diameters of the largest healthy and atretic follicles during the human menstrual cycle." Reproduction **69**(2): 497-502.

Grandinetti, K. B., T. A. Stevens, S. Ha, R. J. Salamone, J. R. Walker, J. Zhang, S. Agarwalla, D. G. Tenen, E. C. Peters and V. A. Reddy (2011). "Overexpression of TRIB2 in human lung cancers

contributes to tumorigenesis through downregulation of C/EBPalpha." Oncogene **30**(30): 3328-3335.

Grosshans, J. and E. Wieschaus (2000). "A genetic link between morphogenesis and cell division during formation of the ventral furrow in *Drosophila*." Cell **101**(5): 523-531.

Großhans, J. and E. Wieschaus (2000). "A Genetic Link between Morphogenesis and Cell Division during Formation of the Ventral Furrow in *Drosophila*." Cell **101**(5): 523-531.

Guan, H., A. Shuaib, D. D. Leon, A. Angyal, M. Salazar, G. Velasco, M. Holcombe, S. K. Dower and E. Kiss-Toth (2016). "Competition between members of the tribbles pseudokinase protein family shapes their interactions with mitogen activated protein kinase pathways." Sci Rep **6**: 32667.

Gupta, P. S., J. K. Folger, S. K. Rajput, L. Lv, J. Yao, J. J. Ireland and G. W. Smith (2014). "Regulation and regulatory role of WNT signaling in potentiating FSH action during bovine dominant follicle selection." PLoS One **9**(6): e100201.

Habara, O., C. Y. Logan, M. Kanai-Azuma, R. Nusse and H. M. Takase (2021). "WNT signaling in pre-granulosa cells is required for ovarian folliculogenesis and female fertility." Development **148**(9).

Hammond, J. M., J. S. Mondschein, S. E. Samaras, S. A. Smith and D. R. Hagen (1991). "The ovarian insulin-like growth factor system." J Reprod Fertil Suppl **43**: 199-208.

Hanzen, C., O. Lourtie and P. V. Drion (2000). "Le développement folliculaire chez la vache I. Aspects morphologiques et cinétiques." Annales de Medecine Veterinaire **144**: 225-235.

Harlow, C. R., L. Davidson, K. H. Burns, C. Yan, M. M. Matzuk and S. G. Hillier (2002). "FSH and TGF-beta superfamily members regulate granulosa cell connective tissue growth factor gene expression in vitro and in vivo." Endocrinology **143**(9): 3316-3325.

Hashimoto, N., N. Watanabe, Y. Furuta, H. Tamemoto, N. Sagata, M. Yokoyama, K. Okazaki, M. Nagayoshi, N. Takedat, Y. Ikawatll and S. Aizawai (1994). "Parthenogenetic activation of oocytes in c-mos-deficient mice." Nature **370**: 68.

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

Hegedus, Z., A. Czibula and E. Kiss-Toth (2006). "Tribbles: novel regulators of cell function; evolutionary aspects." Cell Mol Life Sci **63**(14): 1632-1641.

Hegedus, Z., A. Czibula and E. Kiss-Toth (2007). "Tribbles: a family of kinase-like proteins with potent signalling regulatory function." Cell Signal **19**(2): 238-250.

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

Herndon, M. K., N. C. Law, E. M. Donaubaauer, B. Kyriss and M. Hunzicker-Dunn (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.

Hildebrand, D., M.-E. Eberle, S. M. Wölfle, F. Egler, D. Sahin, A. Sähr, K. A. Bode and K. Heeg (2018). "Hsa-miR-99b/let-7e/miR-125a cluster regulates pathogen recognition receptor-stimulated suppressive antigen-presenting cells." Frontiers in immunology **9**: 1224.

Hill, R., P. A. Madureira, B. Ferreira, I. Baptista, S. Machado, L. Colaco, M. Dos Santos, N. Liu, A. Dopazo and S. Ugurel (2017). "TRIB2 confers resistance to anti-cancer therapy by activating the serine/threonine protein kinase AKT." Nature communications **8**(1): 1-9.

Hill, R., P. A. Madureira, B. Ferreira, I. Baptista, S. Machado, L. Colaco, M. Dos Santos, N. Liu, A. Dopazo, S. Ugurel, A. Adrienn, E. Kiss-Toth, M. Isbilen, A. O. Gure and W. Link (2017). "TRIB2 confers resistance to anti-cancer therapy by activating the serine/threonine protein kinase AKT." Nat Commun **8**: 14687.

Hillier, S. (1994). "Current concepts of the roles of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in folliculogenesis." Human Reproduction **9**(2): 188-191.

Hillier, S. (2001). "Gonadotropic control of ovarian follicular growth and development." Molecular and cellular endocrinology **179**(1-2): 39-46.

Hirshfield, A. N. (1991). "Development of follicles in the mammalian ovary." Int Rev Cytol **124**: 43-101.

Hockenbery, D., G. Nuñez, C. Milliman, R. D. Schreiber and S. J. Korsmeyer (1990). "Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death." Nature **348**(6299): 334-336.

Honda, A., M. Hirose, K. Hara, S. Matoba, K. Inoue, H. Miki, H. Hiura, M. Kanatsu-Shinohara, Y. Kanai and T. Kono (2007). "Isolation, characterization, and in vitro and in vivo differentiation of putative thecal stem cells." PNAS **104**: 12389-12394.

Hoodbhoy, T. and P. Talbot (1994). "Mammalian cortical granules: contents, fate, and function." Mol Reprod Dev **39**(4): 439-448.

Hopper, H. W., S. E. Williams, D. J. Byerley, M. M. Rollosson, P. O. Ahmed and T. E. Kiser (1993). "Effect of prepubertal body weight gain and breed on carcass composition at puberty in beef heifers." J Anim Sci **71**(5): 1104-1111.

Hoshijima, M., T. Hattori, E. Aoyama, T. Nishida, S. Kubota, H. Kamioka and M. Takigawa (2020). "Roles of Interaction between CCN2 and Rab14 in Aggrecan Production by Chondrocytes." International journal of molecular sciences **21**(8): 2769.

Hou, Z., K. Guo, X. Sun, F. Hu, Q. Chen, X. Luo, G. Wang, J. Hu and L. Sun (2018). "TRIB2 functions as novel oncogene in colorectal cancer by blocking cellular senescence through AP4/p21 signaling." Molecular cancer **17**(1): 172-172.

Hou, Z., K. Guo, X. Sun, F. Hu, Q. Chen, X. Luo, G. Wang, J. Hu and L. Sun (2018). "TRIB2 functions as novel oncogene in colorectal cancer by blocking cellular senescence through AP4/p21 signaling." Molecular Cancer **17**(1): 172.

Hsueh, A. J. W., K. Kawamura, Y. Cheng and B. C. J. M. Fauser (2015). "Intraovarian Control of Early Folliculogenesis." Endocrine Reviews **36**(1): 1-24.

Hua, F., R. Mu, J. Liu, J. Xue, Z. Wang, H. Lin, H. Yang, X. Chen and Z. Hu (2011). "TRB3 interacts with SMAD3 promoting tumor cell migration and invasion." Journal of cell science **124**(19): 3235-3246.

Huang, Z. and D. Wells (2010). "The human oocyte and cumulus cells relationship: new insights from the cumulus cell transcriptome." Mol Hum Reprod **16**(10): 715-725.

Hudson, P., J. Haley, M. Cronk, J. Shine and H. Niall (1981). "Molecular cloning and characterization of cDNA sequences coding for rat relaxin." Nature **291**(5811): 127-131.

Hudson, P., M. John, R. Crawford, J. Haralambidis, D. Scanlon, J. Gorman, G. Tregear, J. Shine and H. Niall (1984). "Relaxin gene expression in human ovaries and the predicted structure of a human preprorelaxin by analysis of cDNA clones." Embo j **3**(10): 2333-2339.

Huntzinger, E. and E. Izaurralde (2011). "Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay." Nat Rev Genet **12**(2): 99-110.

Hurk, R., R. Abir, E. Telfer and M. Bevers (2000). "Primate and bovine immature oocytes and follicles as sources of fertilizable oocytes." Human reproduction update **6**: 457-474.

Ichihara, Y., T. Wada, Y. Soeda, Y. Ishii, M. Sasahara, H. Tsuneki and T. Sasaoka (2013). "SH 2-Containing Inositol 5'-Phosphatase 2 Selectively Impairs Hypothalamic Insulin Signalling and Regulation of Food Intake in Mice." Journal of neuroendocrinology **25**(4): 372-382.

Inagaki, K., F. Otsuka, T. Miyoshi, M. Yamashita, M. Takahashi, J. Goto, J. Suzuki and H. Makino (2009). "p38-Mitogen-activated protein kinase stimulated steroidogenesis in granulosa cell-oocyte cocultures: role of bone morphogenetic proteins 2 and 4." Endocrinology **150**(4): 1921-1930.

Inoue, N., F. Matsuda, Y. Goto and N. Manabe (2011). "Role of cell-death ligand-receptor system of granulosa cells in selective follicular atresia in porcine ovary." J Reprod Dev **57**(2): 169-175.

Inoue, Y., S. Miyamoto, T. Fukami, K. Shirota, F. Yotsumoto and T. Kawarabayashi (2009). "Amphiregulin is much more abundantly expressed than transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor in human follicular fluid obtained from patients undergoing in vitro fertilization-embryo transfer." Fertil Steril **91**(4): 1035-1041.

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

Ireland, J. and J. Roche (1983). "Development of Nonovulatory Antral Follicles in Heifers: Changes in Steroids in Follicular Fluid and Receptors for Gonadotropins." Endocrinology **112**(1): 150-156.

Ireland, J. J. (1987). "Control of follicular growth and development." J Reprod Fertil Suppl **34**: 39-54.

Jaffe, L. A. and J. R. Egbert (2017). "Regulation of Mammalian Oocyte Meiosis by Intercellular Communication Within the Ovarian Follicle." Annu Rev Physiol **79**: 237-260.

Jaworska, A. M., N. A. Włodarczyk, A. Mackiewicz and P. Czerwinska (2020). "The role of TRIM family proteins in the regulation of cancer stem cell self-renewal." Stem Cells **38**(2): 165-173.

Jean-Alphonse, F., S. Bowersox, S. Chen, G. Beard, M. A. Puthenveedu and A. C. Hanyaloglu (2014). "Spatially restricted G protein-coupled receptor activity via divergent endocytic compartments." Journal of Biological Chemistry **289**(7): 3960-3977.

Jeppesen, J. V., S. G. Kristensen, M. E. Nielsen, P. Humaidan, M. Dal Canto, R. Fadini, K. T. Schmidt, E. Ernst and C. Yding Andersen (2012). "LH-receptor gene expression in human granulosa and cumulus cells from antral and preovulatory follicles." The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **97**(8): E1524-E1531.

Jiang, C., W. Wei, Y. Wang, C. Song, L. Pan, K. Sun, G. Du, Y. Deng and G. Tang (2020). "TRIM21 causes abnormal expression of IL-6 in oral lichen planus via the TRIB2-MAPK signal axis." Am J Transl Res **12**(8): 4648-4658.

Jiang, C., W. Wei, Y. Wang, C. Song, L. Pan, K. Sun, G. Du, Y. Deng and G. Tang (2020). "TRIM21 causes abnormal expression of IL-6 in oral lichen planus via the TRIB2-MAPK signal axis." American journal of translational research **12**(8): 4648-4658.

