

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

**CONTRÔLE DE L'EXPRESSION DU GÈNE DE LA PROTÉINE
DE RÉGULATION RAPIDE DE LA STÉROÏDOGENÈSE
PENDANT LA LUTÉINISATION**

Par

Nazario Pescador Salas

**Centre de recherche en reproduction animale,
Faculté de médecine vétérinaire et
Faculté de médecine**

**Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiæ Doctor (Ph.D.)
en sciences biomédicales**

Septembre, 1998

© Nazario Pescador, 1998



W
4
U58
1999
v.002

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

CONTRÔLE DE L'EXPRESSION DU GÈNE DE LA PROTÉINE
DE RÉGULATION RAPIDE DE LA STÉROÏDOGÈNÈSE
PRÉDANT LA LUTÉINISATION

Par

Naxos Franchet Bélan

Centre de recherche en reproduction humaine
Faculté de médecine vétérinaire et
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
l'Université de Montréal
en sciences biomédicales



septembre 1999

Dr. Naxos Franchet Bélan

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette Thèse intitulée:

CONTRÔLE DE L'EXPRESSION DU GÈNE DE LA PROTÉINE DE
RÉGULATION RAPIDE DE LA STÉROÏDOGENÈSE
PENDANT LA LUTÉINISATION

présentée par:

Nazario Pescador Salas

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Lawrence C. Smith	président-rapporteur
Dr Bruce D. Murphy	directeur de recherche
Dr Christopher A. Price	membre du jury
Dr Jean-Guy Lehoux	examineur externe
Dr André Dallaire	représentant du doyen

Thèse acceptée le: 9 décembre 1998



REMERCIEMENTS

Je désire tout d'abord remercier sincèrement mon directeur de thèse, professeur et ami, le Dr Bruce D. Murphy, par l'excellent encadrement scientifique, les facilités matérielles dont j'ai pu bénéficier dans son laboratoire ainsi que pour sa motivation et son souci de l'excellence pour la recherche qu'il a su me transmettre. C'est à la fois une joie et un honneur pour moi d'avoir travaillé dans son équipe, *!gracias !*.

Je remercie du fond de mon coeur ma chère épouse Elsa, pour son amour, sa compréhension et son soutien constant, lesquels nulle part ailleurs j'aurais pu trouver.

Je remercie aussi sincèrement Mme Mira Dobias pour son aide précieuse et ses conseils indispensables tout au long de mes travaux ainsi que pour son enthousiasme contagieux.

Je réserve une mention toute spéciale à mes collègues de travail, Jian-Hua Song, Mariana Fernandez, Geneviève Moreau, Debbie Douglas, Tao-Yan Men et plus récemment Tatiana Ruiz et Dan Lacroix, pour leur aide spontanée ainsi que pour leur motivation au travail.

J'aimerais aussi souligner le soutien scientifique des chercheurs du CRRA, plus particulièrement celui du Dr Lawrence C. Smith.

Je remercie par leur contribution indispensable le personnel du CRRA, Mme Micheline Sicotte, Mme Hélène Boucher et plus spécialement la Dre Odette Helie, qui ont toujours su m'appuyer dans mes démarches.

Enfin, j'aimerais remercier le Conseil National de la Science et la Technologie mexicain (CONACYT), l'Université Autonome de l'État de Mexico, le Conseil de recherche médicale du Canada, l'Université de Montréal, ainsi que la Fédération d'associations d'étudiants aux cycles supérieurs de l'Université de Montréal pour l'appui financier au cours de ces dernières années.

AVANT-PROPOS

Cette thèse est présentée à la Faculté des études supérieures de l'Université de Montréal pour l'obtention du grade de *Philosophiae Doctor* en sciences biomédicales. Elle est composée d'une introduction générale et une revue de littérature en français, suivie des manuscrits scientifiques qui ont été publiés ou acceptés dans des revues scientifiques internationales de langue anglaise et qui constituent l'oeuvre de la thèse. Ceux-ci sont précédés d'un court résumé en français. Une discussion générale et les conclusions en français résument finalement les hauts points des études décrites.

La revue de littérature de cette thèse (Chapitre I) passe brièvement en révision la formation et le rôle du corps jaune et les hormones stéroïdiennes, ainsi que la participation et l'importance de la protéine de régulation rapide de la stéroïdogenèse impliquée dans leur biosynthèse et finalement les connaissances actuelles concernant la StAR et l'hyperplasie surrénalocorticale congénitale lipidique chez l'humain.

Le corps de la thèse comprends trois parties: La première (Chapitre II) traite de la distribution tissulaire et de l'expression de l'ARN messenger et de la protéine StAR pendant le cycle oestral chez le bovin. La deuxième (Chapitre III) décrit les mécanismes de régulation transcriptionnelle et de traduction du message de la StAR dans une culture primaire de cellules de la granulosa porcine, en plus de la distribution tissulaire de son expression dans cette espèce. La troisième (Chapitre IV) décrit les changements dans l'expression de la protéine et son message dans le cycle oestral porcin et les modifications moléculaires des cellules de la granulosa *in vitro* lors de la lutéinisation, ainsi que les effets des facteurs de croissance sur ce processus.

La discussion générale et les conclusions de la thèse résument les contributions les plus importantes des ces travaux à la compréhension des mécanismes moléculaires de l'activité et de l'expression de la StAR dans les tissus stéroïdogéniques, particulièrement le tissu lutéal.

Les références citées dans l'introduction, la revue de littérature et la discussion générale sont énumérées à la fin de la thèse.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	i
REMERCIEMENTS.....	iii
AVANT-PROPOS.....	v
TABLE DES MATIÈRES.....	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	x
LISTE DES FIGURES.....	xiii
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I.....	7
REVUE DE LITTÉRATURE.....	7
CORPS JAUNE ET LUTÉINISATION.....	7
Généralités.....	7
Formation du CL.....	9
Lutéinisation.....	10
STÉROÏDOGENÈSE.....	11
Généralités.....	11
Les stéroïdes.....	12
Voie métabolique de la synthèse de la progestérone.....	13
Complexe récepteur protéines G.....	13
Second messenger.....	14
Élément de réponse au AMPc.....	16
Le substrat.....	16
Mécanismes de régulation intracellulaire.....	17
Autorégulation.....	17
Récepteur pour l'HDL.....	19
RÉGULATION GÉNIQUE DE LA SYNTHÈSE DE PROGESTÉRONNE.....	20
Régulation de la sécrétion chronique.....	20
Second messenger et élément de réponse.....	21
Le facteur stéroïdogénique-1.....	22
PROTÉINE DE RÉGULATION RAPIDE DE LA STÉROÏDOGENÈSE.....	23
Antécédents.....	23
Caractérisation de la StAR.....	23
Contrôle moléculaire de la StAR.....	24
Voies métaboliques du contrôle de la StAR.....	25

Traduction	26
Mécanisme d'action	27
Phosphorylation	28
StAR ET AUTRES PROTÉINES.....	28
Protéine de transport des stérols.....	30
Peptide activateur de la stéroïdogénèse.....	31
Récepteur périphérique de la benzodiazépine.....	31
HYPERPLASIE SURRÉNALOCORTICALE LIPIDIQUE CONGÉNITALE ET StAR.....	32
STÉROÏDOGÈNE EN L'ABSENCE DE LA StAR.....	35
CHAPITRE II.....	38
Steroidogenic Acute Regulatory Protein in Bovine Corpora Lutea.....	38
PAGE TITRE DU TIRÉ-À-PART.....	39
RÉSUMÉ.....	40
ABSTRACT.....	41
INTRODUCTION.....	42
MATERIALS AND METHODS.....	44
Animals and tissue collection.....	44
Experiment 1.....	44
Experiment 2.....	44
Experiment 3.....	45
RNA analysis.....	45
StAR protein analysis.....	47
Statistical Analyses.....	47
RESULTS.....	48
DISCUSSION.....	50
ACKNOWLEDGEMENTS.....	54
REFERENCES.....	54
CHAPITRE III.....	71
Follicle-stimulating Hormone and Intracellular Second Messengers Regulate Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR) mRNA in Luteinized Porcine Granulosa Cells.....	71
PAGE TITRE DU TIRÉ-À-PART.....	72
RÉSUMÉ.....	73
ABSTRACT.....	74
INTRODUCTION.....	75
MATERIALS AND METHODS.....	77
Tissue Collection and Cell Culture.....	77
Experiments.....	78

RNA Analysis.....	79
Statistical analyses.....	80
RESULTS.....	80
DISCUSSION.....	83
ACKNOWLEDGMENTS.....	89
REFERENCES.....	90
CHAPITRE IV.....	108
Growth Factor Modulation of Steroidogenic Acute Regulatory Protein and Luteinization.....	108
PAGE TITRE DU TIRÉ-À-PART.....	109
RÉSUMÉ.....	110
ABSTRACT.....	111
INTRODUCTION.....	111
MATERIALS AND METHODS.....	114
Cell culture and tissue collection.....	114
Granulosa Cell Experiments.....	114
RNA analysis.....	115
Western blots.....	116
Morphological observations.....	117
Statistical analyses.....	117
RESULTS.....	118
Luteinization in vivo.....	118
Luteinization in vitro.....	118
EGF reversal of luteinization.....	120
DISCUSSION.....	121
In vivo luteinization.....	121
In vitro luteinization.....	122
Structural changes in granulosa cells during luteinization and after EGF treatment.....	125
ACKNOWLEDGMENTS.....	126
REFERENCES.....	126
DISCUSSION GÉNÉRALE.....	150
Lutéinisation in vivo.....	150
Lutéinisation in vitro.....	155
Régulation positive de la StAR.....	157
Régulation négative de la StAR.....	161
Transcription et traduction.....	166
Directions futures.....	168
CONCLUSIONS.....	171
BIBLIOGRAPHIE.....	173

LISTE DES ABRÉVIATIONS

3 β -HSD	Enzyme 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase
20 α -OH	20 α -hydroxycholestérol
25-OH	25-hydroxycholestérol
ACAT	Acyl coenzyme A: cholestérol-acyl transférase
ACTH	Hormone adénocorticotrophique
Act-D	Actinomycine-D
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AMPc	3',5'-monophosphate d'adénosine cyclique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Triphosphate d'adénosine
BiP	Protéine contrôlée par le glucose
Ca	Sous-unité catalytique des protéines dépendantes de la PKA
CAH	Hyperplasie surrénalocorticale lipidique congénitale
CHX	Cycloheximide
CL	Corps jaune (<i>Corpus luteum</i>)
COS-1	Lignée cellulaire rénale de singe
CRE	Élément de réponse à l'AMPc
CREB	Protéine de liaison pour le CRE
dbcAMP	dibutyrate d'AMPc
eCG	Gonadotrophine chorionique équine
EGF	Facteur de croissance épidermique
FSH	Hormone stimulant les follicules
G ₀	Phase 0 du cycle cellulaire
GDP	Diphosphate de guanidine
GnRH	Hormone libératrice des gonadotrophines
GTP	Triphosphate de guanidine
hCG	Gonadotrophine chorionique humaine
HDL	Lipoprotéines d'haute densité
HMG-CoA	Coenzyme A 3-hydroxy-3-méthylglutaryl
IGF-I	Facteur de croissance de type insulinique I

JEG-3	Lignée cellulaire de carcinome chorionique humain
kDa	kilo Daltons
LDL	Lipoprotéines de faible densité
LH	Hormone lutéinisante
LXR α	Récepteur orphelin de la famille stéroïdo-thyroïdienne de type α
LXR β	Récepteur orphelin de la famille stéroïdo-thyroïdienne de type β
MA-10	Lignée cellulaire tumorale de Leydig
MIS	Substance inhibitrice Mülleriene
ORF	Cadre de lecture ouvert
P450arom	Enzyme cytochrome P450 aromatasase
P450c17	Enzyme cytochrome P450 hydroxylase c17
P450scc	Enzyme cytochrome P450 coupant la chaîne latérale
PBR	Récepteur périphérique de la benzodiazépine
PGF $_{2\alpha}$	Prostaglandine du type F $_{2\alpha}$
PKA	Protéine kinase dépendante de l'AMPc
PKC	Protéine kinase dépendante du Ca $^{++}$
PKI	Inhibiteur de l'activité protéine kinase
PMA	Acétate-myristate de phorbol
PRL	Prolactine
RIa	Sous-unité régulatrice de type Ia des protéines kinases PKA dépendantes
RIIa	Sous-unité régulatrice de type IIa des protéines kinases PKA dépendantes
RIIb	Sous-unité régulatrice de type IIb des protéines kinases PKA dépendantes
R2C	Lignée cellulaire tumorale de Leydig
SAP	Peptide activateur de la Stéroïdogénèse
SCP-2	Protéine de transport des stérols de type 2
SF-1	Facteur stéroïdogénique de type 1
SR-B1	Récepteur piègeur de type B1

SRE-1	Élément de réponse aux stérols de type 1
SRE-2	Élément de réponse aux stérols de type 2
SREBP-1	Protéine de liaison au SRE-1
SREBP-2	Protéine de liaison au SRE-2
StAR	Protéine de régulation rapide de la stéroïdogénèse
VDAC	Transporteur d'anions dépendant du voltage

LISTE DES FIGURES

Figure 1a. Autoradiogram of Northern blots from electrophoresis of 15 μ g total RNA purified from bovine tissues.....	59
Figure 2a. Autoradiogram of Northern blots from electrophoresis of 15 μ g total RNA from.....	61
Figure 3a. Western blot of bovine luteal mitochondrial protein showing the relationship between StAR mRNA and StAR protein in bovine CL.....	63
Figure 4a. StAR mRNA and StAR protein in samples of CL from slaughtered cows.....	65
Figure 5a. P450scc mRNA in bovine CL.....	67
Figure 6a. Disappearance of StAR mRNA following a luteolytic dose (500 μ g) prostaglandin F2a.....	69
Figure 1b. Autoradiogram of Northern blots from electrophoresis of 15 mg total RNA purified from porcine tissues.....	96
Figure 2b. Dose-dependent effects of FSH on StAR and P450scc mRNA accumulation in cultured porcine granulosa cells.....	98
Figure 3b. Time-dependent stimulation of StAR and P450scc mRNA accumulation by FSH and the effects of actinomycin-D.....	100
Figure 4b. Time-dependent effects of FSH and cycloheximide (CHX) on StAR and P450scc mRNA.....	102
Figure 5b. Effects of FSH on StAR and P450scc mRNA accumulation in the presence or absence of phorbol 13-myristate-12-acetate (PMA).....	104
Figure 6b. Time-dependent effects of dibutyryl cAMP on StAR and P450scc mRNA accumulation in porcine granulosa cells.....	106
Figure 1c. Northern and Western analysis derived from porcine corpora lutea.....	134
Figure 2c. Northern blot demonstrating the variation in P450arom and P450scc during the first 24 h after isolation of porcine granulosa cells.....	136
Figure 3c. Morphological changes associated with luteinization of pig granulosa cells.....	138

Figure 4c. Northern blot showing evolution of the presence of StAR mRNA during the process of luteinization of granulosa cells.....	140
Figure 5c. Northern blot showing changes in P450scc mRNA abundance during the process of luteinization of granulosa cells.....	142
Figure 6c. Morphological changes induced by treatment of luteinized granulosa cells with 10 nM EGF.....	144
Figure 7c. Changes in abundance of StAR and P450scc message in luteinized granulosa cells induced by treatment with EGF.....	146
Figure 8c. Northern blot representative of three experiments in which EGF (10 nM) reduced mRNA for the porcine LH receptor in luteinized granulosa cells.....	148

RÉSUMÉ

Le précurseur commun indispensable de toutes les voies de biosynthèse des stéroïdes, le cholestérol, doit être transporté à la membrane mitochondriale interne où l'enzyme de coupure de la chaîne latérale cytochrome P450 (P450_{scc}) le convertira en prégnénolone. Étant donné que le cholestérol est très hydrophobe et que sa diffusion dans l'eau est très lente, il ne peut pas traverser l'espace intermembranaire mitochondrial aqueux dans le temps requis pour la biosynthèse des hormones stéroïdiennes induite par les hormones trophiques. Ainsi, le transfert du cholestérol au travers de l'espace intermembranaire exige un processus de transport actif pour atteindre l'enzyme P450_{scc} de façon rapide. Ce processus a besoin de la synthèse *de novo* d'une protéine dont le rôle est supposé être la régulation de ce transport. Une molécule appelée protéine de régulation rapide de la stéroïdogénèse (StAR, de l'anglais Steroidogenic Acute Regulatory protein) est un candidat très plausible pour participer à cette fonction.

L'intérêt de notre travail a été de révéler le patron d'expression du message de la StAR à travers la phase lutéale *in vivo* en le comparant avec le modèle de lutéinisation *in vitro* des cellules de la granulosa. Nous avons également fait la comparaison entre les acides ribonucléiques messagers (ARNm) de la StAR et des enzymes de la stéroïdogénèse dans les deux modèles. D'autre part, dans cette étude nous avons exploré les mécanismes qui contrôlent l'expression du gène de la StAR pendant la lutéinisation.

Nous avons constaté que le message de la StAR et sa protéine varient de façon parallèle pendant la phase lutéale, en étant faibles pendant le développement lutéal, élevés dans le corps jaune (CL) actif et virtuellement absents dans le CL en régression.

Nous démontrons avec nos recherches que les transcrits du gène de la StAR sont présents dans le placenta bovin. Par contre, ces mêmes recherches indiquent que ces transcrits sont peu abondants dans les cellules de la granulosa porcine lutéinisées lorsque celles-ci ne sont pas soumises à une stimulation hormonale qui implique la voie intracellulaire des protéines kinases AMPc (3'.5'-monophosphate d'adénosine cyclique) dépendantes (PKA). Les réponses induites par

l'hormone stimulant les follicules (FSH) sont inhibées par le co-traitement avec l'actinomycine-D (ActD) et l'acétate-myristate de phorbol (PMA). L'interprétation des résultats obtenus avec la combinaison des traitements FSH-PMA et FSH-Act-D, ainsi que par le pré-traitement avec cycloheximide (CHX), indique que l'expression du gène de la StAR induite par la gonadotrophine est dépendante de la transcription, que la synthèse intermédiaire de protéine est nécessaire pour cette transcription et que la voie intracellulaire des protéines kinases Ca^{++} dépendantes (PKC) est inhibitrice dans ce processus.

Nous démontrons que l'acquisition de l'expression de la StAR peut être induite précocement par l'addition du facteur de croissance de type insulinique I (IGF-I) aux cellules de la granulosa porcine en culture. Nous avons pu déterminer que le facteur de croissance épidermique (EGF) produit des changements structuraux dans les cellules de la granulosa porcine lutéinisées et élimine les niveaux constitutifs des ARNm de la StAR et du récepteur de l'hormone lutéinisante (LH), sans affecter ceux du P450_{scc}. Ces données suggèrent que l'IGF-I rehausse le processus de la lutéinisation, tandis que l'EGF le renverse.

Nous concluons que la StAR est un élément essentiel du système stéroïdogénique dans l'ovaire et a une expression faible en absence de stimulation, malgré sa modulation par les facteurs de croissance. Les agents qui stimulent la stéroïdogénèse agissent via la stimulation de la synthèse *de novo* de la protéine StAR.

INTRODUCTION

Le corps jaune (CL), glande endocrine chargée du maintien de la gestation chez les mammifères grâce à la sécrétion de progestérone, est formé par une série de changements, appelés lutéinisation, de la thèque et la granulosa du follicule après l'ovulation chez la plupart des espèces.

La principale hormone sécrétée par le CL, la progestérone, est synthétisée par ses cellules grâce à l'action des enzymes, principalement de la 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase (3 β -HSD), qui la produisent à partir de la prégnénolone (Niswender et Nett, 1994). Cependant, l'étape initiale de la production des stéroïdes dans le CL et tous les tissus stéroïdogéniques, commence par la transformation du cholestérol en un premier stéroïde: la prégnénolone. Ce premier pas dans la stéroïdogénèse, est considéré comme un des plus importants dans ce processus, car la disponibilité de l'enzyme et son action sont indispensables à la production de l'hormone.

Les tissus stéroïdogéniques peuvent synthétiser le cholestérol *de novo*, bien que la majorité provienne des lipoprotéines plasmatiques de faible densité, dépendant des espèces et du type de cellule (LDL; revue par Murphy et Silavin, 1989). Le cholestérol traverse ensuite la membrane mitochondriale où le clivage de sa chaîne latérale est catalysé par l'enzyme P450_{scc}, laquelle est localisée sur la matrice de la membrane interne de la mitochondrie (Simpson et Boyd, 1966).

Malgré le fait que la production de la prégnénolone soit la première réaction enzymatique dans la stéroïdogénèse et qu'elle ait été considérée comme un des facteurs limitants dans la production des stéroïdes, elle ne semble pas être le premier de

ces facteurs. La stimulation hormonale des cellules stéroïdogéniques en présence d'inhibiteurs de la synthèse *de novo* des protéines cause l'accumulation du cholestérol à l'extérieur de la membrane mitochondriale (Simpson et al., 1979). Par contre, en l'absence de stimulation hormonale, les stéroïdes hydroxylés intermédiaires sont convertis en prégnénolone (Jeffcoate et al., 1987), ce qui montre que l'activité du P450_{scc} ne limite pas de façon absolue ce processus (King et al., 1995).

Il est alors clair que, pour avoir une stéroïdogénèse soutenue, un apport constant du substrat (cholestérol) doit être assuré à la cellule afin qu'il soit transporté au site de la réaction de clivage. Indépendamment de la source de cholestérol, une fois à l'intérieur de la cellule stéroïdogénique il doit être mobilisé en réponse aux stimulus des hormones trophiques par un processus à deux parties. La première partie du processus est la mobilisation du cholestérol à partir des lieux d'entreposage, tels que les gouttelettes lipidiques, vers la membrane externe mitochondriale. Tandis que la deuxième partie constitue un transfert du cholestérol de la membrane externe à la membrane interne des mitochondries (Liscum et Dahl, 1992). Le processus et les facteurs qui interviennent dans la mobilisation du cholestérol impliquent des changements structuraux de l'architecture cellulaire et la participation de protéines de transport. Mais ces mécanismes d'action sont encore mal compris. La circulation intracellulaire et la livraison du cholestérol à la mitochondrie doivent être pris en considération dans l'analyse des événements de la stéroïdogénèse sous dépendance hormonale.

Comme il en ressort des sections précédentes, la deuxième partie du processus de transport devrait être considérée comme une étape limitante étant donné que l'espace intermembranaire

est aqueux et donc que la diffusion du cholestérol est très lente (Rennert et al., 1993). Cette diffusion pourrait alors ne pas subvenir aux besoins en substrat face à une demande accrue dans les cellules stéroïdogéniques. Par conséquent, il est attendu que la stimulation réussie de la stéroïdogénèse doit impliquer un mécanisme qui transfert

de façon rapide le cholestérol à travers cette barrière (Stocco et Clark, 1996).

Depuis deux décennies, il a été observé que la synthèse *de novo* des protéines est indispensable à la synthèse des stéroïdes qui se produit en réponse à la stimulation par les hormones trophiques dans les différents tissus stéroïdogéniques. Ceci a été confirmé plus récemment (Stocco et Chen, 1991) et en conclusion de toutes ces observations nous pourrions citer Stocco et Clark (1996) et dire que la production de stéroïdes en réponse aux hormones trophiques est dépendante d'une protéine produite par stimulation hormonale, synthétisée rapidement, sensible à la cycloheximide et très labile. Donc, sa fonction serait d'être la médiatrice du transfert de cholestérol à travers la membrane mitochondriale.

Récemment, une protéine qui a un rôle essentiel dans la stimulation à court terme de la stéroïdogénèse a été identifiée et sa séquence d'ADNc déterminée, entre autres, chez la souris (Clark et al., 1994), l'humain (Sugawara et al., 1995), le mouton (Juengel et al., 1995), le bovin (Hartung et al., 1995), le hamster (Fleury et al., 1996) et le porc (Pilon et al., 1997). Cette protéine, appelée StAR, semble intervenir dans le transfert du cholestérol de la membrane externe vers la membrane interne de la mitochondrie sous l'influence d'agents stimulants (Clark et al., 1994). L'action de cette protéine produite dans le cytoplasme et d'un poids moléculaire de 37 kDa serait de faciliter le passage du cholestérol par le rapprochement des deux membranes

mitochondriales, à la suite de quoi elle devient inactive. Le principal mécanisme d'action des hormones sur l'expression de la protéine StAR est exercé par un contrôle transcriptionnel dans lequel l'AMPc joue le rôle de second messenger (Clark et al., 1995).

L'importance de cette protéine a été mise en évidence par l'identification d'une mutation responsable d'une maladie humaine, l'hyperplasie surrénalocorticale lipidique congénitale, causée par une protéine StAR tronquée complètement inactive et incapable de promouvoir la stéroïdogenèse (Sugawara et al., 1995). Cette maladie est létale et caractérisée par l'impossibilité du nouveau-né de synthétiser les stéroïdes, ce qui a pour conséquence un manque de minéralocorticoïdes et de glucocorticoïdes qui conduit à la mort de l'enfant s'il ne reçoit pas une thérapie adéquate (hormones stéroïdiennes et électrolytes; Lin et al., 1995). En résumé, la StAR est un élément crucial pour la régulation à court terme de la biosynthèse des stéroïdes.

La formation du CL est initiée par une série de changements morphologiques et biochimiques dans les cellules de la thèque et de la granulosa du follicule préovulatoire. L'ensemble de ces changements correspond au processus de lutéinisation et ils sont causés par l'augmentation des niveaux sériques de LH (Niswender et Nett, 1994). Suite au stimulus ovulatoire, bien qu'il y ait beaucoup de variabilité entre espèces, les modifications principales peuvent être résumées par l'hypertrophie des cellules de la granulosa ainsi qu'une activation du noyau. Ces événements sont suivis par l'ovulation, la dissociation de la membrane basale et l'internalisation des vaisseaux sanguins de la thèque interne dans la cavité du follicule déchiré (Anderson et Little, 1985). Après l'ovulation se produit le rétablissement des jonctions entre les cellules lutéales

en développement, peut-être à cause de l'action des niveaux élevés d'AMPc intracellulaire (Azamia et al., 1981). A l'intérieur de la cellule on observe des modifications dans la structure mitochondriale ainsi que l'augmentation du volume du réticulum endoplasmique lisse, ce qui est en corrélation avec l'augmentation initiale des concentrations de progestérone chez la brebis (Niswender et Nett, 1994).

Chez les mammifères, les stades finaux du développement folliculaire et de la lutéinisation sont accompagnés par des augmentations significatives de l'ARNm et la protéine des enzymes P450_{scc} (Rodgers et al., 1986 et 1987), 3 β -HSD (Couët et al., 1990) et P450_{c17} (Rodgers et al., 1986). En général, ces niveaux augmentent pendant le développement lutéal pour atteindre leur maximum dans la moitié de la phase lutéale (Rodgers et al., 1987; Couët et al., 1990).

Les niveaux des ARN messagers (ARNm) codant pour ces enzymes déclinent pendant la régression du corps jaune *in vivo* chez le mouton (Hawkins et al., 1993), chez le bétail (Tian et al., 1994), ainsi que dans les cellules de la granulosa porcine lutéinisées *in vitro* (Li et al., 1993). De plus à ces observations, l'expression tissulaire de la protéine et du message de la StAR dans les cellules stéroïdogéniques en activité (Clark et al., 1995) indique qu'elle a un rôle très important dans la stéroïdogénèse. Ces données nous font émettre l'hypothèse que l'expression de l'ARNm qui code pour la protéine StAR suit le même comportement que celui des ARNm codant pour les enzymes de la stéroïdogénèse. La participation de la protéine StAR dans la lutéinisation serait donc très importante.

La connaissance approfondie des mécanismes de régulation de la fonction du CL et, par conséquent, le développement de méthodes pour limiter la fonction de cette

glande, pourraient non seulement avoir un effet majeur sur notre contrôle de la reproduction chez les espèces domestiques, mais aussi fournir des données pertinentes aux applications médicales chez l'humain.

Également, le développement de procédures pour prévenir la perte embryonnaire en début de gestation, puisque 25-55% des embryons mammaliens sont perdus en début de gestation (Niswender et Nett, 1994), permettrait une augmentation de la production des animaux de ferme.

Ainsi, le propos de cet étude sera:

- de déterminer la présence et la distribution tissulaire de la protéine StAR dans l'ovaire mammalien,
- d'évaluer les relations entre la StAR et les ARNm des enzymes stéroïdogéniques pendant le processus de la lutéinisation,
- d'identifier les facteurs qui contrôlent l'expression de la protéine StAR dans l'ovaire porcin.

CHAPITRE I

REVUE DE LITTÉRATURE

CORPS JAUNE ET LUTÉINISATION

Généralités

Le corps jaune est une structure endocrine éphémère formée à partir de la lutéinisation de la thèque et de la granulosa du follicule après l'ovulation dans la plupart des espèces. Sa raison d'être est de maintenir un environnement utérin adéquat pour l'embryon par la synthèse et la sécrétion de progestérone, l'hormone responsable du maintien de la gestation chez les mammifères.

L'origine et la fonction du CL, ainsi nommé par Marcello Malpighi en 1898, ont fait l'objet de plusieurs théories à travers le temps (revue par Short, 1977). Depuis les premières expériences portant sur le CL, les chercheurs se sont penchés sur l'étude des mécanismes associés au développement, au maintien et à la régression du CL. Plusieurs chercheurs ont étudié les mécanismes associés au développement du CL. Cependant, quelques mécanismes sont encore controversés, par exemple l'origine exacte des cellules lutéales parmi la population cellulaire du follicule, les changements dans l'expression des gènes pendant la période périovulatoire, le rôle physiologique des oligopeptides et protéines lutéales, ainsi que la régulation de l'angiogenèse lors du développement lutéal (Smith et al., 1994).

L'étude de la fonction lutéale a commencé au début du siècle avec l'établissement au-delà de tout doute raisonnable que le CL était essentiel au maintien de la gestation chez les

lapins et qu'il semblait répondre aux critères d'une glande endocrine (Fraenkel et Cohn, 1901). Par la suite, des résultats semblables ont été rapportés chez plusieurs espèces (revue par Niswender et Nett, 1994). C'est en 1930 qu'Allen et Corner ont utilisé le terme progestatif pour décrire le principe actif obtenu du CL. Quatre ans plus tard, on a déterminé la structure des progestérones et des études subséquentes ont été faites pour établir le contrôle hormonal de la fonction lutéale (Slotta et al., 1934). Ces études ont montré, malgré le manque de disponibilité des préparations des gonadotrophines pures, que l'hormone lutéinisante (LH) était le régulateur prédominant dans la fonction lutéale de la plupart des espèces (Yoshinaga, 1973), alors que chez d'autres espèces (souris, rat, vison; Manns et Murphy, 1985) la prolactine (PRL) était fortement lutéotrope. Des études ultérieures ont décrit le CL comme un organe endocrinien qui au cours de sa brève période de vie possédait une certaine autonomie (Rothchild, 1981). Cette autonomie n'est toutefois pas absolue, car le CL peut subir l'influence d'hormones lutéotropes "permissives" telles que la PRL. Peu de temps après, la contribution du cholestérol extracellulaire à la sécrétion de la progestérone ainsi que le processus de la lutéolyse, particulièrement l'effet direct des prostaglandines $F2\alpha$ ($PGF2\alpha$) sur la cellule lutéale, ont été connus (Gwynne et Strauss, 1982).

Depuis ce temps, il y a eu un grand intérêt pour l'étude des facteurs qui règlent la vie et la fonction du CL avec des résultats qui ont amélioré notre compréhension du sujet. Entre autres, on reconnaît maintenant l'existence de deux types de cellules dans le CL, les petites et les grosses. Aussi, le CL semble manifester une certaine autonomie de la synthèse de progestérone vis-à-vis de la LH et de son messenger intracellulaire, l'AMPc (Hoyer et Niswender, 1985). La découverte des effets délétères de l'hormone libératrice des

gonadotrophines (GnRH) et des $\text{PGF}_2\alpha$ (Leung, 1985) sur la fonction lutéale représente également un nouvel apport à nos connaissances sur le CL. De plus, des données probantes appuient le concept que, d'une part, la PRL exerce un effet lutéotrope actif par la modulation de l'utilisation du substrat diffusé par voie lipoprotéinique (Murphy et Rajkumar, 1985); d'autre part, l'étude de l'influence de l'interaction entre les lutéotrophines sur la synthèse de progestérone a produit des résultats qui ont mis un terme au concept du rôle "permissif" de la PRL, c'est à dire, la connaissance de son action directe sur la fluidité de la membrane cellulaire. Ce dernier, tout en permettant de postuler le rôle direct des lutéotrophines, LH et gonadotrophine chorionique humaine (hCG) sur l'utilisation des lipoprotéines.

Formation du CL

Le CL est le produit de la poursuite de la maturation folliculaire. Il est constitué après l'ovulation par une population hétérogène de cellules qui auront des différences morphologiques, endocrinologiques et biochimiques. (Niswender et Nett, 1994). La préparation des cellules lutéales à la synthèse de la progestérone débute bien avant l'ovulation. De fait, la lutéinisation et la sécrétion de progestérone peuvent avoir lieu sans ovulation chez plusieurs espèces (revue par Smith et al., 1994). Les types cellulaires qui ont été identifiés dans le CL sont: petites cellules lutéales, grandes cellules lutéales, fibroblastes, cellules endothéliales et péricytes (Farin et al., 1986). L'activité stéroïdogénique des cellules lutéales inclut les petites et les grosses, dans la plupart des espèces (Smith et al., 1994). Cependant, il y a des différences dans leur capacité de sécrétion basale de la progestérone ou en réponse à la LH. Par exemple chez le bétail (Hansel et al., 1991), le mouton (Fitz et al., 1982) et le porc (Lemon et Loir, 1977) la sécrétion basale de

progestérone *in vitro* est mineure dans les petites cellules en comparaison avec les grosses. Par contre, la sécrétion de progestérone induite par la LH est élevée dans les petites cellules, tandis que, dans les grosses la LH n'a pas d'effet (Lemon et Loir, 1977; Fitz et al., 1982)

Lutéinisation

Le processus de différenciation des cellules du follicule ovarien, supposément induit par des facteurs ovocytaires (Richards, 1994), débute avec le recrutement initial à partir du stroma ovarien. La phase finale de ce processus est la lutéinisation, normalement déclenchée par le pic préovulatoire des gonadotrophines, qui produit une restructuration remarquable du phénotype ovarien (Richards, 1994). La modification fonctionnelle la plus importante est une forte synthèse de progestérone au lieu de la sécrétion des androgènes et des oestrogènes (Smith et al., 1994). Pour cela, il faut que les cellules de la granulosa, qui transforment les androgènes en provenance de la thèque en oestrogènes, acquièrent la compétence pour faire elles-mêmes le processus complet de production de progestérone. Les mécanismes moléculaires de la lutéinisation ne sont pas encore bien déterminés. Cependant, il est connu qu'il y a des altérations concomitantes de l'expression des gènes qui codent pour les enzymes de la stéroïdogénèse. En particulier, la lutéinisation produit une régulation négative du cytochrome P450-17 α -hydroxylase, qui synthétise les androgènes (P450c17; Voss et Fortune, 1993a), et une régulation positive du P450scc (Voss et Fortune, 1993b; LaVoie et al., 1997) et de la 3 β -HSD (Juengel et al., 1994), enzymes qui synthétisent la progestérone. La perte de la capacité de synthèse des oestrogènes par les cellules de la granulosa est concomitante avec la perte de l'expression du cytochrome P450aromatase (P450arom; Fitzpatrick et al., 1997). Le

prélèvement et la mise en culture primaire des cellules de la granulosa des follicules antraux produit une lutéinisation spontanée (May et Schomberg, 1981) chez celles-ci. Cet effet est dépendant de la maturation et il est moins prononcé dans les cellules qui viennent des petits follicules (Ford et Lunstra, 1992). Chez le rat, la lutéinisation représente une interruption du cycle cellulaire similaire à celle observée chez les cellules qui entrent en phase G₀ (Richards, 1994). À ce sujet, les données expérimentales obtenues pour le nombre de cellules de la granulosa et les cellules lutéales qui en seraient dérivées chez la brebis (Smith et al., 1994), nous amènent à supposer qu'il en est de même chez d'autres espèces.

STÉROÏDOGENÈSE

Généralités

Les hormones stéroïdiennes sont abondamment sécrétées par la glande surrénale, le testicule et l'ovaire. Elles contrôlent l'équilibre des ions dans le sang, le métabolisme des glucides, des lipides et des protéines, ainsi que la différenciation et la fonction sexuelle (Gore-Langton et Armstrong, 1994). Elles agissent en tant qu'activateurs de la transcription par la formation des complexes "stéroïde-récepteur" et leur union avec les éléments de réponse à l'hormone sur la région promotrice du gène ciblé (Truss et Beato, 1993). Indépendamment du tissu d'origine et de leurs diverses actions dans l'organisme, les hormones stéroïdiennes sont toutes synthétisées à partir d'un substrat commun, le cholestérol (Strauss et al., 1981). La biosynthèse des hormones stéroïdiennes, en réponse aux hormones trophiques et autres stimulus stéroïdogéniques, débute avec le clivage enzymatique de la chaîne latérale du cholestérol pour donner lieu au premier

stéroïde produit dans n'importe quel tissu stéroïdien, la prégnénolone (Miller, 1995). Le processus de conversion du cholestérol en prégnénolone est effectué par un système enzymatique localisé sur la matrice de la membrane interne de la mitochondrie (Simpson et Waterman, 1988). Le premier pas dans cette réaction est catalysé par un complexe enzymatique contenant le P450_{scc}, ainsi que deux co-facteurs: une flavoprotéine appelée adrénodoxine réductase, et une protéine ferredoxine contenant un groupe ferrosulfureux appelée adrénodoxine. Les deux adrénodoxines fonctionnent donc comme un "mini système" de transport d'électron, qui transfère les équivalents réducteurs de la molécule de NADPH au P450_{scc} (Simpson et Waterman, 1988).

Les stéroïdes

Les hormones stéroïdiennes peuvent être classifiées selon leur structure chimique ou leurs actions physiologiques principales. En ce qui concerne l'ovaire mammalien, les stéroïdes sexuels peuvent être groupés en trois grandes classes: progestines, androgènes et oestrogènes. Cette classification est basée sur les trois composantes dérivées du cholestérol: pregnane, androstane et oestrane, ainsi que sur leur action biologique principale (Gore-Langton et Armstrong, 1994).

Les deux oestrogènes, oestrone et oestradiol-17 β , sont les plus importants des stéroïdes ovariens. Leur nom fait référence au comportement sexuel de la femelle, mais ils participent à la régulation de beaucoup d'autres aspects de sa physiologie reproductive (Kelly, 1984). L'oestrone a été le premier stéroïde à être isolé (Doisy et al., 1929). L'oestradiol-17 β est maintes fois plus puissant que l'oestrone et il est aussi le plus actif des stéroïdes produits par l'ovaire. (Gore-Langton et Armstrong, 1994).

L'établissement de l'ovaire comme une source importante d'androgènes a été constaté après la confirmation de la sécrétion de ces substances par les cellules folliculaires (Ryan et Petro, 1966). L'androstènedione et la testostérone sont les précurseurs immédiats de l'oestrone et de l'oestradiol-17 β respectivement, car ceux-ci peuvent être aromatisés (Kelly, 1984).

La prégnénolone est le progestatif le plus important produit par l'ovaire étant donné sa position clé comme précurseur de toutes les hormones stéroïdiennes. Son niveau de production est suivi par celui de la progestérone, qui est le produit stéroïdogénique à 21 carbons le plus abondant dans le follicule (Gore-Langton et Armstrong, 1994) et le CL (Niswender et Nett, 1994).

La progestérone a plusieurs effets biologiques sur les tissus cible du système reproducteur pour les préparer à la gestation et produire les conditions adéquates pour le développement de l'embryon. En plus de ses effets sur l'utérus, la glande mammaire, les ovaires et les oviductes, elle participe aussi au contrôle de sa propre sécrétion par son action sur l'axe hypothalamo-hypophysaire (Niswender et Nett, 1994).

Voie métabolique de la synthèse de la progestérone

Complexe récepteur protéines G

Les gonadotrophines sont les principaux effecteurs du démarrage de la stéroïdogénèse. La transduction de leur effet est produite par la liaison avec des récepteurs spécifiques dans les cellules stéroïdogéniques. Les récepteurs de la LH et de la FSH font partie d'une sous-famille unique de sept domaines

transmembranaires qui possèdent une longue région extracellulaire pour capter le ligand. Ils sont couplés à l'adénylcyclase et à la phospholipase-C (McFarland et al., 1989). L'action initiale des gonadotrophines se fait par la stimulation de la voie de l'AMPc-adénylyl cyclase à travers l'activation des protéines G. Les protéines G sont des hétérotrimères formés par des sous-unités α , β et γ , mais elles fonctionnent comme des hétérodimères par ce qu'il y a une forte association entre les sous-unités β et γ (Johnson et Dhanasekaran, 1989). L'activation des protéines G survient quand le ligand occupe le récepteur, en libérant le GDP des protéines G et en permettant au GTP de prendre la place libre. L'activation déclenche la dissociation de la sous-unité α des sous-unités β et γ , alors la sous-unité α stimule l'adénylyl cyclase. Cette dernière est appelée "effecteur", c'est-à-dire une enzyme qui convertit une molécule précurseur inactive en sa forme active dite "second messenger" (Linder et Gilman, 1992). L'activation de l'adénylyl cyclase donne comme résultat l'hydrolyse de l'ATP en AMPc, lequel par la suite activera certaines protéines kinases dans le cytoplasme en produisant une cascade de réactions moléculaires qui vont phosphoryler les protéines impliquées dans la stéroïdogenèse (Leung et Steele, 1992).

Second messenger

La participation de la voie de l'AMPc-adénylyl cyclase dans l'action de la LH et de la FSH est bien acceptée. La liaison des hormones à leur récepteur est associée à l'augmentation des niveaux intracellulaires d'AMPc (Erickson et Ryan, 1975), l'activation de la PKA (Cooke et al., 1976) et la phosphorylation de plusieurs protéines (Bakker et al., 1983). Pourtant, même si le principal mécanisme d'action de la LH et de la FSH est le même, la réponse de la cellule est différente. Plusieurs facteurs sont associés à cette variation: le nombre multiple de transcrits

qui codent pour les récepteurs des gonadotrophines, desquels leur fonction n'est pas définie (Richards, 1994), plusieurs isoformes de l'adénylyl cyclase (Tang et Gilman, 1992), et la complexité de la famille des protéines G (Simon et al., 1991). L'effet initial de la LH et la FSH est l'activation des protéines kinases AMPc dépendantes, pour lesquelles il y a de multiples isoformes dans l'ovaire. Ces isoformes incluent les sous-unités RIa, RIIa, RIIb (sous-unité régulatrice de type I ou II des protéines kinases PKA dépendantes) et Ca (sous-unité catalytique) (Richards et Rolfes, 1980). Ces protéines vont être dissociées par l'action d'une holoenzyme kinase A, ce qui permettra à la sous-unité C d'être transloquée au noyau où elle va phosphoryler des facteurs de transcription spécifiques (Adams et al., 1991). En plus des sous-unités régulatrices des kinases A, les cellules synthétisent d'autres peptides qui peuvent agir comme inhibiteurs de l'activité de la sous-unité catalytique. Ce sont les inhibiteurs des protéines kinases (PKI), pour lesquels il existe également plusieurs isoformes (Scarpetta et Uhler, 1993). L'action des PKI serait de moduler ou de contrôler (Tash et al., 1981), voire même bloquer, les effets des gonadotrophines (Olsen et Uhler, 1991).

En plus du mécanisme antérieur, il est connu que les hormones gonadotrophiques peuvent stimuler la voie de la PKC dans le tissu stéroïdogénique de l'ovaire (Davis et al., 1986). L'activation de la voie PKC par un traitement *in vitro* avec un ester du phorbol (phorbol 12-myristate 13 acétate, PMA) module la stéroïdogénèse et l'expression d'enzymes qui en sont responsables, dont le P450_{scc} (Trzeciak et al., 1987; Lahav et al., 1995) et la 3 β -HSD (Chedrese et al., 1990). Ainsi, la synthèse des hormones stéroïdiennes est réglée par plus d'une voie.

Élément de réponse au AMPc

Une autre explication des variations dans la réponse des cellules aux hormones LH et FSH implique des changements dans l'expression des facteurs de transcription qui règlent l'expression de gènes spécifiques (Krasnov, 1991). Un des éléments de réponse de l'ADN, qui est connu pour sa réaction au système AMPc/PKA, a été identifié comme une séquence consensus courte TGACGTCA appelée CRE (cAMP Response Element). La protéine de liaison a également été identifiée et isolée (CREB; Hoeffler et al., 1988). Elle se fixe au CRE sous forme de dimère. L'ADNc du CREB code pour un peptide de 327 acides aminés, lequel doit être phosphorylé afin d'avoir la capacité d'activer la transcription (Yamamoto et al., 1988). Il existe deux formes de CREB qui ne diffèrent que par une insertion de 14 acides aminés riche en sérine (Berkowitz et Gilman, 1990). Cependant, dans le mécanisme de réponse aux gonadotrophines, il faut également tenir compte de la participation d'autres facteurs de transcription comme le facteur stéroïdogénique-1 (SF-1), dont la séquence de reconnaissance consensus a été trouvée dans la région du promoteur des enzymes P450 hydroxylases impliquées dans la stéroïdogénèse (Rice et al., 1991).

Le substrat

Le substrat pour la stéroïdogénèse, le cholestérol, peut être obtenu par la cellule à partir de l'hydrolyse des esters de cholestérol intracellulaires, la synthèse *de novo* et par l'importation des protéines liées au cholestérol (Gwynne et Strauss, 1982). Cette dernière source est la plus importante du point de vue quantitatif dans l'ovaire, car les LDL extracellulaires sont la source principale du substrat pour la stéroïdogénèse chez plusieurs mammifères (Murphy et Silavin,

1989). La voie LDL du cholestérol inclut le récepteur membranaire du LDL et un système pour l'internalisation du complexe LDL-récepteur sous forme d'endosomes (Brown et Goldstein, 1986). Les récepteurs sont recyclés, les endosomes sont incorporés aux lysosomes, puis la protéine est dégradée et le cholestérol est estérifié ou libéré. Une des caractéristiques de ce substrat est la participation au processus, car, quand la molécule LDL ou son associé, le cholestérol, est ajoutée au milieu de culture, peut stimuler elle même sa propre utilisation par l'induction de la synthèse d'oestrogènes dans les cellules de la granulosa porcine (Keel et al., 1994).

Mécanismes de régulation intracellulaire

Des études récentes suggèrent que la majorité du cholestérol libéré par les lysosomes passe à travers la membrane cytoplasmique avant son estérification (Lange et al., 1997). La caveoline-1, une protéine de liaison du cholestérol, qui circule entre l'appareil de Golgi et la membrane cytoplasmique, pourrait assurer ce transport (Garver et al., 1997). D'autres composantes du système de mobilisation du cholestérol libéré dans la cellule transportent les molécules libres de cholestérol à partir des gouttelettes lipidiques vers les mitochondries dans les cellules stéroïdogéniques (Chanderbhan et al., 1983). Ainsi en est-il de la protéine transporteuse des stérols (SCP-2), dont l'abondance de l'ARNm est en corrélation avec la capacité de synthèse de la progestérone par le CL porcin (LaVoie et al., 1997).

Autorégulation

Le cholestérol importé ou synthétisé *de novo*, pourrait être estérifié par l'enzyme acyl-Co:acyltransferase du cholestérol (ACAT) pour son entreposage en forme de

gouttelettes lipidiques (Strauss et al., 1981). Les concentrations intracellulaires du cholestérol sont réglées par une multitude de mécanismes de rétro-contrôle. Les éléments clés dans sa synthèse, sa dégradation et sa mobilisation sont la coenzyme A 3-hydroxy-3-méthylglutaryl réductase (HMG-CoA), le récepteur des LDL, le système d'estérification ACAT et l'enzyme 17α -hydroxylase (Russell, 1992). L'activité des protéines responsables de la synthèse et de la circulation du cholestérol est modulée par leurs domaines sensibles aux stérols (Skalnik et al., 1988). D'autre part, le cholestérol et ses précurseurs modulent l'activité des enzymes et protéines de l'homéostasie du cholestérol (Russell, 1992). Les molécules de rétro-contrôle les plus puissantes sont les oxystérols (Tamasawa et al., 1997), produits de l'oxydation enzymatique et non enzymatique du cholestérol, qui donne des groupes cétones ou hydroxyls fortement hydrosolubles (Luu, 1995). Les oxystérols contrôlent la transcription des protéines impliquées dans l'homéostasie du cholestérol. Les régions du promoteur de la réductase HMG-CoA, du récepteur LDL (Goldstein et Brown, 1990) et de la synthétase HMG-CoA (Dooley et al., 1998), contiennent des séquences de 10 nucléotides appelées éléments de régulation des stérols 1 et 2 (SRE-1 et SRE-2; Goldstein et Brown, 1990). La transcription de ces éléments est augmentée dans les cellules sans stérols et est inactivée quand il y a accumulation des stérols. L'inactivation est due à l'effet de deux protéines, SREBP-1 et SREBP-2, qui sont localisées au niveau du réticulum endoplasmique et de l'enveloppe nucléaire (Wang et al., 1994). D'autres mécanismes de régulation de la transcription des enzymes de l'homéostasie du cholestérol ont été rapportés. Par exemple, les oxystérols activent la transcription à travers les récepteurs nucléaires orphelins LXR α (Janowski et al., 1996) et LXR β (Lehmann et al., 1997). De même, le récepteur orphelin facteur stéroïdogénique-1 (SF-1) est activé par les oxystérols à des concentrations qui vont inhiber la synthèse du cholestérol

(Lala et al., 1997). Toutefois, des données récentes suggèrent que le 25-hydroxycholestérol n'est pas un ligand pour ce récepteur étant donné que des cellules MA-10 transfectées avec l'élément de réponse au SF-1 des enzymes P450 n'ont pas répondu au traitement avec ce stérol (Mellon et Bair, 1998).

Récepteur pour l'HDL

Des données récentes sur l'identification moléculaire d'un récepteur fonctionnel des HDL (Acton et al., 1996), qui viennent contribuer à la connaissance du processus de transport du cholestérol dans les cellules stéroïdogéniques, montrent que le récepteur piègeur BI (SR-BI pour "scavenger receptor") exprimé dans des cellules transfectées se lie au HDL et produit l'introduction sélective des esters de cholestérol-HDL dans la cellule. Le fait que ce récepteur soit contrôlé par les gonadotrophines nous renseigne sur la signification physiologique du SR-BI. En effet, l'expression du gène SR-BI est inductible par l'eCG dans l'ovaire du rat (Mizutani et al., 1997). Cette induction est rapide et produit une forte accumulation de l'ARNm peu de temps après le traitement dans les cellules de la thèque interne. Son expression a été aussi observée dans le corps jaune (Mizutani et al., 1997). De plus, les niveaux de SR-BI sont réglés par rétro-contrôle en réponse aux changements des réserves de cholestérol cellulaire (Wang et al., 1996).

D'autres données appuient l'hypothèse d'un rôle physiologique du gène SR-B1 dans le transport du cholestérol. En effet, les surrénales de souris transgéniques chez lesquelles le gène SR-B1 a été inactivé par l'introduction d'une mutation présentent une diminution respective du contenu en cholestérol de 42% et 72% chez les animaux hétérozygotes et homozygotes, respectivement (Rigotti et al., 1997). L'anticorps anti SR-BI de souris a un effet inhibiteur de 78% sur la stéroïdogénèse dans

les cultures de cellules de surrénale de souris (Temel et al., 1997). La séquence de la région proximale du promoteur du gène SR-BI présente un site de liaison pour le facteur SF-1 (Cao et al., 1997). Ces résultats indiquent que SR-BI est un élément important du système de transport du cholestérol et que sa régulation transcriptionnelle est associée à celle des gènes impliqués dans la stéroïdogénèse, qui sont eux-même contrôlés par le SF-1.

RÉGULATION GÉNIQUE DE LA SYNTHÈSE DE PROGESTÉRONNE

L'expression du gène du P450_{scc} est induite par les hormones peptidiques hypophysaires (ex. ACTH, FSH, LH). En se liant à leurs récepteurs membranaires sur les cellules cibles, ces hormones déclenchent une cascade de réactions caractérisée par une grande accumulation intracellulaire d'AMPc (Clark et Stocco, 1997). Cette induction hormonale peut être divisée en deux phases: les effets rapides, qui se manifestent en quelques minutes, et les effet chroniques qui requièrent quelques heures avant de se manifester (Miller, 1995). La régulation rapide exige une augmentation de la mobilisation et de la livraison du cholestérol vers la matrice de la membrane mitochondriale interne (Simpson et Waterman, 1988).

Régulation de la sécrétion chronique

Une des caractéristiques des P450 hydroxylases impliquées dans la cascade de la biosynthèse des stéroïdes est leur expression tissulaire spécifique limitée exclusivement aux tissus stéroïdogéniques. De plus, chaque tissu exprime une combinaison spécifique d'enzymes. En effet, la surrénale exprime toutes les enzymes P450 reliées à la stéroïdogénèse

excepté l'aromatase, le testicule exprime le P450_{scc} et la 17 α -hydroxylase, ainsi que la P450_{arom} selon l'espèce, tandis que l'ovaire exprime le P450_{arom} en plus du P450_{scc} et la 17 α -hydroxylase (Omura, 1965; French et al., 1980). Le type d'hormone stéroïdienne sécrétée par chaque tissu est déterminé par l'ensemble des P450 qui y sont exprimés (Simpson et Waterman, 1988). Une autre composante de la régulation de la stéroïdogénèse est donc le contrôle de l'expression des enzymes P450 soumise à de strictes contraintes spatiotemporelles (Miller, 1988).

Second messenger et élément de réponse

Les effets chroniques des hormones trophiques résultent de l'augmentation de la transcription des gènes qui codent pour les enzymes stéroïdogéniques. Cette augmentation maintient une capacité optimale de production des stéroïdes (Miller, 1995). L'induction de l'ARNm du P450_{scc} et de sa protéine par LH/hCG se fait via l'action de l'AMPc. Les études sur la régulation des P450 ont donc été dirigées vers le rôle de ce second messenger (Honda et al., 1993). Dans les promoteurs de plusieurs P450, des CRE ont été signalés (Honda et al., 1993). Cependant, l'induction des hydroxylases stéroïdiennes par l'AMPc est lente et semble nécessiter d'une synthèse de protéines cellulaires tandis que beaucoup d'autres gènes qui répondent à l'AMPc sont induits de façon rapide par des mécanismes qui ne nécessitent pas la synthèse *de novo* des protéines (revue par Miller, 1995). Ces observations suggèrent que les gènes des hydroxylases stéroïdiennes sont contrôlés par une voie hormonale différente de celle qui met en jeu le CRE traditionnel (Habener et al., 1995).

Le facteur stéroïdogénique-1

Des études sur les promoteurs de plusieurs hydroxylases chez la souris ont amené à l'identification et au clonage du SF-1, un nouveau membre du groupe des récepteurs nucléaires orphelins qui se lie comme un monomère sur un élément AGGTCA pour induire l'expression des hydroxylases stéroïdiennes (Rice et al., 1991). Ce groupe de facteurs de transcription orphelins, pour lesquels le ligand d'activation n'a pas encore été identifié (Enmark et Gustafsson, 1996), fait partie de la famille des récepteurs hormonaux nucléaires comprenant des facteurs de transcription qui ciblent des gènes spécifiques et répondent à l'effet de divers éléments effecteurs y compris entre autres, les hormones stéroïdiennes (Mangelsdorf et al., 1995).

À ce jour, plusieurs gènes cibles du SF-1 autres que ceux des hydroxylases stéroïdiennes ont été identifiés. Ainsi, son élément de réponse a été localisé dans les gènes codant pour la MIS (Shen et al., 1994), l'ocytocine (Wehrenberg et al., 1994), ainsi que la 3β -HSD2, enzyme nécessaire à la biosynthèse des stéroïdes, après la prégnénolone (Leers-Sucheta, et al., 1997).

Les premiers travaux qui ont étudié la voie de production des stéroïdes indiquaient que le facteur limitant dans ce processus était la capacité de la P450_{scc} à cliver la chaîne latérale du cholestérol. Cette étape demeure la première réaction enzymatique dans la stéroïdogénèse mais ne représente plus le principal facteur limitant. En effet, plusieurs observations indiquent que le vrai facteur limitant est le processus par lequel le cholestérol est livré à la P450_{scc} à travers la membrane mitochondriale (revue par Stocco et Clark, 1996).

PROTÉINE DE RÉGULATION RAPIDE DE LA STÉROÏDOGENÈSE

Antécédents

L'intérêt manifesté pour l'identification des protéines impliquées dans la stéroïdogénèse n'est pas nouveau. Les premiers travaux de Ferguson (1963) montraient la sensibilité de la stéroïdogénèse à l'action d'un inhibiteur de la synthèse des protéines. Ceci fut confirmé par d'autres chercheurs (Garren et al., 1966; Crivello et Jefcoate, 1978). Les efforts pour identifier la ou les protéines affectées par l'inhibition se sont soldés par une série de publications qui ont décrit l'induction de la synthèse d'un polypeptide en réponse à la stimulation hormonale dans les cellules de la surrénale et du CL de rat. Ce polypeptide d'abord appelé la protéine p28 puis pp30, avait une expression strictement limitée aux tissus stéroïdogéniques (Pon et Orme-Johnson, 1986). Des études ultérieures ont démontré que la pp30 était sensible aux inhibiteurs de la synthèse des protéines. Cependant, son inhibition ne se produisait pas en même temps que celle de la synthèse des stéroïdes (Pon et al., 1986). Cette incongruité a été résolue par l'identification des précurseurs cytosoliques de la protéine. Ceux-ci avaient une masse moléculaire de 37 kDa et 32 kDa et manifestaient une durée de vie moyenne cohérente avec le temps nécessaire pour observer le déclin de la stéroïdogénèse (Epstein et Orme-Johnson, 1991).

Caractérisation de la StAR

Finally les travaux d'identification et de clonage ainsi que les études de l'expression de la StAR ont été menés dans le laboratoire du Dr Douglas M. Stocco sur des cellules tumorales

de Leydig MA-10. Ces travaux ont abouti à l'identification d'une famille de protéines mitochondriales de masse moléculaire de 37 kDa, 32 kDa et 30 kDa et synthétisées en réponse à la LH, la hCG, ou les analogues de l'AMPc qui sont soumises à une induction hormonale (Clark et al., 1994). L'analyse des protéines de 30 kDa a révélé qu'elles sont dérivées d'un même précurseur de 37 kDa produit dans le cytosol qui est importé et transformé dans la mitochondrie (Stocco et Kilgore, 1988). La séquence complète de l'ADNc de la StAR a une longueur de 1456 nucléotides (nt) et contient un cadre de lecture ouvert (ORF) de 852 nt qui code pour une protéine de 284 acides aminés semblable à celle du précurseur de 37 kDa (Clark et al., 1994).

Contrôle moléculaire de la StAR

L'ARNm de la StAR et/ou la protéine a été révélé dans l'ovaire de plusieurs espèces de mammifères incluant la souris (Clark et al., 1994, le rat (Sandhoff et McLean, 1996), l'humain (Sugawara et al., 1995), la brebis (Juengel et al., 1995), la vache (Hartung et al., 1995) et le porc (Chedrese et al., 1996). Les données suggèrent que l'abondance de la StAR, au moins dans les cellules de la granulosa, est la conséquence de l'induction par des hormones dont le signal est transmis par la voie PKA. En effet, l'augmentation de l'ARNm de la StAR est induite par la FSH (Balasubramanian et al., 1997), FSH et LH (Chedrese et al., 1996), ainsi que l'AMPc (Sugawara et al., 1995; Balasubramanian et al., 1997). Un rapport récent indique une synergie entre l'IGF-I et la FSH au regard de l'augmentation de la quantité de transcrits de la StAR dans des cultures primaires de cellules de la granulosa porcine lutéinisées (Balasubramanian et al., 1997). Également, un traitement

prolongé aux oestrogènes (48 h) a produit une plus grande accumulation de l'ARNm de la StAR (Chedrese et al., 1996).

Voies métaboliques du contrôle de la StAR

Comme mentionné précédemment, il est connu que les hormones gonadotrophiques peuvent stimuler la voie de la PKA, ainsi que celle de la PKC dans le tissu stéroïdogénique de l'ovaire (Davis et al., 1986). L'activation de la voie PKC par un traitement *in vitro* avec PMA module de façon négative la stéroïdogénèse et l'expression d'enzymes qui en sont responsables, dont le P450_{scc} (Trzeciak et al., 1987; Lahav, et al., 1995) et la 3 β -HSD (Chedrese et al., 1990). Chez des brebis traitées *in vivo* avec du PMA, on observe une diminution des niveaux du transcrit de la StAR dans le corps jaune (Juengel et al., 1995). Dernièrement, un conflit est apparu dans les données sur le rôle de la voie de la PKC dans la régulation des produits du gène de la StAR. L'activation de la voie PKC avec le PMA augmente l'expression de la protéine StAR dans le cortex surrénalien (Hartigan et al., 1995; Clark et al., 1995) et dans les cellules tumorales de Leydig MA-10 (Chaudhary et Stocco, 1991). Par contre, suite à l'inhibition de la voie PKC par la staurosporine ou le PMA appliqué pendant une longue période dans des cultures primaires de cellules du cortex surrénalien, aucun effet n'a pu être obtenu sur le niveau de l'ARNm de la StAR, qu'il s'agisse du niveau constitutif ou de celui induit par l'ACTH (Liu et al., 1996).

Des données récentes viennent de s'ajouter à notre corpus de connaissances sur le contrôle de la transcription de la StAR. L'application du Ca⁺⁺ aux cellules surrénaliennes de la zona glomerulosa a produit une augmentation de l'expression de l'ARNm de la StAR, augmentation qui est bloquée par l'addition d'actinomycine D. Ces données suggèrent que le calcium

participe au contrôle de l'expression génique de la StAR (Cherradi et al., 1998). De même, l'hormone thyroïdienne pourrait participer dans la régulation de la StAR. En effet, l'expression du gène de la StAR s'est manifestée dans des cellules d'une lignée cellulaire tumorale de Leydig (mLTC-1; Manna et al., 1998) par des réponses comparables, quant à la durée et à la dose employée, à celles obtenues avec l'AMPc lorsque ces cellules ont été soumises à un traitement à la triiodothyronine. L'expression de la StAR est aussi contrôlée par des mécanismes semblables à ceux qui agissent sur le cholestérol. Par exemple, l'administration de différents oxystérols dans la lignée cellulaire surrénalocorticale Y1 a augmenté de deux à quatre fois l'expression de l'ARNm de la StAR. Parmi les oxystérols évalués, le plus efficace était le 20α -OH, tandis que le 25-OH était celui qui produisait le moins d'effet (Reyland et White, 1998). De même, les SRBP pourraient avoir une action sur l'activité de la région du promoteur du gène de la StAR. Cette possibilité est suggérée par le fait que la sensibilité de la réponse aux SRBEP-1a et SRBEP-2 est diminuée lorsqu'il y a délétion de trois sites de liaison potentiels de ces protéines sur le promoteur (Christenson et al., 1998)

Traduction

La présence de la StAR est dépendante de l'activité traductionnelle de la cellule. Quand les cellules sont traitées avec un inhibiteur de la traduction comme la cycloheximide (CHX), l'activité de la StAR disparaît (Clark et al., 1994). Les effets indirects de la CHX sur la transcription des gènes des enzymes stéroïdiennes, via la traduction des ARNm des facteurs de transcription, varient selon l'enzyme, l'espèce, mais aussi les tissus. Par exemple, l'accumulation du message du P450_{scc} est stimulée par l'AMPc dans les cellules de la granulosa (Golos et al., 1987) et cette stimulation ne semble pas être affectée par le

traitement à la CHX. Dans le placenta humain (Ringler et al., 1989) et les cellules néoplasiques JEG-3 (Picado-Leonard et al., 1988), l'augmentation du niveau d'ARNm du P450scc induite par les gonadotrophines et l'AMPc a été inhibée par la CHX alors que le même traitement n'a pas eu d'effet dans les cellules MA-10 (Mellon et Vaise, 1989). La CHX n'a pas eu d'effet apparent sur la quantité d'ARNm de la 3 β -HSD induite par les gonadotrophines dans les cellules de la granulosa porcine (Chedrese et al., 1990). Également, une récente étude montre que le traitement avec la CHX réduit mais n'élimine pas l'induction de ARNm de la StAR induit par l'AMPc dans les cellules MA-10 (Caron et al., 1997a).

Mécanisme d'action

Dans le cadre des recherches sur la StAR, un mécanisme a été proposé pour expliquer de quelle façon le cholestérol est transposé de l'extérieur vers l'intérieur de la mitochondrie. Dans ce modèle, la stimulation hormonale, met en jeu la synthèse rapide de la protéine de 37 kDa dans le cytosol, qui est ensuite rapidement acheminée vers la mitochondrie. En traversant la membrane de ce compartiment cellulaire, la protéine de 37 kDa serait transformée et produirait un site de contact entre les deux parties de la membrane mitochondriale, qui faciliterait le passage du cholestérol (Clark et Stocco, 1997). La transformation de la StAR consisterait en un clivage des séquences signal par une protéase de la matrice de façon séquentielle, produisant ainsi des protéines de 32 kDa ou 30 kDa respectivement. La StAR resterait alors attachée aux crêtes de la membrane mitochondriale interne (King et al., 1995).

Phosphorylation

Dès le début, la StAR a été identifiée comme une phosphoprotéine de 30 kDa associée aux mitochondries dans les cellules stéroïdogéniques de la surrenale et des gonades (Chaudhary et Stocco, 1991). Sur la base des comparaisons des séquences consensus de phosphorylation par les protéines kinases A chez différentes espèces (Kennelly et Krebs, 1991), deux sites très conservés ont été identifiés. Ces sites sont les sérines 56/57 chez l'humain et les sérines 194/195 chez la souris. Chez les autres espèces, la position des résidus correspondants diffère (Arakane et al., 1997a). Des expériences effectuées avec des cellules humaines transfectées ont montré que la phosphorylation des résidus sérines 57 et 195 est catalysée par la PKA et que l'incorporation du phosphate sur ces résidus est augmentée par l'AMPc (Arakane et al., 1997a). Les mêmes expériences ont démontré que la mutation qui remplace la sérine au codon 195 par une alanine non phosphorylable réduit l'activité stéroïdogénique de la StAR de 50%, tandis que la substitution par un acide aspartique à la même position produit une légère augmentation de cette activité (Arakane et al., 1997a). Ces résultats suggèrent que la phosphorylation de ce site consensus module l'activité fonctionnelle de la StAR. Pourtant, la protéine StAR peut être phosphorylée à d'autres sites et par d'autres protéines kinases, dont la protéine kinase II calcium/calmoduline-dépendante (Pezzi et al., 1996), laquelle phosphoryle des résidus sérines ou thréonines dans un contexte semblable à celui de la PKC (Hartigan et al., 1995).

STAR ET AUTRES PROTÉINES

La participation de la StAR dans le transfert du cholestérol à travers la membrane mitochondriale est

indiscutable. Toutefois, de récentes études effectuées avec des ADNc contenant des délétions et destinées à produire des StAR tronquées à leur extrémité amino- ou carboxy-terminale apportent des informations supplémentaires qui nous font remettre en question la fonction du signal d'aiguillage mitochondrial amino-terminal de la StAR. Dans les cellules transfectées avec ces ADNc tronqués, il s'avère que l'élimination de la partie amino-terminale n'a pas d'effet inhibiteur sur la production des stéroïdes (Wang et al., 1998). En outre, l'analyse par transfert de Western des mitochondries de ces mêmes cellules a indiqué que la protéine dont la partie amino-terminale a été tronquée n'a pas été importée à la mitochondrie. Toutefois, il semble que la région carboxy-terminale des protéines StAR soit beaucoup plus importante pour le transfert du cholestérol (Arakane et al., 1996). Ces derniers résultats sont tout à fait en accord avec l'observation que les mutations identifiées dans le cas de la CAH sont toutes situées dans la région carboxy-terminale de la protéine StAR (Katsumata et al., 1998). Ces données nous amènent à croire que cette protéine pourrait être à la fois nécessaire, mais pas suffisante pour expliquer la translocation du substrat vers la P450_{scc}. La formation d'un canal pour le transport du substrat serait donc nécessaire (Thomson, 1998). L'idée que le cholestérol traverse la membrane mitochondriale par les points de contact entre les deux parties de celle-ci (Brdiczka, 1991), comme certaines protéines qui entrent dans la mitochondrie via les points de contact (Lill et Neupert, 1996), implique la formation de ponts ou de tunnels par des protéines membranaires (Wallimann et al., 1992). Parmi les protéines qui pourraient accomplir cette fonction parce que leur présence dans les points de contact a été établie, on retrouve la purine hexokinase (Adams et al., 1989), la créatine kinase (Wallimann et al., 1992) et une protéine de liaison GTP de 19 kDa (Thomson et al., 1995). Il est alors nécessaire de prendre en considération

l'interaction entre d'autres facteurs ou protéines connues ou inconnues à l'extérieur de la mitochondrie, dont l'action serait associée à la StAR ou déclenchée par celle-ci pour promouvoir la stéroïdogénèse (Stocco, 1997a).

Protéine de transport des stérols

Comme nous l'avons dit auparavant, une des protéines qui est impliquée dans la régulation intracellulaire du cholestérol, la protéine de transport des stérols 2 (SCP2; Vahouny et al., 1987), est très abondante tant dans les cellules hépatiques que dans les cellules stéroïdogéniques. Un des rôles de cette protéine est le transfert du cholestérol des gouttelettes lipidiques vers la mitochondrie (Chanderbhan et al., 1982). Elle est également capable de stimuler la production des stéroïdes par les mitochondries isolées des surrénales (McNamara et Jefcoate, 1989) et de transporter le cholestérol synthétisé au niveau du réticulum endoplasmique vers la membrane plasmique (Puglielli et al., 1995). Autre donnée intéressante: le traitement des cellules surrénaliennes avec un anticorps anti-SCP2 a produit une inhibition de la sécrétion des stéroïdes (Chanderbhan et al., 1986). Ces données font apparaître le SCP2 comme essentiel à la stéroïdogénèse. Une autre donnée qui appuie la participation de cette protéine au niveau mitochondrial provient de l'identification d'une séquence d'aiguillage de 20 acides aminés dans la partie N-terminale de la SCP2, qui pourrait servir à son acheminement vers la mitochondrie (revue par Thomson, 1998). En général les données indiquent que le SCP2 est associée à la mobilisation intracellulaire du cholestérol excepté pour la circulation du cholestérol lysosomal (Johnson et Reinhart, 1994), mais sa participation ne semble pas aller tout à fait dans le sens de la stéroïdogénèse rapide (revue par Stocco et Clark, 1996).

Peptide activateur de la stéroïdogénèse

Un autre élément important, mais dont le rôle n'est pas encore très bien connu, est le peptide activateur de la stéroïdogénèse (SAP), qui est dérivé d'une protéine de 78 kDa appelée "protéine réglée par le glucose" ("glucose-regulated protein" ou BiP; Li et al., 1989). Le SAP dont le poids moléculaire est d'environ 3 kDa, se trouve seulement dans les tissus stéroïdogéniques, a une courte demi-vie et est très sensible à l'effet de la CHX (Pedersen et Brownie, 1983). Toutefois, il ne semble pas faciliter l'accès du cholestérol au P450_{scc} (Privalle et al., 1983). Contrairement à la SCP2, les niveaux de SAP augmentent rapidement après le traitement à l'AMPC (Mertz et Pedersen, 1989)

Récepteur périphérique de la benzodiazépine

L'un des éléments les plus importants dans le transfert du cholestérol est peut-être le récepteur mitochondrial de la benzodiazépine (PBR) et son ligand endogène, l'endozépine (Papadopoulos, 1993). La présence de cette molécule, qui compte cinq régions transmembranaires, a été établie dans la membrane externe de la mitochondrie des cellules de la surrénale. Ces régions seraient responsables d'induire la protéine à former un tunnel qui aurait les dimensions appropriées pour permettre le passage d'une molécule de cholestérol (Papadopoulos, 1996). Le PBR a été associé au transporteur d'anions dépendant du voltage (VDAC; McEnery et al., 1992) qui se trouve dans les sites de contact de la membrane mitochondriale (Kinally et al., 1993). La visualisation du complexe, par immunomarquage, montre qu'un pore est formé de quatre ou six molécules du PBR dans la membrane mitochondriale et que celui-ci est en association avec le VDAC (Papadopoulos et al., 1994). Les études qui proposent

l'endozépine et son récepteur comme éléments de transport du cholestérol se basent sur les données qui montrent une augmentation de la synthèse de progestérone lors du traitement avec la protéine des cellules surrénales (Yanagibashi et al., 1988), des cellules de la granulosa (Amsterdam et Suh, 1991) et des cellules de Leydig (Papadopoulos et al., 1990). De plus, l'augmentation de la fonction stéroïdogénique dans deux autres tissus, le placenta (Barnea et al., 1989) et le cerveau (Korneyev et al., 1993), a été associée à l'action du PBR.

Il semble y avoir des données suffisantes pour dire que la liaison de l'endozépine avec son récepteur et son association avec le VDAC peut faciliter le transport du cholestérol dans la membrane mitochondriale (Papadopoulos, 1993). En particulier, notons le fait que les cellules de Leydig possédant un gène PBR mutant inactif manifestent une réduction très marquée des stéroïdes en comparaison avec les cellules témoins contenant le gène sauvage (Papadopoulos et al., 1996). Toutefois, aucun des composants de ce système ne semble posséder la capacité de réponse fine et rapide à l'AMPc, ni la sensibilité à l'inhibition par la CHX qui caractérisent la réponse rapide de la stéroïdogénèse (Miller, 1995).

HYPERPLASIE SURRÉNALOCORTICALE LIPIDIQUE CONGÉNITALE (CAH) ET StAR

Le phénotype clinique de ce syndrome inclut une insuffisance surrénalocorticale grave observée après la naissance, une hyperpigmentation, qui reflète une surproduction de pro-opiomélanocortine et un pseudohermaphrodisme masculin (Arakane et al., 1997b).

L'importance de la StAR dans la stéroïdogénèse a été mise en évidence par les études sur CAH. Ce syndrome a été décrit il y a plus de quarante ans, comme une affection endocrinienne héritée d'une façon récessive autosomique (revue par Miller, 1997). Il se caractérise par un manque de stéroïdes surrénaliens et par une accumulation de dépôts lipidiques dans les surrénales. La CAH est une maladie létale qui se manifeste généralement par l'impossibilité complète du nouveau-né à synthétiser des stéroïdes. Au départ, elle a été associée à une défaillance des enzymes impliquées dans la conversion du cholestérol en prégnénolone (Camacho et al., 1968). Lors des premières études *in vitro* sur ce syndrome, on avait mis en cause l'enzyme 20 α -hydroxylase, car les mitochondries affectées pouvaient convertir le 20 α -hydroxycholestérol en prégnénolone (Degenhart et al., 1972). Il a fallu plus de vingt-cinq années avant que la vraie nature du problème ne soit déterminée (Lin et al., 1995). Il s'agissait de la mutation d'une protéine qui ne possède pas d'activité enzymatique, la StAR.