Jiang, J.-Y., C. Cheung, Y. Wang and B. K. Tsang (2003). "Regulation of cell death and cell survival gene expression during ovarian follicular development and atresia." Front Biosci **8**(1): 222-237.

Johnson, A. and D. C. Woods (2007). "Ovarian dynamics and follicle development." Reproductive biology and phylogeny of birds **6**: 243-277.

Johnston, J., S. Basatvat, Z. Ilyas, S. Francis and E. Kiss-Toth (2015). "Tribbles in inflammation." Biochemical Society Transactions **43**(5): 1069-1074.

Johnston, J., S. Basatvat, Z. Ilyas, S. Francis and E. Kiss-Toth (2015). "Tribbles in inflammation." Biochem Soc Trans **43**(5): 1069-1074.

Johnston, L. A. (2000). "The trouble with tribbles." Curr Biol **10**(13): R502-504.

Jonas, K. C., S. Chen, M. Virta, J. Mora, S. Franks, I. Huhtaniemi and A. Hanyaloglu (2018). "Temporal reprogramming of calcium signalling via crosstalk of gonadotrophin receptors that associate as functionally asymmetric heteromers." Scientific reports **8**(1): 1-11.

Jones, R. E. (1978). The vertebrate ovary: Comparative biology and evolution.

Jurtshuk, P., Jr. (1996). Bacterial Metabolism. Medical Microbiology. th and S. Baron. Galveston (TX).

Kahn, R. A. and A. G. Gilman (1984). "ADP-ribosylation of Gs promotes the dissociation of its alpha and beta subunits." Journal of Biological Chemistry **259**(10): 6235-6240.

Kazanskaya, O., A. Glinka, I. del Barco Barrantes, P. Stannek, C. Niehrs and W. Wu (2004). "R-Spondin2 is a secreted activator of Wnt/ β -catenin signaling and is required for Xenopus myogenesis." Developmental cell **7**(4): 525-534.

Keeshan, K., Y. He, B. J. Wouters, O. Shestova, L. Xu, H. Sai, C. G. Rodriguez, I. Maillard, J. W. Tobias and P. Valk (2006). "Tribbles homolog 2 inactivates C/EBP α and causes acute myelogenous leukemia." Cancer cell **10**(5): 401-411.

Keeshan, K., Y. He, B. J. Wouters, O. Shestova, L. Xu, H. Sai, C. G. Rodriguez, I. Maillard, J. W. Tobias, P. Valk, M. Carroll, J. C. Aster, R. Delwel and W. S. Pear (2006). "Tribbles homolog 2 inactivates C/EBP α and causes acute myelogenous leukemia." Cancer Cell **10**(5): 401-411.

Kezele, P., E. E. Nilsson and M. K. Skinner (2005). "Keratinocyte growth factor acts as a mesenchymal factor that promotes ovarian primordial to primary follicle transition." Biology of reproduction **73**(5): 967-973.

Kezele, P. R., E. E. Nilsson and M. K. Skinner (2002). "Insulin but not insulin-like growth factor-1 promotes the primordial to primary follicle transition." Molecular and cellular endocrinology **192**(1-2): 37-43.

Kiss-Toth, E., S. M. Bagstaff, H. Y. Sung, V. Jozsa, C. Dempsey, J. C. Caunt, K. M. Oxley, D. H. Wyllie, T. Polgar, M. Harte, A. O'Neill L, E. E. Qwarnstrom and S. K. Dower (2004). "Human tribbles, a protein family controlling mitogen-activated protein kinase cascades." J Biol Chem **279**(41): 42703-42708.

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

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

Knight, P. G. and C. Glister (2006). "TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development." Reproduction **132**(2): 191-206.

Ko, J. C., J. P. Kastelic, M. R. Del Campo and O. J. Ginther (1991). "Effects of a dominant follicle on ovarian follicular dynamics during the oestrous cycle in heifers." J Reprod Fertil **91**(2): 511-519.

Koch, W. J., B. E. Hawes, J. Inglese, L. M. Luttrell and R. Lefkowitz (1994). "Cellular expression of the carboxyl terminus of a G protein-coupled receptor kinase attenuates G beta gamma-mediated signaling." Journal of Biological Chemistry **269**(8): 6193-6197.

Komaragiri, M. V. and R. A. Erdman (1997). "Factors affecting body tissue mobilization in early lactation dairy cows. 1. Effect of dietary protein on mobilization of body fat and protein." J Dairy Sci **80**(5): 929-937.

Krishnamurthy, H., C. Galet and M. Ascoli (2003). "The association of arrestin-3 with the follitropin receptor depends on receptor activation and phosphorylation." Molecular and cellular endocrinology **204**(1-2): 127-140.

Kritsch, D., F. Hoffmann, D. Steinbach, L. Jansen, S. Mary Photini, M. Gajda, A. S. Mosig, J. Sonnemann, S. Peters and M. Melnikova (2017). "Tribbles 2 mediates cisplatin sensitivity and DNA damage response in epithelial ovarian cancer." International journal of cancer **141**(8): 1600-1614.

Kulick, L. J., K. Kot, M. C. Wiltbank and O. J. Ginther (1999). "Follicular and hormonal dynamics during the first follicular wave in heifers." Theriogenology **52**(5): 913-921.

Kumar, T. R., Y. Wang, N. Lu and M. M. Matzuk (1997). "Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility." Nat Genet **15**(2): 201-204.

Lamming, G. E. and G. E. Mann (1995). "Control of endometrial oxytocin receptors and prostaglandin F2 alpha production in cows by progesterone and oestradiol." J Reprod Fertil **103**(1): 69-73.

Lapointe, E. and D. Boerboom (2011). "WNT signaling and the regulation of ovarian steroidogenesis." Front Biosci (Schol Ed) **3**(1): 276-285.

Lavoir, M. and J. E. Fortune (1990). "Follicular dynamics in heifers after injection of PGF2 α during the first wave of follicular development." Theriogenology **33**(1): 270.

Lécureuil, C., E. Kara, F. Guillou, D. Monniaux and P. Crépieux (2007). "[Does FSH signaling have a gender?]." Med Sci (Paris) **23**(1): 75-80.

Levasseur, A., M. Paquet, D. Boerboom and A. Boyer (2017). "Yes-associated protein and WW-containing transcription regulator 1 regulate the expression of sex-determining genes in Sertoli cells, but their inactivation does not cause sex reversal[†]." Biology of Reproduction **97**(1): 162-175.

Li, J., Q. Zhou, Z. Ma, M. Wang, W.-J. Shen, S. Azhar, Z. Guo and Z. Hu (2017). "Feedback inhibition of CREB signaling by p38 MAPK contributes to the negative regulation of steroidogenesis." Reproductive Biology and Endocrinology **15**(1): 1-13.

Li, X., S. Pongkitwitoon, H. Lu, C. Lee, R. Gelberman and S. Thomopoulos (2019). "CTGF induces tenogenic differentiation and proliferation of adipose-derived stromal cells." Journal of Orthopaedic Research® **37**(3): 574-582.

Liang, K. L., C. O'Connor, J. P. Veiga, T. V. McCarthy and K. Keeshan (2016). "TRIB2 regulates normal and stress-induced thymocyte proliferation." Cell Discov **2**: 15050.

Liang, K. L., C. O'Connor, J. P. Veiga, T. V. McCarthy and K. Keeshan (2016). "TRIB2 regulates normal and stress-induced thymocyte proliferation." Cell discovery **2**(1): 1-16.

Liang, K. L., R. Paredes, R. Carmody, P. A. Eysers, S. Meyer, T. V. McCarthy and K. Keeshan (2016). "Human TRIB2 Oscillates during the Cell Cycle and Promotes Ubiquitination and Degradation of CDC25C." International journal of molecular sciences **17**(9): 1378.

Liang, K. L., R. Paredes, R. Carmody, P. A. Eysers, S. Meyer, T. V. McCarthy and K. Keeshan (2016). "Human TRIB2 Oscillates during the Cell Cycle and Promotes Ubiquitination and Degradation of CDC25C." Int J Mol Sci **17**(9).

Liang, K. L., L. Rishi and K. Keeshan (2013). "Tribbles in acute leukemia." Blood, The Journal of the American Society of Hematology **121**(21): 4265-4270.

Lien, W.-H. and E. Fuchs (2014). "Wnt some lose some: transcriptional governance of stem cells by Wnt/ β -catenin signaling." Genes & development **28**(14): 1517-1532.

Lim, H., B. C. Paria, S. K. Das, J. E. Dinchuk, R. Langenbach, J. M. Trzaskos and S. K. Dey (1997). "Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice." Cell **91**(2): 197-208.

Lin, K.-R., H.-F. Yang-Yen, H.-W. Lien, W.-H. Liao, C.-J. Huang, L.-I. Lin, C.-L. Li and J. J.-Y. Yen (2016). "Murine tribbles homolog 2 deficiency affects erythroid progenitor development and confers macrocytic anemia on mice." Scientific reports **6**: 31444.

Lin, K. R., S. F. Lee, C. M. Hung, C. L. Li, H. F. Yang-Yen and J. J. Yen (2007). "Survival factor withdrawal-induced apoptosis of TF-1 cells involves a TRB2-Mcl-1 axis-dependent pathway." J Biol Chem **282**(30): 21962-21972.

Liu, Y. H., K. A. Tan, I. W. Morrison, J. R. Lamb and D. J. Argyle (2013). "Macrophage migration is controlled by Tribbles 1 through the interaction between C/EBPbeta and TNF-alpha." Vet Immunol Immunopathol **155**(1-2): 67-75.

Liu, Y. X., Y. Zhang, Y. Y. Li, X. M. Liu, X. X. Wang, C. L. Zhang, C. F. Hao and S. L. Deng (2019). "Regulation of follicular development and differentiation by intra-ovarian factors and endocrine hormones." Front Biosci (Landmark Ed) **24**: 983-993.

Liu, Z., R. S. Youngquist, H. A. Garverick and E. Antoniou (2009). "Molecular mechanisms regulating bovine ovarian follicular selection." Mol Reprod Dev **76**(4): 351-366.

Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-408.

Llewellyn, S., R. Fitzpatrick, D. A. Kenny, J. J. Murphy, R. J. Scaramuzzi and D. C. Wathes (2007). "Effect of negative energy balance on the insulin-like growth factor system in pre-recruitment ovarian follicles of post partum dairy cows." Reproduction **133**(3): 627-639.

Lohan, F. and K. Keeshan (2013). "The functionally diverse roles of tribbles." Biochem Soc Trans **41**(4): 1096-1100.

Lohan, F. and K. Keeshan (2013). "The functionally diverse roles of tribbles." Biochemical Society Transactions **41**(4): 1096-1100.

Lucy, M. (2007). "The bovine dominant ovarian follicle." Journal of animal science **85**(suppl_13): E89-E99.

Lucy, M. C. (2001). "Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end?" J Dairy Sci **84**(6): 1277-1293.

Lucy, M. C. (2007). "The bovine dominant ovarian follicle." Journal of Animal Science **85**(suppl_13): E89-E99.

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

Lv, X., C. He, C. Huang, H. Wang, G. Hua, Z. Wang, J. Zhou, X. Chen, B. Ma, B. Timm, V. Maclin, J. Dong, B. Rueda, J. Davis and C. Wang (2019). "Timely expression and activation of YAP1 in

granulosa cells is essential for ovarian follicle development." The FASEB Journal **33**: fj.201900179RR.