À la suite de nombreuses études on a pu mettre en évidence le facteur responsable de la maladie. L'implication possible d'une anomalie de l'activité du P450_{scc} dans le CAH a été étudiée. Mais cette hypothèse a été rejetée parce que chez les patients affectés la séquence du gène, les niveaux de l'ARNm (Lin et al., 1991) et ceux de la protéine P450_{scc} (Sakai et al., 1994) sont tous normaux. Il a également été démontré que les niveaux de l'ARNm et/ou des protéines de l'adrénodoxine et l'adrénodoxine réductase (Lin et al., 1991), étaient normaux chez ces patients. En outre, ces études ont démontré que le message et la quantité de SCP2, SAP, PBR et de leur ligand, étaient normaux (Lin et al., 1993). Par conséquent aucun de ces facteurs n'est impliqué dans le CAH même si leur participation dans la stéroïdogénèse est démontrée.

Lorsque la StAR humaine a été clonée, il a été démontré que l'expression de son message était circonscrite aux tissus stéroïdogéniques (surrénales, testicules et ovaires; Sugawara et al., 1995) sauf le placenta et le cerveau. Des études ultérieures ont confirmé que son action était fondamentale pour la stéroïdogénèse rapide et que sa défaillance était responsable du CAH (Lin et al., 1995). Les mutations identifiées sont des changements du cadre de lecture ("frameshifts"), des erreurs d'épissage, ainsi que la production d'arrêts prématurés et de codons causant un changement d'acide aminé (Arakane et al., 1997b). L'analyse de l'ADN des parents des malades confirme que la CAH est héritée d'une façon autosomale récessive. Ceci est en accord avec la cartographie du gène structural de la StAR humaine localisé dans un locus simple sur le petit bras du chromosome 8 (8p11.2; Sugawara et al., 1995).

Pour pouvoir analyser de façon plus exhaustive le CAH, des chercheurs ont inactivé le gène de la StAR ("knockout") chez la souris (Caron et al., 1997c). Ces souris constituent un bon modèle animal puisqu'elles expriment le phénotype du syndrome.

Ces souris présentent la déletion d'une partie de l'exon 2 et de tout l'exon 3 du gène de la StAR, ce qui produira la synthèse de la protéine sans le résidu terminal-C, qui est considéré comme essentiel pour sa fonction (Bose et al., 1996). L'accouplement de souris hétérozygotes a produit 25% de souriceaux homozygotes parmi les animaux vivants. Ceci indique que la StAR n'est pas nécessaire pour la survie *in utero*. En plus, tel que prévu pour un caractère autosomal récessif, le nombre de porteurs du gène de la StAR inactivée mâles et femelles était identique. Le phénotype des ces souriceaux semble normal sauf qu'autant les mâles (X,Y) que les femelles

(X,X) ont des organes génitaux externes femelle. (Caron et al., 1997c).

La plupart des souris meurt entre le 2^e et le 10^e jour suivant la mise-bas (80%; Caron et al., 1997c). Moins de 10% survivent jusqu'à 16 jours sans traitement. Les souriceaux qui meurent dans les premiers jours présentent de la cyanose et de la bradycardie. Des problèmes semblables se produisent chez les souris qui ont subi l'inactivation du gène du récepteur aux glucocorticoïdes (Cole et al., 1995).

Les souris avec le gène de la StAR inactivé ont des multiples anomalies hormonales: les niveaux de corticostérone et d'aldostérone sont bas, tandis que les niveaux d'ACTH et CRH sont élevés (Caron et al., 1997c). Des extraits de surrénale des souris avec le gène de la StAR inactivée, analysés par immunotransfert, ne présentaient pas de bande de 30 kDa, qui signale la présence de la protéine StAR mûre (Caron et al., 1997c). Les ovaires, ne montrent pas des anomalies détectables, mais la surrénale et le testicule sont clairement anormaux. Toutefois, chez ce dernier on observe une petite activité stéroïdogénique, attestée par l'apparente normalité de l'épididyme et le canal déférent (Caron et al., 1997c).

Ce modèle est très intéressant pour l'étude de la fonction de la StAR ainsi que les multiples effets de la déficience en stéroïdes sur le développement et la fonction de plusieurs systèmes organiques.

STÉROÏDOGÈNE EN L'ABSENCE DE LA StAR

La complexité de la stéroïdogénèse se manifeste par la multitude de différences qu'il y a entre les cellules

stéroïdogéniques. Quelques-unes suivent un processus commun et complet tandis que d'autres ne le font que partiellement ou selon des voies différentes (Gore-Langton et Armstrong, 1994). Le placenta et le cerveau, par exemple, présentent des différences très prononcées par rapport aux gonades.

Ainsi, malgré que la StAR semble être un élément crucial de la stéroïdogénèse dans les gonades et la surrénale, certains tissus, comme le placenta humain, n'expriment pas le gène de la StAR, qui produit de grandes quantités de prégnéolone (Sugawara et al., 1995). Dans ce cas il faudrait envisager l'existence d'autres mécanismes qui seraient indépendants de la StAR et mettraient le cholestérol à la disposition du P450_{scc}.

Nous avons dit plus haut que la région terminale C de la protéine StAR est la clé de son action et que l'absence de sa région terminale N, qui est pourtant la séquence d'aiguillage destinée à la mitochondrie, n'empêche pas la stéroïdogénèse (Wang et al., 1988).

La protéine MLN64, dont les fonctions ne sont pas connues, est fortement exprimée dans certains carcinomes mammaires avec une activité stéroïdogénique. L'analyse de la région terminale C de cette protéine de 50 kDa révèle une forte homologie avec celle de la StAR (Moog-Lutz et al., 1997). L'étude de la distribution tissulaire de l'ARNm de cette protéine indique qu'elle est présente dans pratiquement tous les tissus d'adulte humain et que son expression est particulièrement élevée dans le placenta et le cerveau (Watari et al., 1997).

Les résultats de la transfection des cellules rénales de singe (COS-1) avec la P450_{scc} et la MLN64 montrent que la sécrétion de progestérone augmente d'environ deux fois, par rapport aux cellules transfectées exclusivement avec la P450_{scc}

(Watari et al., 1997). Cet effet est équivalent à 28% de celui que la StAR produit dans ce système. Cependant, le mécanisme par lequel cette action stimule la stéroïdogénèse n'est pas encore clair. D'ailleurs, des mutations dirigées des résidus dans le domaine C, qui sont identiques ou semblables à ceux de la StAR, entraînent la perte de l'activité stéroïdogénique. En contraste, l'élimination des séquences dans le domaine N, qui contient supposément la séquence d'aiguillage microsomale, ainsi que dans les domaines supposés renfermer les séquences transmembranaires ont produit une augmentation de l'activité stéroïdogénique deux fois plus importante que celle produite par la StAR dans des cellules COS-1 (Watari et al., 1997). Toutes ces données, nous suggèrent, entre autres fonctions de cette protéine, une fonction régulatrice de la stéroïdogénèse, particulièrement dans les tissus où la StAR est absente.

En résumé, il est très probable que d'autres protéines et d'autres voies métaboliques participent au transfert du cholestérol des entrepôts cellulaires vers la matrice de la membrane mitochondriale interne dans les tissus qui sont dépourvus de la StAR.

CHAPITRE II

Steroidogenic Acute Regulatory Protein in Bovine Corpora Lutea¹

**Nazario Pescador², Korian Soumano², Douglas M.
Stocco³, Christopher A. Price² and Bruce D.
Murphy^{2,4}**

²Centre de recherche en reproduction animale, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe Québec, Canada J2S 7C6 and ³Department of Cell Biology and Biochemistry, Texas Tech Health Sciences Center, Lubbock Texas, USA 79430.

¹Supported by MRC Canada grant MT 10118 to BDM, NSERC, Canada grant OGP0106389 to CAP, and NIH HD 17481 to DMS. N. Pescador and K. Soumano are recipients of graduate fellowships from CONACYT, Mexico, and Bourse de la francophonie, CIDA, respectively.

⁴Correspondence: FAX (514) 778-8103, internet murphyb@ere.umontreal.ca

Running title: StAR in the bovine CL

Key words : Steroidogenic acute regulatory protein, corpus luteum, bovine, estrous cycle, luteinization

Steroidogenic Acute Regulatory Protein in Bovine Corpora Lutea¹

Nazario Pescador,³ Korian Soumano,³ Douglas M. Stocco,⁴ Christopher A. Price,³ and Bruce D. Murphy^{2,3}

Centre de recherche en reproduction animale,³ Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6

Department of Cell Biology and Biochemistry,⁴ Texas Tech Health Sciences Center, Lubbock, Texas 79430

ABSTRACT

Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) transfers cholesterol from the outer to the inner mitochondrial membrane to initiate steroidogenesis. Our purpose was to determine the tissue distribution of StAR mRNA and the occurrence of StAR gene products in the bovine corpus luteum (CL). Tissues were taken from the slaughterhouse or by ovariectomy of cattle at specific times after estrus or ovulation. StAR mRNA was identified by Northern analysis employing a 1.6-kb cDNA mouse StAR probe, and polyclonal antiserum against mouse StAR was used in Western analysis of StAR protein in bovine luteal tissue. The mRNA for cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme (P450_{sc}) was also evaluated by means of a homologous cDNA probe. Two isoforms of StAR mRNA, approximately 2.9 and 1.8 kb, were present in bovine CL, adrenal, theca, and granulosa cells and caruncles and cotyledons. One, or sometimes two, protein bands were recognized by the mouse StAR antiserum. P450_{sc} mRNA colocalized in all sites where StAR mRNA was found, and in bovine liver. StAR mRNA was low in developing CL, increased 9- to 15-fold during the mid- to late-luteal phase, and disappeared in CL that had regressed. StAR protein concentrations were highly correlated with StAR mRNA throughout the estrous cycle ($r = 0.93$, $p < 0.05$). P450_{sc} mRNA abundance did not vary through the luteal phase except for its disappearance in regressed CL. Corpora lutea from intact animals treated with prostaglandin F_{2α} displayed a 50% decline in StAR mRNA over 12 h while P450_{sc} mRNA remained unchanged. At 24 h StAR mRNA was undetectable, while P450_{sc} mRNA had declined to 50% of pretreatment values. We conclude that StAR mRNA and protein are tightly coupled in the bovine CL, being present at low levels during CL development and in elevated concentrations during the midluteal phase, and disappearing in regressed CL within 24 h of prostaglandin-induced luteolysis. We have further shown, for the first time, that StAR mRNA is present in the mammalian placenta.

INTRODUCTION

Circulating levels of progesterone in the cow fluctuate in a manner consistent with a luteal phase composed of the development, attainment of maximal function, and demise of the corpus luteum (CL) [1, 2]. The patterns of activity and messenger RNA abundance of the steroidogenic enzymes, cytochrome P450 side-chain cleavage (P450_{sc}) [3, 4], 3β-hydroxysteroid dehydrogenase (3βHSD) [5], and P450_{17α} hydroxylase [4] have been described for the CL during the bovine luteal phase. In general, the mRNAs coding for steroidogenic enzymes increase during luteal development and are strongly expressed during the midluteal

phase [4, 5]. These messages decline during luteal regression *in vivo* in the ewe [6] and cow [7] and in luteinized porcine granulosa cells in culture treated with prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}) [8]. However, it is of interest to note that immunohistochemically detectable 3βHSD protein remains present in a substantial portion of the cells of both the ovine and bovine CL during the late stages of regression [9] in spite of the dramatic reduction in detectable message [7], implying a relatively long half-life of steroidogenic enzymes. During luteal regression, the message for P450_{sc} declines more slowly in the cow than in other species, with perceptible amounts evident by Northern and *in situ* hybridization 24 h after administration of a luteolytic dose of PGF_{2α} [7].

Recently, a protein that has an essential role in the acute stimulation of steroidogenesis has been identified in MA-10 mouse Leydig tumor cells. It is known as steroidogenic acute regulatory protein (StAR), and its cDNA sequence has been determined for the mouse [10], human [11], and cow [12]. A partial sequence has recently been reported for the sheep [13]. StAR functions to mediate the transfer of cholesterol from the outer to inner mitochondrial membrane under the influence of agents that stimulate steroidogenesis [10]. It is believed to act primarily through the cAMP pathway [10]. It has been shown that StAR is synthesized as a 37-kDa cytosolic precursor protein that is then imported into the mitochondria and gives rise to four 30-kDa mature isoforms [10, 14]. It is during the importation and processing in the mitochondrion that StAR is believed to transfer cholesterol to the inner mitochondrial membrane [10, 14]. Thus, the active form of StAR is believed to be the 37-kDa precursor. The mature 30-kDa forms, while remaining associated with the inner mitochondrial membrane for a relatively long time, are believed to be no longer active in cholesterol transfer. In addition, StAR mRNA has been found and characterized in mouse MA-10 cells [10] and in the mouse adrenal, ovary, and testis [15], in the human ovary and adrenal [11], and in the ovine CL [13]. There is preliminary evidence for its occurrence in bovine luteal tissues [12].

The purposes of this study were to determine the occurrence and tissue distribution of StAR mRNA in the cow. Given the ligand regulation of the bovine CL [2] and the abbreviated functional life span of StAR mRNA [10], it was of interest to determine the pattern of StAR expression in the bovine CL during the luteal phase of the estrous cycle and after prostaglandin-induced luteolysis in this species. The relationship of StAR to the steroidogenic enzyme, P450_{sc}, during the bovine luteal phase is also reported.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Tissue Collection

Experiment 1. To determine the occurrence of StAR mRNA and protein during the early phase of luteal devel-

Accepted April 15, 1996.

Received February 14, 1996.

¹Supported by MRC Canada grant MT 10118 to B.D.M., NSERC, Canada grant OGP106389 to C.A.P., and NIH HD 17481 to D.M.S. N. Pescador and K. Soumano are recipients of graduate fellowships from CONACYT, Mexico, and Bourse de la francophonie, CIDA, respectively.

²Correspondence. FAX: (514) 778-8103;

e-mail: murphyb@ere.umontreal.ca

RÉSUMÉ

La protéine de régulation rapide de la stéroïdogénèse (StAR) transfère le cholestérol de l'extérieur vers l'intérieur de la membrane mitochondriale pour initier la stéroïdogénèse. L'objet de cette étude a été de déterminer la distribution tissulaire de l'ARNm de la StAR et la présence des produits du gène de la StAR dans le corps jaune bovin (CL). Les tissus ont été pris à l'abattoir ou par ovariectomie chez le bétail à des temps précis après l'oestrus ou l'ovulation. L'ARNm de la StAR a été identifié par analyse "Northern" en utilisant une sonde d'ADNc de la StAR de souris de 1,6-kb. Un antisérum polyclonal contre la StAR de souris a été utilisé dans l'analyse par Western de la protéine StAR dans le tissu lutéal bovin. L'ARNm du cytochrome P450 qui clive la chaîne latérale du cholestérol (P450scc) a été aussi évaluée au moyen d'une sonde d'ADNc homologue. Deux isoformes de l'ARNm de la StAR, d'environ 2.9 et 2.8 kb ont été détectés dans le CL, cellules de la thèque et de la granulosa et caroncles et cotylédons. Une, et quelquefois deux bandes de protéine ont été identifiées par l'antisérum murine de la StAR. L'ARNm du P450scc, est colocalisé dans tous les sites où l'ARNm de la StAR a été trouvé et dans le foie. De faibles niveaux de l'ARNm de la StAR ont été observés dans les CL en développement, avec une augmentation de 9 à 15 fois pendant la mi-phase jusqu'à la fin de la phase lutéale et disparition dans le CL en régression. Les concentrations protéiques de StAR ont été en corrélation étroite avec son ARNm à travers le cycle oestral ($r=0,93$, $p<0.05$). La quantité de l'ARNm du P450scc n'a pas varié pendant la phase lutéale, exception faite de sa disparition dans le CL en régression. Les corps jaunes des animaux intacts traités aux prostaglandines F2 α montrent un déclin de 50% de l'ARNm la StAR dans les 12h, par opposition à l'ARNm du P450scc qui, lui, n'a pas changé. L'ARNm de la StAR était non décelable 24h après le traitement,

tandis que l'ARNm du P450scc a diminué de 50% par rapport aux valeurs pré-traitement. Nous concluons que l'ARNm de la StAR et sa protéine sont en étroite relation dans le CL bovin. L'ARNm et la protéine sont présents à des niveaux faibles pendant le développement du CL et élevés dans la mi-phase lutéale; de plus, ils ont disparu 24h après l'induction de la lutéolyse par des prostaglandines. Nous montrons, pour la première fois, que l'ARNm de la StAR est présent dans le placenta mammalien

ABSTRACT

Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) transfers cholesterol from the outer to the inner mitochondrial membrane to initiate steroidogenesis. Our purpose was to determine the tissue distribution of StAR mRNA and the occurrence of StAR gene products in the bovine corpus luteum (CL). Tissues were taken from the slaughterhouse or by ovariectomy of cattle at specific times following estrus or ovulation. StAR mRNA was identified by Northern analysis employing a 1.6 kb cDNA mouse StAR probe and polyclonal antiserum against mouse StAR was used in Western analysis of StAR protein in bovine luteal tissue. The mRNA for cytochrome P450 side chain cleavage enzyme (P450scc) was also evaluated by means of a homologous cDNA probe. Two isoforms of StAR mRNA, approximately 2.9 and 1.8 kb, were present in bovine CL, adrenal, theca and granulosa cells and caruncles and cotyledons. One, or sometimes two, protein bands were recognized by the mouse anti-StAR antiserum. P450scc mRNA co-localized in all sites where StAR mRNA was found, and in bovine liver. StAR mRNA was low in developing CL, increased 9-15 fold during the mid to late luteal phase and disappeared in CL that had regressed. StAR protein concentrations were highly correlated with StAR mRNA throughout the estrous cycle

($r=0.93$, $p<0.05$). P450scc mRNA abundance did not vary through the luteal phase except for disappearance in regressed CL. CL from intact animals treated with prostaglandin $F_{2\alpha}$ displayed a 50% decline in StAR mRNA over 12 h while P450scc mRNA remained unchanged. At 24 h StAR, mRNA was undetectable while P450scc mRNA had declined to 50 % of pretreatment values. We conclude that StAR mRNA and protein are tightly coupled in the bovine CL, present at low levels during CL development, in elevated concentrations during the midluteal phase and disappearing in regressed CL within 24 h of prostaglandin-induced luteolysis. We have further shown, for the first time, that StAR mRNA is present in the mammalian placenta.

INTRODUCTION

Circulating levels of progesterone in the cow fluctuate consistent with a luteal phase comprised of the development, attainment of maximal function and demise of the CL (1,2). The patterns of activity and messenger RNA abundance of the steroidogenic enzymes, cytochrome P450-side chain cleavage (P450scc, 3,4), 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β HSD, 8), and P450-17 α hydroxylase (4) have been described for the CL during the bovine luteal phase. In general, the mRNAs coding for steroidogenic enzymes increase during luteal development, and are strongly expressed during the mid-luteal phase (4,5). These messages decline during luteal regression *in vivo* in the ewe (6) and cow (7) and in luteinized porcine granulosa cells in culture treated with prostaglandin $F_{2\alpha}$ (PGF $_{2\alpha}$, 8). However, it is of interest to note that immunohistochemically detectable 3 β HSD protein remains present in a substantial portion of the cells of both the ovine and bovine CL during the late stages of regression (9) in spite of the dramatic reduction in detectable message (7), implying a relatively long half life of steroidogenic

enzymes. During luteal regression, the message for P450_{scc} declines more slowly in the cow than in other species with perceptible amounts evident by Northern and *in situ* hybridization 24 h after administration of a luteolytic dose of PGF_{2α} (7).

Recently, a protein that has an essential role in the acute stimulation of steroidogenesis has been identified in MA-10 mouse Leydig tumor cells. It is known as steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and its cDNA sequence has been determined for the mouse (10), human (11) and cow (12). A partial sequence has recently been reported for the sheep (13). StAR functions to mediate the transfer of cholesterol from the outer to inner mitochondrial membrane under the influence of agents that stimulate steroidogenesis (10). It is believed to act primarily through the cAMP pathway (10). StAR has been shown to be synthesized as a 37 kDa cytosolic precursor protein which is then imported into the mitochondria and gives rise to four 30 kDa mature isoforms (10,14). It is during the importation and processing in the mitochondria that StAR is believed to transfer cholesterol to the inner mitochondrial membrane (10,14). Thus, the active form of StAR is believed to be the 37 kDa precursor. The mature 30 kDa forms, while remaining associated with the inner mitochondrial membrane for a relatively long time, are believed to be no longer active in cholesterol transfer. In addition, StAR mRNA has been found and characterized in mouse MA-10 cells (10) and mouse adrenal, ovary and testis (15), human ovary and adrenal (11), in ovine corpus luteum (13). There is preliminary evidence for its occurrence in bovine luteal tissues (12).

The purposes of this study were to determine the occurrence and tissue distribution of StAR mRNA in the cow. Given the ligand regulation of the bovine CL (19) and the

abbreviated functional lifespan of StAR mRNA (10) it was of interest to determine the pattern of StAR expression in the bovine corpus luteum during the luteal phase of the estrous cycle and following prostaglandin induced luteolysis in this species. The relationship of StAR to the steroidogenic enzyme, P450_{scc}, during the bovine luteal phase is also reported herein.

MATERIALS AND METHODS

Animals and tissue collection

Experiment 1: To determine the occurrence of StAR mRNA and protein during the early phase of luteal development, two consecutive estrous cycles were confirmed by observation of six mature Holstein cows housed indoors at the CRRA farm in St-Hyacinthe, PQ (latitude 45° 30' N), maintained under standard husbandry conditions. Estrus was then synchronized by two injections of 500 µg PGF_{2α} analogue (Estrumate; Cooper Agropharm Inc., Ajax, ON). Ultrasound monitoring of ovarian changes was conducted at 6 h intervals beginning 24 h before expected estrus. Ovulation occurred in all six animals, and ovariectomy and removal of the incipient corpus luteum was carried out at 24 and 48 h respectively after the first observation of ovulation, in two groups of three animals each.

Experiment 2: To determine the evolution of StAR message and protein through the bovine luteal phase, bovine ovaries were collected from the abattoir. The stage of the estrous cycle was determined according to the morphological criteria established by Ireland et al. (16) and validated histologically by Rodgers et al. (3). Four categories were identified, representing Stages I, II, III and IV of the luteal phase, which were, respectively the early, midcycle (early and

late) and regressed CL. Segments of representative CL were preserved in fixative and embedded in paraffin, sectioned at 7 μ M and stained with haemotoxylin and eosin. Three to nine CL from each stage were collected for Northern and Western analysis. The ovarian theca was collected, as described previously (17), and granulosa cells were aspirated from a pool of follicles of 5-10 mm in diameter. Other tissues were also taken, including adrenal, liver, kidney, brain, heart, liver, lung, spleen, and intestine. Uteri from 260-280 day pregnant animals were collected at the abattoir (18) and cotyledons and caruncles were separated.

Experiment 3: To evaluate the effects of $\text{PGF}_{2\alpha}$ -induced luteolysis on StAR message, crossbred Holstein Friesian heifers, 18 months old, were observed and regular estrous cycles confirmed. Superovulatory treatments were initiated on Day 9 of the cycle (Day 0 = day of estrus). Animals received either a single injection of 2500 IU eCG (Folligon, Intervet Canada Inc., West Hill, ON) or a total of 8 injections of 2.25 mg Folltropin-V (Vetrepharm Inc., London, ON; equivalent to 50 mg of NIH-FSH-P1) at 12-h intervals. Luteolysis was induced on day 12 by an injection of 500 μ g of $\text{PGF}_{2\alpha}$ analogue. Ovaries were removed by colpotomy from both treatment groups of three animals at 24 h before injection of $\text{PGF}_{2\alpha}$ (n=3) at the time of injection (n=3) and at 12 (n=4) and 24 (n=4) h after $\text{PGF}_{2\alpha}$ administration. Corpora lutea were collected within 30 min of ovariectomy, and were placed in a guanidinium isothiocyanate- β mercaptoethanol solution and maintained at -70°C until total RNA extraction.

RNA analysis

Tissues for Northern analysis were homogenized in 4 M guanidine isothiocyanate, 20 mM sodium acetate, 1 mM

dithiothreitol and 0.5 % N-lauryl sarcosine and stored at -70°C until analyzed. Total RNA was purified through a density gradient of 5.7 M CsCl. Aliquots of 15 μg from each sample, assessed by the optical density at 260 nm, were then subjected to electrophoresis on 1% agarose-formaldehyde gels using a 20 mM morpholinopropanesulfonic acid buffer (pH 7.0), transferred overnight to nylon membranes and cross-linked for 10 min in a UV Stratalink 2400 (Stratagene, La Jolla, CA). Blots from corpora lutea collected from the slaughterhouse were hybridized in sequence with three probes, a 1.6 kb cDNA representing the coding region and 5' and 3' untranslated regions of the mouse StAR cDNA sequence (10), a 1.7 kb portion of the homologous P450scc cDNA (19) and a 1.4 kb fragment from an internal region of the human 28s rRNA gene. All probes were labelled with ^{32}P to specific activities of $1.5\text{-}3.0 \times 10^9$ dpm/ μg by random primer synthesis using a kit from Boehringer Mannheim (Laval, PQ). Hybridization was conducted as previously described (20), followed by two high stringency washes at 60°C and hybridized blots were autoradiographed. To provide a quantitative estimate of StAR mRNA, the two major positive bands on the consequent autoradiograms were scanned individually using a computer imaging system and the areas under each resultant curve were integrated by means of the Macintosh program, Collage, and summed. The single P450scc band and the 28s band were likewise scanned and the latter served as control for loading and transfer of RNA. Data are presented as the dimensionless ratio between the sum of the two mRNA species of interest and 28s, normalized to 1.0, which represents the value for a control sample which was present in all blots evaluated in the first and second experiments. In the third trial, observations were normalized to the mean values 24 h prior to injection of $\text{PGF}_{2\alpha}$.

StAR protein analysis

For Western blotting in experiments 1 and 2, a portion of each CL was homogenized in 0.25 M sucrose, 10mM Tris and 0.1 mM EDTA and stored at -70°C. Mitochondria were isolated from tissue homogenates by centrifugation at 600 X g for 30 min and the resultant supernatant recentrifuged at 9000 X g for 30 min, and protein concentration determined (21). The proteins were then solubilized in sample buffer containing 25 mM Tris, pH 6.8, 1% SDS, 5% β -mercaptoethanol, 1mM EDTA, 4% glycerol and 0.01% bromophenol blue. Samples (25 μ g protein) were subjected to electrophoresis on a 12.5 % SDS-PAGE minigel for 45 min at 200 V. The proteins were electrophoretically transblotted to a polyvinylidene difluoride membrane (Bio-Rad, Richmond, CA) at 100 V for 2 h. The membranes were then blocked with 4% Carnation non-fat dry milk in PBS buffer containing 0.5% Tween 20. The membranes were then washed in the same buffer and incubated with primary antibodies specific to StAR (10). The second antibody, donkey anti-rabbit IgG, conjugated to horseradish peroxidase, was added in the presence of the blocking agent. The signal was detected by chemiluminescence as previously described (10), and the optical density of the immunospecific bands was quantitated by means of a BioImage Visage 2000 computer-assisted analysis system.

Statistical Analyses

Data for each analysis were subject to Shapiro's test to determine normality of distribution and Bartlett's test for the homogeneity of variance. A one-way analysis of variance was then conducted, and in the presence of significant F values, individual comparisons were made by Tukey-Kramer test. In the absence of homogenous variance, the analysis was

performed on square root transformed data. Correlation analysis was performed to examine the relationship between StAR mRNA and StAR protein, and between the abundance of StAR and P450scc mRNA's. The level of probability selected to determine significance was $p < 0.05$.

RESULTS

Fig. 1a depicts the mouse StAR cDNA probe that hybridized to two species of RNA from the bovine CL. We estimate that the major band migrated at 2.9 kb and the minor band at 1.8 kb. The bovine adrenal displayed messages of similar size to those present in the CL. No hybridization could be detected in kidney, brain, liver, intestine, muscle, heart or spleen. The probe for P450scc hybridized with the expected single band of bovine RNA at 1.9 Kb, and this message was present in CL, adrenal and liver. However, the hepatic message was considerably weaker than found elsewhere. StAR mRNA in the same two isoforms was present in bovine granulosa cells and in both cotyledons and caruncles of bovine placenta (Fig. 2a). The message was much reduced in thecal cells, but the two bands could be detected in the theca tissue after 7 d of exposure of the autoradiogram (data not shown). The mRNA for P450scc was present in granulosa and theca cells and in both cotyledons and caruncles of placental tissue (Fig. 2a).

Mitochondrial protein isolated from the bovine CL reacted with the mouse StAR antibody (Fig. 3a) and in some cases there were two bands present (Fig. 4a). The major protein band in the bovine CL was approximately 30 kDa in size and migrated identically with the StAR protein derived from stimulated MA-10 cell mitochondria employed as the positive control. The band representing 25 μ g MA-10 protein had a density value of approximately 70% of Stage II and III CL. The minor band was

slightly larger, and when present, was less than 10 % of the major band. It is highly likely that this larger molecular weight band is the 37 kDa precursor protein of StAR previously observed and described in MA-10 (10,14,22) and rat adrenal cortex cells (23).

Microscopic scrutiny of tissue samples from the CL collected from the abattoir confirmed the stage of the cycle and concurred with the findings presented by Rodgers et al. (3). The CL classified in Stage I were morphologically indistinguishable from those taken at 24 and 48 h intervals after ovulation in the first trial. StAR mRNA abundance varied through the bovine luteal phase ($P < 0.001$). Both StAR mRNA and protein appeared to increase between 24 and 48 h after ovulation ($0.05 < p < 0.1$, Fig. 3a). As can be seen from Fig. 4a, StAR mRNA and protein were 7-15 fold greater during the midluteal phase (Stages II and III) relative to Stage I. Individual comparison of means which considered all CL but those in Stage IV revealed two statistically distinct levels of abundance ($P < 0.001$). A low level of StAR message was present in CL from 24 and 48 h after ovulation and those in Stage I (developing) CL. Elevated abundance relative to these samples was present in Stage II (early midcycle) and Stage III (late midcycle) CL (Fig. 4a). There was similar fluctuation of StAR protein, with the Stage II and III samples containing as much as 25-35 fold greater concentrations than those in Stage I or those collected in the first 48 h after ovulation (Figs 3a and 4a). In one of four samples taken from CL in Stage IV (regressed), there was a faint but detectable band which hybridized with the StAR antibody. No protein was detected in Western blots from the remaining three samples. The pattern of StAR protein was highly correlated with StAR message abundance ($r = 0.93$ $P < 0.001$).

Fig. 5a shows there was considerable variation in the abundance of mRNA for P450scc in the CL. There were no statistically significant differences among message abundance values for early CL (those taken at 24 or 48 hr after ovulation), CL in Stage I (developing) or for early and late midcycle CL (Stage II and III). As with the StAR message, the mRNA for P450scc was not detectable in the regressed CL (Stage IV).

The abundance of mRNA for both StAR and P450scc followed the same general pattern in CL from superovulated animals as described above for corpora lutea from untreated animals and ovaries derived from the abattoir (Fig. 6a). Levels of both messages were elevated in CL taken before injection of $\text{PGF}_{2\alpha}$ regardless of the superovulatory regime (eCG or FSH) employed. Mean levels of StAR mRNA declined significantly at 12 h after $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($p < 0.05$), and were not detectable at 24 h in either of the groups of animals. P450scc declined more slowly, such that levels were not different from pretreatment values at 12 h and were reduced only by approximately half at 24 h. This reduction was significant in the FSH treated group ($p < 0.05$), but not so in the eCG treated cows.

DISCUSSION

The results of the present study demonstrate the occurrence of a protein in the bovine CL which migrates electrophoretically in a manner virtually identical to StAR from the mouse, the species in which this protein was originally characterized (10). We report herein the presence of a major protein band at 30 kD, and a minor band representing a protein which is slightly larger. As indicated earlier, StAR is synthesized as a 37 kDa precursor protein in the cytosol and is subsequently imported into the mitochondria and processed to 30 kDa mature forms of the protein. In the mouse there is a

highly conserved motif in the signal sequence portion of the molecule which predicts a two cleavage event (24). However, this motif is not present in the human, and bovine StAR proteins (11,12), indicating that there may be only one StAR precursor protein present in these species. The observed size of the larger protein seen in the present studies is consistent with that predicted for the StAR precursor.

It was also observed that the mouse StAR cDNA probe hybridizes with multiple mRNA species in samples purified from the bovine CL, a finding similar to that described for the mouse (10), human (11), sheep (13) and cow (12). In the present study, the major band at 2.9 kb and a minor band at 1.8 kb confirm the findings of Hartung et al. (12) in which a homologous probe was employed. They are also more similar to observations from the ovine CL (13), than to human findings where the smaller (1.6 kb) band predominates (11).

The significance of the presence of two messages is not known at this time. The open reading frame coding for the mature human StAR protein of 285 amino acids is 855 nt (11), and the bovine protein of 284 amino acids requires 852 codons (12). Thus, both bovine messages could, in theory, produce the bovine protein. However, the smaller message is not of sufficient length to have the coding region and the 5' and 3' untranslated regions which characterize the human cDNA (14), and the difference may be due to variations in the untranslated portion of the mRNA. Hartung et al. (12), found that a probe derived from the 3' region of the bovine StAR cDNA only hybridized to the larger message, which they interpreted to indicate the difference between the two species of mRNA was due to the extent of polyadenylation.

The results of the present study differ from those of Hartung et al. (12), as we have demonstrated the presence of

StAR mRNA in bovine theca and granulosa cells. Both of these ovarian cell types are steroidogenic, and there is a large body of information to indicate that steroid synthesis in these tissues is cAMP dependent in mammals (25). Thus, it was not surprising that both theca and granulosa contain the message for StAR and P450scc, and it is somewhat puzzling that no StAR message was detected by Hartung et al. (12).

Previous studies have suggested that the protein is not present in human or mouse placenta (26). Hartung et al. (12) report the absence of StAR mRNA in bovine endometrium of pregnancy, but it is not clear whether they studied placental complexes or the intercaruncular region of the uterus. The unequivocal occurrence of StAR mRNA in bovine caruncles and cotyledons in the present study represents the first demonstration of its presence in placenta. It is well known that the bovine placenta is steroidogenic, and has the enzymatic activity of both P450scc and 3BHSD (27).

In the present investigation, it was possible to detect P450scc mRNA throughout development and function of the CL, and at least 24 h after PGF₂ α treatment. The studies of Rodgers (3,4) suggest that mRNA levels for this enzyme are lower in developing (Stage I) than in mature (Stage II and III) CL, a finding not borne out by the present study. Our findings are consistent with the interpretation that this message, while variable among individuals, is not greatly different through the secretory lifespan of the bovine CL. In the rat CL, P450scc expression has been described as constitutive and independent of gonadotropins/cAMP (28). The occurrence of relatively invariable message levels in the bovine CL throughout the luteal phase concurs with that view. In spite of differences in the experimental model (i.e. superovulated vs. untreated cows), the time course of P450scc message loss from the bovine CL

following treatment with $\text{PGF}_{2\alpha}$ is consistent between the present study and in an earlier report (7). Together these findings can be interpreted as further evidence for constitutive expression of this gene. This conclusion is based on the absence of significant reduction in message abundance over the first 12 h after $\text{PGF}_{2\alpha}$ treatment, the period during which there is loss of LH receptors (29) and uncoupling of receptor-cAMP connections (30) in this tissue. It should, however, be noted that the P450scc mRNA signal was undetectable in Stage IV CL, indicating that there is complete loss during regression. Further, in luteinized porcine granulosa cells, LH and cAMP elevate P450scc mRNA abundance, and $\text{PGF}_{2\alpha}$ treatment reduces this stimulation in a time and dose dependent manner (8), demonstrating that regression interferes with the expression of this gene.

Regression of the bovine CL is associated with the loss of expression of StAR and its gene products. This is indicated by the absence of detectable message in Stage IV CL, and by the temporal sequence of reduction in abundance of the message over the 24 h after administration of luteolytic doses of $\text{PGF}_{2\alpha}$. This finding concurs with the recent report of a decline of over 90% in the abundance of StAR message in ovine CL following treatment of the animals with $\text{PGF}_{2\alpha}$ (13). In the present study, it was surprising to find a small amount of StAR protein in the extract from a CL presumed to be regressed, and in which there was no detectable StAR mRNA. This finding is reminiscent of the presence of 3 β HSD protein in ovine and bovine CL late in regression (9). The regulation of StAR protein synthesis is acute, the half life of the active precursor form is brief and the coupling between message and protein synthesis is very tight (15). However, while the half life of the StAR mRNA is relatively short, the half life of the 30 kDa mature, but inactive, form of StAR protein is quite long (14,15). Thus, the presence of

the 30 kDa mature form of the StAR protein during a time when steroidogenesis is quiescent suggests that it is also in an inactive form, as has previously been shown to exist in MA-10 cells. Alternatively, there may be low levels of message present which escaped detection by the relatively insensitive method of Northern blotting.

In conclusion, we have provided evidence that, in addition to its mRNA, the newly discovered steroidogenic protein, StAR is present in bovine corpora lutea. We have also shown the first occurrence of the StAR message in placental tissue. StAR message and protein vary during the bovine luteal phase, with both message and protein low during luteal development, elevated in active CL, and virtually absent in regressed CL. A number of questions remain to be answered relative to its occurrence in luteal cell subpopulations and its regulation in the CL.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Mira Dobias and Deborah Alberts for technical assistance. Special thanks are extended for the generous gifts of probes to Drs. M. Waterman for P450scc and G. Schultz for 28S.

REFERENCES

1. Smith MF, McIntush EW, Smith GW. Mechanisms associated with corpus luteum development. *J Anim Sci* 1994; 72:1857-1872.
2. Niswender GD, Nett TM. The corpus luteum and its control in infraprimate species. In: Knobil E, Neill JD (eds.), *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press; 1994; Vol 1:781-816.

3. Rodgers RJ, Waterman MR, Simpson ER. Cytochromes P-450_{scc}, P-450_{17 α} , adrenodoxin, and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome P-450 reductase in bovine follicles and corpora lutea. Changes in specific contents during the ovarian cycle. *Endocrinology* 1986; 118:1366-1374.
4. Rodgers RJ, Waterman MR, Simpson ER. Levels of messenger ribonucleic acid encoding cholesterol side-chain cleavage cytochrome P-450, 17 α -hydroxylase cytochrome P450, adrenodoxin and low density lipoprotein receptor in bovine follicles and corpora lutea throughout the ovarian cycle. *Molec Endocrinol* 1987; 1:274-279.
5. Couët J, Martel C, Dupont E, Luu-The V, Sirard MA, Zhao H-F, Pelletier G, Labrie F. Changes in 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 isomerase messenger ribonucleic acid, activity and protein levels during the estrous cycle in the bovine ovary. *Endocrinology* 1990; 127: 2141-2148.
6. Hawkins DE, Belfiore CJ, Kile JP, Niswender GD. Regulation of messenger ribonucleic acid encoding 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 isomerase in the ovine corpus luteum. *Biol Reprod* 1993; 48:1185-1190.
7. Tian XC, Berndtson AK, Fortune JE. Changes in levels of messenger ribonuclei acid for cytochrome P450 side-chain cleavage and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase during prostaglandin F_{2 α} -induced luteolysis in cattle. *Biol Reprod* 1994; 50:349-356.
8. Li X-M, Juorio AV, Murphy BD. 1993. Prostaglandins alter the abundance of messenger ribonucleic acid for steroidogenic enzymes in cultured porcine granulosa cells. *Biol Reprod* 1993; 48:1360-1366.
9. Conley AJ, Kaminski MA, Dubowsky SA, Jablonka-Shariff A, Redmer DA and Reynolds LP. Immunohistochemical localization of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase and P450

- 17 α -hydroxylase during follicular and luteal development in pigs, sheep, and cows. *Biol Reprod* 1995; 52:1081-1094.
10. Clark BJ, Wells J, King SR, Stocco, DM. The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. *J Biol Chem* 1994; 269:28314-28322.
 11. Sugawara T, Holt JA, Driscoll D, Strauss III JF, Lin D, Miller WL, Patterson D, Clancy KP, Hart IM, Clark BJ, Stocco DM. Human steroidogenic acute regulatory protein: Functional activity in COS-1 cells, tissue-specific expression, and mapping of the structural gene to 8p11.2 and a pseudogene to chromosome 13. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:4778-4782.
 12. Hartung S, Rust W, Balvers M, Ivell R. Molecular cloning and in vivo expression of the bovine steroidogenic acute regulatory protein. *Biochem Biophys Res Comm* 1995; 215:646-653.
 13. Juengel JL, Meberg BM, Turzillo AM, Nett TM, Niswender GD. Hormonal regulation of messenger ribonucleic acid encoding steroidogenic acute regulatory protein in ovine corpora lutea. *Endocrinology* 1995; 136:5423-5429.
 14. Stocco DM, Sodeman TC. The 30-kDa mitochondrial proteins induced by hormone stimulation in MA-10 mouse Leydig tumor cells are processed from larger precursors. *J Biol Chem* 1991; 266:19731-19738
 15. Clark BJ, Soo S-C, Caron KM, Ikeda, Y, Parker KL, Stocco DM. Hormonal and developmental regulation of the steroidogenic acute regulatory protein. *Molec Endocrinol* 1995; 9:1346-1355
 16. Ireland JJ, Murphree RL, Coulson BP. Accuracy of predicting stages of bovine estrous cycle by gross appearance of the corpus luteum. *J Dairy Sci* 1980; 63:155-160.

17. Fortune JE, Hansel W. The effects of 17β -estradiol on progesterone secretion by bovine theca and granulosa cells. *Endocrinology* 1979; 104:1834-1838.
18. Sorensen AM, Beverly JR. Determining pregnancy in cattle. 1979; Bull. B-1077, Texas Ag Exp Stat: College Station, 15 p.
19. John ME, John MC, Ashley P, MacDonald RJ, Simpson ER, Waterman MR. Identification and characterization of cDNA clones specific for cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81:5628-5632.
20. Chedrese, PJ, Luu The V, Labrie F, Juorio AV, Murphy BD. Evidence for the regulation of 3β -hydroxysteroid dehydrogenase messenger RNA by human chorionic gonadotrophin in luteinized porcine granulosa cells. *Endocrinology* 1990; 126:2228-2230.
21. Lowry OH, Rosebrough NV, Farr AL, Randall RJ. Protein measurements with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-275.
22. King SR, Ronen-Fuhrmann T, Timberg R, Clark BJ, Orly J, Stocco DM. Steroid production after the in vitro transcription, translation and mitochondrial processing of protein products of complementary deoxyribonucleic acid for the steroidogenic acute regulatory protein. *Endocrinology* 1995; 136:5165-5176
23. Epstein LF, Orme-Johnson NR. Regulation of steroid hormone biosynthesis: Identification of precursors of a phosphoprotein targeted to the mitochondrion in stimulated rat adrenal cortex cells. *J Biol Chem* 1991; 266:19739-19745
24. Hendrick JP, Hodges PE, Rosenberg LE. Survey of amino-terminal proteolytic cleavage sites in mitochondrial precursor proteins: Leader peptides cleaved by two matrix proteases share a three-amino acid motif. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:4056-4060.

25. Gore-Langton RE, Armstrong DT. Follicular steroidogenesis and its control. In: Knobil E, Neill JD (eds.), *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press; 1993, Vol. 1: 571-628.
26. Strauss III JF, Martinez F, Kiriakidou M. Placental steroid hormone synthesis: Unique features and unanswered questions. *Biol Reprod* 1996; 54:303-311.
27. Shemesh M, Hansel W, Strauss JF, Shore LS. Regulation of side-chain cleavage enzyme and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase by Ca²⁺, second messenger and protein kinase C in the placenta. *J. Reprod Fert* 1989; Suppl 37:163-172.
28. Richards JS. Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocrin Rev* 1994; 15:725-751.
29. Spicer LJ, Ireland JJ, Roche JF. Changes in serum LH, progesterone, and specific binding of ¹²⁵I-hCG to luteal cells during regression and development of bovine corpora lutea. *Biol Reprod* 1981; 25:832-841.
30. Pate JL, Condon WA. Effects of prostaglandin F_{2 α} on agonist-induced progesterone production in cultured bovine luteal cells. *Biol Reprod* 1984; 31:427-435.

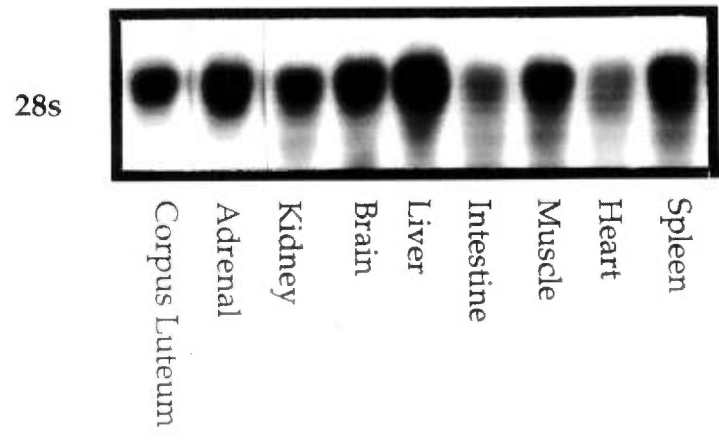
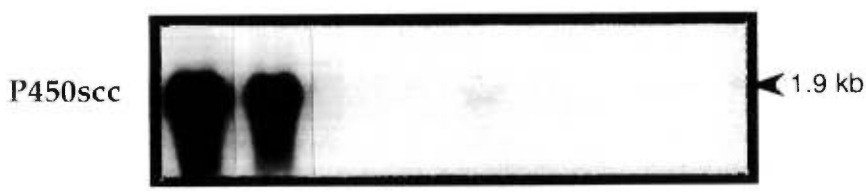
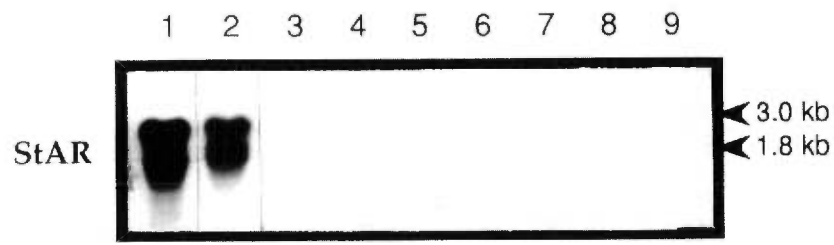


Figure 1a. Autoradiogram of Northern blots from electrophoresis of 15 μ g total RNA purified from bovine tissues including corpus luteum, adrenal, kidney, brain, liver, intestine, muscle, heart and spleen. Blots were hybridized with the 1.6 kb full length mouse probe for steroidogenic acute regulatory protein (StAR), a 1.7 kb cDNA representing a portion of the sequence for cytochrome P450side chain cleavage enzyme (P450scc), stripped and hybridized with a 1.4 kb fragment from the internal region of the 28S ribosomal RNA gene. Approximate transcript sizes were derived from a RNA ladder which was subject to electrophoresis along with the samples in question.

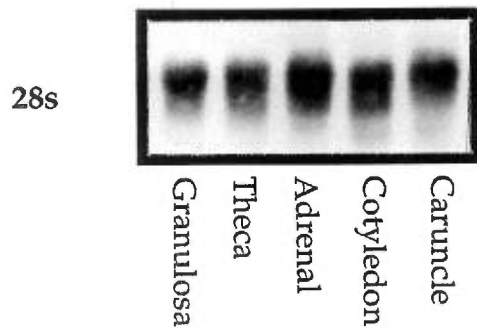
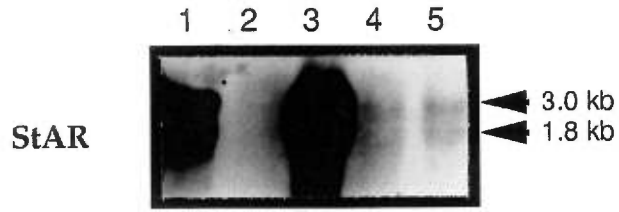


Figure 2a. Autoradiogram of Northern blots from electrophoresis of 15 μ g total RNA from granulosa cells aspirated from 5-10 mm bovine follicles, theca dissected from the exterior of follicles in the same diameter range, adrenal, and cotyledon and caruncle from the uterus of a cow estimated to be 260-280 days pregnant (18). Probes employed as in Fig. 1. The StAR blot was autoradiographed for 3 days to provide the photograph in this figure. The StAR message was visible in the theca lane after 7 days of autoradiography (data not shown).

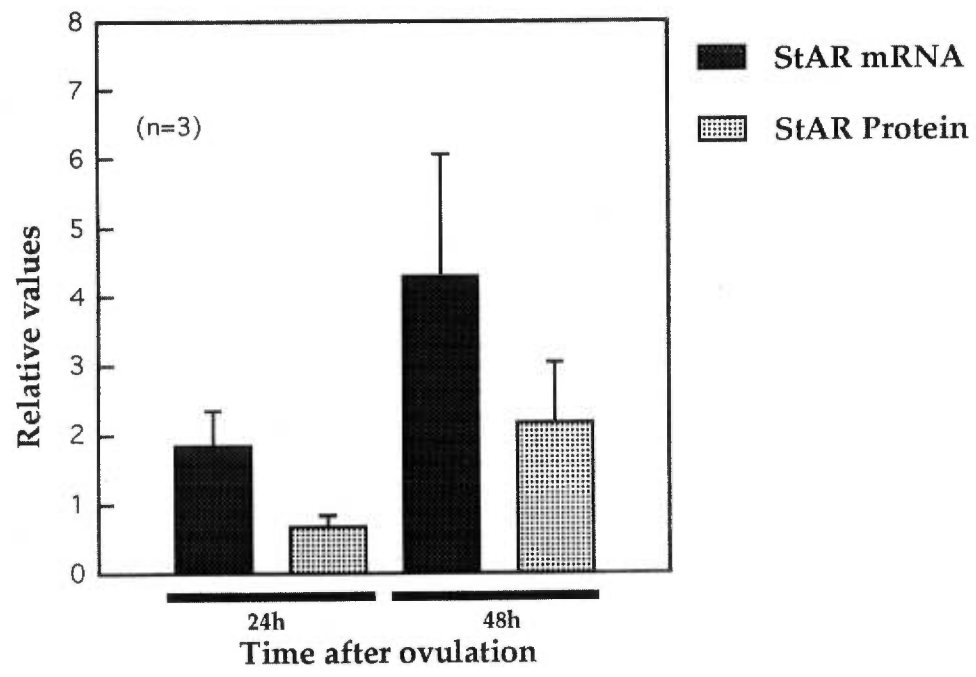
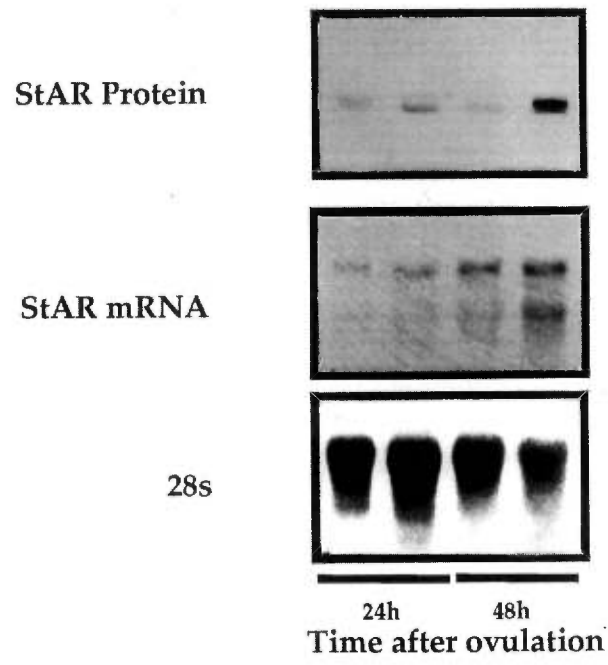


Figure 3a. Western blot of bovine luteal mitochondrial protein showing the relationship between StAR mRNA and StAR protein in bovine CL taken from 6 cows, 3 at 24 h and 3 at 48 h after ovulation was confirmed by transrectal echography. The blot was incubated with primary antibodies against mouse StAR and with second antibody conjugated to horseradish peroxidase. The consequent signal was detected by chemiluminescence and quantitated by computer-assisted densitometry. No statistical difference could be detected between the two time periods for either StAR RNA or StAR protein. Bars represent mean \pm SEM for CL from 3 cows.

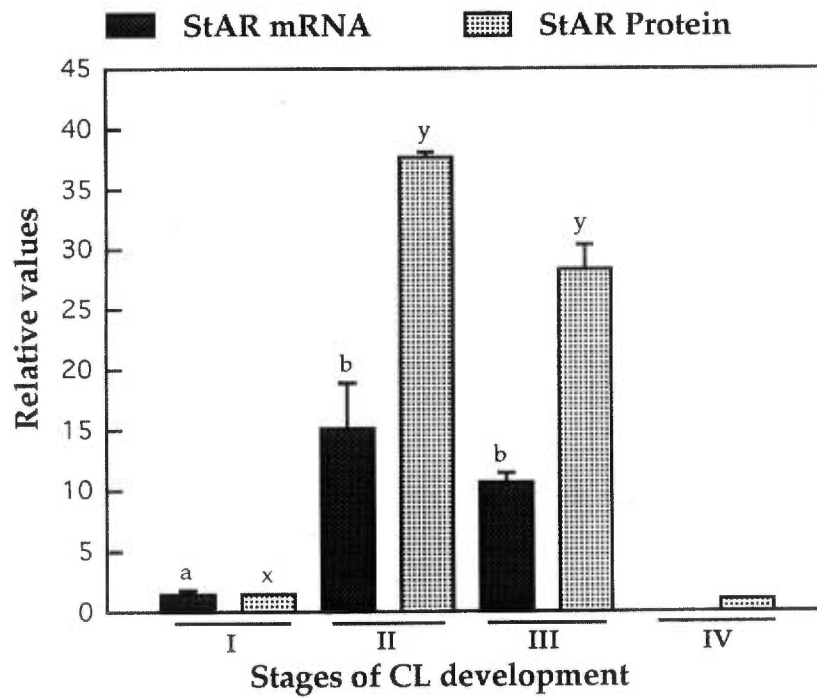
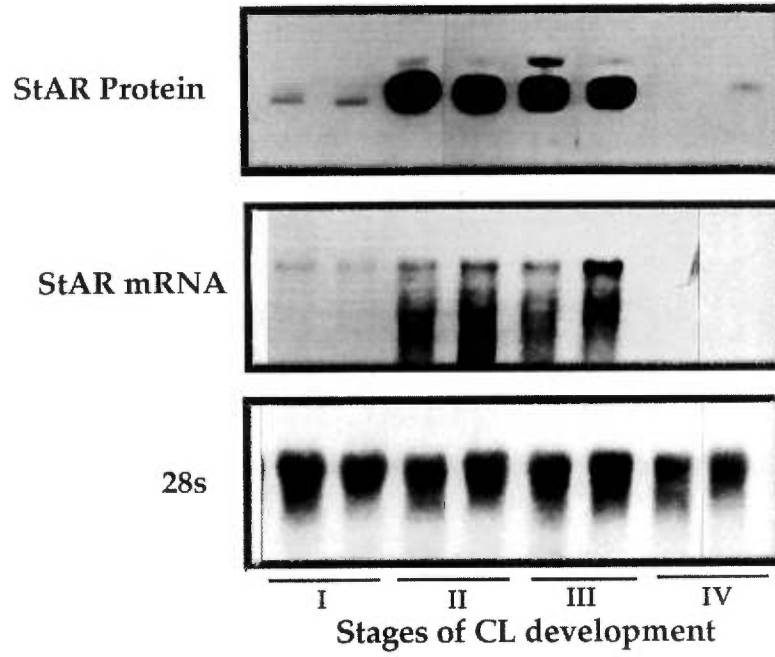
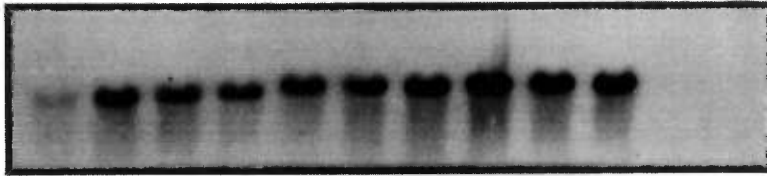
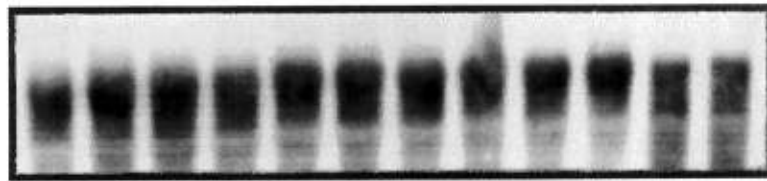


Figure 4a. StAR mRNA and StAR protein in samples of CL from slaughtered cows. Stage of the luteal phase (I-IV) was determined according to the morphological criteria of Ireland et al. (16) and validated by histological analysis. Northern and Western blotting and quantification were achieved as described above. Bars represent mean \pm SEM for CL from 3-9 cows. Different superscripts represent significant differences ($p < 0.01$) for mRNA (a,b) and protein (x,y).

P450_{scc} mRNA



28s



24h

48h

I

II

III

IV

Stages of CL development

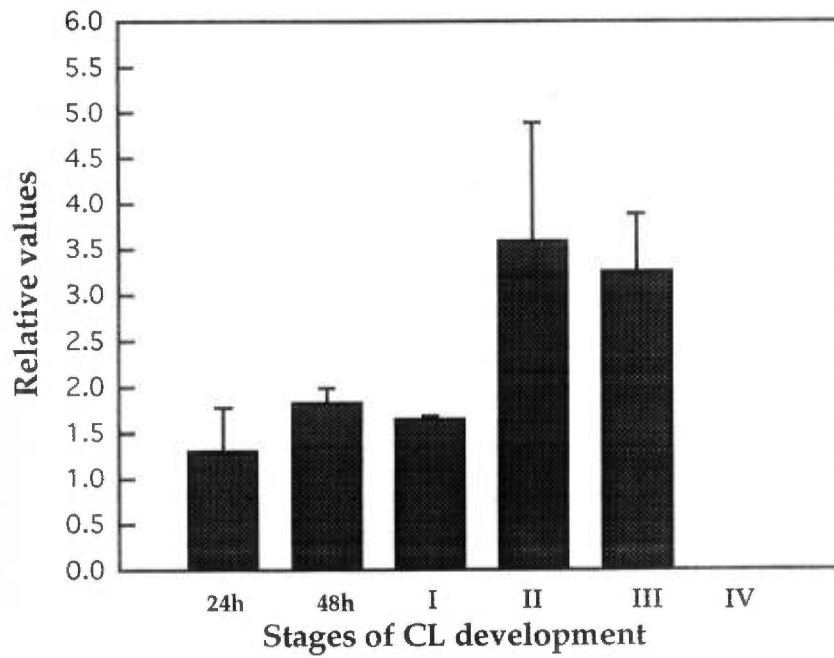


Figure 5a. P450_{scc} mRNA in bovine CL from samples taken at 24 and 48 h after confirmed ovulation (n=3) or CL from slaughtered animals classified in Stages I-IV of the luteal phase as described in the legend to Fig. 4 (n=3-9). Quantification of mRNA was achieved as described in the legend to Fig. 3. No message was detectable in Stage IV CL. No significant differences could be detected in RNA abundance among the samples from 24 and 48 h after ovulation and Stages I-III.

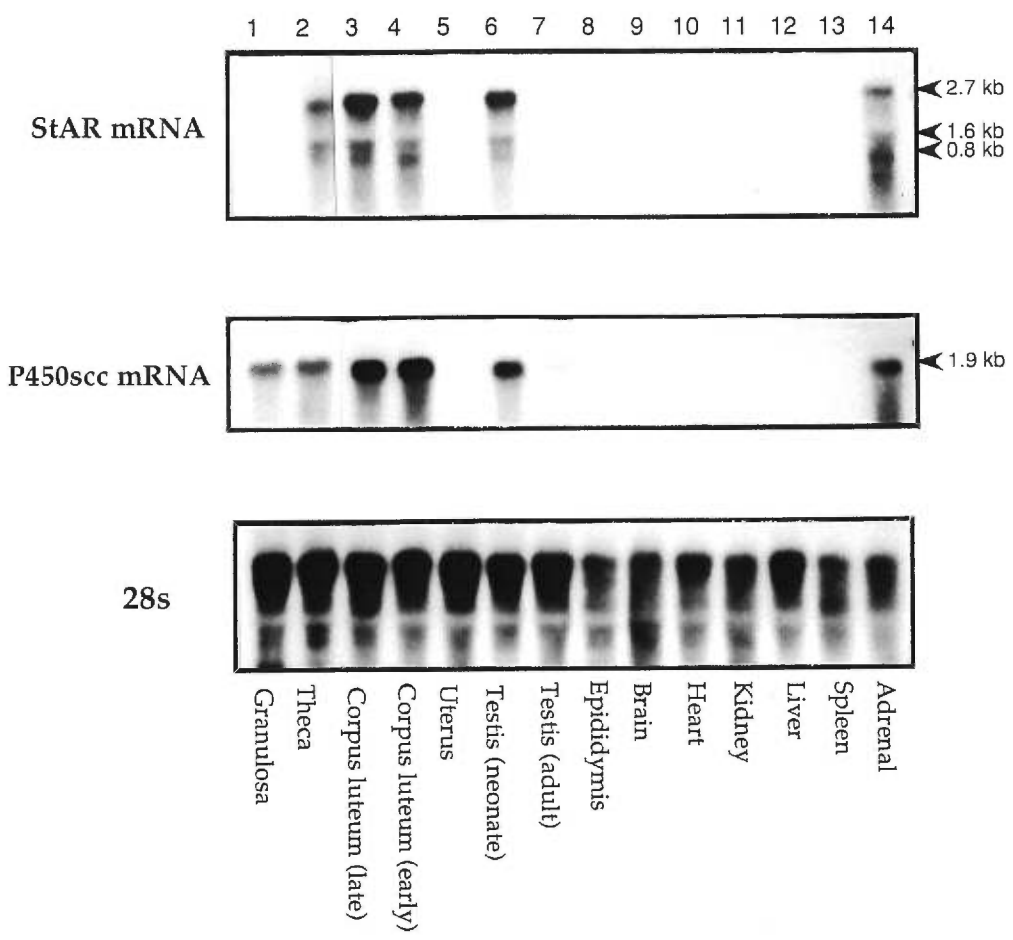


Figure 6a. Disappearance of StAR mRNA following a luteolytic dose (500 μ g) prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$). The autoradiograms of Northern blots are examples of individual animals, treated with 2500 iu equine chorionic gonadotrophin (eCG) or with 8 injections of 2.25 mg FSH. The cows were then subjected to ovariectomy at 24 h before $PGF_{2\alpha}$, at the time of $PGF_{2\alpha}$, or 12 or 24 h after $PGF_{2\alpha}$. The graph represents the mean \pm SEM of the mRNA in question, quantified as described above for groups of three or four cows treated with FSH and in which luteal regression was induced with $PGF_{2\alpha}$.

CHAPITRE III

Follicle-stimulating Hormone and Intracellular Second Messengers Regulate Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR) mRNA in Luteinized Porcine Granulosa Cells.¹

**Nazario Pescador², Alain Houde^{2,3} Douglas M. Stocco⁴
and Bruce D. Murphy^{2,5}**

Centre de recherche en reproduction animale², Faculté de médecine vétérinaire
Université de Montréal, St.-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6
Department of Cell Biology and Biochemistry⁴, Texas Tech Health Sciences Center,
Lubbock, Texas 79430

Short title: FSH, cAMP and StAR

Key words: steroidogenesis, StAR, trophic hormones, granulosa cells, luteinization.

¹Supported by MRC Canada grant MT10118 to B.D.M. and NIH HD 17481 to D.M.S. N. Pescador is a recipient of a graduate fellowship from CONACYT, Mexico.

³Current address: Centre de recherche et de développement sur les aliments,
Agriculture et Agroalimentaire Canada,
3600, boul. Casavant ouest, St.-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 8E3

⁵Correspondence, Fax 514 778 8103, e-mail
murphyb@ere.umontreal.ca

Follicle-Stimulating Hormone and Intracellular Second Messengers Regulate Steroidogenic Acute Regulatory Protein Messenger Ribonucleic Acid in Luteinized Porcine Granulosa Cells¹

Nazario Pescador,⁴ Alain Houde,^{3,4} Douglas M. Stocco,⁵ and Bruce D. Murphy^{2,4}

Centre de recherche en reproduction animale,⁴ Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6

Department of Cell Biology and Biochemistry,⁵ Texas Tech Health Sciences Center, Lubbock, Texas 79430

ABSTRACT

Ligand- and second messenger-regulated expression of the gene for steroidogenic acute regulatory protein (StAR) was evaluated in luteinized porcine granulosa cells. For comparison, cytochrome P450 side-chain cleavage (P450_{sc}) was examined. Northern hybridization with homologous cDNA probes demonstrated three StAR mRNA species, of 2.7, 1.6, and 0.8 kilobases (kb), with the smallest variably present, and a single P450_{sc} band at 1.9 kb. FSH elevated both StAR and P450_{sc} messages in a dose-dependent manner over 6 h and continually stimulated both over 24 h ($p < 0.001$). StAR message induction depended on transcription, as did that of P450_{sc}. Over 6 h, actinomycin D eliminated constitutive StAR message and reduced that of P450_{sc} by two thirds, indicating briefer persistence of StAR. Pretreatment with cycloheximide prevented FSH induction of StAR and P450_{sc} mRNA, implicating intermediate protein synthesis in expression of both genes. Dibutyl cAMP caused time-dependent increases in StAR and P450 mRNAs over 24 h ($p < 0.001$), indicating the importance of the protein kinase A (PKA) pathway in their gene expression. Activation of the protein kinase C (PKC) pathway by a phorbol ester eliminated FSH induction of StAR mRNA increases ($p < 0.01$) while only reducing P450_{sc} induction ($p < 0.05$). Thus, StAR gene expression, as reflected in mRNA abundance, is regulated by FSH via the PKA pathway and is dependent on transcription and translation. Conversely, the PKC pathway inhibits induction of these important steroid synthetic genes in luteinized granulosa cells.

INTRODUCTION

It was shown some 35 yr ago that acute regulation of steroidogenesis has, as an absolute requirement, the de novo synthesis of protein [1]. A single protein that appears to be the essential regulatory element for tropic stimulation of steroidogenesis was recently purified from mouse MA-10 Leydig tumor cells [2]. It has been designated the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and is believed to function by facilitating delivery of cholesterol to the inner mitochondrial membrane, where it can then serve as substrate for cytochrome P450 side-chain cleavage (P450_{sc}), thereby initiating the steroidogenic process (re-

viewed in [3]). The structural motif of StAR includes a signal sequence for targeting to the mitochondrion, but recent studies have indicated that this sequence may not be necessary for its activity [4].

StAR mRNA and/or protein have been shown to be present in the ovary of several species of mammals, including the mouse [5], rat [6, 7], human [8], sheep [9], cow [10, 11], and pig [12–14]. Increases in StAR mRNA are induced in ovarian cells by FSH [15], FSH and LH [13], and cAMP [8, 15], implicating the protein kinase A (PKA) intracellular second messenger pathway. However, gonadotropins are not the sole tropic hormone influence, as a recent report indicates synergy between insulin-like growth factor (IGF)-I and FSH in elevation of the abundance of StAR transcripts in porcine granulosa cells [15]. Likewise, long-term treatment of these cells with estrogen (48 h) resulted in accumulation of StAR mRNA [13]. A role for estrogen in the maintenance of StAR protein has also been demonstrated in the rabbit ovary, where this hormone is luteotrophic [16].

Gonadotropins stimulate both the PKA and protein kinase C (PKC) pathways in ovarian steroidogenic tissue [17]. Activation of the PKC pathway by treatment with a phorbol ester (phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA) modulates steroidogenesis. This occurs in part by regulation of the expression of steroid biosynthetic enzyme genes, including P450_{sc} [18, 19] and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β HSD [20]). Conflicting evidence has emerged on the role of the PKC pathway in regulation of StAR gene products. Activation of PKC by PMA elevated expression of StAR protein in the adrenal cortex [21, 22] and in MA-10 Leydig tumor cells [23]. In contrast, PMA had no effect on constitutive or ACTH-stimulated StAR mRNA increases in primary cultures of adrenal cells [24]. The third possibility, inhibition of StAR gene expression by PKC, was indicated by experiments in which treatment of ewes with PMA reduced the abundance of StAR transcripts in corpora lutea collected at 4 and 12 h after initiation of infusion [9].

The presence of StAR protein is dependent on ongoing translation of mRNA, as treatment of cells with the translation inhibitor cycloheximide (CHX) eliminates StAR activity [2]. However, the effect of CHX on transcription of steroidogenic enzymes varies not only between enzymes and species, but also in the same enzyme between tissues in the same species. For example, the accumulation of the message for P450_{sc} was stimulated by cAMP in human granulosa cells [25], and this stimulation appeared unaffected by CHX treatment. However, in human placenta [26] and in JEG-3 choriocarcinoma cells [27], the gonadotropin- and cAMP-induced elevations in P450_{sc} transcript abundance were inhibited by CHX. P450_{sc} expression was un-

Accepted May 8, 1997.

Received February 10, 1997.

¹Supported by MRC Canada grant MT10118 to B.D.M. and NIH HD 17481 to D.M.S. N.P. is a recipient of a graduate fellowship from CONACYT, Mexico, and is on leave from Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, México.

²Correspondence: Bruce D. Murphy, Centre de recherche en reproduction animale, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, 3200 rue Sicotte, St-Hyacinthe, PQ, Canada J2S 7C6. FAX: (514) 778-8103; e-mail: murphyb@ere.umontreal.ca

³Current address: Centre de recherche et de développement sur les aliments, Agriculture et Agroalimentaire Canada, St. Hyacinthe, PQ, Canada J2S 8E3.

RÉSUMÉ

L'expression du gène codant pour la protéine de régulation rapide de la stéroïdogénèse (StAR) a été évaluée dans des cellules de la granulosa porcine lutéinisées. Pour comparaison, le cytochrome P450 qui clive la chaîne latérale du cholestérol (P450scc) a été examiné. L'hybridation avec des sondes d'ADNc homologues ont montré trois espèces d'ARN pour StAR de 2,7, 1,6, et 0,8 kilobases (kb), la plus petite n'étant pas toujours détectable. Une seule bande du P450scc, à 1,9 kb, a été observée. Un traitement à la FSH a produit une augmentation des messages de la StAR et du P450scc d'une façon dose dépendante aux 6h et elle a maintenu cette stimulation sur 24h ($p < 0,001$). L'induction des messages de la StAR et du P450scc a été dépendante de la transcription. En 6h, l'actinomycine D a éliminé le message constitutif de la StAR et a réduit celui du P450scc des deux tiers, et a mis en évidence une brève persistance de la StAR. Le pré-traitement avec cycloheximide a empêché l'induction des ARNm de la StAR et du P450scc par la FSH, suggérant ainsi la participation d'une synthèse protéique intermédiaire dans l'expression des deux gènes. Le dibutyryl d'AMPc produit des augmentations dépendant du temps des ARNm de la StAR et du P450scc dans les 24h ($p < 0,001$), indiquant ainsi l'importance de la voie de la protéine kinase A (PKA) dans leur expression génique. L'activation de la voie de la protéine kinase C (PKC) par un ester de phorbol a empêché les augmentations de l'ARNm de la StAR induites par la FSH ($p < 0,01$), mais seulement produit une réduction de l'induction du P450scc ($P < 0,05$). Ainsi, l'expression du gène de la StAR, évaluée par l'abondance de son ARNm, est contrôlée par la FSH à travers la voie PKA et est dépendante de la transcription et la traduction. En contraste, la voie PKC inhibe l'induction de ces deux gènes importants dans la

synthèse des stéroïdes dans les cellules de la granulosa lutéinisées.

ABSTRACT

Ligand and second messenger-regulated expression of the gene for steroidogenic acute regulatory protein (StAR) was evaluated in luteinized porcine granulosa cells. For comparison, cytochrome P450 side chain cleavage (P450scc) was examined. Northern hybridization with homologous cDNA probes demonstrated three StAR mRNA species, 1.7, 1.6 and 0.8 kb, with the smallest variably present, and a single P450scc band at 1.9 kb. FSH elevated both StAR and P450scc messages in a dose-dependent manner over 6 h and continually stimulated both over 24 h. StAR message induction depended on transcription, as did P450scc. Over 6 h, actinomycin D eliminated constitutive StAR message and reduced P450scc by two thirds, indicating briefer persistence of StAR. Pre-treatment with cycloheximide prevented FSH induction of StAR and P450scc mRNA, implicating intermediate protein synthesis in expression of both genes. Dibutryl cAMP caused time-dependent increases in StAR and P450 mRNA over 24 h, indicating the importance of the protein kinase A pathway in their gene expression. Activation of the protein kinase (PKC) pathway by a phorbol ester eliminated FSH induction of StAR mRNA increases, while only reducing P450scc induction. Thus, StAR gene expression, as reflected in mRNA abundance, is regulated by FSH via the PKA pathway, and is dependent on transcription and translation. Conversely, the PKC pathway inhibits induction of these important steroid synthetic genes in luteinized granulosa cells.

INTRODUCTION

It was shown some 35 years ago that acute regulation of steroidogenesis has, as an absolute requirement, the de novo synthesis of protein (1). A single protein that appears to be the essential regulatory element necessary for trophic stimulation of steroidogenesis, was recently purified from mouse MA-10 Leydig tumor cells (2). It has been designated the steroidogenic acute regulatory protein (StAR), and is believed to function by facilitating delivery of cholesterol to the inner mitochondrial membrane, where it can then serve as substrate for cytochrome P450side chain cleavage (P450scc), thereby initiating the steroidogenic process (reviewed in 3). The structural motif of StAR includes a signal sequence for targeting to the mitochondrion, but recent studies have indicated that this sequence may not be necessary for its activity (4).