Lydon, J. P., F. J. DeMayo, O. M. Conneely and B. W. O'Malley (1996). "Reproductive phenotypes of the progesterone receptor null mutant mouse." The Journal of steroid biochemistry and molecular biology **56**(1-6): 67-77.

Ma, X., X. Zhou, H. Qu, Y. Ma, Z. Yue, W. Shang, P. Wang, S. Xie, Y. Li and Y. Sun (2018). "TRIB2 knockdown as a regulator of chemotherapy resistance and proliferation via the ERK/STAT3 signaling pathway in human chronic myelogenous leukemia K562/ADM cells." Oncol Rep **39**(4): 1910-1918.

Ma, X., X. Zhou, H. Qu, Y. Ma, Z. Yue, W. Shang, P. Wang, S. Xie, Y. Li and Y. Sun (2018). "TRIB2 knockdown as a regulator of chemotherapy resistance and proliferation via the ERK/STAT3 signaling pathway in human chronic myelogenous leukemia K562/ADM cells." Oncology reports **39**(4): 1910-1918.

Macias-Silva, M., S. Abdollah, P. A. Hoodless, R. Pirone, L. Attisano and J. L. Wrana (1996). "MADR2 is a substrate of the TGFbeta receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling." Cell **87**(7): 1215-1224.

Magoffin, D. (2005). "Ovarian theca cell." International Journal of Biochemistry & Cell Biology **37**: 1344-1349.

Magoffin, D. and S. Weitsman (1994). "Insulin-like growth factor-I regulation of luteinizing hormone (LH) receptor messenger ribonucleic acid expression and LH-stimulated signal transduction in rat ovarian theca-interstitial cells." Biology of Reproduction **51**: 766-775.

Maidarti, M., Y. L. Clarkson, M. McLaughlin, R. A. Anderson and E. E. Telfer (2019). "Inhibition of PTEN activates bovine non-growing follicles in vitro but increases DNA damage and reduces DNA repair response." Hum Reprod **34**(2): 297-307.

Maizels, E. T., J. Cottom, J. C. Jones and M. Hunzicker-Dunn (1998). "Follicle stimulating hormone (FSH) activates the p38 mitogen-activated protein kinase pathway, inducing small heat shock protein phosphorylation and cell rounding in immature rat ovarian granulosa cells." Endocrinology **139**(7): 3353-3356.

Maizels, N. (2006). "Dynamic roles for G4 DNA in the biology of eukaryotic cells." Nat Struct Mol Biol **13**(12): 1055-1059.

Manna, P., M. Dyson and D. Stocco (2009). "Regulation of the steroidogenic acute regulatory protein gene expression: present and future perspectives." Molecular Human Reproduction **15**: 321-333.

Mariana, J. C., D. Monniaux and M. A. Driancourt (1991). Folliculogenesis. Reproduction in Domestic Animals. San Diego (united states), Academic Press.

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

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

Martin-Orozco, E., A. Sanchez-Fernandez, I. Ortiz-Parra and A.-S. Nicolas (2019). "WNT signaling in tumors: the way to evade drugs and immunity." Frontiers in immunology: 2854.

Mata, J., S. Curado, A. Ephrussi and P. Rorth (2000). "Tribbles coordinates mitosis and morphogenesis in *Drosophila* by regulating string/CDC25 proteolysis." Cell **101**(5): 511-522.

Mata, J., S. Curado, A. Ephrussi and P. Rørth (2000). "Tribbles coordinates mitosis and morphogenesis in *Drosophila* by regulating string/CDC25 proteolysis." Cell **101**(5): 511-522.

Matsuda, F., N. Inoue, N. Manabe and S. Ohkura (2012). "Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells." J Reprod Dev **58**(1): 44-50.

Matsuda-Minehata, F., N. Inoue, Y. Goto and N. Manabe (2006). "The regulation of ovarian granulosa cell death by pro-and anti-apoptotic molecules." Journal of Reproduction and Development: 0608220032-0608220032.

Matthews, C. H., S. Borgato, P. Beck-Peccoz, M. Adams, Y. Tone, G. Gambino, S. Casagrande, G. Tedeschini, A. Benedetti and V. K. K. Chatterjee (1993). "Primary amenorrhoea and infertility due to a mutation in the β -subunit of follicle-stimulating hormone." Nature Genetics **5**(1): 83-86.

Mayoral-Varo, V., L. Jiménez and W. Link (2021). "The Critical Role of TRIB2 in Cancer and Therapy Resistance." Cancers **13**(11): 2701.

McLaughlin, E. A. and S. C. McIver (2009). "Awakening the oocyte: controlling primordial follicle development." REPRODUCTION **137**(1): 1-11.

McNatty, K. P., A. Makris, C. DeGrazia, R. Osathanondh and K. J. Ryan (1979). "The production of progesterone, androgens, and estrogens by granulosa cells, thecal tissue, and stromal tissue from human ovaries in vitro." J Clin Endocrinol Metab **49**(5): 687-699.

Mermillod, P.-M., R. (1999). "La maturation de l'ovocyte de mammifères." Med Sci (Paris) **Vol. 15**(N° 2): p.148-156.

Messinis, I. E., C. I. Messini and K. Dafopoulos (2014). "Novel aspects of the endocrinology of the menstrual cycle." Reproductive biomedicine online **28**(6): 714-722.

Michalovic, L., L. Currin, K. Gutierrez, A. M. Bellefleur, W. G. Glanzner, Y. Schuermann, M. P. de Macedo, R. C. Bohrer, N. Dicks, R. Lopez, M. Taibi, E. Madogwe, A. St-Yves, R. G. Mondadori, J. Gourdon, C. Vigneault, H. Baldassarre and V. Bordignon (2018). "Granulosa cells of prepubertal cattle respond to gonadotropin signaling and upregulate genes that promote follicular growth and prevent cell apoptosis." Mol Reprod Dev **85**(12): 909-920.

Mihm, M., E. Austin, T. Good, J. Ireland, P. Knight, J. Roche, Ireland and JJ (2000). "Identification of potential intrafollicular factors involved in selection of dominant follicles in heifers." Biology of reproduction **63**(3): 811-819.

Mihm, M., P. J. Baker, J. L. Ireland, G. W. Smith, P. M. Coussens, A. C. Evans and J. J. Ireland (2006). "Molecular evidence that growth of dominant follicles involves a reduction in follicle-stimulating hormone dependence and an increase in luteinizing hormone dependence in cattle." Biol Reprod **74**(6): 1051-1059.

Mihm, M., N. Curran, P. Hyttel, P. G. Knight, M. P. Boland and J. F. Roche (1999). "Effect of dominant follicle persistence on follicular fluid oestradiol and inhibin and on oocyte maturation in heifers." J Reprod Fertil **116**(2): 293-304.

Miloux, B., P. Laurent, O. Bonnin, J. Lupker, D. Caput, N. Vita and P. Ferrara (1997). "Cloning of the human IL-13R alpha1 chain and reconstitution with the IL4R alpha of a functional IL-4/IL-13 receptor complex." FEBS Lett **401**(2-3): 163-166.

Monga, J., I. Adrianto, C. Rogers, S. Gadgeel, D. Chitale, J. J. Alumkal, H. Beltran, A. Zoubeidi and J. Ghosh (2021). "Tribbles 2 confers enzalutamide resistance in prostate cancer by promoting lineage plasticity." bioRxiv: 2021.2003.2026.437250.

Monniaux, D., A. Caraty, F. Clement, R. Dalbies-Tran, J. Dupont, S. Fabre, N. Gerard, P. Mermillod, P. Monget and S. Uzbekova (2009). "Développement folliculaire ovarien et ovulation chez les mammifères." INRAE Productions Animales **22**(2): 59-76.

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

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

Munday, N. A., J. P. Vaillancourt, A. Ali, F. J. Casano, D. K. Miller, S. M. Molineaux, T. T. Yamin, V. L. Yu and D. W. Nicholson (1995). "Molecular cloning and pro-apoptotic activity of ICeIII and ICeIII, members of the ICE/CED-3 family of cysteine proteases." J Biol Chem **270**(26): 15870-15876.

Nagashima, T., J. Kim, Q. Li, J. P. Lydon, F. J. DeMayo, K. M. Lyons and M. M. Matzuk (2011). "Connective tissue growth factor is required for normal follicle development and ovulation." Mol Endocrinol **25**(10): 1740-1759.

Nakamura, T. (2015). "The role of Trib1 in myeloid leukaemogenesis and differentiation." Biochem Soc Trans **43**(5): 1104-1107.

Nakamura, T. (2015). "The role of Trib1 in myeloid leukaemogenesis and differentiation." Biochemical Society Transactions **43**(5): 1104-1107.

Natraj, U. and J. S. Richards (1993). "Hormonal regulation, localization, and functional activity of the progesterone receptor in granulosa cells of rat preovulatory follicles." Endocrinology **133**(2): 761-769.

Ndiaye, K., P. D. Carriere, J. Sirois, D. W. Silversides and J. G. Lussier (2015). "Differential expression of lysosome-associated protein transmembrane-4 beta (LAPTM4B) in granulosa cells of ovarian follicles and in other bovine tissues." J Ovarian Res **8**(1): 12.

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

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

Ndiaye, K., D. H. Poole, S. Walusimbi, M. J. Cannon, K. Toyokawa, S. W. Maalouf, J. Dong, P. Thomas and J. L. Pate (2012). "Progesterone effects on lymphocytes may be mediated by membrane progesterone receptors." J Reprod Immunol **95**(1-2): 15-26.

Nebreda, A. R. and A. Porras (2000). "p38 MAP kinases: beyond the stress response." Trends in biochemical sciences **25**(6): 257-260.

Nechamen, C. A., R. M. Thomas, B. D. Cohen, G. Acevedo, P. I. Poulikakos, J. R. Testa and J. A. Dias (2004). "Human follicle-stimulating hormone (FSH) receptor interacts with the adaptor protein APPL1 in HEK 293 cells: potential involvement of the PI3K pathway in FSH signaling." Biology of reproduction **71**(2): 629-636.

Nilsson, E. E., C. Detzel and M. K. Skinner (2006). "Platelet-derived growth factor modulates the primordial to primary follicle transition." Reproduction **131**(6): 1007-1015.

Nilsson, E. E., P. Kezele and M. K. Skinner (2002). "Leukemia inhibitory factor (LIF) promotes the primordial to primary follicle transition in rat ovaries." Molecular and cellular endocrinology **188**(1-2): 65-73.

Nilsson, E. E. and M. K. Skinner (2003). "Bone Morphogenetic Protein-4 Acts as an Ovarian Follicle Survival Factor and Promotes Primordial Follicle Development1." Biology of Reproduction **69**(4): 1265-1272.

Nilsson, E. E. and M. K. Skinner (2004). "Kit ligand and basic fibroblast growth factor interactions in the induction of ovarian primordial to primary follicle transition." Molecular and cellular endocrinology **214**(1-2): 19-25.

Niswender, G. (1981). "Mechanisms controlling luteolysis." Dynamics of ovarian function: 153-160.

Norris, D. and L. Kh (2011). The Endocrinology of the Mammalian Ovary. **5**: 59-72.