StAR mRNA and/or protein have been shown to be present in the ovary of several species of mammals, including the mouse (5), rat (6,7), human (8) sheep (9), cow (10,11) and pig (12,13). Increases in StAR mRNA are induced in ovarian cells by FSH (14), FSH and LH (13) and cAMP (8,14), implicating the protein kinase A (PKA) pathway. Nevertheless this is not the sole trophic hormone influence, as a recent report indicates synergy between insulin like growth factor I (IGF-I) and FSH in elevation of the abundance of StAR transcripts in porcine granulosa cells (14). Likewise, long term treatment of these cells with estrogen (48 h) resulted in accumulation of StAR mRNA (13). A role for estrogen in the maintenance of StAR protein has also been demonstrated in the rabbit corpus luteum where this hormone is luteotrophic (15).

It is known that gonadotropins stimulate both the PKA and protein kinase C (PKC) pathways in ovarian steroidogenic

tissue (16). Activation of the PKC pathway by treatment with a phorbol ester (phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA) *in vitro* modulates steroidogenesis. This occurs in part by regulation of the expression of steroid biosynthetic enzyme genes, including cytochrome P450 side chain cleavage (P450_{scc}, 17,18) and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -HSD, 19). Conflicting evidence has emerged on the role of the PKC pathway in regulation of StAR gene products. Activation of PKC by PMA elevated expression of StAR protein in the adrenal cortex (20,21) and in MA-10 Leydig tumor cells (22). In contrast, treatment of primary cultures of adrenal cells with PMA, and inhibition of PKC had no effect on constitutive or ACTH-induced expression of StAR mRNA (23). An inhibitory influence of the PKC pathway was further indicated by experiments in which treatment of ewes with PMA reduced the abundance of StAR transcripts in corpora lutea collected at 4 and 12 h after initiation of infusion (9).

The presence of the StAR protein is dependent on ongoing translation of mRNA, as treatment of cells with the translation inhibitor, cycloheximide (CHX) eliminates StAR activity (2). However, the effect of CHX on transcription of steroidogenic enzymes varies, not only between enzymes and species, but also between the same enzyme in different tissues of the same species. For example, the accumulation of the message for P450_{scc} was stimulated by cAMP in human granulosa cells (24) and this stimulation appeared unaffected by CHX treatment. However, in human placenta (25) and in JEG-3 choriocarcinoma cells (26) the gonadotropin and cAMP-induced elevations in P450_{scc} transcript abundance were inhibited by CHX. P450_{scc} expression was unaffected by CHX in MA-10 cells (27) and CHX had no apparent effect on gonadotropin induced 3 β -HSD mRNA in luteinized porcine granulosa cells (28).

A recent study shows that co-treatment of MA-10 cells with CHX reduced, but did not eliminate the cAMP-induced elevations in StAR mRNA (29). Given the significance of protein translation to the function of StAR, it was deemed important to investigate the effects of CHX on ligand-induced StAR message abundance in the granulosa cell model.

These experiments were aimed at further characterizing the ligand control of StAR expression in luteinized porcine granulosa cells, including the role of second messenger pathways and the effects of inhibition of transcription and translation on StAR mRNA. For comparative purposes, the concomitant abundance of P450_{scc} transcripts was also studied.

MATERIALS AND METHODS

Tissue Collection and Cell Culture

Porcine ovaries from prepubertal gilts were collected from the abattoir, granulosa cells were aspirated from medium-sized (3-5 mm) follicles and cultured as previously described (30). Briefly, 3×10^6 viable cells/ml were pooled in minimum essential medium (MEM, Gibco BRL, Burlington, ON) containing 4.8 g/l HEPES (Gibco BRL), 2.2 g/L sodium bicarbonate (Sigma, St. Louis MO), 1 mg/l insulin (Sigma), 0.1 mM non-essential amino acids (Gibco BRL), 5×10^4 IU/l penicillin (Gibco BRL), 50 mg/l streptomycin (Gibco BRL), 0.5 mg/l fungizone (Gibco BRL), and 10% fetal calf serum (Gibco BRL). Incubations were carried at 37 C in 95% humidified air with 5% CO₂. At 48 h after initiation of culture, the cells were washed, and medium was replaced with serum-free medium. At 96 h the medium was removed from each well and treatments were initiated by addition of experimental reagents in the medium. Control cultures were incubated in medium alone. For determination of

StAR mRNA tissue distribution, tissues were taken from adult and prepubertal pigs, including the ovarian theca and granulosa cells, uterus, testes, epididymis, brain, heart, kidney, liver, spleen, and adrenal gland. Corpora lutea were collected from the early and late luteal phase of cycling animals as identified by morphological criteria (31).

Experiments

To evaluate the effects of FSH stimulation on StAR message, cells were incubated with 0, 10, 40, or 100 ng/ml porcine FSH (Sigma) and collected for RNA purification at 6 h after initiation of treatment. To determine the time course of FSH stimulation and the effects of blockade of gene transcription, cells were exposed to FSH (200 ng/ml) or actinomycin-D (ActD, 5 μ g/ml, Sigma) at the time of addition of FSH. Cultures were terminated at 0, 6, 12, and 24 h after initiation of FSH treatment. To determine the dependence of StAR mRNA on translation, cells were pretreated for 30 minutes with CHX (40 μ M, Sigma), and then treated with FSH (200 ng/ml) or medium alone. Cells were collected at 0, 6, 12, and 24 h after initiation of FSH treatment. Subsequent trials were designed to explore the effects of activation of PKC pathway by PMA on FSH-induced accumulation of StAR. Cells were incubated with FSH (100 ng/ml) alone or in combination with PMA (10 nM, Sigma), with PMA (10 nM) alone or with medium. The cells were collected for RNA extraction at 6 h after treatment. To confirm the role of the PKA pathway in gonadotrophin-induced stimulation of StAR gene expression, cultures were treated with an analog of cAMP, dibutyryl cAMP (dbcAMP, 1 μ M, Sigma). To determine the temporal aspects of the response, cells were harvested at 0, 6, 12, and 24 h after initiation of dbcAMP or medium treatment.

RNA Analysis

Tissues and cultured cells were homogenized in 4 M guanidine isothiocyanate (Gibco BRL), 26.5 mM sodium acetate (Sigma), and 0.12 M β -mercaptoethanol (Sigma), and stored at -70 C until analysis. Total RNA was purified by centrifugation through a density gradient of 5.7 M CsCl. Aliquots of 15 μ g from each sample, assessed by the optical density at 260 nm, were subjected to electrophoresis on 1% agarose-formaldehyde gels using a 20 mM morpholinopropanesulfonic acid buffer (pH 7.0), transferred overnight to nylon membranes and cross-linked for 30 sec to 150 mJ in a UV chamber (Bio-Rad GS Gene Linker, Richmond, CA). Blots from tissues collected from the slaughterhouse and from cell culture were hybridized in sequence with three probes: a 0.85 kb cDNA representing the coding region of the porcine StAR cDNA sequence generated in our laboratory from the full length cDNA sequence present in Genbank (accession U53020), a 1.7 kb portion of the homologous P450scc cDNA donated by Dr. T. Wise, and a 1.4 kb fragment from an internal region of the human 28S rRNA gene kindly provided by Dr. G. Schultz. All probes were labeled with 32 P to specific activities of 1.5 to 3.0 $\times 10^9$ dpm/ μ g by random primer synthesis using a kit from Boehringer Mannheim (Laval, PQ,). Hybridization was conducted as previously described (11), two high-stringency washes (65 C) were then carried out and hybridized blots were autoradiographed. To provide a quantitative estimate of StAR mRNA the two major positive bands on the resultant autoradiograms were scanned individually using a computer imaging system. The areas of the each resultant curve were integrated by means of the Macintosh program, Collage, and summed. The single P450scc band and the 28S band were likewise scanned and the latter served as control for loading and transfer of RNA.

Statistical analyses

For graphical representation, data were calculated as the means (SEM) of the ratio of optical density values for the mRNA in question to that of 28S in three or four independent replicates of each experiment, each conducted on different days on different pools of cells. For statistical analysis, normality of distribution and homogeneity of variance of optical density values was confirmed by Shapiro's and Bartlett's tests, respectively. Overall statistical significance of each experiment was evaluated by analysis of covariance, with treatment, time (or dose where appropriate) and replicate as the main effects. To adjust for variation in pipetting and other potential sources of error, the 28S density value for each sample was designated its covariate (32). In the presence of a significant overall F value, individual comparisons between treatments were made by the least significant difference (LSD) method. Correlation analysis was employed to determine whether differential expression of the two principal StAR mRNA species occurred. The level of probability considered statistically significant was $p < 0.05$.

RESULTS

There were consistently two and often three transcripts which hybridized with the full length StAR cDNA in Northern analysis (Fig. 1b). The two principal bands migrated at approximately 2.7 and 1.6 kb, with the variably present band at 0.8 kb. StAR message was present in adrenal, ovarian theca, corpus luteum and the testes of both neonatal and adult pigs. The message was relatively more abundant in neonatal pig testis because at this developmental stage, this organ is comprised, for the most part, of Leydig cells, while tubular elements predominate in the adult. StAR mRNA was not

detected in ovarian stroma, freshly isolated granulosa cells, uterus, epididymis, kidney, liver, spleen, heart and brain. Correlation analysis of the 2.7 and 1.6 kb bands in all experiments revealed highly significant co-expression of these species of mRNA ($r=0.91-0.95$, $p<0.0001$). The P450scc message migrated as expected in a single band at approximately 1.9 kb, and was present in the theca, granulosa, corpus luteum, testis and adrenal tissues (Fig.1b).

StAR transcript levels, as indicated by Northern analysis and densitometry, were low and sometimes non-detectable in unstimulated cultures. This rendered inappropriate analysis of fold changes which ranged from 60 to greater than 100 fold in trophic hormone stimulated cells. There was no statistically definable effect of replicates nor of the 28S covariate within any of the experiments. This indicated homogeneity among replicates of each experiment and in the pipetting and transfer of samples of mRNA subjected to Northern analysis.

Analysis of covariance revealed significant treatment and dose effects of FSH on both StAR and P450scc transcript accumulation over 6 h ($p<0.001$). Individual comparisons demonstrated that the abundance of both messages was increased by all doses of FSH ($p<0.001$, Fig. 2b). There were significant treatment and time effects when cells were stimulated with a 200 ng/ml FSH for a periods of 0-24 h ($p<0.001$, Figs. 3b and 4b). Individual comparisons indicated that the response to FSH of both steroidogenic messages was elevated at 6 h and persisted through the 24 h experimental period ($p<0.01$, Figs 3b and 4b).

To assess the possibility that gonadotropin stimulation of the two messages was the result of transcription of new mRNA, cultures were co-treated with ActD and FSH. No stimulation of

StAR nor P450scc mRNA abundance ensued in the presence of ActD (Fig. 3b). In cultures treated with ActD alone, it was possible to estimate the disappearance of both messages (Fig. 3b insets). The constitutive levels of StAR message were eliminated in two replicates and barely detectable in the other two at 6 h. Only a trace of StAR mRNA was found at 12 h, and then in only one of four trials. P450scc messages proved more persistent, they were reduced to a third of steady state levels at 6 h and declining to approximately one tenth at 24 h, suggesting a considerably longer half life for this mRNA.

No effect of CHX on the steady state level of StAR or P450scc message was evident, although there was a trend toward message reduction of P450 mRNA (data not shown). However, pre-treatment with CHX 30 min before addition of FSH clearly prevented the ligand-induced increases in both StAR and P450scc mRNA accumulation that were seen in the FSH only treated cultures at 6, 12 and 24 h (Fig. 4b).

PMA treatment to determine the role of the PKC pathway in StAR gene expression resulted in an overall significant treatment effect ($p < 0.01$), but, as above, there was no definable replicate effect. FSH produced the expected stimulation of both StAR and P450 mRNA (Fig. 5b) while PMA alone had no statistically definable effect on abundance of either message. The response to PMA in the presence of FSH varied between the two genes, it reduced StAR abundance to steady state levels ($p < 0.01$), while producing a much more modest, but nevertheless significant reduction in P450scc message ($p < 0.05$). Stimulation of the PKA pathway by culturing cells with dbcAMP resulted in a highly significant ($p < 0.001$) treatment effect, but as with all previous trials, there were no replicate effects on either StAR or P450scc mRNA abundance (Fig. 6b). Comparison with controls terminated at each time period indicated

significant increases at 6-24 h for StAR ($p < 0.01$), and at 12-24 h for P450_{scc} ($p < 0.05$). Within the FSH treated groups the 24 h increases in StAR transcript abundance were greater than the 6 h response ($p < 0.05$).

DISCUSSION

The homologous StAR cDNA probe, consisting of the open reading frame of the porcine StAR gene, hybridized with transcripts of three approximate sizes in this investigation, 2.8, 1.6 and 0.8 kb, respectively. We previously reported the presence of two messages when the pig ovary was probed with a mouse StAR cDNA sequence (12). In the present investigation, the third message (0.8 kb) was not always discernable, and therefore presumably less abundant than the other two. However, we could detect no pattern of differential expression of the transcripts. The presence of three species of transcript is consistent with reports for StAR in the rat (6) and human (8), but not the cow, where two transcripts were detected (10,11) or sheep, where there appears to be a single species of mRNA (9). The presence of multiple messages for StAR has been attributed to variation in the 3' untranslated regions of the transcripts (10), but this hypothesis not been unequivocally verified.

Our preliminary report demonstrated that StAR protein abundance was highly correlated with the magnitude of StAR mRNA detected (12), as we reported for the bovine corpus luteum (11). Concurrent StAR mRNA and protein abundance was also observed in less differentiated porcine granulosa cells (14). Together these observations suggest that transcription and translation of StAR are coupled in ovarian tissue.

The results of the present study further confirm that FSH and cAMP induce StAR mRNA in porcine granulosa cells (14). However, the responses we report herein are more robust and appear earlier than those described by Balasubramanian et al. (14). As noted above, constitutive levels of StAR message are low, sometimes non-detectable, thus calculation of fold increases over control values provides spuriously high estimates of stimulation. In the present study, elevated and statistically significant stimulation was achieved in the absence of exogenously supplied IGF-I, which was essential for pronounced responses to cAMP in the investigation of Balasubramanian et al. (14). The differences may be related to culture conditions, as we routinely incubate with 1 mg/l insulin, which may act through the IGF receptors in granulosa cells (reviewed in 33). In support of this view, Balasubramanian et al. (14) demonstrated that insulin alone, at a dose of 3 mg/l, produced elevations in StAR mRNA. The differences between the two studies of porcine granulosa cells may further be related to the state of differentiation of the cell model. In the current experiments, the cells were luteinized following incubation with serum for 48 h and in medium for a further 48 h prior to initiation of treatments. Balasubramanian et al. (14) performed their trials on cells treated with a lower concentration of serum for a shorter interval and hormonal treatments were initiated at 16-24 h after isolation. Our tissue distribution study (Fig. 1b) and preliminary information (Pescador and Murphy, unpublished) indicates an absence of StAR transcripts at the time of isolation of granulosa cells from 3-5 mm pig follicles. We have previously shown evolution of StAR mRNA abundance during the process of luteinization in the bovine corpus luteum (11), and it is reasonable to conclude that granulosa cells may acquire the capacity to express the StAR gene in response to ligands as they luteinize.

ActD abrogation of ligand-induced StAR and P450scc responses in granulosa cells is consistent with observations in MA-10 cells (29) and suggests that the effect of FSH is to induce transcription of these genes. This interpretation must be made with caution, as the effects of ActD are visited on transcription of all genes, and there are alternate explanations for the phenomenon. For example, ActD may be inhibiting the transcription of an element which increases message stability. Nonetheless, transcriptional regulation appears to be the principal means by which trophic hormones regulate steroidogenic hormone gene expression and nuclear run-on experiments have shown that P450scc (25) and 3 β -HSD (34) are transcriptionally regulated by gonadotropins in granulosa cells.

Subject to the same caveat, transcription blockade can be employed to estimate the rate of disappearance of StAR and P450scc mRNAs. In the present investigation, comparison reveals a clear difference between StAR and P450scc message persistence in luteinized granulosa cells. The latter is reduced by approximately two thirds by 6 h after ActD treatment, consistent with relative stability of the message over this period, as has been shown in JEG-3 cells (35). StAR message, on the other hand, is negligible 6 h after ActD treatment, indicating a considerably briefer half life. Early investigations indicated that ActD had no effect on the acute stimulation of steroid hormone synthesis by ACTH, while there was profound inhibition of ACTH stimulation at 24 h (36). Our findings fit this model, i.e. acute steroid synthesis can be induced in luteinized cells (37). This is presumed to occur by translation of existing, if somewhat rare, StAR message. The half life of the message is brief, and continued transcriptional replenishment is necessary for continued steroidogenesis.

Conclusions can also be drawn from the present experiments relative to the intracellular pathways responsible for StAR expression in the luteinized model. As noted above, there is good evidence for involvement of the PKA pathway, based on the response to the dibutryl analog of cAMP. This conforms with results in MA-10 cells (5), where a response of similar magnitude but shorter duration was noted, and with the effects of 8-bromo cAMP in human (37) and porcine granulosa cells (14). In adrenal cultures, StAR mRNA elevation is also induced by dbcAMP in a dose-dependent manner (23). The involvement of the PKA pathway in StAR gene transcription is further indicated by the fact that StAR gene products accrue when cells normally devoid of StAR are transiently transfected with the StAR gene and treated with cAMP analogs (8, 38).

Progress has recently been made toward understanding of the transcriptional control of StAR gene expression. There is a consensus sequence present in the promoter region for the orphan nuclear steroid receptor SF-1 (5) and StAR transcripts are not detected in the SF-1 knockout mouse (29). In common with known steroidogenic enzyme genes, the 5' flanking region of the StAR gene in the mouse lacks classical cAMP response elements (5). However, it has recently been shown that dbcAMP stimulates StAR transcription via a specific region between 254 and 113 nucleotides upstream of the transcription initiation site in the mouse (29). Dissection of the promoter region indicates that SF-1 is essential to basal StAR expression, however, cAMP stimulated StAR transcription occurs in the absence of the SF-1 consensus sequence suggesting independence of the promoter elements (29). In the human gene, two SF-1 sites were found in the 1.3 kb upstream from the transcription initiation site (38). Deletion analysis indicated that maximal basal and cAMP-induced transcription required both SF-1 sites, indicating synergy between SF-1 and the cAMP

response element. These observations suggest that transcriptional control of the StAR gene varies among species.

PMA treatment eliminated the FSH induction of StAR message accumulation in the present study. Dose-dependent reduction of gonadotropin-induced 3β -HSD message by PMA has previously been reported in this model, and the dose employed in the current study (10 nM) produced a submaximal reduction in 3β -HSD message (19). This suggests that the StAR gene is more sensitive to PKC inhibition than is 3β -HSD. P450scc was recognized as one of the loci of PKC inhibition of porcine granulosa cells (39). PMA treatment in the present study inhibited FSH-stimulation of the P450scc message, in keeping with a phenomenon first shown in bovine granulosa cells by Trzeciak et al. (17). However, Lahav et al. (18) reported a positive interaction between 30mM PMA and cAMP in porcine granulosa cells from small follicles treated 4-8 h beginning 48 h after isolation. In support of the concept of PKA-PKC synergy is a tendency toward PMA-induced augmentation of P450scc abundance at 6 h in the present study (Fig. 5b). Short term increases such as these may be attributable to crosstalk between the PKA and PKC pathways, as one of the early responses to PMA in porcine granulosa (37) and luteal (40) cells is a brisk increase in cAMP production.

Adrenal steroidogenesis appears to differ from that in granulosa cells, as activation of both the PKA and PKC pathways stimulates steroidogenesis and StAR protein synthesis in a human adrenal cell line (21). Angiotensin II, which reduces both P450scc and 3β -HSD gene expression in luteinized pig granulosa cells (30), elevates StAR protein synthesis in the adrenal tumor cell model (21). In contrast to both the present ovarian findings and adrenal tumor cell line data, Liu et al. (23) reported that activation of the PKC pathway by PMA or its

blockade by staurosporine had no effect on ACTH- induced StAR or P450scc message abundance in cultured human adrenal cells. The genesis of these differences remains to be determined.

The mechanism of PMA-PKC inhibition is also not known. However, Caron et al. (27) recently identified a portion of the upstream flanking region of the mouse StAR gene that inhibits cAMP induction of transcription. It may therefore be that PKC functions via this domain to limit the response of StAR to trophic hormones.

It has been stated that the blockade of protein synthesis either inhibits, or has no effect on most steroidogenic genes (41). In the current investigation we demonstrate CHX sensitivity of ligand stimulation of StAR and P450scc responses, such that the FSH induction of both messages was eliminated by pre-treatment with 40 $\mu\text{g/ml}$ CHX. We have previously shown that half of this dose (20 $\mu\text{g/ml}$) reduced the incorporation of ^{35}S -methionine by more than 91 percent (42), indicating that pre-treatment effectively eliminated protein synthesis in this model. We further showed that CHX treatment rapidly elevated follistatin message abundance, indicating that the mechanism of action is not via generalized reduction of message stability in the porcine granulosa cells (42). Cotreatment of MA-10 cells with a lower dose of CHX (7 $\mu\text{g/ml}$) reduced, but did not eliminate dbcAMP induction of P450scc gene expression (27), consistent with the view that protein synthesis is necessary for induction of StAR gene expression. In contrast, basal levels of StAR transcripts in cultured adrenal cells were unaffected by CHX (23).

CHX may interdict FSH induction of StAR and P450 transcript accumulation by interfering with the translation of the message for a labile protein which is essential for

transcription. In the Sertoli cell, a paracrine factor, PModS, regulates transcription of transferrin, and its effects are abrogated by CHX (43). In that study, a peak in c-fos message preceded transferrin, and PModS stimulation of transferrin expression could be prevented by antisense neutralization of c-fos expression, suggesting that c-fos is the labile protein essential for transferrin transcription. Liu et al. (23) reported the occurrence of a similar peak of c-fos which preceded StAR expression in adrenal cultures, which was not CHX sensitive (nor was StAR message accumulation in this model). It may be that c-fos, or a similar transcription factor is the protein element essential for expression of the StAR gene in granulosa cells.

In summary, these investigations demonstrate that StAR gene transcripts are in low abundance in luteinized porcine granulosa cells not subject trophic hormone stimulation. Treatment with FSH or dbcAMP causes time-dependent increases in the accumulation of StAR message, implicating the PKA intracellular pathway. The FSH induced responses are interdicted by co-treatment with ActD and PMA and by pre-treatment with CHX. These results are interpreted to indicate that FSH induction of StAR gene expression depends on transcription, that intermediate protein synthesis is necessary for this transcription and that the PKC intracellular pathway is inhibitory to this process.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Tao-Yan Men and Mira Dobias for invaluable technical support and constant cheerfulness and good will. We thank Drs. Tommy Wise and Gil Schultz for generous contribution of cDNA probes, and Dr. Bill Thatcher for suggesting the statistical analysis.

REFERENCES

1. Ferguson JJ. Protein synthesis and adrenocorticotrophin responsiveness. *J Biol Chem* 1963; 238:2754-2759.
2. Clark BJ, Wells J, King SR, Stocco DM. The purification, cloning and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. *J Biol Chem* 1994; 269: 28314-28322.
3. Stocco DM, Clark BJ. Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. *Endocrin Rev* 1996; 17:221-244.
4. Arakane F, Sugawara T, Nishino H, Liu Z, Holt JA, Pain D, Stocco DM, Miller WL, Strauss III JF. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) retains activity in the absence of its mitochondrial import sequence: Implications for the mechanism of StAR action. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:13731-13736.
5. Clark BJ, Soo, S-C, Caron KM, Ikeda Y, Parker KL, Stocco DM. Hormonal and developmental regulation of the steroidogenic acute regulatory protein. *Mol Endocrinol* 1995; 9:1346-1355.
6. Sandhoff TW, McLean MP. Hormonal regulation of steroidogenic acute regulatory protein messenger ribonucleic acid expression in the rat ovary. *Endocrine* 1996; 4:259-267.
7. Orly J, Ronen-Fuhrmann T, Clark BJ, King SR, and Stocco DM. Expression of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) during follicular development in the rat ovary. *Biol Reprod* 1995; 52(Suppl 1): 196 Abst 558.
8. Sugawara T, Lin D, Holt JA, Martin KO, Javitt NB, Miller WL, Strauss III JF. Structure of human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene: StAR stimulates mitochondrial cholesterol 27-hydroxylase activity. *Biochemistry* 1995; 34:12506-12512.

9. Jeungel JL, Meberg BM, Turzillo AM, Nett TM, Niswender GD. Hormonal regulation of messenger ribonucleic acid encoding steroidogenic acute regulatory protein in ovine corpora lutea. *Endocrinology* 1995; 136:5423-5429.
10. Hartung S, Rust W, Balvers M, Ivell R. Molecular cloning and in vivo expression of the bovine steroidogenic acute regulatory protein. *Biochem Biophys Res Comm* 1995; 215: 646-653.
11. Pescador N, Soumano K, Stocco DM, Price CA, Murphy BD. Steroidogenic acute regulatory protein in bovine corpora lutea. *Biol Reprod* 1996; 55:485-491.
12. Pescador N, Houde A, Men T-Y, Dobias M, Murphy BD. Steroidogenic acute regulatory protein in porcine ovary and testis. *Biol Reprod* 1996; 54(Suppl 1):164 Abst 431.
13. Chedrese PJ, Stocco DM, Braileanu GT. FSH, LH and estradiol-17 β stimulates steroidogenic acute regulatory (StAR) protein-gene expression in cultured porcine granulosa cells. *Biol Reprod* 1996; 54 (Suppl 1):75, Abst. 75.
14. Balasubramanian K, Lavoie HA, Garmey JC, Stocco DM, Veldhuis JD. Regulation of porcine granulosa cell steroidogenic acute regulatory protein (StAR) by insulin-like growth factor I: Synergism with follicle-stimulating hormone or protein kinase A agonist. *Endocrinology* 1997; 138:433-439.
15. Townson DH, Wang XJ, Keyes PL, Kostyo JL, Stocco DM. Expression of the steroidogenic acute regulatory protein in the corpus luteum of the rabbit: dependence on the luteotropic hormone, estradiol 17 β . *Biol Reprod* 1996; 55:868-874.
16. Davis JS, Weakland LL, West LA, Farese RV. Luteinizing hormone stimulates the formation of inositol triphosphate and cAMP in rat granulosa cells: Evidence for phospholipase C generated second messengers in the action of luteinizing hormone. *Biochem J* 1986; 238:597-604.

17. Trzeciak WH, Duda T, Waterman MR, Simpson ER. Tetradecanoyl phorbol acetate suppresses follicle-stimulating hormone-induced synthesis of the cholesterol side-chain cleavage enzyme complex in rat ovarian granulosa cells. *J Biol Chem* 1987; 262:15246-50.
18. Lahav M, Garmey JC, Shupnik MA, Veldhuis JD. Dual actions of phorbol ester on cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage messenger ribonucleic acid accumulation in porcine granulosa cells. *Biol Reprod* 1995; 52:972-81.
19. Chedrese PJ, Zhang D, Luu The V, Labrie F, Juorio AV, Murphy BD. Regulation of mRNA expression of 3 β -hydroxy-5-ene steroid dehydrogenase in porcine granulosa cells in culture: A role for the protein kinase-C pathway. *Mol Endocrinol* 1990; 4:1532-1538.
20. Hartigan JA, Green EG, Mortensen RM, Menachery A, Williams GH, Orme-Johnson NR. Comparison of protein phosphorylation patterns produced in adrenal cells by activation of cAMP-dependent protein kinase and Ca-dependent protein kinase. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1995; 53:95-101.
21. Clark BJ, Pezzi V, Stocco DM, Rainey WE. The steroidogenic acute regulatory protein is induced by angiotensin II and K⁺ in H295R adrenocortical cells. *Mol Cell Endocrinol* 1995; 115:215-219.
22. Chaudhary LR, Stocco DM. Effect of different steroidogenic stimuli on protein phosphorylation and steroidogenesis in MA-10 mouse Leydig tumor cells. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1094:175-84.
24. Golos TJ, Miller WL, Strauss III JF. Human chorionic gonadotropin and 8-bromo-cyclic adenosine monophosphate promote an acute increase in cytochrome P450_{scc} and adrenodoxin messenger RNAs in cultured human granulosa cells by a cycloheximide insensitive method. *J Clin Invest* 1987; 80:896-899.

25. Ringler, GK, Kao L, Miller WL, Strauss III JF. Effects of 8-bromo-cAMP on expression of endocrine functions by cultured human trophoblast cells. Regulation of specific mRNAs. *Molec Cell Endocrinol* 1989; 62:13-21.
26. Picado-Leonard J, Voutilainen R, Kao L, Chung, B, Strauss III JF and Miller WL. Human adrenodoxin: cloning of three cDNAs and cycloheximide enhancement in JEG-3 cells. *J Biol Chem* 1988; 263:3240-3244.
27. Mellon SH, Vaisse C. cAMP regulates P450scc gene expression by a cycloheximide-insensitive mechanism in cultured mouse Leydig MA-10 cells. *Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.* 86 (1989) 7775-7779.
28. Chedrese PJ, Luu The V, Labrie F, Juorio AV, Murphy BD. Evidence for the regulation of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase messenger RNA by human chorionic gonadotrophin in luteinized porcine granulosa cells. *Endocrinology* 1990; 126:2228-2230.
29. Caron KM, Ikeda Y, Soo S-C, Stocco DM, Parker KL, Clark BJ. Characterization of the promoter region of the mouse gene encoding the steroidogenic acute regulatory protein (StAR). *Mol Endocrinol* 1997; in press.
30. Li X-M, Juorio AV, Murphy BD. Angiotensin II interferes with steroidogenesis in porcine granulosa cells. *Biol Reprod* 1995; 53:791-799.
31. Akins EL, Morrissette MC. Gross ovarian changes during the estrous cycle of swine. *Am J Vet Res* 1968; 29:1953-1957
32. de la Sota RL, Simmen FA, Diaz T, Thatcher WW. Insulin-like growth factor system in bovine first-wave dominant and subordinate follicles. *Biol Reprod* 1996; 55:803-812.
32. Liu J, Heikkilä P, Kahri AI, Voutilainen R. Expression of the steroidogenic acute regulatory protein mRNA in adrenal tumors and cultured adrenal cells. *J Endocrinol* 1996; 150:43-50.

33. Monget P, Monniaux D. Growth factors and the control of folliculogenesis. *J Reprod Fert* 1995; Suppl 49:321-333.
34. Chedrese PJ, Braileanu GT, Salmon R. 3 β -hydroxy-5-ene steroid dehydrogenase gene expression regulation in porcine granulosa cells. I. FSH- and LH-mediated transcriptional activation. *Endocrine* 1996; 3:195-199.
35. Brentano ST, Miller WL. Regulation of human P450_{scc} and adrenodoxin mRNAs in JEG-3 cytotrophoblast cells. *Endocrinology* 1992; 131:3010-3018.
36. Vernikos-Dannelis J, Hall M. Inhibition of adrenocortical response to ACTH by actinomycin-D in vivo. *Nature* 1965; 207:766.
37. Murphy BD, Chedrese PJ, Rajkumar K. Evidence for cross-talk between protein kinase C and cAMP pathways in porcine granulosa cells. *Biol Reprod* 1989; 40 (supp 1):162, Abst 345.
37. Sugawara T, Holt JA, Driscoll D, Strauss III JF, Lin D, Miller WL, Patterson, D, Clancy KP, Hart IM, Clark BJ and Stocco DM. Human steroidogenic acute regulatory protein: Functional activity in COS-1 cells, tissue-specific expression, and mapping of the structural gene to 8o11.2 and a pseudogene to chromosome 13. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:4778-4782.
38. Sugawara T, Holt JA, Kiriakidou, M, Strauss III JF. Steroidogenic Factor 1-dependent promoter activity of the human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene. *Biochem* 1996; 35:9052-9059.
39. Flores, JA, Garmey JC, Nestler JE, Veldhuis JD. Sites of inhibition of steroidogenesis by activation of protein kinase-C in swine ovarian (granulosa) cells. *Endocrinology* 1993; 132:1983-1990.
40. Wheeler MB, Veldhuis JD. Facilitative actions of the protein kinase-C effector system on hormonally stimulated adenosine 3',5'-monophosphate production by swine luteal cells. *Endocrinology* 1989; 125:2414-2420.

41. Miller WL. Mitochondrial specificity of the early steps of steroidogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995; 55: 607-616.
42. Lindsell CE, Misra V, Murphy BD. Follistatin has the characteristics of a primary response gene in porcine granulosa cells. *Endocrine* 1995; 3:609-614.
43. Norton JN , Skinner MK. Regulation of Sertoli cell differentiation by the testicular paracrine factor PModS: potential role of immediate-early genes. *Molec Endocrinol* 1992; 6:2018-2026.

Figure 1b. Autoradiogram of Northern blots from electrophoresis of 15 mg total RNA purified from porcine tissues, including freshly aspirated granulosa cells, theca dissected from 3-5 mm diameter follicles, corpora lutea, uterus, testes, epididymis, brain, heart, kidney, liver, spleen, and adrenal. Blots were hybridized with the 0.85 kb cDNA probe for porcine StAR, stripped and hybridized a 1.0 kb cDNA for porcine P450scc cDNA probe, followed by hybridization with a 1.4 kb fragment from the internal region of the 28S ribosomal RNA gene. Approximate transcript sizes were derived from a RNA ladder that was subject to electrophoresis along with the samples.

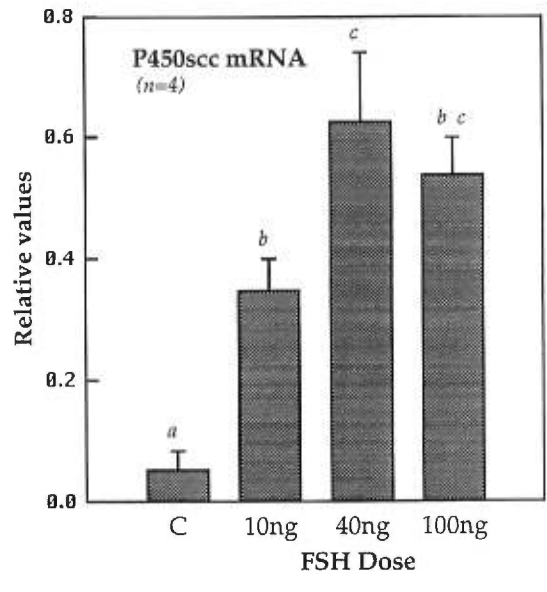
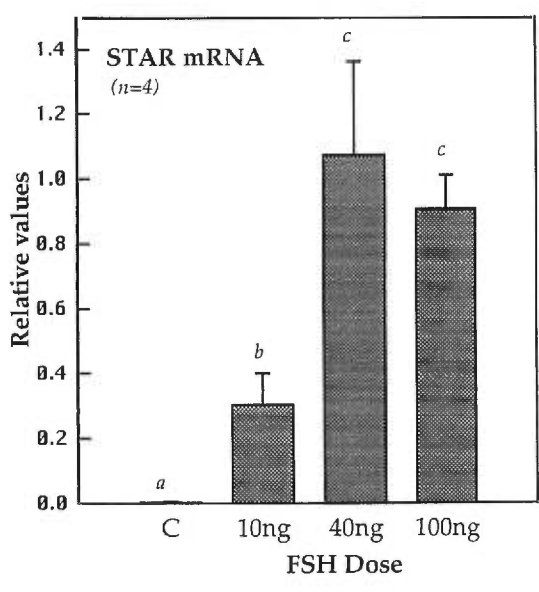
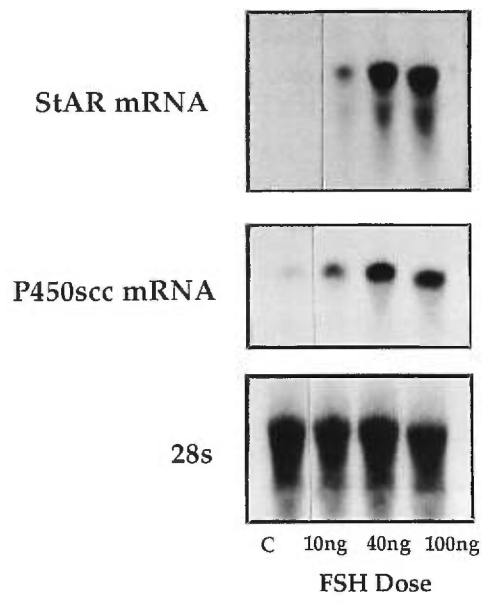


Figure 2b. Dose-dependent effects of FSH on StAR and P450scc mRNA accumulation in cultured porcine granulosa cells isolated from 3-5 mm follicles and cultured for 48 h in MEM with 10% fetal bovine serum, then for 48 h in MEM without serum. Treatments were 10, 40, and 100 ng/ml of FSH or control (C, culture medium alone), and were added and cells were incubated for 6 h. Autoradiograms in this and subsequent figures depict representative Northern blots from electrophoresis of 15 μ g total RNA. Probes were employed as described for Figure 1. Quantification of mRNA was achieved by computer-assisted densitometry. Bars represent means (\pm SEM) of the ratio of the mRNA optical density values for either StAR or P450scc and 28S from four independent replicates of the experiment. Different superscripts in this and subsequent legends represent significant differences in optical density by the LSD method after analysis of covariance ($p < 0.01$).