Norris, R. P., M. Freudzon, L. M. Mehlmann, A. E. Cowan, A. M. Simon, D. L. Paul, P. D. Lampe and L. A. Jaffe (2008). "Luteinizing hormone causes MAP kinase-dependent phosphorylation and closure of connexin 43 gap junctions in mouse ovarian follicles: one of two paths to meiotic resumption." Development **135**(19): 3229-3238.

Norris, R. P., M. Freudzon, V. O. Nikolaev and L. A. Jaffe (2010). "Epidermal growth factor receptor kinase activity is required for gap junction closure and for part of the decrease in ovarian follicle cGMP in response to LH." Reproduction **140**(5): 655-662.

Nusse, R. and H. Clevers (2017). "Wnt/ β -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities." Cell **169**(6): 985-999.

O'Shea, J. D., R. J. Rodgers and M. J. D'Occhio (1989). "Cellular composition of the cyclic corpus luteum of the cow." J Reprod Fertil **85**(2): 483-487.

O'Connor, C., K. Yalla, M. Salomé, H. A. Moka, E. G. Castañeda, P. A. Evers and K. Keeshan (2018). "Trib2 expression in granulocyte-monocyte progenitors drives a highly drug resistant acute myeloid leukaemia linked to elevated Bcl2." Oncotarget **9**(19): 14977.

Opsomer, G., Y. T. Grohn, J. Hertl, M. Coryn, H. Deluyker and A. de Kruif (2000). "Risk factors for post partum ovarian dysfunction in high producing dairy cows in Belgium: a field study." Theriogenology **53**(4): 841-857.

Orsi, N. M. (2008). "Cytokine networks in the establishment and maintenance of pregnancy." Hum Fertil (Camb) **11**(4): 222-230.

Orsi, N. M. and R. M. Tribe (2008). "Cytokine networks and the regulation of uterine function in pregnancy and parturition." J Neuroendocrinol **20**(4): 462-469.

Ostertag, A., A. Jones, A. J. Rose, M. Liebert, S. Kleinsorg, A. Reimann, A. Vegiopoulos, M. Berriel Diaz, D. Strzoda, M. Yamamoto, T. Satoh, S. Akira and S. Herzig (2010). "Control of adipose tissue inflammation through TRB1." Diabetes **59**(8): 1991-2000.

Pages, G., P. Lenormand, G. L'Allemain, J.-C. Chambard, S. Meloche and J. Pouyssegur (1993). "Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation." Proceedings of the National Academy of Sciences **90**(18): 8319-8323.

Pangas, S. A. (2007). "Growth factors in ovarian development." Semin Reprod Med **25**(4): 225-234.

Pangas, S. A., Y. Choi, D. J. Ballow, Y. Zhao, H. Westphal, M. M. Matzuk and A. Rajkovic (2006). "Oogenesis requires germ cell-specific transcriptional regulators Sohlh1 and Lhx8." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(21): 8090-8095.

Papacleovoulou, G., H. O. Critchley, S. G. Hillier and J. I. Mason (2011). "IL1alpha and IL4 signalling in human ovarian surface epithelial cells." J Endocrinol **211**(3): 273-283.

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

Park, O.-K. and K. E. Mayo (1991). "Transient expression of progesterone receptor messenger RNA in ovarian granulosa cells after the preovulatory luteinizing hormone surge." Molecular endocrinology **5**(7): 967-978.

Parrott, J. A. and M. K. Skinner (2000). "Kit ligand actions on ovarian stromal cells: Effects on theca cell recruitment and steroid production." Molecular Reproduction and Development **55**(1): 55-64.

Patton, J., D. A. Kenny, J. F. Mee, F. P. O'Mara, D. C. Wathes, M. Cook and J. J. Murphy (2006). "Effect of milking frequency and diet on milk production, energy balance, and reproduction in dairy cows." J Dairy Sci **89**(5): 1478-1487.

Pawson, A. J. and A. S. McNeilly (2005). "The pituitary effects of GnRH." Anim Reprod Sci **88**(1-2): 75-94.

Pei, L., R. Dodson, W. E. Schoderbek, R. A. Maurer and K. E. Mayo (1991). "Regulation of the α Inhibin Gene by Cyclic Adenosine 3', 5'-Monophosphate after Transfection into Rat Granulosa Cells." Molecular Endocrinology **5**(4): 521-534.

Pennica, D., G. E. Nedwin, J. S. Hayflick, P. H. Seeburg, R. Derynck, M. A. Palladino, W. J. Kohr, B. B. Aggarwal and D. V. Goeddel (1984). "Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin." Nature **312**(5996): 724-729.

Perlman, S., T. Bouquin, B. Van den Hazel, T. Jensen, H. Schambye, S. Knudsen and J. Okkels (2006). "Transcriptome analysis of FSH and FSH variant stimulation in granulosa cells from IVM patients reveals novel regulated genes." Molecular human reproduction **12**(3): 135-144.

Perry, R. C., L. R. Corah, R. C. Cochran, W. E. Beal, J. S. Stevenson, J. E. Minton, D. D. Simms and J. R. Brethour (1991). "Influence of dietary energy on follicular development, serum gonadotropins, and first postpartum ovulation in suckled beef cows." J Anim Sci **69**(9): 3762-3773.

Peter, A. T. and N. Dhanasekaran (2003). "Apoptosis of granulosa cells: a review on the role of MAPK-signalling modules." Reprod Domest Anim **38**(3): 209-213.

Peters, H. (1969). "The development of the mouse ovary from birth to maturity." Acta Endocrinol (Copenh) **62**(1): 98-116.

Phillips, D. J. and D. M. de Kretser (1998). "Follistatin: a multifunctional regulatory protein." Front Neuroendocrinol **19**(4): 287-322.

Piccolo, S., S. Dupont and M. Cordenonsi (2014). "The Biology of YAP/TAZ: Hippo Signaling and Beyond." Physiological Reviews **94**(4): 1287-1312.

Pisarska, M. D., F.-T. Kuo, I. K. Bentsi-Barnes, S. Khan and G. M. Barlow (2010). "LATS1 phosphorylates forkhead L2 and regulates its transcriptional activity." American journal of physiology. Endocrinology and metabolism **299**(1): E101-E109.

Plant, T. M. and G. R. Marshall (2001). "The functional significance of FSH in spermatogenesis and the control of its secretion in male primates." Endocrine reviews **22**(6): 764-786.

Plewes, M. R., X. Hou, P. Zhang, A. Liang, G. Hua, J. R. Wood, A. S. Cupp, X. Lv, C. Wang and J. S. Davis (2019). "Yes-associated protein 1 is required for proliferation and function of bovine granulosa cells in vitro[†]." Biol Reprod **101**(5): 1001-1017.

Plewes, M. R., X. Hou, P. Zhang, A. Liang, G. Hua, J. R. Wood, A. S. Cupp, X. Lv, C. Wang and J. S. Davis (2019). "Yes-associated protein 1 is required for proliferation and function of bovine granulosa cells in vitro dagger." Biol Reprod **101**(5): 1001-1017.

Portela, V. M., G. Zamberlam, P. B. Goncalves, J. F. de Oliveira and C. A. Price (2011). "Role of angiotensin II in the periovulatory epidermal growth factor-like cascade in bovine granulosa cells in vitro." Biol Reprod **85**(6): 1167-1174.

Prasad, N. K. (2009). "SHIP2 phosphoinositol phosphatase positively regulates EGFR-Akt pathway, CXCR4 expression, and cell migration in MDA-MB-231 breast cancer cells." International journal of oncology **34**(1): 97-105.

Qiao, Y., Y. Zhang and J. Wang (2013). "Ubiquitin E3 ligase SCF(β -TRCP) regulates TRIB2 stability in liver cancer cells." Biochem Biophys Res Commun **441**(3): 555-559.

Qin, Y., Y. Shi, Y. Zhao, S. A. Carson, J. L. Simpson and Z. J. Chen (2009). "Mutation analysis of NOBOX homeodomain in Chinese women with premature ovarian failure." Fertil Steril **91**(4 Suppl): 1507-1509.

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

Rahe, C. H., R. E. Owens, J. L. Fleeger, H. J. Newton and P. G. Harms (1980). "Pattern of plasma luteinizing hormone in the cyclic cow: dependence upon the period of the cycle." Endocrinology **107**(2): 498-503.

Rajakoski, E. (1960). "The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special reference to seasonal, cyclical, and left-right variations." Acta Endocrinol Suppl (Copenh) **34(Suppl 52)**: 1-68.

Rajkumar, K., D. Kerr, R. Kirkwood and B. Laarveld (1992). "Inhibitory action of somatostatin-14 on hormone-stimulated cyclic adenosine monophosphate induction in porcine granulosa and luteal cells." Journal of endocrinology **134**(2): 297-306.

Revah, I. and W. R. Butler (1996). "Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes." J Reprod Fertil **106**(1): 39-47.

Richard, S. and J. M. Baltz (2017). "Preovulatory suppression of mouse oocyte cell volume-regulatory mechanisms is via signalling that is distinct from meiotic arrest." Sci Rep **7**(1): 702.

Richards, J. S. (1980). "Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation." Physiological reviews **60**(1): 51-89.

Richards, J. S. (1994). "Hormonal control of gene expression in the ovary." Endocr Rev **15**(6): 725-751.

Richards, J. S. (2001). "New signaling pathways for hormones and cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate action in endocrine cells." Molecular Endocrinology **15**(2): 209-218.

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

RICHARDS, J. S., J. A. JONASSEN, A. I. ROLFES, K. KERSEY and L. E. REICHERT JR (1979). "Adenosine 3', 5'-monophosphate, luteinizing hormone receptor, and progesterone during granulosa cell differentiation: effects of estradiol and follicle-stimulating hormone." Endocrinology **104**(3): 765-773.

Richards, J. S. and S. A. Pangas (2010). "The ovary: basic biology and clinical implications." The Journal of Clinical Investigation **120**(4): 963-972.

Richards, J. S., D. L. Russell, R. L. Robker, M. Dajee and T. N. Alliston (1998). "Molecular mechanisms of ovulation and luteinization." Mol Cell Endocrinol **145**(1-2): 47-54.

Richmond, L. and K. Keeshan "Pseudokinases: a tribble-edged sword." The FEBS Journal **n/a**(n/a).

Richmond, L. and K. Keeshan (2020). "Pseudokinases: a tribble-edged sword." Febs j **287**(19): 4170-4182.

Rinderknecht, E. and R. E. Humbel (1978). "The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin." J Biol Chem **253**(8): 2769-2776.

Ripley, D., B. Shoup, A. Majewski and N. Chegini (2004). "Differential expression of interleukins IL-13 and IL-15 in normal ovarian tissue and ovarian carcinomas." Gynecol Oncol **92**(3): 761-768.

Rishi, L., M. Hannon, M. Salomè, M. Hasemann, A.-K. Frank, J. Campos, J. Timoney, C. O'Connor, M. R. Cahill, B. Porse and K. Keeshan (2014). "Regulation of Trib2 by an E2F1-C/EBP α feedback loop in AML cell proliferation." Blood **123**(15): 2389-2400.

Rivera, G. M. and J. E. Fortune (2003). "Proteolysis of insulin-like growth factor binding proteins -4 and -5 in bovine follicular fluid: implications for ovarian follicular selection and dominance." Endocrinology **144**(7): 2977-2987.