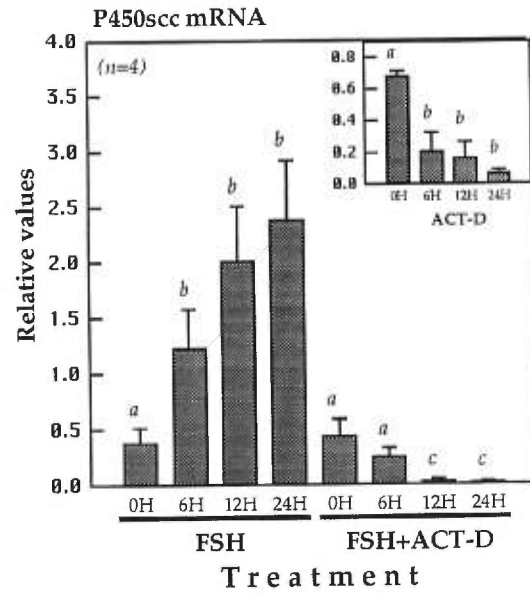
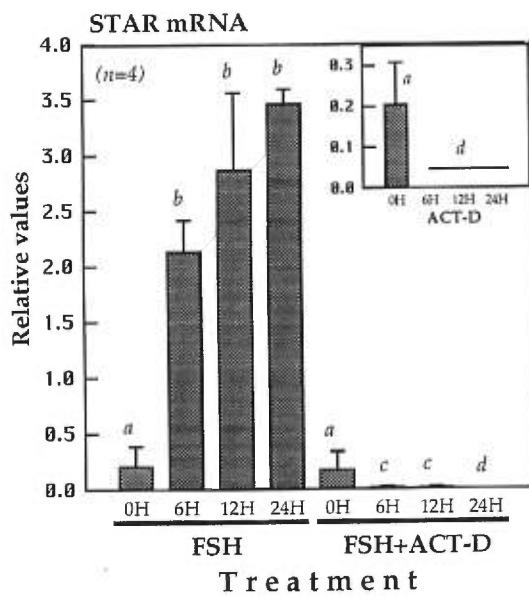
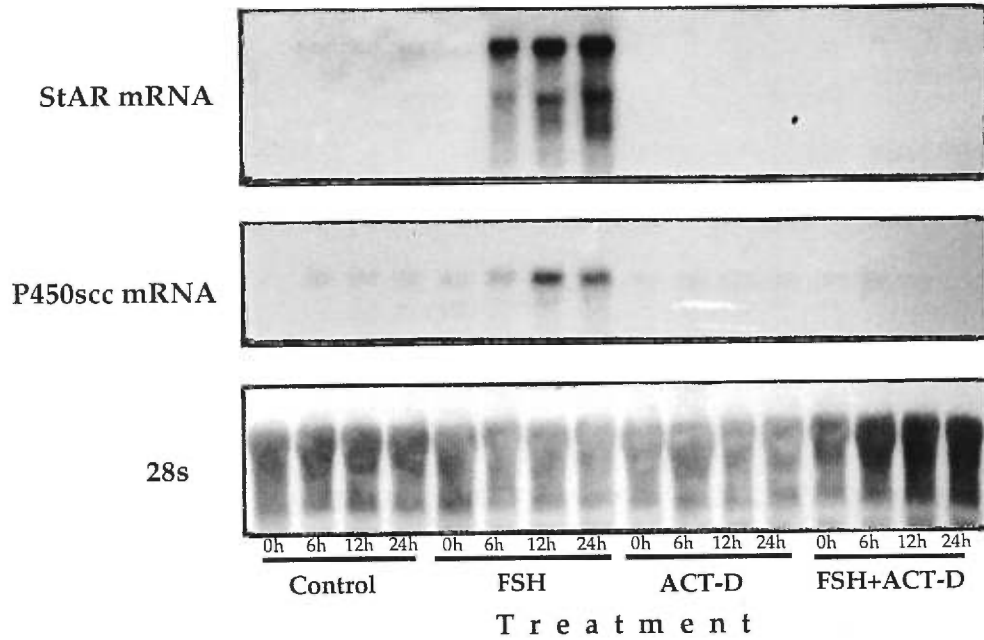


Figure 3b. Time-dependent stimulation of StAR and P450scc mRNA accumulation by FSH and the effects of actinomycin-D. Granulosa cells were cultured as described in the legend to Fig. 2b, and treated with FSH (200 ng/ml), ActD (5 μ g/ml) + FSH, or ActD alone, for 0, 6, 12, and 24 h. Total RNA was analysed by Northern blot hybridization (15 μ g) from four independent replicates of the experiment as described in the legend to Fig. 1b. Bars represent means (\pm SEM) of the ratio of the mRNA in question to 28S quantified as described above. Different superscripts represent significant differences ($p < 0.01$)

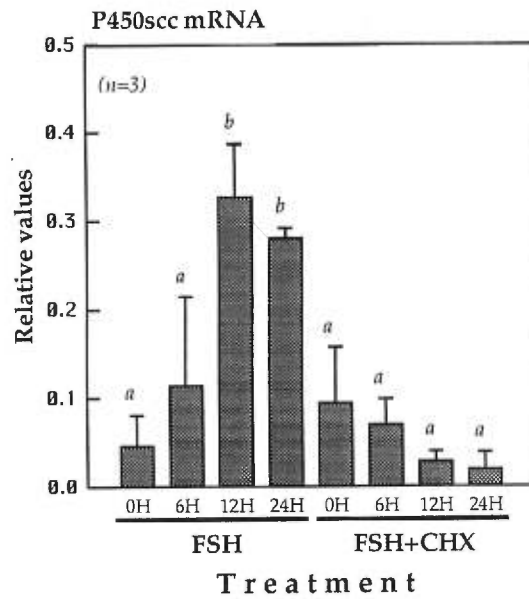
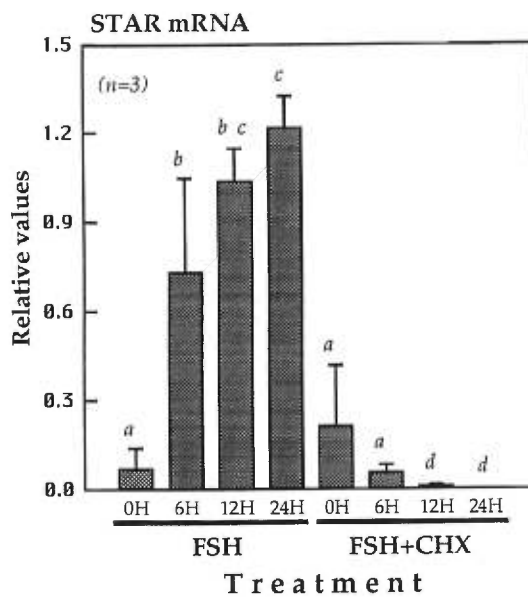
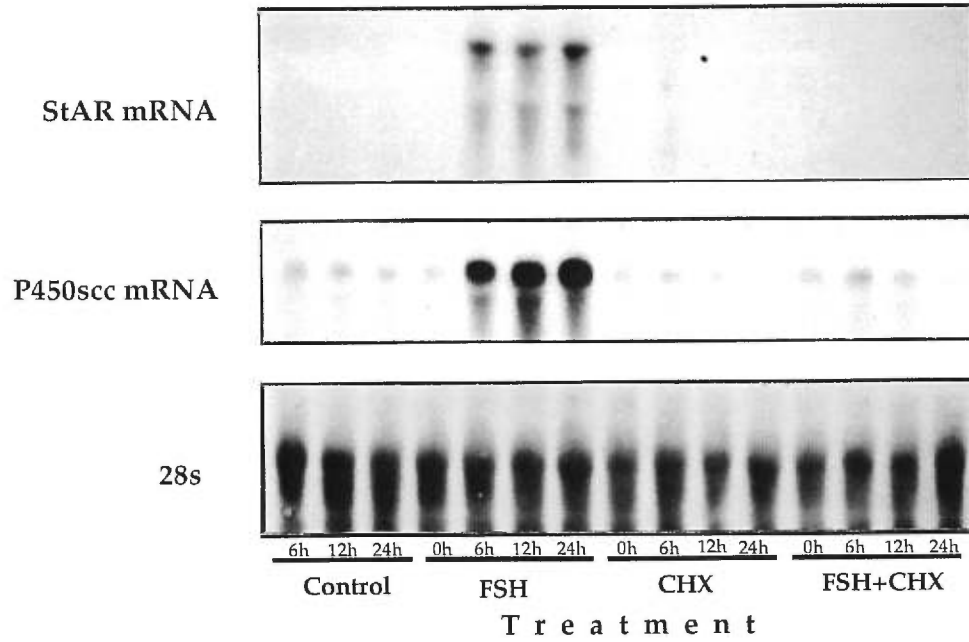


Figure 4b. Time-dependent effects of FSH and cycloheximide (CHX) on StAR and P450_{scc} mRNA. Granulosa cells were cultured as described above and treated with FSH (200 ng/ml), CHX (40 µg/ml) added 30 min before FSH, or CHX alone, for 0, 6, 12, and 24 h. Total RNA was analysed by Northern blot hybridization as described in the legend to Fig. 1. Bars represent means (\pm SEM) of the ratio of the mRNA in question to 28S quantified as described above in three independent replicates. Different superscripts represent significant differences ($p < 0.04$).

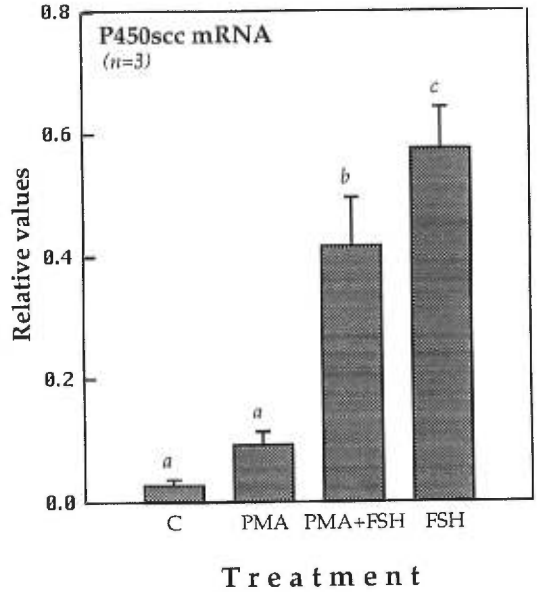
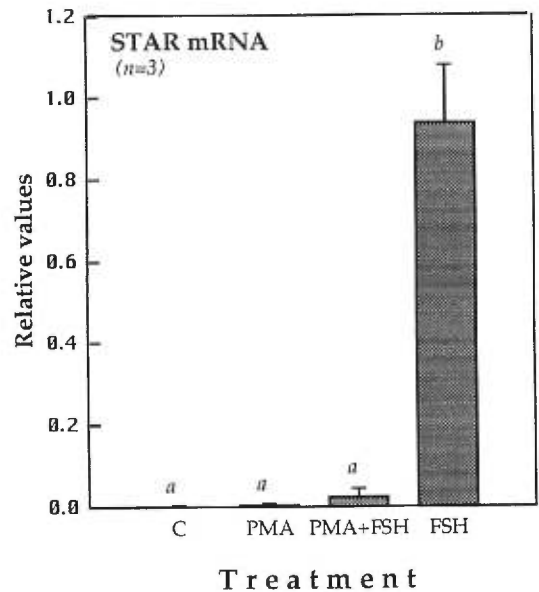
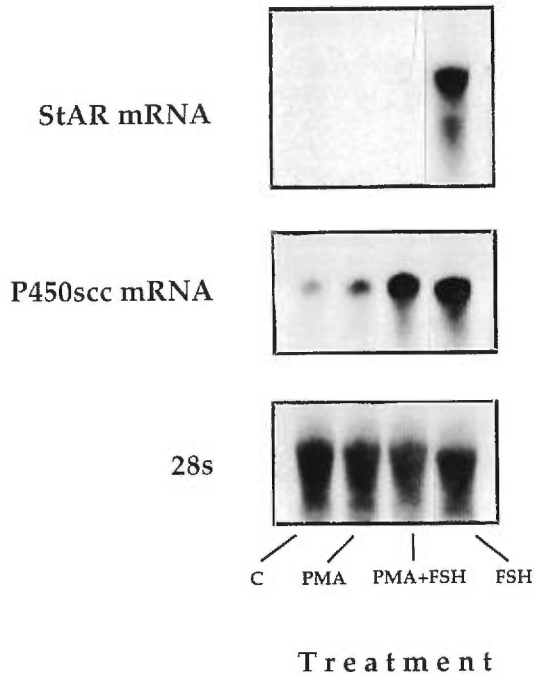


Figure 5b. Effects of FSH on StAR and P450scc mRNA accumulation in the presence or absence of phorbol 13-myristate-12-acetate (PMA). Cells were cultured as described in the legend to Fig. 1 and treated for 6 h with 10 nM PMA in presence or absence of FSH, 100 ng/ml FSH alone or vehicle (C). Cultures from three independent experiments were analysed by Northern blot hybridization and quantified and depicted as described in the legend to Fig. 2. The graphs represent the mean (\pm SEM) of the mRNA in question. Different superscripts indicate significant differences ($p < 0.001$).

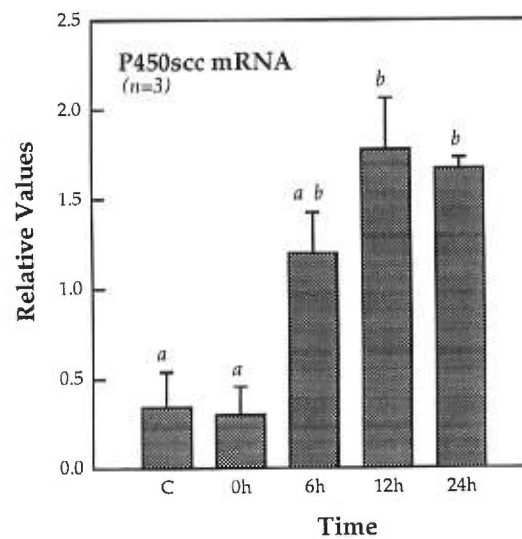
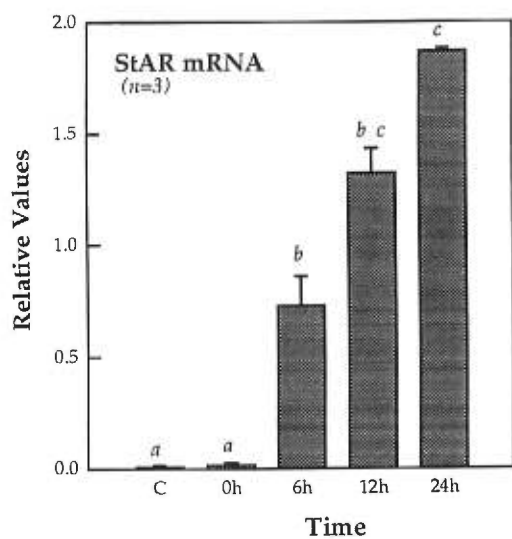
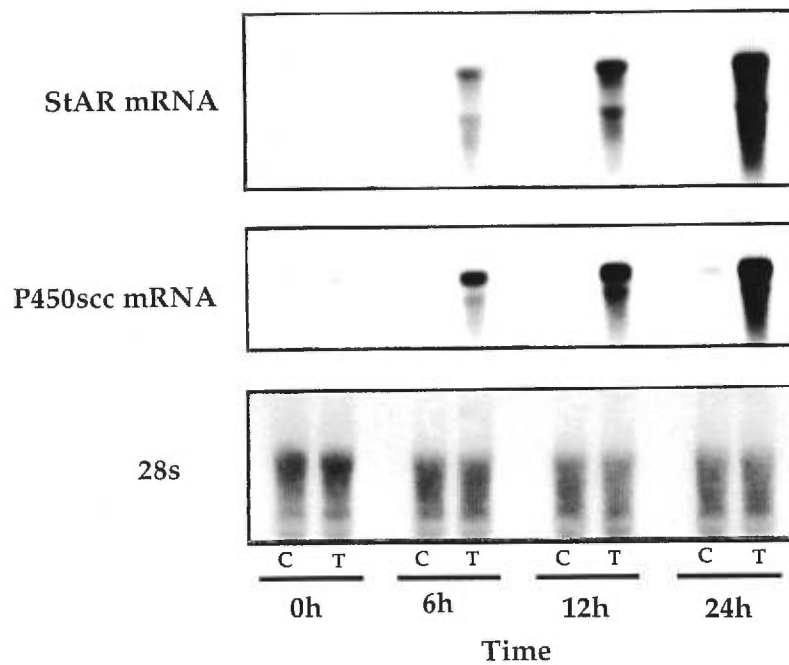


Figure 6b. Time-dependent effects of dibutyryl cAMP on StAR and P450scc mRNA accumulation in porcine granulosa cells. Cells were cultured as in the legend to Figure 2, and treated with dbcAMP (1mM) or medium alone for 0, 6, 12, or 24 h, then collected and RNA analysed by Northern blot hybridization. The data represent the mean (\pm SEM) of the ratio of mRNA between 28S densitometric units in three independent trials, quantified and depicted as described in the legend to Fig. 2. Different superscripts represent significant differences ($p < 0.01$).

CHAPITRE IV**Growth Factor Modulation of Steroidogenic Acute
Regulatory Protein and Luteinization
in the Pig Ovary¹****Nazario Pescador², Douglas M. Stocco³ and
Bruce D. Murphy^{2,4}**

²Centre de recherche en reproduction animale, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe Québec, Canada, J2S 7C6; and ³Department of Biochemistry and Cell Biology, Texas Tech Health Sciences Center, Lubbock, Texas 79430

Running title: IGF and EGF and luteinization

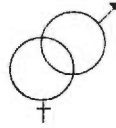
¹Supported by MRC Canada Grant MT 11018 to B.D.M. and NIH HD 17481 to D.M.S. Nazario Pescador is recipient of a graduate fellowship from CONACYT, México, and is on leave from Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca México.

⁴Correspondence, FAX (450) 778 8103, e-mail: murphyb@medvet.umontreal.ca.

EDITORIAL OFFICE:

Animal Reproduction and
Biotechnology Laboratory
Colorado State University
Fort Collins, CO 80523-1683
Telephone: (970) 491-2006
FAX: (970) 491-2007
Electronic mail address:
biorepro@cvmb.colostate.edu

BIOLOGY
OF
REPRODUCTION



Gordon D. Niswender
Editor-in-Chief
Terry M. Nett
Associate Editor
Judith Jansen
Managing Editor

OFFICIAL JOURNAL OF THE SOCIETY FOR THE STUDY OF REPRODUCTION

August 24, 1998

Bruce D. Murphy
Centre de recherche en reprod. an.
Universite de Montreal
St-Hyacinthe, Quebec
CANADA, J2S 7C6

Dear Dr. ~~Murphy~~: *Bruce*

Your manuscript (98360) entitled

Growth factor modulation of steroidogenic acute
regulatory protein and luteinization in the pig
ovary.

has been found provisionally acceptable for publication in Biology of Reproduction if adequately revised and rereviewed. Please consider revising Manuscript No. 98360. If you decide to revise the manuscript, please prepare a letter responding to the individual comments from all reviewers (copies enclosed). We will send your letter, with the revision, to those reviewer(s) requesting re-review.

The final disposition of your manuscript depends on your persuading the reviewers to accept the paper at a rating of solid contribution or better. I hope that you decide to make the necessary revisions, and I look forward to receiving the new version of your paper. Please note our request on the Revision Checklist that you return a copy of the present version, with the changes drafted in; this is a tremendous aid in our review of your revisions.

Sincerely,

Gordon D. Niswender, Ph.D.
Editor-in-Chief

Terry
Terry M. Nett, Ph.D.
Associate Editor

RÉSUMÉ

Le processus de la lutéinisation *in vivo* et *in vitro* a été étudié dans l'ovaire porcin, avec emphase sur l'expression de la protéine de régulation rapide de la stéroïdogénèse (StAR). La protéine StAR et son ARNm ainsi que l'ARNm du cytochrome P450 qui coupe la chaîne latérale du cholestérol (P450scc) augmentent pendant la phase lutéale dans le corps jaune (CL) et sont absents dans le CL en régression. L'ARNm du cytochrome P450 aromatisation (P450arom) n'a jamais été présent dans le CL. La lutéinisation *in vitro* des cellules de la granulosa a été effectuée sur 96h et a été caractérisée par la perte de l'expression de l'ARNm du P450arom dès 6h après l'isolation des cellules. Les ARNm du P450scc et de la StAR ont été initialement détectés, respectivement, à 6h et 48h. L'incubation des cultures avec le facteur de croissance 1 analogue à l'insuline (IGF-1, 10ng/ml), l'analogue dibutyrylique de l'AMPc (dbAMPc) ou une combinaison des deux, a produit une induction de l'ARNm de la StAR en quantités mesurables à 24h ($p < 0,05$). Ces inducteurs ont également augmenté autant l'expression de la StAR que celle du P450scc au cours des 96h de lutéinisation. L'incubation des cellules de la granulosa lutéinisées avec le facteur de croissance épidermique (EGF, 10nM) change le phénotype de celles-ci d'épithélial à fibroblastique. De plus, cette incubation bloque l'expression de base de la StAR et empêche également l'induction du message de la StAR induite par l'AMPc. L'EGF n'a que peu d'effet sur l'abondance de l'ARNm du P450scc. Il en est conclu que l'expression de la StAR est un marqueur de la lutéinisation. D'autre part, la lutéinisation précoce peut être induite par l'AMPc et IGF-1 *in vitro*. En plus, EGF renverse le processus de lutéinisation et produit un phénotype morphologique et fonctionnel caractéristique d'une étape précoce de la fonction des cellules de la granulosa.

ABSTRACT

In vivo and in vitro luteinization were investigated in the porcine ovary, with emphasis on expression of steroidogenic acute regulatory protein (StAR). StAR mRNA and protein and cytochrome P450side chain cleavage mRNA (P450scc) increased during the luteal phase in the corpus luteum (CL), and were absent in regressed CL. Cytochrome P450aromatase mRNA (P450arom) was not present at any time in CL. In vitro luteinization of granulosa cells ensued over 96 h in culture, and was characterized by the loss of P450aromatase mRNA within 6 h after cell isolation. P450scc and StAR mRNAs were first detectable at 6 h and 48 h respectively. Incubation of cultures with insulin-like growth factor 1 (IGF-1, 10 ng/ml), the cAMP analog, dbcAMP, or their combination, induced measurable StAR mRNA at 24 h ($p < 0.05$), and increased both StAR and P450scc expression through 96 h ($p < 0.05$). Incubation of luteinized granulosa cells with epidermal growth factor (EGF 10 nM) changed their phenotype from epithelial to fibroblastic, eliminated steady-state StAR expression and interfered with cAMP induction of StAR mRNA accumulation. EGF had little apparent effect on P450scc mRNA abundance. It is concluded that StAR expression characterizes luteinization and early luteinization is induced in vitro by cAMP and IGF-1. Further, EGF reverses the luteinization process, resulting in a morphological and functional phenotype characteristic of an earlier stage of granulosa cell function.

INTRODUCTION

The lengthy process of differentiation of ovarian follicular cells that begins with their initial recruitment from the ovarian stroma, by factors presumed to arise from the oocyte. The

penultimate stage in follicular differentiation is luteinization, which is normally triggered by the preovulatory gonadotropin surge. It engenders a remarkable phenotypic remodeling of the ovary (1) and the most striking functional change is the shift from androgen and estrogen production to the large scale synthesis of progesterone (2). While present in follicles, granulosa cells transform androgens from the theca into estrogens. During luteinization, they acquire the competence for the entire process of progesterone synthesis, i.e. the capability to employ cholesterol as substrate. While the molecular mechanisms of luteinization have not been entirely determined, it is known that there are coincidental alterations in expression of the genes coding for steroidogenic enzymes. In particular there is a down-regulation of androgen synthetic cytochrome P450 17 α -hydroxylase (3) and the up-regulation of the progesterone synthetic enzymes, cytochrome P450_{scc} (P450_{scc}, 3, 4) and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (5). The loss of estrogen synthesis by granulosa cells concurs with loss of expression of cytochrome P450 aromatase (P450_{arom}, 6). Removal and culture of granulosa cells from antral follicles results in spontaneous luteinization (7). This effect is maturation dependent, and therefore less pronounced in cells from smaller follicles (8). In the rat model, luteinization represents exit from the cell cycle (1), and this is believed to be true in other species, based on the numbers of granulosa and putative granulosa-derived cells in the sheep CL (reviewed in 2). The exception appears to be the CL of obligate embryonic diapause in the mink, which has the steroidogenic characteristics of the CL while retaining the ability to proliferate (9).

The mobilization and delivery of cholesterol to the mitochondrion in ovarian steroidogenic cells is ligand-dependent. A key step in the process is the transport of

cholesterol from intracellular stores to the inner mitochondrial membrane, where it is transformed to pregnenolone by P450_{scc}. A protein that affects this transfer, steroidogenic acute regulatory protein (StAR) was identified in 1994 (10). Its significance to steroidogenesis can be seen in the profound disruption of gonadal and adrenal differentiation and adrenocortical function that ensue when the StAR gene is mutated in humans (11) or in mice (12). A role for StAR in luteinization can be inferred from its appearance in porcine follicles following the administration of ovulatory doses of gonadotropic hormone (4) and from the pattern of its expression in the corpus luteum (CL) during the bovine luteal phase (13). In luteinized porcine granulosa cells, StAR expression is stimulated by FSH and cAMP, depends on ongoing protein synthesis and is inhibited by phorbol 12 myristate 13-acetate (PMA, 14).

It was shown more than 20 years ago that growth factors have marked effects on the function of mammalian granulosa cells (15). Epidermal growth factor (EGF) is a potent mitogen in pig granulosa cells in vitro (16, 17), and appears to be locally synthesized in the pig ovarian follicle (18). Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) expression can likewise be localized to the theca, stroma and corpus luteum of the rat ovary (19) and has pleiotropic effects ovarian cells. It interacts with gonadotropins in support of developing follicles in the bovine and ovine ovaries (reviewed in 20). In the porcine ovary, IGF-1 stimulates both proliferation and differentiation (reviewed in 21), usually in combination with FSH (17). In porcine granulosa cells in culture, IGF-1 stimulates the activity of P450_{scc} and P450_{arom} (22), and acts in synergy with FSH in the induction of StAR gene expression (23).

As noted above, luteinization is a large scale remodeling process that occurs in response to endocrine (gonadotropin) stimulation. Paracrine growth factors have the potential to modulate both differentiation and proliferation, processes that appear mutually exclusive in luteinizing granulosa cells. The present experiments were conceived to further describe the luteinization process in porcine granulosa cells and to test the hypothesis that EGF and IGF-1 modulate luteinization, as indicated by the acquisition of the capacity to employ cholesterol for progesterone synthesis.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture and tissue collection

Porcine ovaries from adult and prepubertal gilts were collected from the abattoir. For determination of the variation in StAR expression associated with luteinization *in vivo*, corpora lutea were collected from cycling adult pigs at various stages of the estrous cycle. Four categories were identified morphological criteria (24). These were the postovulatory CL (stage I) mid-cycle (early, stage II, late stage III) and regressed (R) CL. Three to five CL from each stage were collected for Northern and Western analyses. In the remainder of the experiments, granulosa cells obtained by aspiration from medium-sized (3-5 mm) follicles from immature pigs, were employed.

Granulosa Cell Experiments

The first experiment was conducted to determine the characteristics of *in vitro* luteinization of granulosa cells. Granulosa cells were plated in 10% fetal bovine serum (FBS) and treated with either dibutyryl cAMP (dbcAMP, 300 μ M,

Sigma Chemicals, St. Louis MO) or medium alone, and cultures were terminated at 1, 6, 12 and 24 h. The cAMP dose was based on optimal stimulation of steroidogenic proteins in previous studies (14). In the second trial, the effects of human IGF-1 were assessed by incubating freshly isolated cells with 0, 1, 10, 100 ng/ml human IGF-I (Gibco BRL) followed by termination of cultures at 24 or 48 h after initiation of treatment. In subsequent trials, the effects of dbcAMP (300 μ M) and IGF-1 (10 ng/ml) on the expression of factors associated with luteinization were assessed over 96 h from the time of isolation of cells. Cultures were terminated at 12, 24, 48, 72 and 96 h. As in previous studies (14), cells were incubated with FBS for the first 48 h and serum-free for the final 48 h of culture.

Subsequent trials were conducted in luteinized cells, i.e. those which had been cultured for 96 h as described above and in previous trials (14). These cells were treated with medium alone or dbcAMP (300 μ M) or EGF (10 nM, Sigma). Cultures were incubated for 0, 12, 18, and 30 h.

RNA analysis

Corpora lutea and cultured cells were homogenized in 4 M guanidine isothiocyanate (Gibco BRL), 2.6 mM sodium acetate (Sigma), and 0.12 M β -mercaptoethanol (Sigma) and stored at -70° C until analysis. Total RNA was purified by CsCl gradient ultracentrifugation and aliquots of 15 μ g were subjected to Northern analysis as previously described (14). Probes were labeled with 32 P to specific activity of $1.5-3.0 \times 10^9$ dpm/ μ g with a random primer synthesis kit (Boehringer Mannheim, Laval, QC Canada). These and all remaining blots were hybridized in sequence with three probes, porcine StAR cDNA (14), P450scc cDNA (25) and 28s rRNA. Duplicate blots from all trials were hybridized with a P450arom probe corresponding to

nt 850-1497 of the bovine sequence (26). To further characterize the response to EGF, representative blots were hybridized with a porcine LH receptor probe (27). Quantitative estimates of mRNA abundance for the genes of interest were made as we have previously reported (13, 14). For StAR the major positive bands on the consequent autoradiograms were scanned individually using a computer imaging system. The areas under the resultant curves were summed and integrated by means of the Macintosh program, Collage (Fotodyne Inc., New Berlin, WI). The single P450_{scc}, P450_{arom} and 28s bands were likewise scanned and the latter served as control for loading and transfer of RNA.

Western blots

CL from each of the four stages of the luteal phase described above were homogenized in 0.25 M sucrose 10 mM Tris and 0.1 mM EDTA. The mitochondrial fraction was isolated by centrifugation as previously described (13), and the protein content assayed by the Lowry method (28). Western immunoblotting was performed as previously described (13). Briefly, mitochondrial proteins were solubilized and boiled for 15 min in sample buffer containing 25 mM Tris, pH 6.8, 1% SDS, 5% b-mercaptoethanol, 1mM EDTA, 4% glycerol and 0.01% bromophenol blue. Samples were subjected to electrophoresis on a 12.5 % SDS-PAGE minigel for 45 min at 200 V. The proteins were electrophoretically transblotted to a polyvinylidene difluoride membrane (Bio-Rad, Richmond, CA) at 100 V for 2 h. The membranes were then blocked with 4% Carnation non-fat dry milk in PBS buffer containing 0.5% Tween 20. The membranes were then washed in the same buffer and incubated with primary antibodies specific to StAR (10). The second antibody, donkey anti-rabbit IgG, conjugated to horseradish peroxidase, was added in the presence of the

blocking agent. The signal was detected by chemiluminescence as previously described (10), and the optical density of the immunospecific bands was quantitated by means of a BioImage Visage 2000 computer-assisted analysis system.

Morphological observations

Cells were examined under phase contrast microscopy at 24 h intervals from the time of their isolation through 96 h. Cells were also observed at 6, 12 and 24 h after following treatment with EGF. Photomicrographs of representative fields were taken.

Statistical analyses

Data are presented as means (\pm SEM) of the ratio of optical density values for the mRNA in question to that of 28s in three or four independent replicates of each experiment, each conducted on different days in different pools of cells. For statistical analysis, Shapiro's test was employed to determine normality of distribution of optical density data, and when normality was absent, data were logarithmically transformed prior to analysis. Homogeneity of variance was confirmed for each experiment by Bartlett's test. Overall statistical significance was evaluated by analysis of variance of optical density data, with treatment, time (or dose where appropriate), and replicate as the main effects. In the presence of a significant overall F value, individual comparisons between treatments or times were made by the least significant difference method. Correlation analysis was performed to determine the relationship between StAR mRNA and protein abundance. The level of probability accepted as statistically significant was $p < 0.05$.

RESULTS

Luteinization *in vivo*

The abundance of mRNA coding for both StAR and P450scc, depicted in Fig. 1c, varied during the luteal phase in corpora lutea ($p < 0.05$). Both were detectable in the earliest corpora lutea recovered, and were further elevated during the later part of the mid-luteal phase ($p < 0.05$). No message for either gene was detectable in the regressed CL. StAR protein was also detected in the earliest corpora lutea collected. Mean protein abundance was 3-4 fold greater during the mid-luteal phase ($p < 0.05$), and no protein was detectable in Western blots from regressed corpora lutea (Fig. 1c inset). There was a positive correlation ($r = 0.79$, $p < 0.03$) between StAR message and StAR protein. P450arom mRNA was not detectable in any CL samples.

Luteinization *in vitro*

At isolation from 3-5 mm porcine follicles, granulosa cells contained P450aromatase mRNA in detectable amounts, while both StAR and P450scc mRNA appeared absent. Stimulation of these cells for 1 h with 300 μ M dbcAMP resulted in up to five-fold increases in the message coding for P450aromatase ($p < 0.05$, Figure 2). By 6 h after isolation, both steady-state and cAMP-stimulated P450arom message were barely present, while P450scc mRNA had begun to appear. At 12 and 24 h, the P450arom message had disappeared, and it could not be found at any time thereafter through 120 h after cell isolation. The dbcAMP treatment resulted in increases in P450scc mRNA to 4.5 fold by 24 h after plating (Fig. 2).

Cells underwent progressive morphological changes consistent with luteinization (Fig. 3). At 24 h after plating, the cultures were not yet confluent and cells were found in clumps, with most maintaining the rounded shape present at isolation, with but a few displaying cytoplasmic projections (Fig. 3A). By 48 h large scale remodeling had occurred, confluence had been achieved, round cells had become rare and a flattened, epithelial form was the most common phenotype. By 72 h virtually all of the cells had attained the epithelial form, and by 96 h an epithelial, block-like form was the most common phenotype (Fig. 3B).

StAR mRNA was not detectable in control cultures by Northern blot until 48 h after plating, while P450scc mRNA, first observed at 6 h (Fig. 2) was found to be continuously present through 96 h of culture (Fig. 4). Incubation with 300 μ M dbcAMP hastened the appearance of the message coding for StAR by at least 24 h. The same dose of cAMP significantly elevated both StAR and P450scc message abundance at every time evaluated, from 24-96 h of culture (Figs. 4 and 5, $p < 0.01$). IGF-1 (10 ng/ml) also induced precocious occurrence of StAR message relative to control cultures, in that a detectable signal was present at 24 h. This signal was quantitatively greater at 24 h than that induced by dbcAMP alone ($p < 0.05$). The effects of IGF-1 on StAR mRNA were not dose-dependent, as responses of the same magnitude were present at 1, 10 and 100 ng/ml (data not shown), nor were the effects of dbcAMP and IGF-1 additive (Figure 4). IGF-1 also increased P450scc message abundance at 24 and 96 h ($p < 0.05$), with a tendency toward increase at 48 and 72 h (Fig. 5). As above, the effects of IGF-1 on the P450scc message were not dose-dependent within the range of 1-100 ng/ml (data not shown). IGF-1 had no apparent effect on the disappearance of P450arom that occurred with luteinization.

EGF reversal of luteinization

EGF induced remarkable changes in the luteinized epitheloid phenotype (Fig. 6A). Within 6 h first signs of morphological change, the lengthening of the cytoplasmic processes were evident. By 12 h cells with the flattened epithelial phenotype had been largely replaced by star shaped cells with multiple thin projections (Fig. 6B). By 18 h and 24 h these cells were present in clumps and the projections had further thinned.

Equally profound changes in gene expression followed EGF treatment of luteinized granulosa cells (Fig. 7). StAR mRNA, present in low abundance at the initiation of treatment, became barely detectable at 12 h and could not be found at 18 and 30 h. Steady state P450_{scc} message was nonsignificantly elevated at 12 h, and then declined over the subsequent 18 h. Both StAR and P450_{scc} messages were substantially and progressively increased by incubation with dbcAMP, with changes from 12 to 35 fold for StAR and from 7-20 fold for P450_{scc}. EGF virtually eliminated the StAR response to dbcAMP at 6 and 12 h and greatly attenuated it at 18 and 30 h. The P450_{scc} response to dbcAMP was unaffected by EGF treatment. LH receptor mRNA was probed for comparison, and it was progressively reduced by EGF treatment with significant reduction at 6 h and virtual elimination of the message by 24 h (Fig. 8). No P450_{arom} expression could be documented, either before or after EGF treatment of the cultures.

DISCUSSION

In vivo luteinization.

The results of the present study indicate that StAR transcripts and protein vary in the CL through the estrous cycle in mature pigs, with the maximum expression during the mid- to late luteal phase. There was an absence of signal in regressed CL. The pattern of StAR mRNA concurs with that observed by LaVoie et al. (4) in the CL of gilts induced to ovulate by treatment with eCG and hCG, and with our previous results in the bovine CL (13). Further, we show that StAR protein is correlated with transcript abundance in the pig, indicating coupling of transcription and translation, as in the bovine CL (13). The correspondence between StAR expression and progesterone concentrations in luteal tissue (4) is consistent with its important role in the acquisition of steroidogenic capability during luteinization.

LaVoie et al. (4) demonstrated basal levels of StAR transcripts in whole follicles in unstimulated pig ovaries, and modest increases in StAR prior to ovulation in the pig. We previously reported strong expression of StAR in thecal cells from porcine follicles, but none in porcine granulosa cells (14). It is therefore expected that the StAR in preovulatory follicles is restricted to the thecal compartment. Alternatively, it may be that the LH activity of eCG (29) stimulates premature preovulatory changes in StAR expression and progesterone synthesis in granulosa cells.