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

Robker, R. L. and J. S. Richards (1998). "Hormone-induced proliferation and differentiation of granulosa cells: a coordinated balance of the cell cycle regulators cyclin D2 and p27Kip1." Mol Endocrinol **12**(7): 924-940.

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

Roche, J. F. and M. P. Boland (1991). "Turnover of dominant follicles in cattle of different reproductive states." Theriogenology **35**(1): 81-90.

Rodgers, R. J. and H. F. Irving-Rodgers (2010). "Morphological classification of bovine ovarian follicles." Reproduction **139**(2): 309-318.

Rohrschneider, L. R., J. F. Fuller, I. Wolf, Y. Liu and D. M. Lucas (2000). "Structure, function, and biology of SHIP proteins." Genes & development **14**(5): 505-520.

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

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

Sakai, S., C. Miyajima, C. Uchida, Y. Itoh, H. Hayashi and Y. Inoue (2016). "Tribbles-Related Protein Family Members as Regulators or Substrates of the Ubiquitin-Proteasome System in Cancer Development." Curr Cancer Drug Targets **16**(2): 147-156.

Salmassi, A., A. Fattahi, M. Nouri, J. Hedderich and A. G. Schmutzler (2017). "Expression of mRNA and protein of IL-18 and its receptor in human follicular granulosa cells." J Endocrinol Invest **40**(4): 447-454.

Salome, M., A. Magee, K. Yalla, S. Chaudhury, E. Sarrou, R. J. Carmody and K. Keeshan (2018). "A Trib2-p38 axis controls myeloid leukaemia cell cycle and stress response signalling." Cell Death Dis **9**(5): 443.

Salomé, M., A. Magee, K. Yalla, S. Chaudhury, E. Sarrou, R. J. Carmody and K. Keeshan (2018). "A Trib2-p38 axis controls myeloid leukaemia cell cycle and stress response signalling." Cell Death & Disease **9**(5): 443.

Salomé, M., A. Magee, K. Yalla, S. Chaudhury, E. Sarrou, R. J. Carmody and K. Keeshan (2018). "A Trib2-p38 axis controls myeloid leukaemia cell cycle and stress response signalling." Cell death & disease **9**(5): 1-17.

Salomé, M., A. Magee, K. Yalla, S. Chaudhury, E. Sarrou, R. J. Carmody and K. Keeshan (2018). "A Trib2-p38 axis controls myeloid leukaemia cell cycle and stress response signalling." Cell Death Dis **9**(5): 443.

Salvador, L. M., E. Maizels, D. B. Hales, E. Miyamoto, H. Yamamoto and M. Hunzicker-Dunn (2002). "Acute signaling by the LH receptor is independent of protein kinase C activation." Endocrinology **143**(8): 2986-2994.

Samir, M., C. Glister, D. Mattar, M. Laird and P. G. Knight (2017). "Follicular expression of pro-inflammatory cytokines tumour necrosis factor-alpha (TNFalpha), interleukin 6 (IL6) and their receptors in cattle: TNFalpha, IL6 and macrophages suppress thecal androgen production in vitro." Reproduction **154**(1): 35-49.

Samir, M., C. Glister, D. Mattar, M. Laird and P. G. Knight (2017). "Follicular expression of pro-inflammatory cytokines tumour necrosis factor- α (TNF α), interleukin 6 (IL6) and their receptors in cattle: TNF α , IL6 and macrophages suppress thecal androgen production in vitro." Reproduction **154**(1): 35-49.

Sarit, F. and D. Ada (2005). "Ovarian transcriptomes as a tool for a global approach of genes modulated by gonadotropic hormones in human ovarian granulosa cells." Endocrine **26**(3): 259-265.

Sasano, H., M. Okamoto, J. I. Mason, E. R. Simpson, C. R. Mendelson, N. Sasano and S. G. Silverberg (1989). "Immunolocalization of aromatase, 17 alpha-hydroxylase and side-chain-cleavage cytochromes P-450 in the human ovary." J Reprod Fertil **85**(1): 163-169.

Sasseville, M., N. Cote, C. Vigneault, C. Guillemette and F. J. Richard (2007). "3'5'-cyclic adenosine monophosphate-dependent up-regulation of phosphodiesterase type 3A in porcine cumulus cells." Endocrinology **148**(4): 1858-1867.

Sasson, R., A. Dantes, K. Tajima and A. Amsterdam (2003). "Novel genes modulated by FSH in normal and immortalized FSH-responsive cells: new insights into the mechanism of FSH action." The FASEB journal **17**(10): 1256-1266.

Sattler, M., S. Verma, Y. B. Pride, R. Salgia, L. R. Rohrschneider and J. D. Griffin (2001). "SHIP1, an SH2 domain containing polyinositol-5-phosphatase, regulates migration through two critical tyrosine residues and forms a novel signaling complex with DOK1 and CRKL." Journal of Biological Chemistry **276**(4): 2451-2458.

Savio, J. D., M. P. Boland, N. Hynes and J. F. Roche (1990). "Resumption of follicular activity in the early post-partum period of dairy cows." J Reprod Fertil **88**(2): 569-579.

Savio, J. D., L. Keenan, M. P. Boland and J. F. Roche (1988). "Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers." J Reprod Fertil **83**(2): 663-671.

Savio, J. D., W. W. Thatcher, L. Badinga, R. L. de la Sota and D. Wolfenson (1993). "Regulation of dominant follicle turnover during the oestrous cycle in cows." J Reprod Fertil **97**(1): 197-203.

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

Sayasith, K., K. A. Brown, J. G. Lussier, M. Doré and J. Sirois (2006). "Characterization of bovine early growth response factor-1 and its gonadotropin-dependent regulation in ovarian follicles prior to ovulation." J Mol Endocrinol **37**(2): 239-250.

Sayasith, K., J. Lussier and J. Sirois (2013). "Molecular characterization and transcriptional regulation of a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif 1 (ADAMTS1) in bovine preovulatory follicles." Endocrinology **154**(8): 2857-2869.

Sayasith, K. and J. Sirois (2014). "Expression and regulation of stromal cell-derived factor-1 (SDF1) and chemokine CXC motif receptor 4 (CXCR4) in equine and bovine preovulatory follicles." Molecular and cellular endocrinology **391**(1-2): 10-21.

Sayasith, K. and J. Sirois (2015). "Molecular characterization of a disintegrin and metalloprotease-17 (ADAM17) in granulosa cells of bovine preovulatory follicles." Molecular and cellular endocrinology **411**: 49-57.

Sayasith, K., J. Sirois and J. G. Lussier (2013). "Expression, regulation, and promoter activation of Vanin-2 (VNN2) in bovine follicles prior to ovulation." Biology of reproduction **89**(4): 98, 91-11.

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

Sayasith, K., J. Sirois and J. G. Lussier (2014). "Expression and regulation of regulator of G-protein signaling protein-2 (RGS2) in equine and bovine follicles prior to ovulation: molecular characterization of RGS2 transactivation in bovine granulosa cells." Biology of reproduction **91**(6): 139, 131-112.

Schally, A. V., A. Arimura, A. Kastin, H. Matsuo, Y. Baba, T. Redding, R. Nair, L. Debeljuk and W. White (1971). "Gonadotropin-releasing hormone: one polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle-stimulating hormones." Science **173**(4001): 1036-1038.

Schiffer, Z. e., I. Keren-Tal, M. Deutsch, A. Dantes, D. Aharoni, A. Weinerb, R. Tirosh and A. Amsterdam (1996). "Fourier analysis of differential light scattering for the quantitation of FSH response associated with structural changes in immortalized granulosa cells." Molecular and cellular endocrinology **118**(1-2): 145-153.

Schmidt, D., C. E. Ovitt, K. Anlag, S. Fehsenfeld, L. Gredsted, A.-C. Treier and M. Treier (2004). "The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance." Development **131**(4): 933-942.

Schuermann, Y., M. T. Rovani, B. Gasperin, R. Ferreira, J. Ferst, E. Madogwe, P. B. Gonçalves, V. Bordignon and R. Duggavathi (2018). "ERK1/2-dependent gene expression in the bovine ovulating follicle." Scientific Reports **8**(1): 16170.

Schultz, G. S. and A. Wysocki (2009). "Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing." Wound Repair Regen **17**(2): 153-162.

Segaloff, D. L., H. Y. Wang and J. S. Richards (1990). "Hormonal regulation of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor mRNA in rat ovarian cells during follicular development and luteinization." Mol Endocrinol **4**(12): 1856-1865.

Seger, R. and E. G. Krebs (1995). "The MAPK signaling cascade." The FASEB journal **9**(9): 726-735.

Seher, T. C. and M. Leptin (2000). "Tribbles, a cell-cycle brake that coordinates proliferation and morphogenesis during Drosophila gastrulation." Curr Biol **10**(11): 623-629.

Seher, T. C. and M. Leptin (2000). "Tribbles, a cell-cycle brake that coordinates proliferation and morphogenesis during Drosophila gastrulation." Current Biology **10**(11): 623-629.

Sekiguchi, T., T. Mizutani, K. Yamada, T. Kajitani, T. Yazawa, M. Yoshino and K. Miyamoto (2004). "Expression of epiregulin and amphiregulin in the rat ovary." J Mol Endocrinol **33**(1): 281-291.

Setchell, B. P. (1974). "The contributions of Regnier de Graaf to reproductive biology." European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology **4**(1): 1-13.

Sharma, A., R. Mir and S. Galande (2021). "Epigenetic Regulation of the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway in Cancer." Frontiers in Genetics **12**.

Shimada, M., I. Hernandez-Gonzalez, I. Gonzalez-Robayna and J. S. Richards (2006). "Paracrine and autocrine regulation of epidermal growth factor-like factors in cumulus oocyte complexes and granulosa cells: key roles for prostaglandin synthase 2 and progesterone receptor." Mol Endocrinol **20**(6): 1352-1365.

Shimizu, T. (2016). "Molecular and cellular mechanisms for the regulation of ovarian follicular function in cows." The Journal of reproduction and development **62**(4): 323-329.

Shrestha, K., K. Lukasik, A. Baufeld, J. Vanselow, U. Moallem and R. Meidan (2015). "Regulation of ovulatory genes in bovine granulosa cells: lessons from siRNA silencing of PTGS2." Reproduction **149**(1): 21-29.

Shuhaibar, L. C., J. R. Egbert, R. P. Norris, P. D. Lampe, V. O. Nikolaev, M. Thunemann, L. Wen, R. Feil and L. A. Jaffe (2015). "Intercellular signaling via cyclic GMP diffusion through gap junctions restarts meiosis in mouse ovarian follicles." Proc Natl Acad Sci U S A **112**(17): 5527-5532.

Siddappa, D., É. Beaulieu, N. Gévry, P. P. Roux, V. Bordignon and R. Duggavathi (2015). "Effect of the transient pharmacological inhibition of Mapk3/1 pathway on ovulation in mice." *PloS one* **10**(3): e0119387.

Sina, M., E. Dirandeh, H. Deldar and B. Shohreh (2018). "Inflammatory status and its relationships with different patterns of postpartum luteal activity and reproductive performance in early lactating Holstein cows." *Theriogenology* **108**: 262-268.

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

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

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

Skarzynski, D., G. Ferreira-Dias and K. Okuda (2008). "Regulation of Luteal Function and Corpus Luteum Regression in Cows: Hormonal Control, Immune Mechanisms and Intercellular Communication." *Reproduction in Domestic Animals* **43**(s2): 57-65.

Skarzynski, D. J., G. Ferreira-Dias and K. Okuda (2008). "Regulation of luteal function and corpus luteum regression in cows: hormonal control, immune mechanisms and intercellular communication." *Reprod Domest Anim* **43 Suppl 2**: 57-65.

Skarzynski, D. J., J. J. Jaroszewski and K. Okuda (2005). "Role of tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide in luteolysis in cattle." *Domest Anim Endocrinol* **29**(2): 340-346.

Smith, S. M., A. P. Moran, S. P. Duggan, S. E. Ahmed, A. S. Mohamed, H. J. Windle, L. A. O'Neill and D. P. Kelleher (2011). "Tribbles 3: a novel regulator of TLR2-mediated signaling in response to *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide." *The Journal of Immunology* **186**(4): 2462-2471.

Smolikova, K., A. Mlynarcikova and S. Scsukova (2012). "Role of interleukins in the regulation of ovarian functions." *Endocr Regul* **46**(4): 237-253.

Spanou, S., D. Kalogiannis, E. Zapanti, M. Gazouli, I. A. Sfontouris, C. Siristatidis and G. Mastorakos (2018). "Interleukin 15 concentrations in follicular fluid and their effect on oocyte maturation in subfertile women undergoing intracytoplasmic sperm injection." *J Assist Reprod Genet* **35**(6): 1019-1025.

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

Sposini, S., F. G. Jean-Alphonse, M. A. Ayoub, A. Oqua, C. West, S. Lavery, J. J. Brosens, E. Reiter and A. C. Hanyaloglu (2017). "Integration of GPCR Signaling and Sorting from Very Early Endosomes via Opposing APPL1 Mechanisms." Cell Rep **21**(10): 2855-2867.

Stassi, A. F., M. E. Baravalle, E. M. Belotti, A. N. Amweg, E. Angeli, M. M. L. Velazquez, F. Rey, N. R. Salvetti and H. H. Ortega (2018). "Altered expression of IL-1beta, IL-1RI, IL-1RII, IL-1RA and IL-4 could contribute to anovulation and follicular persistence in cattle." Theriogenology **110**: 61-73.

Stassi, A. F., M. E. Baravalle, E. M. Belotti, A. N. Amweg, E. Angeli, M. M. L. Velázquez, F. Rey, N. R. Salvetti and H. H. Ortega (2018). "Altered expression of IL-1 β , IL-1RI, IL-1RII, IL-1RA and IL-4 could contribute to anovulation and follicular persistence in cattle." Theriogenology **110**: 61-73.

Stassi, A. F., M. E. Baravalle, E. M. Belotti, F. Rey, N. C. Gareis, P. U. Diaz, F. M. Rodriguez, C. J. Leiva, H. H. Ortega and N. R. Salvetti (2017). "Altered expression of cytokines IL-1alpha, IL-6, IL-8 and TNF-alpha in bovine follicular persistence." Theriogenology **97**: 104-112.

Stassi, A. F., M. E. Baravalle, E. M. Belotti, F. Rey, N. C. Gareis, P. U. Díaz, F. M. Rodríguez, C. J. Leiva, H. H. Ortega and N. R. Salvetti (2017). "Altered expression of cytokines IL-1 α , IL-6, IL-8 and TNF- α in bovine follicular persistence." Theriogenology **97**: 104-112.

Stein, S. J., E. A. Mack, K. S. Rome and W. S. Pear (2015). "Tribbles in normal and malignant haematopoiesis." Biochemical Society Transactions **43**(5): 1112-1115.

Sterneck, E., L. Tessarollo and P. F. Johnson (1997). "An essential role for C/EBP β in female reproduction." Genes & development **11**(17): 2153-2162.

Stocco, C., C. Telleria and G. Gibori (2007). "The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression." Endocr Rev **28**(1): 117-149.

Stocco, C. O., L. F. Lau and G. Gibori (2002). "A Calcium/Calmodulin-dependent Activation of ERK1/2 Mediates JunD Phosphorylation and Induction of *nur77* and *hsp27* Genes by Prostaglandin F_{2 α} in Ovarian Cells *." Journal of Biological Chemistry **277**(5): 3293-3302.

Strauss, J. F., B. Modi and J. M. McAllister (2014). Chapter 18 - Defects in Ovarian Steroid Hormone Biosynthesis. Cellular Endocrinology in Health and Disease. A. Ulloa-Aguirre and P. M. Conn. Boston, Academic Press: 285-309.

Su, Y.-Q., M. Nyegaard, M. T. Overgaard, J. Qiao and L. C. Giudice (2006). "Participation of mitogen-activated protein kinase in luteinizing hormone-induced differential regulation of steroidogenesis and steroidogenic gene expression in mural and cumulus granulosa cells of mouse preovulatory follicles." Biology of reproduction **75**(6): 859-867.

Su, Y.-Q., X. Wu, M. J. O'Brien, F. L. Pendola, J. N. Denegre, M. M. Matzuk and J. J. Eppig (2004). "Synergistic roles of BMP15 and GDF9 in the development and function of the oocyte-cumulus cell complex in mice: genetic evidence for an oocyte-granulosa cell regulatory loop." Developmental biology **276**(1): 64-73.

Sullivan, M. W., A. Stewart-Akers, J. S. Krasnow, S. L. Berga and A. J. Zeleznik (1999). "Ovarian responses in women to recombinant follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone (LH): a role for LH in the final stages of follicular maturation." J Clin Endocrinol Metab **84**(1): 228-232.

Sunderland, S., M. Crowe, M. Boland, J. Roche and J. Ireland (1994). "Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of heifers." Reproduction **101**(3): 547-555.

Sung, H. Y., S. E. Francis, D. C. Crossman and E. Kiss-Toth (2006). "Regulation of expression and signalling modulator function of mammalian tribbles is cell-type specific." Immunol Lett **104**(1-2): 171-177.

Sung, H. Y., H. Guan, A. Czibula, A. R. King, K. Eder, E. Heath, S. K. Suvarna, S. K. Dower, A. G. Wilson, S. E. Francis, D. C. Crossman and E. Kiss-Toth (2007). "Human tribbles-1 controls proliferation and chemotaxis of smooth muscle cells via MAPK signaling pathways." J Biol Chem **282**(25): 18379-18387.

Taieb, F., C. Thibier and C. Jesus (1997). "On cyclins, oocytes, and eggs." Mol Reprod Dev **48**(3): 397-411.

Tajima, K., K. Yoshii, S. Fukuda, M. Orisaka, K. Miyamoto, A. Amsterdam and F. Kotsuji (2005). "Luteinizing hormone-induced extracellular-signal regulated kinase activation differently modulates progesterone and androstenedione production in bovine theca cells." Endocrinology **146**(7): 2903-2910.

Takenaka, K., T. Moriguchi and E. Nishida (1998). "Activation of the protein kinase p38 in the spindle assembly checkpoint and mitotic arrest." Science **280**(5363): 599-602.

Takigawa, M. (2003). "CTGF/Hcs24 as a multifunctional growth factor for fibroblasts, chondrocytes and vascular endothelial cells." Drug news & perspectives **16**(1): 11-21.

Tamemoto, H., T. Kadowaki, K. Tobe, K. Ueki, T. Izumi, Y. Chatani, M. Kohno, M. Kasuga, Y. Yazaki and Y. Akanuma (1992). "Biphasic activation of two mitogen-activated protein kinases during the cell cycle in mammalian cells." Journal of Biological Chemistry **267**(28): 20293-20297.

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

Tatone, C., F. Amicarelli, M. C. Carbone, P. Monteleone, D. Caserta, R. Marci, P. G. Artini, P. Piomboni and R. Focarelli (2008). "Cellular and molecular aspects of ovarian follicle ageing." Human reproduction update **14**(2): 131-142.

Taylor, C. and R. Rajamahendran (1991). "Follicular dynamics and corpus luteum growth and function in pregnant versus nonpregnant cows." J Dairy Sci **74**(1): 115-123.

Tej, J., J. Pulukuri, K. Krishna, K. Kaushik, P. S. P. Gupta, S. Nandi and S. Mondal (2021). "Copper and Selenium stimulates CYP19A1 expression in caprine ovarian granulosa cells: possible involvement of AKT and WNT signalling pathways." Molecular Biology Reports **48**.

Tepekoy, F. and G. Akkoyunlu (2016). "The effect of FSH and activin A on Akt and MAPK1/3 phosphorylation in cultured bovine ovarian cortical strips." Journal of ovarian research **9**: 13-13.

Terret, M.-E. (2004). control of the meiosis I to meiosis II transition and role of DOC1R during CSF arrest of meiotic maturation in mouse, Université Pierre et Marie Curie - Paris VI.

Thomas, R. M., C. A. Nechamen, J. E. Mazurkiewicz, A. Ulloa-Aguirre and J. A. Dias (2011). "The adapter protein APPL1 links FSH receptor to inositol 1,4,5-trisphosphate production and is implicated in intracellular Ca(2+) mobilization." Endocrinology **152**(4): 1691-1701.

Tilly, J. L., K. I. Kowalski, A. L. Johnson and A. J. Hsueh (1991). "Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression." Endocrinology **129**(5): 2799-2801.

Tranchant, T., G. Durand, C. Gauthier, P. Crépieux, A. Ulloa-Aguirre, D. Royère and E. Reiter (2011). "Preferential β -arrestin signalling at low receptor density revealed by functional characterization of the human FSH receptor A189 V mutation." Molecular and cellular endocrinology **331**(1): 109-118.

Trimble, E. J. (1996). "The management of aircraft passenger survival in fire." Toxicology **115**(1-3): 41-61.

Tsafiriri, A., S. Y. Chun, R. Zhang, A. J. Hsueh and M. Conti (1996). "Oocyte maturation involves compartmentalization and opposing changes of cAMP levels in follicular somatic and germ cells: studies using selective phosphodiesterase inhibitors." Dev Biol **178**(2): 393-402.

Tsafiriri, A. and S. H. Pomerantz (1986). "8 Oocyte maturation inhibitor." Clinics in Endocrinology and Metabolism **15**(1): 157-170.

Vainio, S., M. Heikkilä, A. Kispert, N. Chin and A. P. McMahon (1999). "Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling." Nature **397**(6718): 405-409.

Valdez, K. E., S. P. Cuneo and A. M. Turzillo (2005). "Regulation of apoptosis in the atresia of dominant bovine follicles of the first follicular wave following ovulation." Reproduction **130**(1): 71-81.

Van Deerlin, P. G., N. Cekleniak, C. Coutifaris, J. Boyd and J. F. Strauss, 3rd (1997). "Evidence for the oligoclonal origin of the granulosa cell population of the mature human follicle." J Clin Endocrinol Metab **82**(9): 3019-3024.

van der Velden, V. H., B. A. Naber, A. F. Wierenga-Wolf, R. Debets, H. F. Savelkoul, S. E. Overbeek, H. C. Hoogsteden and M. A. Versnel (1998). "Interleukin 4 receptors on human bronchial epithelial cells. An in vivo and in vitro analysis of expression and function." Cytokine **10**(10): 803-813.

van Dessel, H. J., I. Schipper, T. D. Pache, H. van Geldorp, F. H. de Jong and B. C. Fauser (1996). "Normal human follicle development: an evaluation of correlations with oestradiol, androstenedione and progesterone levels in individual follicles." Clin Endocrinol (Oxf) **44**(2): 191-198.