In vitro luteinization

One purpose of the present study was to determine how faithful the model of granulosa cell luteinization *in vitro* is to the development of the CL *in vivo*. Estrogen production by granulosa cells declines rapidly after the LH surge in both in the pig (30) and the cow (31). In the present study, no P450arom mRNA could be detected in the corpora lutea from the porcine estrous cycle. There is a similar decline in estrogen synthesis during the early stages of luteinization *in vitro* in porcine (32) and bovine (33) granulosa cells. P450aromatase gene expression is decreased by the LH surge in the rat (6). Herein we show the loss of both the steady-state and cAMP-inducible P450arom mRNA within 6 hours after plating of granulosa cells, during the early stages of *in vitro* luteinization, indicating concurrence of the *in vitro* and *in vivo* models.

StAR mRNA was undetectable in untreated cultures prior to 48 h, consistent with reports of unstimulated bovine granulosa cells (34). This compares with the report of Balasubramanian et al. (23), who reported detection of steady state StAR mRNA in porcine granulosa cells at 30 h after plating in 3% FBS. The difference may reflect their use of the RNAase protection assay, expected to be more sensitive than the Northern analysis we employed. Induction of StAR by cAMP was first detectable at 24 h in the present study, similar to FSH stimulation at 30 h reported by Balasubramanian et al. (23). In contrast to StAR, P450scc was present as early as 6 h after plating in the present study. Progesterone accumulation in medium of porcine granulosa cells has been demonstrated as early as 24 h in this model (35, Murphy and Dobias 1998 unpublished). It has been suggested that steroidogenesis can proceed in the absence of previous or concurrent StAR expression in both adrenal (36) and Leydig cells (37). It is possible that this occurs early in the luteinization process in granulosa cells. However, it is more

likely that StAR is expressed in low but sufficient abundance to allow for basal progesterone synthesis during early luteinization. We may have been able to demonstrate StAR transcripts earlier in luteinization by means of a more sensitive detection method.

The evidence in the present study clearly demonstrates that IGF-1 brings about earlier expression of StAR mRNA, and thus, accelerated luteinization. The effects appear binomial rather than dose-dependent, as the responses were the same through a 100-fold range of IGF-1 doses. The combination of IGF-1 and cAMP was neither consistently additive nor synergistic. These results differ from the report of Balasubramanian et al. (23), who showed little direct effect of IGF-1 on StAR expression, and who reported a marked synergism between IGF-1 and either FSH, a ligand that employs cAMP as a second messenger, or 8-bromo-cAMP. The differences may reflect differences in the model systems employed in each study. The cell populations in the study of Balasubramanian et al. (23), are described as sparingly differentiated, in reference to the minimal concentration of serum used in plating, and the small (1-5 mm) follicles from which the cells were derived. In the present study we took cells exclusively from 3-5 mm follicles, and plated with 10 % serum, which may have resulted in a different population of cells and a dissimilar state of differentiation. Nonetheless, both studies concur in demonstrating a role for IGF-1 in the acquisition of full steroidogenic capability in luteinizing cells. In contrast, IGF-1 mRNA is present in proliferating rat granulosa cells, while its absence is related to luteinization (38). This difference may be explained by the fact that IGF-1 mRNA and IGF-1 protein do not co-localize in the rodent ovary (19). The effects of EGF on luteinized granulosa cells were both acute and profound. They included reduction in the abundance of the

LH receptor message within 6 h, and its complete elimination by 24 h. This result concurs with the down-regulatory effect of EGF on hCG binding and LH receptor mRNA in pig Leydig cells (39) and in MA-10 Leydig tumor cells (40), where the effect is reduction in transcription of the LH receptor gene (41). Incubation with EGF reduced StAR mRNA to barely detectable levels within 12 h of treatment, and the ability of dbcAMP to stimulate StAR was drastically compromised by EGF. This result agrees with EGF neutralization of cAMP-stimulated 17 α -hydroxysteroid dehydrogenase expression (42). Nevertheless, the effects on steady state P450scc transcript levels were biphasic, with apparent increases at 6 h followed by a decline through 30 h, and dbcAMP induction of P450scc was only marginally affected. The early increase in P450scc can be explained by the fact that EGF initially stimulates the formation of endogenous cAMP (43). This explanation does not account for the EGF abolition of StAR expression. In porcine granulosa cells cultured for 36 h in 1 % serum and then treated with 10 nM EGF for a further 48h, there was significant up-regulation of P450scc mRNA, in the absence of increases of progesterone (44). These results are consistent with the view that there are differential effects of EGF on steroidogenic proteins, with stimulation or no effect on P450scc, and profound downregulation of StAR expression. A recent study demonstrated similar differential effects of elevated cellular temperature and consequent heat shock protein synthesis, in which StAR protein abundance was severely reduced, while little change was seen in P450scc protein (45).

The cytoplasmic and nuclear effectors of EGF inhibition of StAR expression have not been elucidated. The PKC pathway is a good candidate for the effects of EGF, as we have previously demonstrated its role in EGF-mediated changes in this model (46). In addition, phorbol ester activation of PKC interferes

with ligand-induced StAR expression (14) and other investigators have shown that PKC activation interferes with differentiation of pig granulosa cells (47). Recent studies have demonstrated potent down-regulatory effects of transforming growth factor- β on StAR gene expression in bovine adrenal cortex cells, believed to act through Smad protein regulation of transcription (48). At the level of the StAR promoter, it has been shown that the nuclear receptor DAX-1 binds DNA and acutely regulates StAR transcription in MA-10 cells (49), providing yet another mechanism for regulation of this essential element of steroidogenesis.

Structural changes in granulosa cells during luteinization and after EGF treatment.

At isolation, granulosa cells are round, and, at attachment, they take a fibroblastic form. After 72 h in culture, they have blocky appearance, often described as epitheloid. These changes are accompanied by, and or due to rearrangement of junctional elements and concurrent reorganization of the cytoskeleton (50). This phenotypic remodeling engenders reduction in expression of actin and actin binding proteins in rat granulosa cells (51). Phenotypic remodeling is an essential element of luteinization and is believed to be necessary for maximal progesterone synthesis (50). As noted above, the effects of EGF treatment on StAR and LH receptor expression were indicative of inhibition of steroidogenesis and the reversal of the luteinization process. The morphological changes, especially the establishment of long cytoplasmic processes, are suggestive of a return to the fibroblastic form, and the involvement of the cytoskeleton. Similar morphology was documented by Hatey et al. (47) in phorbol ester treated pig granulosa cells, implicating the PKC pathway and EGF in structural modification of granulosa cells. A mechanism for

EGF-induced cytoskeletal remodeling can be found in the presence of an actin binding domain on the EGF receptor (52) which is essential for the morphological changes associated with invasion of tumor cell lines (53).

In summary, the results of the present investigation demonstrate that in pig ovarian tissues, the onset of StAR and the loss of P450arom gene expression accompany luteinization *in vivo* and *in vitro*. The acquisition of StAR can be precociously induced by addition of IGF-1 to pig granulosa cell cultures. EGF causes structural changes in luteinized granulosa cells, and eliminates the steady state levels of StAR and LH receptor mRNA, with no effect on P450scc. Together these results suggest the IGF-1 enhances and EGF reverses the process of luteinization.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Mira Dobias for excellent technical assistance and Tao-Yan Men for RT-PCR cloning of the pig StAR cDNA, Dr. Tommy Wise for the P450scc probe and Dr. C.A. Price for the P450arom probe and for a critical review of the manuscript.

REFERENCES

1. Richards JS. Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocrine Rev* 1994; 15 725-751.
2. Smith MF, McIntush EW, Smith GW. Mechanisms associated with corpus luteum development. *J Anim Sci* 1994; 72: 1857-1872.
3. Voss AK, Fortune JE. Levels of messenger-ribonucleic-acid for cytochrome-P450 17-alpha-hydroxylase and p450 aromatase in preovulatory bovine follicles decrease after

- the luteinizing-hormone surge. *Endocrinology* 1993; 132: 2239-2245.
4. LaVoie HA, Benoit AM, Garmey JC, Dailey RA, Wright DJ, Veldhuis JD. Coordinate developmental expression of genes regulating sterol economy and cholesterol side-chain cleavage in the porcine ovary. *Biol Reprod* 1997;57:402-407
 5. Juengel JL, Guy MK, Tandeski TR, McGuire WJ, Niswender GD. Steady-state concentrations of messenger ribonucleic acid encoding cytochrome P450 side-chain cleavage and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ 5, Δ 4 isomerase in ovine corpora lutea during the estrous cycle. *Biol Reprod* 1994: 51:380-384.
 6. Fitzpatrick SL, Carlone DL, Robker RL, Richards JS. Expression of aromatase in the ovary: down-regulation of mRNA by the ovulatory luteinizing hormone surge. *Steroids* 1997; 62:197-206.
 7. May JV, Schomberg DW. Granulosa cell differentiation in vitro: effect of insulin on growth and functional integrity. *Biol Reprod* 1981; 25:421-431.
 8. Ford JJ, Lunstra DD. Differential production of estradiol by subpopulations of porcine granulosa cells. *J Reprod Dev* 1992; 38:91-98.
 9. Douglas, D. A., J. H. Song, Moreau GM, Murphy BD. Differentiation of the corpus luteum of the mink (*Mustela vison*): mitogenic and steroidogenic potential of luteal cells from embryonic diapause and postimplantation gestation. *Biol Reprod* 1998; 58:1163-11699.
 10. Clark BJ, Wells J, King SR, Stocco DM. The purification, cloning and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. *J Biol Chem* 1994; 269:28314-28322.
 11. Lin D, Sugawara T, Strauss JF, Clark BJ, Stocco DM, Saenger P, Rogol A, Miller WL. Role of steroidogenic acute regulatory

- protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. *Science* 1995; 267:1828-1831.
12. Caron KM, Soo S-C, Wetsel WC, Stocco DM, Clark BJ, Parker KL. Targeted disruption of the mouse gene encoding steroidogenic acute regulatory protein provides insights into congenital lipoid adrenal hyperplasia. *Proc Nat Acad Sci USA* 1997; 94:11540-11545.
 13. Pescador N, Soumano K, Stocco DM, Price CA, Murphy BD. Steroidogenic acute regulatory protein in bovine corpora lutea. *Biol Reprod* 1996; 55:485-491
 14. Pescador N, Houde A, Stocco DM, Murphy BD. Follicle-stimulating hormone and intracellular second messengers regulate steroidogenic acute regulatory protein messenger ribonucleic acids in in luteinized porcine granulosa cells. *Biol Reprod* 1997; 57:660-668.
 15. Gospadarowicz D, Ill CR, Birdwell CR. Effects of fibroblast and epidermal growth factors on ovarian cell proliferation in vitro. I. Characterization of the response of granulosa cells to FGF and EGF. *Endocrinology* 1977; 100:1108-
 16. Gospadarowicz D, Bialecki H. Fibroblast and epidermal growth factors are mitogenic agents for cultured granulosa cells of rodent, porcine and human origin. *Endocrinology* 1979; 104:757-764.
 17. May JV, Frost JP, Schomberg DW. Differential effects of epidermal growth factor, somatomedin-C/insulin-like growth factor I, and transforming growth factor- on porcine granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation. *Endocrinology* 1988; 123:168-179.
 18. Singh B, Rutledge JM, Armstrong DT. Epidermal growth factor and its receptor gene expression and peptide localization in porcine ovarian follicles. *Mol Reprod Dev* 1995; 40:391-399.
 19. Goubau S, Murphy BD, Han VKM, Schultz GA. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) colocalizes with IGF-binding

- proteins (IGFBPs) in mouse and rat ovary. *Endocrine* 1996 4:231-221.
20. Monniaux D, Huet C, Besnard N, Clement F, Bosc M, Pisselet C, Monget P, Mariana JC. Follicular growth and ovarian dynamics in mammals. *J Reprod Fertil (Suppl)* 1997; 51:3-23.
 21. Guidice LC. Insulin-like growth factors and ovarian follicular development. *Endocrin Rev* 1992; 13:641-669.
 22. Veldhuis JD, Furlanetto RW, Juchter D, Garmey J, Veldhuis P. Trophic actions of human somatomedin-C/insulin-like growth factor I on ovarian cells: In vitro studies with swine granulosa cells. *Endocrinology* 1985; 116:1235-
 23. Balasubramanian K, Lavoie HA, Garmey JC, Stocco DM, Veldhuis JD. Regulation of porcine granulosa cell steroidogenic acute regulatory protein (StAR) by insulin-like growth factor I: synergism with follicle-stimulating hormone or protein kinase A agonist. *Endocrinology* 1997; 138:433-439
 24. Akins EL, Morrissette MC. Gross ovarian changes during the estrous cycle of swine. *AM J Vet Res* 1968; 29:1953-1957.
 25. Mulheron GW, Stone RT, Miller WL, Wise T. Nucleotide sequence of cytochrome P450 cholesterol side chain cleavage cDNA isolated from porcine testis. *Nucleic Acid Res* 1989; 17:1773.
 26. Soumano K, Silversides DW, Doizé F, Price CA. Follicular 3β -hydroxysteroid dehydrogenase and cytochromes P450 17α -hydroxylase and aromatase messenger ribonucleic acid in cattle undergoing superovulation. *Biol Reprod* 1996; 55:1419-1326.
 27. Sites CK, Patterson K, Jamison CS, Friezner-Degen SJ, LaBarbera AR. Follicle-stimulating hormone (FSH) increased FSH receptor messenger ribonucleic acid while decreasing FSH binding in cultured porcine granulosa cells. *Endocrinology* 1994; 134:411-417.

28. Lowry OH, Rosebrough NV, Farr AL, Randall LJ. Protein measurements with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-275.
29. Murphy BD, Martinuk SD. Equine chorionic gonadotropin. *Endocrine Rev* 1991; 12:27-44.
30. Ainsworth L, Tsang BK, Downey BR, Marcus GJ, Armstrong DT. Interrelationships between follicular fluid steroid levels, gonadotropic stimuli, and oocyte maturation during preovulatory development of porcine follicles. *Biol Reprod* 23: 621-627.
31. Dieleman SJ, Blankenstein DM. Changes in estrogen synthesizing ability of bovine follicles relative to the peak of LH. *J Reprod Fert* 1984; 72:487-494.
32. Kettelberger DM, Hoover D, Anderson L. Loss of aromatase activity in porcine granulosa cells during spontaneous luteinization in vitro. 19th Ann Mtng Soc Study Reprod, Ithaca NY 1986; Abs 160.
33. Henderson KM, Moon YS. Luteinization of bovine granulosa cells and corpus luteum formation associated with loss of androgen-aromatizing ability. *J Reprod Fertil* 1979; 56:89-97.
34. Hartung S, Rust W, Balvers M, Ivell R. Molecular cloning and in vivo expression of the bovine steroidogenic acute regulatory protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 215:646-653
35. Murphy BD. Down-regulation of FSH receptor mRNA in luteinized porcine granulosa cells. *Bio Reprod* 1994; 50 (suppl. 1): Abstr. 316 p.133.
36. Ariyoshi N, Kim YC, Artemenko I, Bhattacharyya KK, Jefcoate CR. Characterization of the rat StAR gene that encodes the predominant 3.5- kilobase pair mRNA. ACTH stimulation of adrenal steroids in vivo precedes elevation of StAR mRNA and protein. *J Biol Chem* 1998; 273:7610-9.

37. Lukyanenko YO, Carpenter AM, Brigham DE, Stocco DM, Hutson JC. The macrophage-derived stimulator of Leydig cells regulates steroidogenesis through a StAR-independent pathway. *J Endocrinol* 1998; (in press).
38. Zhou, J, Refuerzo J, Bondy C. Granulosa cell DNA synthesis is strictly correlates with the presence of insulin-like growth factor I and absence of c-fos/c-jun. *Mol Endocrinol* 1995; 9:924-931.
39. Chuzel F, Clark AM, Avallet O, Saez JM. Transcriptional regulation of the lutropin/human choriogonadotropin receptor and three enzymes of steroidogenesis by growth factors in cultured pig Leydig cells. *Eur J Biochem* 1996; 239:8-16.
40. Wang H, Segaloff DL, Ascoli M. Epidermal growth factor and phorbol esters reduce the levels of the cognate mRNA for the LH/CG receptor. *Endocrinology* 1991; 128: 2651-2653.
41. Nelson S, Ascoli M. Epidermal growth factor, a phorbol ester, and 3',5'-cyclic adenosine monophosphate decreased the transcription of the luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor gene in MA-10 Leydig tumor cells. *Endocrinology* 1992; 131:615-620.
42. Kaminski, T, Akinola L, Poutanen M, Vihko R, Vihko P. Growth factors and phorbol 12-myristate-13-acetate modulate the follicle-stimulating hormone and cyclic adenosine-3',5'-monophosphate-dependent regulation of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression in rat granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 31:47-56.
43. Budnik LT, Mukhopakhyay AK. Modulatory action of epidermal growth factor on differentiated human granulosa lutein cells: cross-talk between ligand activated receptors for EGF and gonadotropin. *Mol Cell Endocrinol* 1996; 124:141-150.
44. Urban RJ, Garmey JC, Shupnik MA, Veldhuis JD. Insulin-like growth factor type I increases concentrations of messenger

- ribonucleic acid encoding cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage enzyme in primary cultures of porcine granulosa cells. *Endocrinology* 1990; 127:2481-2488.
45. Liu Z, Stocco DM. Heat shock-induced inhibition of acute steroidogenesis in MA-10 cells is associated with inhibition of the synthesis of the steroidogenic acute regulatory protein. *Endocrinology* 1997; 138:2722-2728.
 46. Lindsell CE, Misra V, Murphy BD. Regulation of follistatin messenger ribonucleic acid in porcine granulosa cells by epidermal growth factor and the protein kinase-C pathway. *Endocrinology* 1993; 132:1630-1636.
 47. Hatey F, Mulsant P, Bonnet A, Benne F, Gasser F. Protein kinase C inhibition of in vitro FSH-induced differentiation in pig granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 1995; 107:9-16.
 48. Brand C, Cherradi N, Defaye G, Chinn A, Chambaz EM, Feige J-J, Bailly S. Transforming growth factor β 1 decreases cholesterol supply to mitochondria via repression of steroidogenic acute regulatory protein expression. *J Biol Chem* 1998; 273:6410-6416.
 49. Zazopoulos E, Lalli E, Stocco DM, Sassone-Corsi P. DNA binding and transcriptional repression by DAX-1 blocks steroidogenesis. *Nature* 1997; 390:311-315.
 50. Amsterdam A, Phehn-Dujowich D, Suh BS. Structure-function relationships during differentiation of normal and oncogene-transformed granulosa cells. *Biol Reprod* 1992; 46:513-522.
 51. Ben-Zèev A, Amsterdam A. In vitro regulation of granulosa cell differentiation. Involvement of cytoskeletal protein. *J Biol Chem* 1987; 262:5266-5376.
 52. van der Heyden MA, Nievers M, Verkleij AJ, Boonstra J, Van Bergen Henegouwen PM. Identification of an intracellular domain of the EGF receptor required for high-affinity binding of EGF. *FEBS Lett* 1997; 410:265-268.

53. van der Heyden MA, Van Bergen en Henegouwen PM, de Ruiten N, Verdaasdonk MA, van den Tweel JG, Rijksen G, Boonstra J, Joling P. The actin binding domain of the epidermal growth factor receptor is required for EGF-stimulated tissue invasion. *Exp Cell Res.* 1997; 234: 521-526.

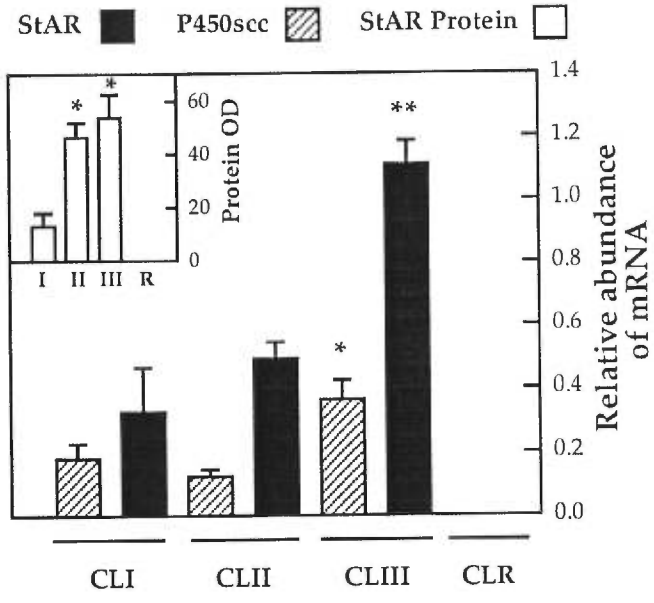
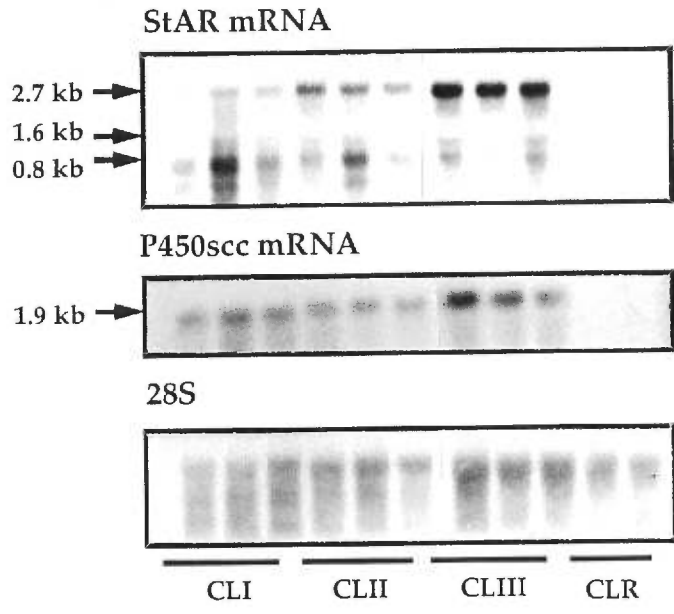


Figure 1c. Northern and Western analysis derived from porcine corpora lutea in which the stage of the estrous cycle was defined by morphological characteristics. Northern blots were hybridized in sequence with the 0.85 kb porcine StAR cDNA probe, the 1.0 kb porcine P450scc probe, and the 1.4 kb fragment from the internal region of the 28S ribosomal RNA gene. The upper panel is a representative Northern blot, while the lower panel presents the results of densitometric scanning 3 to 5 CL from different ovaries taken at stages of the estrous cycle. Values are the mean \pm SEM of the ratio between either StAR or P450scc mRNA abundance divided by the 28S value, which served as a control for loading. The inset to the lower panel depicts mean \pm SEM of optical density indicating relative protein concentrations in 50 μ g mitochondrial protein from 3 CL from each stage of the estrous cycle. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ from CLI.

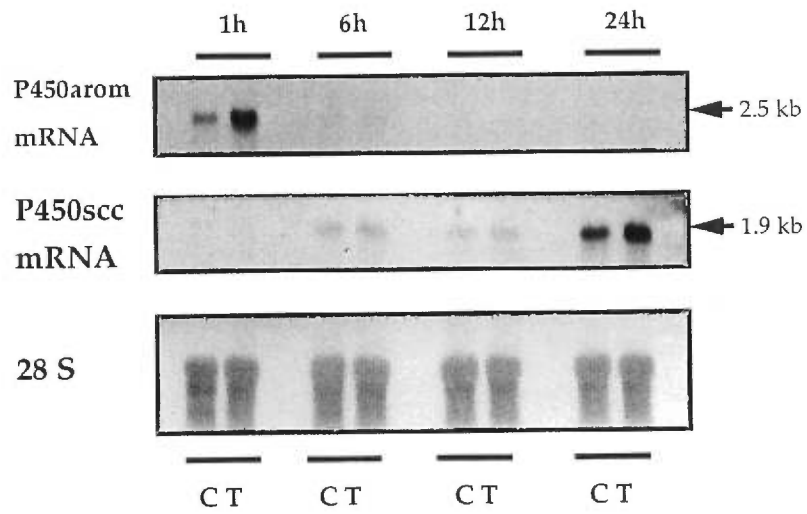


Figure 2c. Northern blot demonstrating the variation in P450arom and P450scc during the first 24 h after isolation of porcine granulosa cells from 3-5 mm follicles. Cells were plated in 10% serum and incubated in medium (C) or in medium containing dbcAMP (300 μ M, T) for periods from 6-24 h. This blot is representative of four replicates of the experiment.

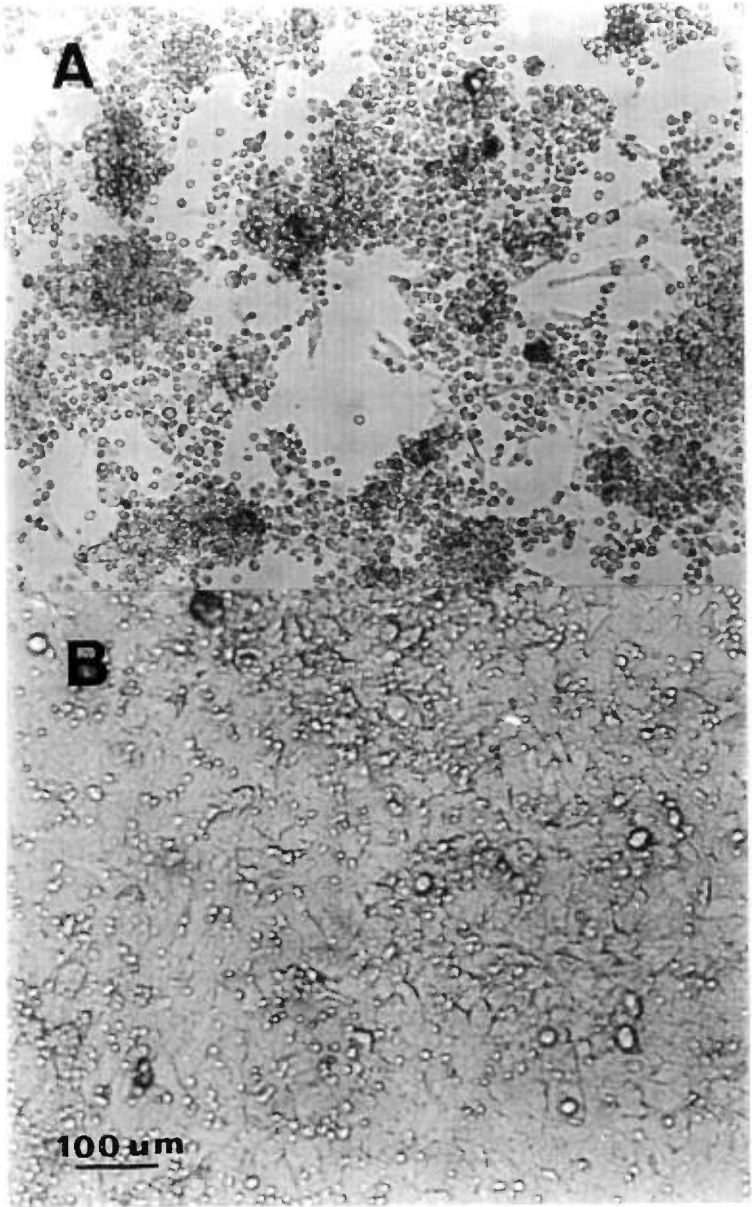


Figure 3c. Morphological changes associated with luteinization of pig granulosa cells. Cultures were incubated for 48 h with 10 % FBS and 48 h under serum-free conditions. The photos presented are of representative fields of culture wells at 24 (A) and 96 h (B) after plating taken under phase contrast microscopy. The bar represents 100 μ M.

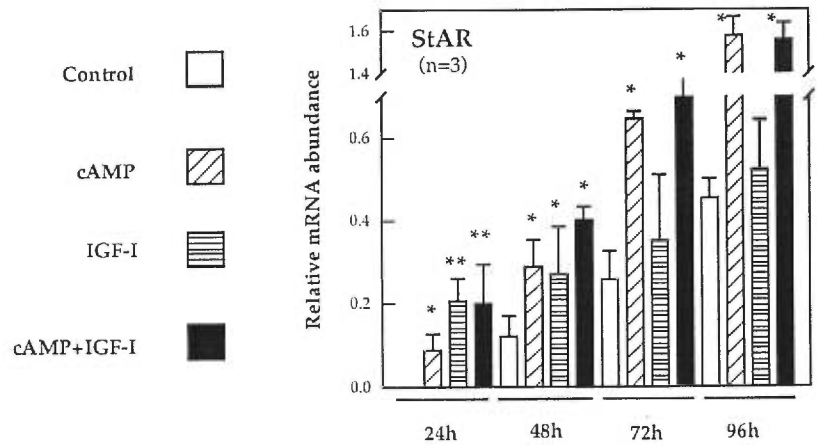
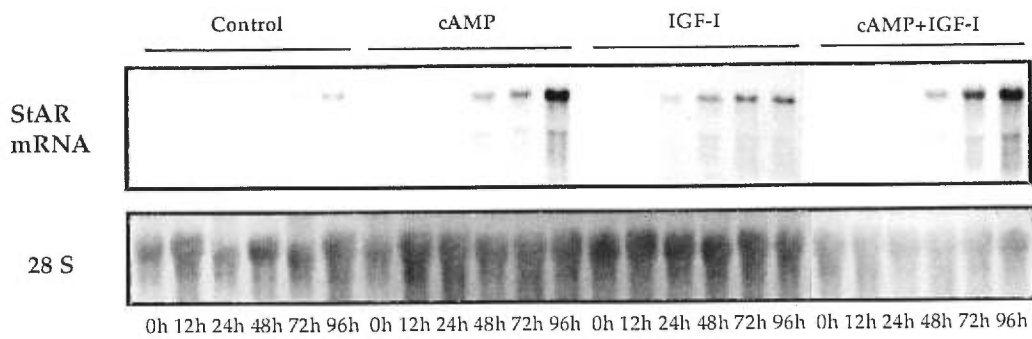


Figure 4c. Northern blot showing evolution of the presence of StAR mRNA during the process of luteinization of granulosa cells. Cells designated control received medium alone (48 h with 10% FBS, 48 h serum free), while other cultures were continuously treated with dbcAMP (300 μ M), IGF-I (10 ng/ml) or the combination of these doses of dbcAMP and IGF-I. The lower panels depict the effects of treatments (mean \pm SEM) on StAR abundance based on densitometric ratios, as described in the legend to Fig. 1c. Asterisks indicate treatments significantly different (* p <0.05, ** p <0.01) from control for each time period.

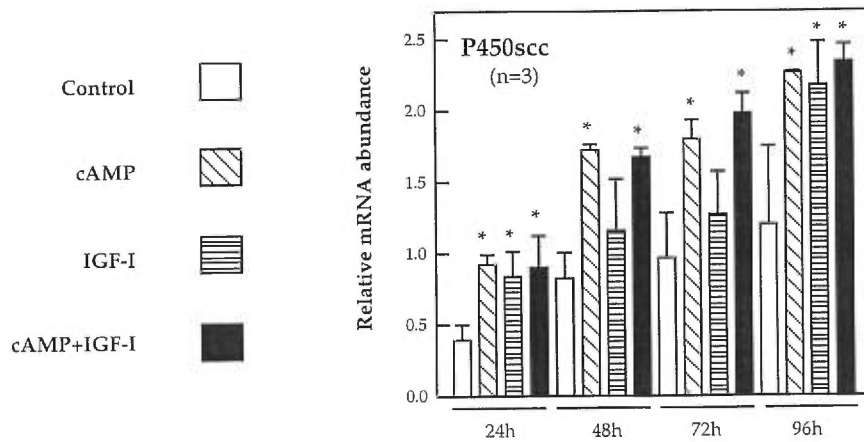
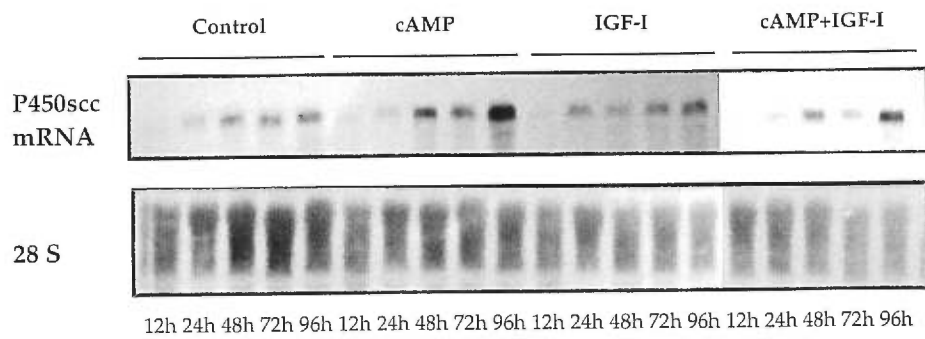


Figure 5c. Northern blot showing changes in P450_{scc} mRNA abundance during the process of luteinization of granulosa cells. Cells designated control received medium alone (48 h with 10% FBS, 48 h serum free), while other cultures were continuously treated with dbcAMP (300 μ M), IGF-I (10 ng/ml) or the combination of these doses of dbcAMP and IGF-I. The lower panels depict the effects of treatments (mean \pm SEM) on P450_{scc} transcripts based on densitometric ratios as described in the legend to Fig. 1c. Asterisks indicate treatments significantly different (* p <0.05) from control for each time period.

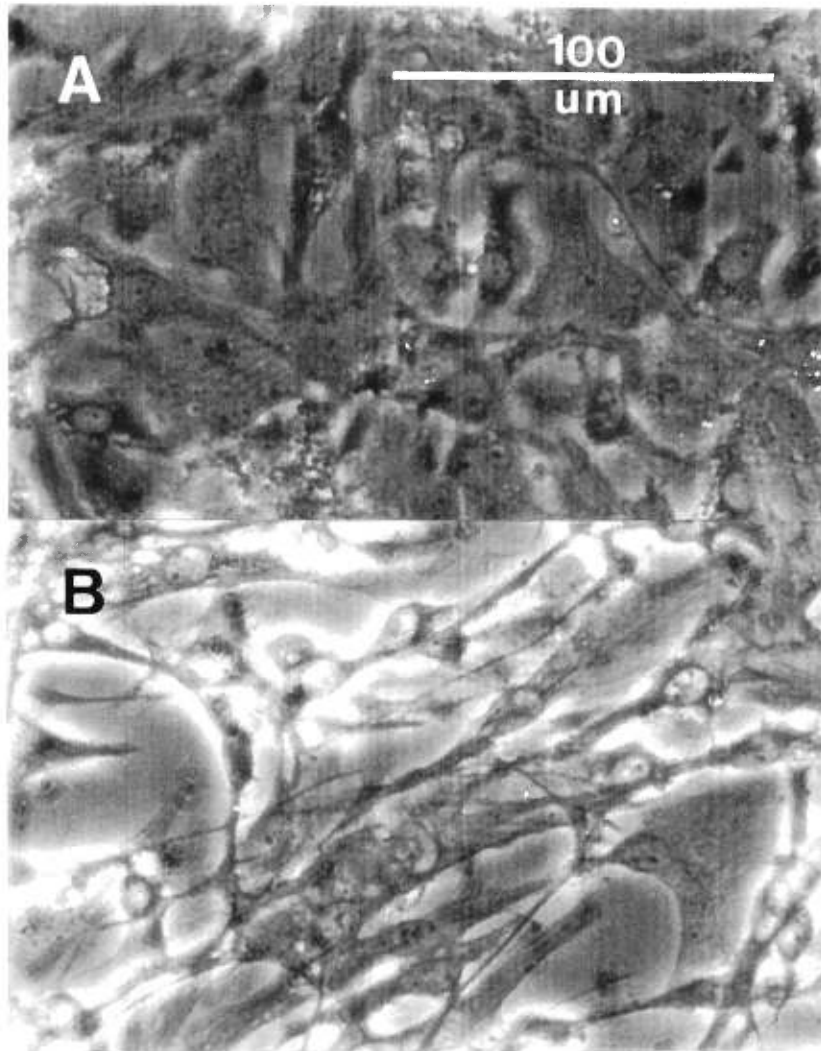


Figure 6c. Morphological changes induced by treatment of luteinized granulosa cells with 10 nM EGF. Cells were fixed in methanol viewed under phase contrast microscopy. Panel A is a control culture, panel B shows the a representative field from an EGF-treated culture at 12 h after initiation of the experiment. The bar indicates 100 μ M.