Vanhaesebroeck, B., S. J. Leever, K. Ahmadi, J. Timms, R. Katso, P. C. Driscoll, R. Woscholski, P. J. Parker and M. D. Waterfield (2001). "Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids." Annu Rev Biochem **70**: 535-602.

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

Visser, J. A. and A. P. Themmen (2005). "Anti-Müllerian hormone and folliculogenesis." Mol Cell Endocrinol **234**(1-2): 81-86.

Vizcarra, J., R. Wettemann and G. Morgan (1996). "Influence of amplitude, frequency and duration of infused GnRH pulses on secretion of LH and FSH in beef cows." J Anim Sci [Suppl 1] **72**: 122.

Vizcarra, J. A., R. P. Wettemann, T. D. Braden, A. M. Turzillo and T. M. Nett (1997). "Effect of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Pulse Frequency on Serum and Pituitary Concentrations of Luteinizing Hormone and Follicle-Stimulating Hormone, GnRH Receptors, and Messenger Ribonucleic Acid for Gonadotropin Subunits in Cows*." Endocrinology **138**(2): 594-601.

Voronina, E., L. A. Lovasco, A. Gyuris, R. A. Baumgartner, A. F. Parlow and R. N. Freiman (2007). "Ovarian granulosa cell survival and proliferation requires the gonad-selective TFIIID subunit TAF4b." Developmental biology **303**(2): 715-726.

Vujisic, S., S. Z. Lepej, I. Emedi, R. Bauman, A. Remenar and M. K. Tiljak (2006). "Ovarian follicular concentration of IL-12, IL-15, IL-18 and p40 subunit of IL-12 and IL-23." Hum Reprod **21**(10): 2650-2655.

Wagner, E. F. and A. R. Nebreda (2009). "Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development." Nat Rev Cancer **9**(8): 537-549.

Wagner, E. F. and Á. R. Nebreda (2009). "Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development." Nature Reviews Cancer **9**(8): 537-549.

Wang, H., M. L. Russa and L. S. Qi (2016). "CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond." Annual Review of Biochemistry **85**(1): 227-264.

Wang, J., J.-S. Park, Y. Wei, M. Rajurkar, J. L. Cotton, Q. Fan, B. C. Lewis, H. Ji and J. Mao (2013). "TRIB2 acts downstream of Wnt/TCF in liver cancer cells to regulate YAP and C/EBP α function." Molecular cell **51**(2): 211-225.

Wang, J., J. S. Park, Y. Wei, M. Rajurkar, J. L. Cotton, Q. Fan, B. C. Lewis, H. Ji and J. Mao (2013). "TRIB2 acts downstream of Wnt/TCF in liver cancer cells to regulate YAP and C/EBP α function." Mol Cell **51**(2): 211-225.

Wang, J., Y. Zhang, W. Weng, Y. Qiao, L. Ma, W. Xiao, Y. Yu, Q. Pan and F. Sun (2013). "Impaired phosphorylation and ubiquitination by p70 S6 kinase (p70S6K) and Smad ubiquitination regulatory factor 1 (Smurf1) promote tribbles homolog 2 (TRIB2) stability and carcinogenic property in liver cancer." J Biol Chem **288**(47): 33667-33681.

Wang, J., J. Zuo, A. Wahafu, M.-d. Wang, R.-c. Li and W.-f. Xie (2020). "Combined elevation of TRIB2 and MAP3K1 indicates poor prognosis and chemoresistance to temozolomide in glioblastoma." CNS Neuroscience & Therapeutics **26**(3): 297-308.

Wang, P. Y., Y. X. Sun, S. Zhang, M. Pang, H. H. Zhang, S. Y. Gao, C. Zhang, C. J. Lv and S. Y. Xie (2013). "Let-7c inhibits A549 cell proliferation through oncogenic TRIB2 related factors." FEBS Lett **587**(16): 2675-2681.

Webb, R., P. Garnsworthy, J.-G. Gong and D. Armstrong (2004). "Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences." Journal of Animal Science **82**(suppl_13): E63-E74.

Webb, R., J. G. Gong, A. S. Law and S. M. Rusbridge (1992). "Control of ovarian function in cattle." J Reprod Fertil Suppl **45**: 141-156.

Wei, G., T. Lu, J. Shen and J. Wang (2020). "LncRNA ZEB1-AS1 promotes pancreatic cancer progression by regulating miR-505-3p/TRIB2 axis." Biochem Biophys Res Commun **528**(4): 644-649.

Wei, J., C. Yee, P. Ramanathan, L. J. Bendall and P. Williamson (2011). "Variation in immunophenotype of lactating mice." J Reprod Immunol **89**(2): 178-184.

Wei, S.-C., I. M. Rosenberg, Z. Cao, A. S. Huett, R. J. Xavier and D. K. Podolsky (2012). "Tribbles 2 (Trib2) is a novel regulator of toll-like receptor 5 signaling." Inflammatory bowel diseases **18**(5): 877-888.

Wei, S. C., I. M. Rosenberg, Z. Cao, A. S. Huett, R. J. Xavier and D. K. Podolsky (2012). "Tribbles 2 (Trib2) is a novel regulator of toll-like receptor 5 signaling." Inflamm Bowel Dis **18**(5): 877-888.

Wiese, K. E., R. Nusse and R. van Amerongen (2018). "Wnt signalling: conquering complexity." Development **145**(12): dev165902.

Wilkin, F., N. Suarez-Huerta, B. Robaye, J. Peetermans, F. Libert, J. E. Dumont and C. Maenhaut (1997). "Characterization of a phosphoprotein whose mRNA is regulated by the mitogenic pathways in dog thyroid cells." Eur J Biochem **248**(3): 660-668.

Wilkin, F., N. Suarez-Huerta, B. Robaye, J. Peetermans, F. Libert, J. E. Dumont and C. Maenhaut (1997). "Characterization of a phosphoprotein whose mRNA is regulated by the mitogenic pathways in dog thyroid cells." European journal of biochemistry **248**(3): 660-668.

Wohlres-Viana, S., E. K. N. Arashiro, T. P. Minare, C. A. C. Fernandes, J. G. V. Grazia, L. G. B. Siqueira, M. A. Machado and J. H. M. Viana (2019). "Differential expression of LHCGR and its isoforms is associated to the variability in superovulation responses of Gir cattle." Theriogenology **126**: 68-74.

Xu, S., M. Tong, J. Huang, Y. Zhang, Y. Qiao, W. Weng, W. Liu, J. Wang and F. Sun (2014). "TRIB2 inhibits Wnt/ β -Catenin/TCF4 signaling through its associated ubiquitin E3 ligases, β -TrCP, COP1 and Smurf1, in liver cancer cells." FEBS letters **588**(23): 4334-4341.

Xu, Z., H. Allen Garverick, G. W. Smith, M. F. Smith, S. A. Hamilton and R. S. Youngquist (1995). "Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave." Biology of reproduction **53**(4): 951-957.

Xu, Z., H. A. Garverick, G. W. Smith, M. F. Smith, S. A. Hamilton and R. S. Youngquist (1995). "Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave." Biol Reprod **53**(4): 951-957.

Yang, M. Y., R. A. Cushman and J. E. Fortune (2017). "Anti-Müllerian hormone inhibits activation and growth of bovine ovarian follicles in vitro and is localized to growing follicles." Molecular Human Reproduction **23**(5): 282-291.

Yang, M. Y. and J. E. Fortune (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." Biol Reprod **78**(6): 1153-1161.

Yokoyama, T., Y. Kanno, Y. Yamazaki, T. Takahara, S. Miyata and T. Nakamura (2010). "Trib1 links the MEK1/ERK pathway in myeloid leukemogenesis." Blood **116**(15): 2768-2775.

Yokoyama, T., Y. Kanno, Y. Yamazaki, T. Takahara, S. Miyata and T. Nakamura (2010). "Trib1 links the MEK1/ERK pathway in myeloid leukemogenesis." Blood, The Journal of the American Society of Hematology **116**(15): 2768-2775.

Yokoyama, T. and T. Nakamura (2011). "Tribbles in disease: Signaling pathways important for cellular function and neoplastic transformation." Cancer Sci **102**(6): 1115-1122.

Yokoyama, T. and T. Nakamura (2011). "Tribbles in disease: Signaling pathways important for cellular function and neoplastic transformation." Cancer science **102**(6): 1115-1122.

Young, J. M. and A. S. McNeilly (2010). "Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle." Reproduction **140**(4): 489-504.

Young, J. M. and A. S. McNeilly (2010). "Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle." **140**(4): 489.

Yu, F.-Q., C.-S. Han, W. Yang, X. Jin, Z.-Y. Hu and Y.-X. Liu (2005). "Activation of the p38 MAPK pathway by follicle-stimulating hormone regulates steroidogenesis in granulosa cells differentially." Journal of Endocrinology **186**(1): 85-96.

Zamah, A., M. Hsieh, J. Chen, J. Vigne, M. Rosen, M. Cedars and M. Conti (2010). "Human oocyte maturation is dependent on LH-stimulated accumulation of the epidermal growth factor-like growth factor, amphiregulin." Human reproduction **25**(10): 2569-2578.

Zarka, M., E. Haý and M. Cohen-Solal (2022). "YAP/TAZ in Bone and Cartilage Biology." Frontiers in Cell and Developmental Biology **9**.

Zerial, M. and H. McBride (2001). "Rab proteins as membrane organizers." Nature reviews Molecular cell biology **2**(2): 107-117.

Zhang, C., Y. L. Chi, P. Y. Wang, Y. Q. Wang, Y. X. Zhang, J. Deng, C. J. Lv and S. Y. Xie (2012). "miR-511 and miR-1297 Inhibit Human Lung Adenocarcinoma Cell Proliferation by Targeting Oncogene TRIB2." PLOS ONE **7**(10): e46090.

Zhang, J., J.-Y. Ji, M. Yu, M. Overholtzer, G. A. Smolen, R. Wang, J. S. Brugge, N. J. Dyson and D. A. Haber (2009). "YAP-dependent induction of amphiregulin identifies a non-cell-autonomous component of the Hippo pathway." Nature Cell Biology **11**(12): 1444-1450.

Zhang, J., Y. Liu, W. Yao, Q. Li, H. Liu and Z. Pan (2018). "Initiation of follicular atresia: gene networks during early atresia in pig ovaries." **156**(1): 23.

Zhang, J., X. Zhao, Z. Luan and A. Wang (2020). "Rab14 Overexpression Promotes Proliferation and Invasion Through YAP Signaling in Non-Small Cell Lung Cancers." OncoTargets and therapy **13**: 9269.

Zhang, W. and H. T. Liu (2002). "MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells." Cell Research **12**(1): 9-18.

Zhang, X., J. George, S. Deb, J. L. Degoutin, E. A. Takano, S. B. Fox, D. D. Bowtell and K. F. Harvey (2011). "The Hippo pathway transcriptional co-activator, YAP, is an ovarian cancer oncogene." Oncogene **30**(25): 2810-2822.

Zhang, Y.-X., Y.-F. Yan, Y.-M. Liu, Y.-J. Li, H.-H. Zhang, M. Pang, J.-X. Hu, W. Zhao, N. Xie, L. Zhou, P.-Y. Wang and S.-Y. Xie (2016). "Smad3-related miRNAs regulated oncogenic TRIB2 promoter activity to effectively suppress lung adenocarcinoma growth." Cell Death & Disease **7**(12): e2528-e2528.

Zhao, B., X. Ye, J. Yu, L. Li, W. Li, S. Li, J. Yu, J. D. Lin, C.-Y. Wang and A. M. Chinnaiyan (2008). "TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control." Genes & development **22**(14): 1962-1971.

Zhao, B., X. Ye, J. Yu, L. Li, W. Li, S. Li, J. Yu, J. D. Lin, C. Y. Wang, A. M. Chinnaiyan, Z. C. Lai and K. L. Guan (2008). "TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control." Genes Dev **22**(14): 1962-1971.

Zhou, W. J., H. L. Yang, J. Shao, J. Mei, K. K. Chang, R. Zhu and M. Q. Li (2019). "Anti-inflammatory cytokines in endometriosis." Cell Mol Life Sci **76**(11): 2111-2132.

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

ANNEXES

Annexe 1. Résumé des principales méthodes utilisées

Annexe 1.1. La technologie CRISPR/CAS9

L'approche CRISPR/Cas9 permet d'éditer l'ADN chromosomique de manière à modifier de façon spécifique la séquence nucléotidique d'un gène pour le rendre non fonctionnel (Wang, Russa et al. 2016). Pour étudier la fonction TRIB2, nous avons utilisé la technologie CRISPR/Cas9 à travers le système CRISPR/Cas9 guide-it (Clontech) pour le clonage et l'expression d'ARN guide (sgRNA) cible pour l'inhibition de TRIB2 dans les CG. Quatre sgRNA ont été conçus en utilisant des outils en ligne pour maximiser l'efficacité du clivage sur le site cible et minimiser les événements de clivage non spécifique. L'efficacité des sgRNA est testée avant les expériences de transfection en utilisant le système *Guide-it sgRNA in vitro transcription and Screening System* (Clontech). Des matrices d'ADN contenant des séquences codant pour les sgRNA sous le contrôle du promoteur T7 sont générées par PCR, transcrites *in vitro* et purifiées. Pour vérifier l'efficacité des sgRNA, des fragments de TRIB2 (600-800 pb) sont générés par PCR à partir d'échantillons d'ADN de follicules dominants. Une réaction de clivage sur ces fragments est réalisée en utilisant les sgRNA purifiés et en présence de la nucléase Cas9 recombinante (Clontech). L'efficacité des réactions de clivage est analysée sur gel d'agarose et par densitométrie. Un sgRNA en particulier est utilisé pour le clonage dans le vecteur pGuide-it pour la construction du plasmide et la transfection des CG en utilisant le kit de transfection Xfect (Clontech). L'édition du gène TRIB2 a été confirmée en utilisant l'analyse RT-PCR. Les effets de l'inhibition de TRIB2 peuvent alors

être évalués à différents niveaux notamment la prolifération cellulaire, la stéroïdogénèse, l'expression de gènes cibles potentiels et la régulation des voies de signalisation.

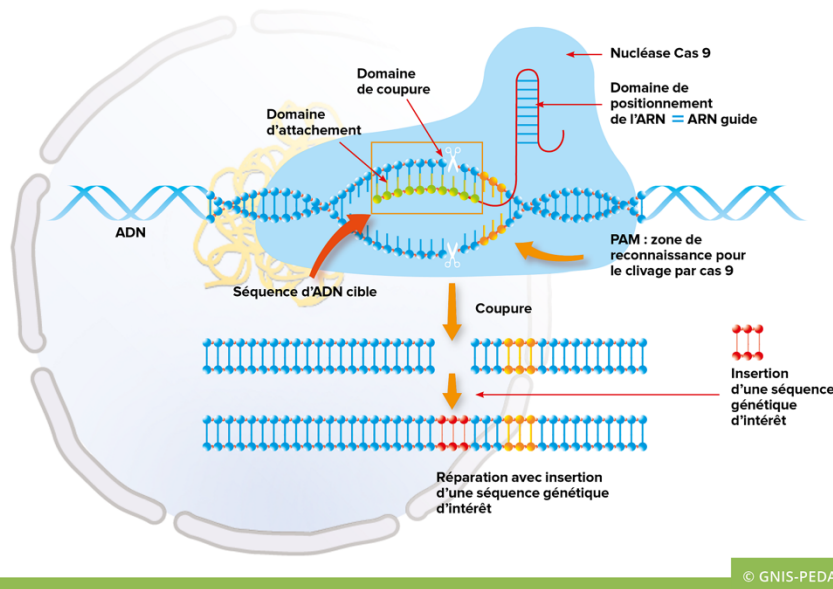


Figure 1. – Le principe de la disruption génique médiée par CRISPR/Cas9.

Un ARN guide unique (sgRNA), composé d'une séquence spécifique à l'ADN cible (TRIB2) et d'une séquence qui interagit avec la protéine Cas9, se lie à une forme recombinante de protéine Cas9 qui a une activité d'endonucléase d'ADN. Le complexe résultant provoquera un clivage d'ADN double brins spécifique à la cible. Le site de clivage sera réparé par la voie de réparation de l'ADN non homologue (NHEJ), un processus sujet aux erreurs pouvant entraîner des insertions/suppressions (INDEL) susceptibles de perturber la fonction des gènes. <https://www.takarabio.com/learning-centers/gene-function/gene-editing/gene-editing-tools-and-information/introduction-to-the-crispr/cas9-system>.

Annexe 1.2. L'approche double hybride chez la levure pour identifier les protéines partenaires de TRIB2 dans les CG

La méthode du double hybride (Y2H) permet de mettre en évidence les interactions physiques entre deux protéines (Vidal and Fields 2014). Le système Y2H exploite la nature modulaire des facteurs

de transcription eucaryotes qui consistent en un domaine de liaison à l'ADN et un domaine d'activation (AD) de la transcription permettant de recruter l'ARN polymérase II pour initier la transcription d'un gène rapporteur ou de sélection (Fig.12). Les domaines BD et AD du facteur de transcription GAL4 de la levure sont utilisés afin de générer des protéines fusions. Pour identifier les protéines partenaires de TRIB2 dans les GC (objectif 2 de cette thèse. La séquence correspondant au cadre de lecture ouvert de TRIB2 bovin (Accession #: AY360147) a été cloné dans le vecteur pGBKT7 en fusion avec le domaine de liaison à l'ADN du promoteur GAL4 afin de construire le plasmide appât pGBKT7-TRIB2 (Matchmaker, Clontech). Cette construction est utilisée pour transformer la souche de levure Y2H Gold renfermant des gènes rapporteurs (HIS3, ADE2, MEL1 et AUR1) sous le contrôle des séquences d'activation en amont de GAL4. Une banque d'ADNc de CG bovines provenant de follicule dominant est construite dans la souche de levure Y187 en utilisant le vecteur pGADT7-Rec en fusion avec le domaine d'activation de GAL4. Les levures Y2HGold portant le plasmide appât TRIB2 sont alors couplées avec les levures Y187 renfermant la banque d'ADNc de CG bovines pour isoler des partenaires potentiels. Ces partenaires ont été isolés et caractérisés par séquençage. Les interactions identifiées ont été confirmées par co-immunoprécipitation en utilisant le système Matchmaker Co-IP (Clontech). Des analyses RT-qPCR ont été effectuées pour analyser l'expression et la régulation des partenaires potentiels de TRIB2 dans les CG pendant le développement folliculaire et lors de l'inhibition ou la surexpression de TRIB2.

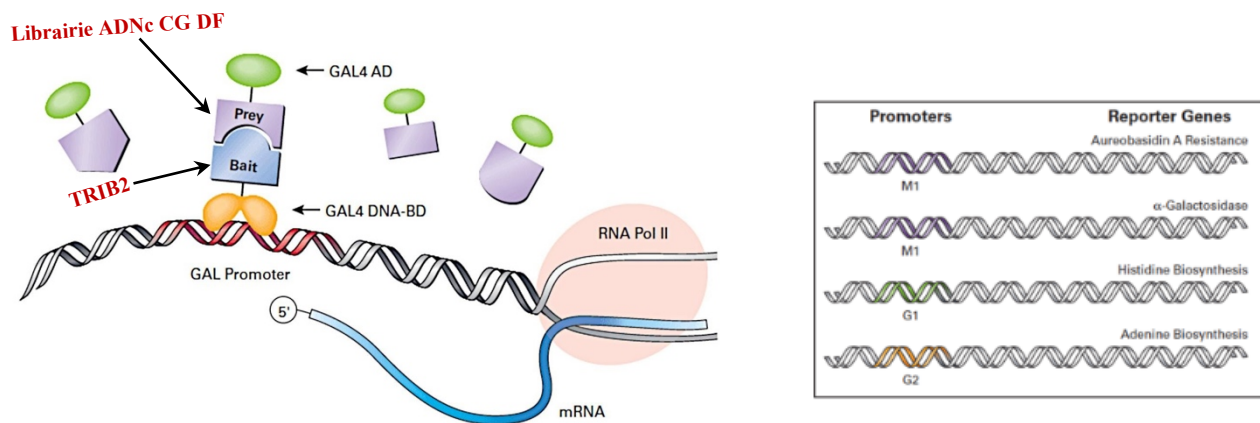


Figure 2. – Méthode double-hybride dans les levures - Activation des gènes rapporteurs

La protéine appât (TRIB2) est fusionnée à un domaine de liaison BD reconnaissant une séquence spécifique de l'ADN des levures qui est promotrice de 4 gènes rapporteurs. La protéine proie, provenant de la librairie de cADN des CG des DF, a été fusionnée à un domaine d'activation AD. Ces deux constructions sont naturellement introduites dans une levure qui exprimera les deux protéines fusion (BD-TRIB2 + AD-librairie ADNc GC DF). La transcription des gènes rapporteurs n'aura lieu que si TRIB2 et une protéine de la librairie interagissent. Adapté de Clontech, 2013, Matchmaker® Gold Yeast Two-Hybrid Syst

Annexe 2. Annexe à l'article 3 : Régulation de l'expression de TRIB2 dans les cellules de granulosa de vaches BHB⁺ comparées aux vaches BHB⁻.

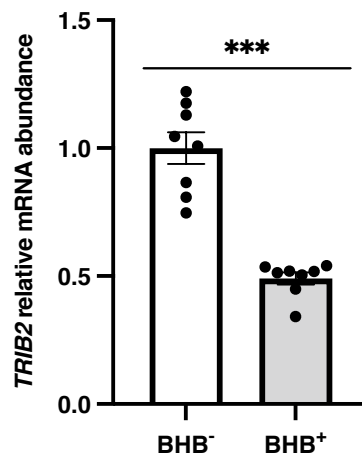


Figure 3. – TRIB2 regulation in post-partum granulosa cells.

Total RNA was extracted from GC of either postpartum cows with high BHB levels (BHB⁺) or low BHB (CTRL) and analyzed by RT-qPCR for *TRIB2* (n=8 cows for each group). *TRIB2* was significantly reduced during the postpartum period in BHB⁺ cows as compared to the control group (BHB⁻). mRNA relative expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method with *RPL19* as reference gene. ***, P=0.0003.