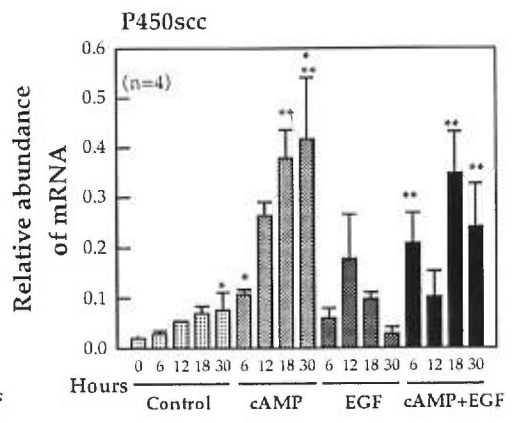
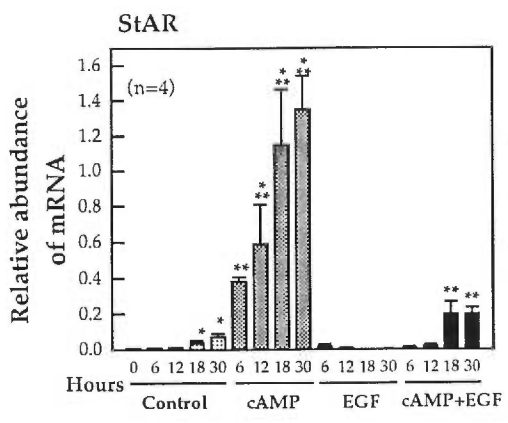
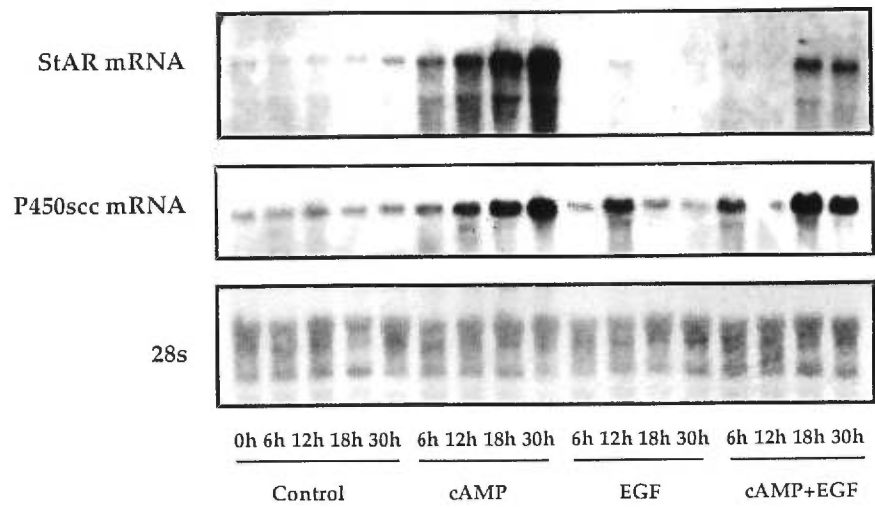


Figure 7c. Changes in abundance of StAR and P450scc message in luteinized granulosa cells induced by treatment with EGF. Luteinized cells (96 h after plating), were treated with medium alone (control), 10 nM EGF (EGF), 300 μ M dbcAMP (cAMP) or the combination of these two agents at the same doses (cAMP+EGF). The upper panel is a Northern blot of a representative experiment, the lower depicts the mean (\pm SEM) of the densitometric ratios for StAR and P450scc abundance over the 30 h of the experiment. Different superscripts indicate values significantly different at $p < 0.05$.

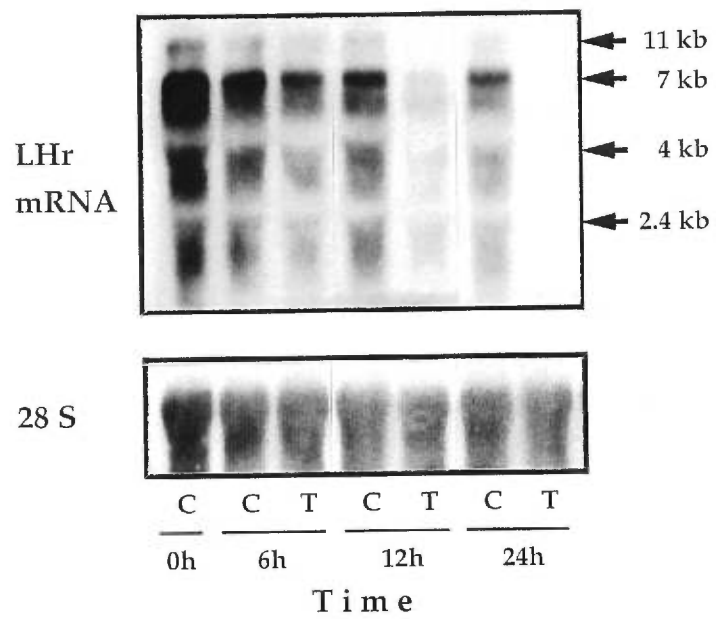


Figure 8c. Northern blot representative of three experiments in which EGF (10 nM) reduced mRNA for the porcine LH receptor in luteinized granulosa cells. Cells were treated beginning at 96 h after plating with either EGF (T) or medium alone (C) and cultures were terminated at 0, 6, 12 and 24 h.

DISCUSSION GÉNÉRALE

L'ensemble des résultats de notre travail apporte de l'information nouvelle sur le contrôle de l'expression, *in vivo* et *in vitro* de la protéine StAR et son message dans le tissu lutéal ainsi que sur la distribution tissulaire de ce dernier. Nous avons pu observer que l'augmentation dans l'accumulation du message stimulé par la voie de la PKA est dépendant du temps, de son inhibition par la voie PKC, de sa modulation par les facteurs de croissance et de la sensibilité de sa transcription à la synthèse *de novo* des protéines.

Des études antérieures ont suggéré que la protéine StAR n'était pas présente dans le placenta humain et murin (Strauss et al., 1996). Hartung et al. (1995) rapportent l'absence de l'ARNm de la StAR dans l'endomètre bovin pendant la gestation, mais il n'est pas clair s'ils ont étudié le complexe placentaire ou la région intercaronculaire de l'utérus. La présence indiscutable de l'ARNm de la StAR dans les cotylédons et les caroncules bovins tel qu'observé dans nos expériences constitue la première démonstration de sa présence dans le placenta.

Lutéinisation *in vivo*

Les résultats des études effectuées dans le corps jaune bovin et porcin, montrent la présence d'une protéine dont la migration électrophorétique est identique à celle de la StAR chez la souris (Clark et al., 1994), l'espèce chez laquelle cette protéine a été initialement caractérisée. Nous rapportons dans ce travail la présence d'une bande principale à 30 kDa et une bande secondaire. Cette petite bande représente une protéine légèrement plus grande qui est tout probablement le précurseur protéique synthétisé dans le cytosol puis importé

et enfin transformé. Ce qui donne comme résultat des protéines isomorphes matures de 30 kDa. Chez la souris un des motifs de la séquence d'aiguillage de la molécule est fortement conservé (Hendrick et al., 1989). Cependant, ce motif n'est pas présent dans la StAR bovine (Hartung et al., 1995) et humaine (Sugawara et al., 1995), ce qui indique peut-être, l'existence d'un seul précurseur protéique chez ces espèces. On observe une très forte corrélation de la quantité de protéine StAR avec son message dans le CL bovin et porcin. Une variation concurrente a été observée dans les cellules de la granulosa porcine (Balasubramanian et al., 1997). L'ensemble de ces observations suggèrent que la transcription et la traduction de la StAR vont de pair dans le tissu ovarien.

Nous avons également observé que la sonde StAR de souris s'hybride avec plusieurs transcrits dans les échantillons des corps jaunes bovins comme les sondes homologues chez la souris (Clark et al., 1994), l'humain (Sugawara et al., 1995), la brebis (Juengel et al., 1995) la vache (Hartung et al., 1995). Dans notre cas, la bande majeure se situe à 2.9 kb et la bande mineure à 1.8 kb, ce qui confirme les résultats de Hartung et al. (1995). Ces résultats sont aussi plus en accord avec les résultats des travaux sur le CL ovin (Juengel et al., 1995) que ceux obtenus chez l'humain, où la bande mineure prédomine (Sugawara et al., 1995).

En ce qui concerne le CL porcin, nous avons pu détecter la présence de deux messages avec la sonde d'ADNc de souris. La sonde StAR homologue constituée du cadre de lecture du gène porcin de la StAR s'hybride avec des transcrits d'environ 2.7, 1.6 et 0.8 kb dans les tissus homologues. Dans cette étude, le troisième message (0.8 kb) n'était pas toujours discernable: il était donc moins abondant que les deux autres. Cependant, nous n'avons pas détecté un patron d'expression différentiel

des transcrits. La présence de trois espèces d'ARNm concorde avec les résultats des travaux sur l'ARNm de la StAR avec des sondes homologues chez le rat (Sandhoff et McLean, 1996) et l'humain (Sugawara et al., 1995), mais pas avec ceux que nous avons obtenu ou qui ont été rapportés (Hartung et al., 1995) chez la vache, où deux transcrits sont détectés. Par contre, chez l'ovin, il ne semble y avoir qu'une seule espèce d'ARNm (Juengel et al., 1995). Sur ce point, il y a divergence avec d'autres travaux où deux messages de différente mobilité électrophorétique (1.8 et 1.1 kb) ont été identifiés chez le porc avec une sonde homologue (Pilon et al., 1997).

La signification de la présence des deux, trois et parfois quatre messages n'est pas encore connue. Le cadre de lecture qui code pour la protéine StAR mûre de 285 acides aminés chez l'humain est de 885 nt (Sugawara et al., 1995) et la protéine bovine de 284 acides aminés a besoin de 852 codons (Hartung et al., 1995). Ainsi, les deux messages bovins pourraient en théorie produire la StAR. Cependant, le petit message n'a pas la longueur suffisante pour contenir la région codante ou les régions non traduites 5' et 3' qui caractérisent l'ADNc humain (Clark et al., 1995), et les différences peuvent être attribuées à des variations dans la portion non traduite de l'ARNm. Hartung et al. (1995) ont trouvé qu'une sonde dérivée de la région 3' de l'ADNc de la StAR bovin hybride uniquement avec le grand message. Ils en ont conclu que la différence entre les deux espèces d'ARNm était due à l'absence de polyadénylation.

Les résultats de nos études indiquent que les transcrits de la StAR varient dans le CL tout au long du cycle oestral bovin et porcin. L'expression maximale serait associée à la mi-phase lutéale. Le patron d'expression de l'ARNm de StAR est en accord avec celui observé par LaVoie et al. (1997) dans le CL

des truies avec ovulation induite par traitement à l'eCG et l'hCG. La correspondance entre l'expression de la StAR et la concentration de progestérone dans le tissu folliculaire et lutéal (LaVoie et al., 1997) est en concordance avec leur rôle, très important dans l'acquisition de la capacité stéroïdogénique pendant la lutéinisation. LaVoie et al. (1997) ont observé des niveaux de base des transcrits de la StAR dans les follicules complets des ovaires porcins non stimulés et des faibles augmentations de StAR avant l'ovulation. Nous avons observé une forte expression du message de la StAR dans la thèque, mais pas dans les cellules de la granulosa porcine. On peut donc s'attendre à ce que l'ARNm de la StAR dans les follicules préovulatoires soit restreint à la thèque.

Dans nos expériences *in vivo* chez le bovin nous avons été capables de détecter le message du P450scc à travers le développement et la fonction du CL au moins pendant les 24 h suivant le traitement à la PGF2 α . Les études de Rodgers et al. (1986; 1987) suggèrent que les niveaux de l'ARNm de cette enzyme sont plus faibles dans le CL en développement (Stade I) que dans le CL mûre (Stade II et III). Nos résultats confirment l'interprétation que ce message, qui varie entre individus, n'est pas très différent pendant la durée de vie active du CL bovin. Chez le rat, l'expression du P450scc dans le CL a été décrite comme constitutive et indépendante des gonadotrophines/AMPc (Richards, 1994). L'absence de variation relative des niveaux du message dans le CL pendant la phase lutéale est en accord avec le point antérieur. Malgré les différences du modèle expérimental (vaches suroovulées vs non traitées), la perte dans le temps du message du P450scc dans le CL bovin après le traitement à la PGF2 α va dans le sens d'une recherche antérieure (Tian et al., 1994). L'ensemble de ces données peut être interprété comme la preuve de l'expression constitutive de ce gène. Cette conclusion est basée

sur l'absence d'une réduction significative du message pendant les premières 12 h suivant à la traitement avec $\text{PGF2}\alpha$, période durant laquelle le message (Soumano et al., 1998) et les récepteurs (Spicer et al., 1981) à la LH et les connexions AMPc-récepteur (Pate et Condon, 1984) sont perdus dans ce tissu. Cependant, il faut noter que le signal de l'ARNm du P450scc n'a pas été détecté dans le CL au stade IV, indiquant qu'il y a une perte totale pendant la régression. En plus dans les cellules de la granulosa porcine lutéinisées, la LH et l'AMPc augmentent la quantité d'ARNm du P450scc et le traitement à la $\text{PGF2}\alpha$ réduit cette stimulation d'une façon relie au temps et à la dose (Li et al., 1993), ce qui démontre que la régression interfère avec l'expression de ce gène.

La régression du CL bovin est associée à la perte de l'expression de la StAR et de ses produits géniques. Cela est indiqué par l'absence de la détection du message dans le CL stade IV et par la consécutive réduction dans l'abondance de ce message dans les 24 h suivant l'administration des doses lutéolytiques de $\text{PGF2}\alpha$. Ce résultat est en accord avec certains rapports qui indiquent une réduction de 90% de la quantité message de la StAR dans le CL ovin après le traitement des animaux à la $\text{PGF2}\alpha$ (Juengel et al., 1995). Dans nos expériences il a été surprenant de trouver une petite quantité de protéine StAR dans l'extrait d'un CL bovin supposé avoir régressé et dans lequel le message de la StAR n'avait pas été détecté. Cette donnée nous rappelle la présence de la protéine 3β -HSD dans le CL ovin et bovin au moment où la régression est avancée (Conley et al., 1995). La régulation de la synthèse de la protéine StAR est rapide, la demi-vie du précurseur actif est brève et la production de la protéine suit de très près le message (Clark et al., 1995). Cependant, tandis que la demi-vie de l'ARNm de la StAR est relativement courte, la demi-vie de la protéine StAR de 30 kDa mûre, mais inactive, est plus longue

(Stocco et Chen, 1991; Clark et al., 1995). Ceci explique pourquoi la forme mûre de la StAR peut ne pas se manifester pendant la stéroïdogénèse comme dans le cas des cellules MA-10. Finalement, il est possible que des faibles niveaux du message aient échappé à la sensibilité de détection de l'analyse par transfert de Northern.

Lutéinisation *in vitro*

Un des objectifs de nos expériences était de déterminer la fidélité du modèle de lutéinisation des cellules de la granulosa en culture par rapport au développement du CL *in vivo*. La production des oestrogènes par les cellules de la granulosa décline avec rapidité après le pic de LH chez la truie (Ainsworth et al., 1980) et la vache (Dieleman et al., 1984). Dans notre cas, la détection de l'ARNm du P450arom n'a pas été possible dans les CL cycliques porcins. Il y a une diminution semblable de la synthèse des oestrogènes pendant les premiers stades de la lutéinisation *in vitro* dans les cellules de la granulosa porcine (Kettelberger et al., 1986) et bovine (Henderson and Moon, 1979). L'expression du gène du P450arom est diminué par le pic de LH chez le rat (Fitzpatrick et al., 1997). Pour ce qui est de l'ARNm du P450arom nos résultats montrent une perte des niveaux de base et des niveaux générés par l'AMPC au cours des 12 h suivant la mise en culture des cellules de la granulosa, c'est-à-dire au début de la lutéinisation *in vitro*. Il y aurait donc correspondance entre les deux modèles, *in vitro* et *in vivo*.

La lutéinisation est un processus de remodelage à grande échelle qui se produit en réponse à la stimulation endocrine. Pourtant, les facteurs de croissance paracrines ont le potentiel de moduler la différenciation et la prolifération cellulaires (Gospadarowicz et al., 1997; 1979), des processus qui semblent

s'exclure mutuellement dans les cellules de la granulosa pendant la lutéinisation. Dans nos expériences, les effets de l'EGF sur les cellules de la granulosa lutéinisées ont été profonds et rapides. Ceux-ci incluent la diminution de la quantité du message du récepteur de la LH dans les 6 h suivant le traitement et son élimination complète en 24 h. Ces résultats sont en accord avec l'effet inhibiteur de l'EGF sur l'ARNm du récepteur à la LH dans les cellules de Leydig porcines (Chuzel et al., 1996) et dans les cellules tumorales de Leydig MA-10 (Wang et al., 1991): plus précisément il y a réduction de la transcription du gène du récepteur à la LH (Nelson et Ascoli, 1992). L'incubation des cellules de la granulosa avec l'EGF a réduit l'ARNm de la StAR jusqu'à des niveaux indécélables au cours des 12 h suivant le traitement ainsi que la capacité de l'AMPc à stimuler l'expression de la StAR. Ce résultat est en concordance avec la neutralisation par l'EGF de la stimulation de l'expression de la 17 β -HSD (Kaminski et al., 1997). Pourtant, l'effet sur le message du P450scc a été biphasique avec une augmentation apparente à 6 h suivie par une diminution dans les 30 h. De plus l'induction de cet ARNm par l'AMPc a été affectée d'une façon marginale. L'augmentation initiale du P450scc peut être expliquée par l'effet biphasique de l'EGF, qui a été décrit par Budnik et Mukhopakhyay (1996) comme une stimulation initiale de l'AMPc endogène. Cela n'explique pas pour autant la régulation négative de l'EGF sur l'expression de l'ARNm de la StAR.

En ce qui concerne les changements structuraux des cellules de la granulosa pendant la lutéinisation ainsi qu'après le traitement à l'EGF, nos résultats indiquent qu'une fois isolées, les cellules sont rondes et qu'après leur fixation elles acquièrent la forme fibroblastique. Après 72 h en culture, les cellules ont l'apparence d'un pavé, qualifié d'épithéloïde. Ces changements sont accompagnés d'un réarrangement des

éléments de jonction et de la réorganisation du cytosquelette (Amsterdam et al., 1992). Ce remodelage phénotypique génère une réduction de l'expression de l'actine et des protéines de liaison à l'actine dans les cellules de la granulosa chez le rat (Ben-Zèev et al., 1987). Le remodelage phénotypique est un élément essentiel de la lutéinisation et supposément nécessaire à la synthèse maximale de la progestérone (Amsterdam et al., 1992). Comme il est noté plus haut, les effets du traitement à l'EGF sur l'expression de la StAR et du récepteur à la LH ont permis de mettre à jour l'inhibition de la stéroïdogenèse et de la réversion de la lutéinisation. Les changements morphologiques, spécialement l'établissement du processus cytoplasmique, suggèrent le retour à la forme fibroblastique. Les résultats de la cytochimie par fluorescence pour localiser les filaments d'actine sont concordants avec la réversion de la lutéinisation. Un des mécanismes de remodelage du cytosquelette induit par l'EGF, peut être établi en présence d'un domaine de liaison à l'actine sur le récepteur à l'EGF (Van der Hayden et al., 1997a), lequel est essentiel aux les changements morphologiques associés à l'invasion par des lignées cellulaires tumorales (Van der Hayden et al., 1997b).

Régulation positive de la StAR

À la lumière de la réponse à l'analogue dibutyrylique de l'AMPc et en conformité avec les résultats dans les cellules MA-10 (Clark et al., 1995) et les cellules de la granulosa porcine (Balasubramanian et al., 1997) nous pouvons penser que la voie métabolique de la PKA est impliquée. Dans les cultures de cellules surrénales, l'augmentation de l'ARNm de la StAR est aussi induite par le dbAMPc d'une façon qui est reliée du temps (Liu et al., 1996). L'implication de la voie de la PKA dans la transcription du gène de la StAR est de plus appuyée par le fait que les produits du gène de la StAR augmentent quand les

cellules qui normalement n'ont pas de la StAR sont transfectées avec le gène de la StAR et traitées avec les analogues de l'AMPc (Sugawara et al., 1995).

Les résultats de nos expériences confirment que la FSH et un analogue de l'AMPc induisent des augmentations de l'ARNm de la StAR dans les cellules de la granulosa porcine. Cependant, les réponses que nous rapportons sont beaucoup plus fortes et apparaissent plus tôt que celles décrites antérieurement (Balasubramanian et al., 1997) ont été obtenues sans l'ajout d'IGF-I exogène, lequel a été essentiel pour obtenir les réponses prononcées à l'AMPc. La différence peut être attribuée aux conditions de culture, car nous avons incubé les cellules avec 1 mg/L d'insuline, laquelle peut agir à travers les récepteurs des IGF dans les cellules de la granulosa (Monget et Monniaux, 1995). De plus, Balasubramanian et al. (1997) ont observé que l'insuline seule à dose de 3 mg/L produit des élévations de l'ARNm de la StAR. Les différences entre les deux modèles de culture des cellules de la granulosa porcine peuvent être en plus associées à l'état de différenciation cellulaire. Balasubramanian et al. (1997) ont réalisé ces expériences sur des cellules traitées avec une faible concentration de sérum pendant un court intervalle et ces traitements hormonaux ont été entrepris 16-24 h après l'isolement, tandis que nous les débutons à 96 h. La distribution tissulaire indique l'absence du transcrite au moment de l'isolement cellules de la granulosa à partir des follicules porcins de 3-5 mm en accord avec les résultats obtenus avec les cellules de la granulosa bovine non stimulées (Hartung et al., 1995). Nos résultats dans le CL bovin et porcine montrent que la quantité d'ARNm de la StAR évolue pendant le processus de la lutéinisation. Il est alors raisonnable de conclure que les cellules de la granulosa acquièrent la capacité d'exprimer le gène de la StAR en réponse au ligand quand elles se lutéinisent. Dans nos expériences la

StAR a été stimulée par l'AMPc 24 h après l'isolement des cellules. En opposition à l'ARNm de la StAR, le message du P450scc a été présent et induit par l'AMPc 6 h après la mise en culture des cellules. La stéroïdogénèse dans la surrénale et les cellules de Leydig en l'absence ou avant l'expression de la StAR a été décrite (Ariyoshi et al., 1998), il serait donc possible que cela ce produise en début de lutéinisation. Cependant il est plus plausible que la StAR soit exprimée, en quantité tout juste suffisante, pour participer à la synthèse basale de la progestérone en début de la lutéinisation.

Les données de nos études montrent que l'IGF-I déclenche l'expression hâtive de la StAR et accélère ainsi la lutéinisation. Son effet semble être davantage binomiale que relié à la dose, car les réponses ont été similaires pour tout éventail de doses d'IGF-I. La combinaison d'IGF-I et d'AMPc n'a été ni cumulative ni synergique. Ces résultats ne sont pas en accord avec Balasubramanian et al. (1997), qui mettent en évidence un petit effet direct de l'IGF-I sur l'expression de la StAR et une action synergique très marquée entre l'IGF-I et la FSH, un ligand qu'utilise l'AMPc comme second messager. Ce désaccord, comme nous l'avons dit auparavant, peut refléter des différences dans le modèle. Pourtant, les deux études démontrent un rôle pour l'IGF-I dans l'acquisition de la capacité stéroïdogénique des cellules en lutéinisation. Cependant, chez le rat, l'ARNm de l'IGF-I dans les cellules de la granulosa est impliqué dans leur prolifération et son absence est associée à la lutéinisation (Zhou et al., 1995). Cette différence pourrait être expliquée par le fait que l'ARNm de l'IGF-I et sa protéine ne sont pas colocalisables dans l'ovaire des rongeurs (Goubau et al., 1996).

Tout comme les gènes connus des enzymes stéroïdogéniques, la région terminale 5' du gène de la StAR chez

la souris n'a pas l'élément de réponse à l'AMPc traditionnelle (Clark et al., 1995). Cependant, il a été démontré que le dbAMPc stimule la transcription du gène de la StAR par une région spécifique située entre le 224e et le 113e nucléotides avant le site de déclenchement de la transcription (Caron et al., 1997a). L'analyse de la région du promoteur indique que la séquence de liaison du récepteur nucléaire orphelin SF-1 est essentielle à l'expression basale de la StAR. Pourtant, la transcription induite par l'AMPc du gène de la StAR de souris après la délétion de la séquence consensus SF-1, suggère l'indépendance des éléments promoteurs (Caron et al., 1997a). Dans le gène de la StAR humain, deux sites SF-1 ont été établis dans la région de 1.3 kb avant le site de déclenchement de la transcription (Sugawara et al., 1996). L'analyse des délétions indique que la transcription basale ou inductible par l'AMPc requièrent les deux sites SF-1, ce qui indique l'existence d'une synergie entre SF-1 et la séquence inconnue responsable de la réponse à l'AMPc. Ces observations suggèrent que le contrôle transcriptionnel du gène de la StAR varie entre espèces. Des études récentes ont confirmé, l'importance du site SF-1 dans l'expression de ce gène chez le porc (LaVoie et al., 1998), résultat obtenu lors de la délétion du site SF-1 (-48 à -41 bp) dans la région du promoteur du gène de la StAR. Dans la même expérience, on a identifié trois régions d'activités stimulatrices pour l'association d'IGF-I/FSH entre les fragments -139 nt avant le site de déclenchement de la transcription ainsi qu'une région potentielle d'inhibition entre les -1115 et le -905 nt. (LaVoie et al., 1998).

Comme nous en avons discuté, l'interaction entre la FSH et l'IGF-I implique la voie des PKA en augmentant l'accumulation de la protéine StAR et de son message (Balasubramanian et al., 1997). Des études récentes sur la région du promoteur du gène de la StAR visant la détermination des mécanisme(s)

spécifique(s) par lesquels l'IGF-I amplifie l'expression du gène de la StAR induite par la FSH. LaVoie et al. (1998) ont démontré que l'IGF-I est capable d'augmenter l'activation du promoteur du gène de la StAR induite par la voie des PKA en favorisant une plus forte accumulation de l'AMPc.

Régulation négative de la StAR

En ce qui concerne la régulation négative de la StAR, à ce jour, plusieurs facteurs ont été mis en cause, dont entre autres l'implication des protéines thermosensibles, certains facteurs de croissance, quelques stéroïls ainsi que des facteurs de transcription.

L'activation des voies des PKA et PKC stimule la stéroïdogénèse et la synthèse de la protéine StAR dans une lignée cellulaire humaine (Clark et al., 1995). L'angiotensine II, laquelle réduit l'expression des gènes P450scc et 3 β -HSD dans les cellules de la granulosa porcine lutéinisées (Li et al., 1995), stimule la synthèse de la protéine StAR dans le modèle de cellules tumorales de la surrenale (Clark et al., 1995). En opposition à ces études Liu et al. (1996) rapportent que l'activation de la voie PKC par le PMA ou son inhibition par la staurosporine (inhibiteur de la voie PKC) n'ont pas d'effet sur la quantité des messages de la StAR ou du P450scc induits par l'ACTH dans les cellules surrenaliennes humaines en culture. La genèse de ces différences est encore à déterminer.

Dans nos expériences, le traitement avec le PMA, élimine l'accumulation du message de la StAR induit par la FSH. La réduction reliée à la dose du message de la 3 β -HSD induit par les gonadotrophines et conséquente à l'action du PMA, a été rapportée antérieurement avec ce modèle et la dose de PMA utilisée dans nos expériences (10 nM) produit une réduction

submaximale du message de la 3 β -HSD (Chedrese et al., 1990) par le PMA. Cela suggère que le gène de la StAR est beaucoup plus sensible à l'inhibition par les PKC que celui de la 3 β -HSD. L'accumulation du message du P450_{scc} induite par l'action du ligand a été reconnue comme une des loci de l'inhibition par les PKC de la stéroïdogénèse dans les cellules de la granulosa porcine (Flores et al., 1993). Le traitement au PMA dans nos expériences a inhibé l'accumulation du message P450_{scc} induit par la FSH tel que démontré pour la première fois par Trzeciak et al. (1987). Pourtant, Lahav et al. (1995) rapportent une synergie positive entre 30 ng/ml de PMA et un analogue de l'AMPc sur la régulation de l'expression du P450_{scc} dans les cellules de la granulosa porcine issues de petits follicules et traitées pendant 4 à 8 h après avoir été isolées. La tendance vers l'augmentation de la quantité du P450_{scc} induite par le PMA à 6 h dans nos études, appuie le concept de la synergie entre les voies PKA et PKC. Cette augmentation à court terme peut être attribuée à la communication croisée entre les voies métaboliques des PKA et des PKC, étant donné qu'une des réponses hâtives au PMA dans les cellules porcines de la granulosa et les cellules lutéales est l'augmentation rapide de la production de l'AMPc (Murphy et al., 1989).

Le facteur de transcription Dax-1 ("Dosage sensitive sex reversal + Adrenal hypoplasia congenita + X chromosome + gene 1") est un membre pas très utilisé de la famille des récepteurs nucléaires hormonaux. Les mutations de ce gène chez l'humain sont responsables des syndromes hypoplasie surrénale congénitale et de l'hypogonadisme hypogonadotrope (Muscatelli et al., 1994; Zanaria et al., 1994). De plus, la duplication du chromosome X dans la région Xp21, qui contient le gène DAX-1, produit la réversion du sexe mâle en femelle ou réversion sexuelle sensible à la dose (DSS; Bardoni et al., 1994). La protéine Dax-1 est homologue seulement avec le domaine de

liaison des récepteurs nucléaires hormonaux. Le domaine de liaison à l'ADN manque des motifs canoniques en doigts de zinc et est formé de 3,5 répétitions d'une séquence de 65-67 acides aminés dans sa région terminale N (Zanaria et al., 1994). L'expression du DAX-1 inhibe la synthèse des stéroïdes dans les cellules tumorales surrénales de souris Y-1. Ce blocage est attribué à une inhibition de l'expression du gène de la StAR, qui se produit quand il y a un excès de DAX-1. Cette inhibition se fait par la liaison de la protéine dans une structure en boucle située dans une région où l'ADN est à simple brin dans la région du promoteur du gène de la StAR (Zazapoulos et al., 1997). De plus, la protéine DAX-1 comporte un puissant domaine de transcription silencieux dans sa région terminale C (Lalli et al., 1997). Ainsi, il est possible que le phénotype observé dans le DSS soit le résultat de l'excès de DAX-1 qui est produit par duplication de la région Xp21 du chromosome X.

Les agents d'induction de la réponse au choc thermique connus bloquent aussi la biosynthèse des stéroïdes dans les cellules stéroïdogéniques. Il a été prouvé que la haute température produit l'induction de la HSP-70 (de l'anglais "Heat Shock Protein") ainsi que l'arrêt de la biosynthèse de progestérone dans les cellules lutéales chez le rat. (Khanna et al., 1994). Dans le même ordre d'idée, il avait été suggéré que la HSP-70 médiait le processus de production protéique intracellulaire de la régression lutéale. En effet, les PGF2 α induisent une rapide et soutenable accumulation de HSP-70 et l'inhibition abrupte de la production de progestérone sensible aux hormones dans le même type de cellules (Jordan, 1981). De plus, les HSP produisent des agents additionnels comme les esters du phorbol (Musicki et al., 1990) et le facteur de nécrose tumoral alpha (TNF α ; Benyo et Pate, 1992) qui sont reconnus pour inhiber les hormones stéroïdes.

Les derniers résultats obtenus avec ces protéines montrent que dans les cellules MA-10, le choc thermique induit une grande augmentation dans la synthèse de la HSP-70 et inhibe la synthèse de la progestérone et de la StAR (Liu et Stocco, 1997). En ce qui concerne le P450scc ainsi que la 3 β -HSD1 et la 3 β -HSD2, leurs niveaux n'ont pas été aussi affectés par la température ou le temps que ceux de la StAR. Ainsi, il est suggéré que dans les cellules MA-10, l'inhibition de la production de stéroïdes induite par le choc thermique est due à l'inhibition de la synthèse de la StAR, ce qui ne permet pas le transfert du cholestérol du côté matriciel de la membrane mitochondriale interne (Liu et Stocco, 1997).

Le TNF α , une cytokine d'origine générale (Mealy et al., 1990) ou interstitielle (Moore et Hutson, 1994) peut être activée pendant une réponse immunitaire ou un processus inflammatoire (Damas et al., 1989). Les principaux effets du TNF α sur la reproduction sont la diminution de l'activité des gonades, tel que démontré par l'hypogonadisme grave chez le rat lorsqu'on lui administre de l'endotoxine, un inducteur de la production du TNF α (Tulassay et al., 1970; Christeff et al., 1987), ainsi que la diminution drastique de la concentration de testostérone accompagnée de lésion de l'épithélium séminifère chez la même espèce (Mealy et al., 1990), lors de l'infusion continue du TNF α . D'un autre côté, l'augmentation des niveaux de sécrétion des gonadotrophines chez les mâles traités à la TNF α indique que cette cytokine exerce un effet nocif sur les testicules.

Les dernières données à cet égard ont été obtenues avec des cultures de cellules de Leydig porcines stimulées avec l'eCG. Les résultats indiquent que le TNF α exerce une action inhibitrice sur la stéroïdogenèse dans ces cellules, principalement par la diminution de l'expression de la StAR et

que cette action se fait par médiation de l'oncogène p53 (protéine 53) au $\text{TNF}\alpha$ exprimé dans les cellules de Leydig (Mauduit et al., 1998). Cette étude nous montre clairement que l'expression de la StAR induite par l'eCG est inhibée de façon reliée à la dose par le $\text{TNF}\alpha$, un effet aussi observé dans l'expression de son ARNm. De plus, cette cytokine a produit une diminution de 90% hautement significative dans la sécrétion de la testostérone, mais de façon très intéressante, ce phénomène ne s'est pas produit lors de la coculture avec le 22R-hydroxycholestérol, un substrat dérivé du cholestérol qui passe facilement à travers la membrane mitochondriale. L'ensemble de ces observations montre une fois de plus l'importance de la StAR dans la stéroïdogénèse.

Le diméthylsulfoxyde (DMSO) est un composant de faible poids moléculaire, qui produit une gamme pléiotropique de réponses biologiques dans une grande variété de tissus. Ces réponses incluent des changements des niveaux de lipides, des altérations dans la structure intracellulaire, une fluctuation des fonctions membranaires et l'induction de réponses de différenciation et de croissance (Kharasch et Thyagarajan, 1983). Il a été aussi identifié que le DMSO peut améliorer la déficience secondaire de l'activité de la sphingomyélinase (Sato et al., 1988) et moduler le processus anormal des LDL et du cholestérol (Mackie et al., 1989) dans les cultures de cellules fibroblastiques des patients atteints de la maladie de Niemann-Pick type C. Dans les dernières années, les effets du DMSO sur la capacité des cellules stéroïdogéniques de Leydig à synthétiser des hormones stéroïdes en réponse aux hormones trophiques ont été investigués. Ces études montrent que le DMSO a un effet dramatique sur la production hormonale stimulée dans les cellules MA-10 tandis que dans les cellules R2C, la production de base de stéroïdes a été beaucoup moins affectée (Stocco et al., 1995). Les mécanismes par lesquels le

DMSO inhibe la synthèse des stéroïdes sont inconnus, mais la réduction de la StAR peut y être associée clairement, car l'application de DMSO aux cellules MA-10 bloque la production de la StAR induite par l'AMPc et l'accumulation de la progestérone dans le milieu de culture (Stocco et al., 1995).

Transcription et traduction

L'abrogation par l'ActD des réponses en StAR et en P450scc induites par le ligand dans les cellules de la granulosa est en concordance avec les observations dans les cellules MA-10 (Caron et al., 1997a) et suggère que l'effet de la FSH est l'induction de la transcription de ces gènes. On doit pourtant demeurer prudent, car les effets de l'ActD s'exercent sur la transcription de toutes les protéines et il y a d'autres explications pour ce phénomène. Par exemple, l'ActD peut inhiber la transcription d'un élément qui augmente la stabilité du message. Pourtant, la régulation de la transcription semble être le moyen principal par lequel les hormones trophiques règlent l'expression des gènes des hormones stéroïdogéniques, car des expériences nucléaires "run-on" ont montré que le P450scc dans les cellules placentaires (Ringler et al., 1989) et la 3 β -HSD dans les cellules de la granulosa (Chedrese et al., 1995) sont contrôlées par les gonadotrophines au niveau transcriptionnelle.

Dans le même cadre, le blocage de la transcription peut être utilisé pour estimer le taux de disparition des ARNm de la StAR et du P450scc. Dans notre recherche, la comparaison a révélé une nette différence entre la persistance des messages de la StAR et du P450scc des cellules de la granulosa lutéinisées. Dans le cas du P450scc, la période de persistance est réduite d'environ deux-tiers, 6 h après le traitement avec l'Act-D. Ceci est en concordance avec la stabilité relative du

message dans cette période, comme c'est le cas dans les cellules JEG-3 (Brentano et al., 1992). D'autre part, la quantité de message de la StAR est négligeable ce qui indique une très faible persistance. Les premières recherches sur le sujet, ont montré que l'ActD n'a pas d'effet sur la stimulation rapide de la synthèse des hormones stéroïdiennes par l'ACTH, mais une profonde inhibition de la stimulation par l'ACTH à 24 h (Vernikos-Dannelis et Hall, 1965).

Il a été établi que le blocage de la synthèse des protéines inhibe ou n'a pas d'effet sur la plupart des gènes stéroïdogéniques (Miller, 1995). Dans notre recherche, nous mettons en évidence la sensibilité à la CHX des réponses de la StAR et du P450scc au ligand. Ainsi, l'induction des deux messages par la FSH a été éliminée par le prétraitement avec 40 µg/ml de CHX. Il a été montré antérieurement que la moitié de cette dose (20 µg/ml) réduit l'incorporation de méthionine (S^{35}) de plus de 90% (Lindsell et al., 1993), indiquant que le prétraitement élimine de façon efficace la synthèse de protéines dans les cellules de la granulosa porcine. De plus, les mêmes auteurs ont montré que le traitement avec CHX élève d'une façon rapide la quantité du message de follistatine, indiquant que le mécanisme d'action n'agit pas par une réduction généralisée de la stabilité des messages dans ce modèle. Le cotraitement des cellules MA-10 avec une faible dose de CHX (7 µg/ml) réduit, mais n'élimine pas l'induction de l'expression du message P450scc par le dbAMPc (Mellon et Vaisse, 1989). Par contre, des niveaux de base des transcrits de la StAR n'ont pas été affectés par la CHX dans les cellules surrénales en culture (Liu et al., 1996).

La CHX peut interférer avec l'accumulation des transcrits de la StAR et du P450scc induite par la FSH en empêchant la traduction du message par une protéine labile qui est

essentielle pour la transcription. Il a été rapporté dans les cellules de Sertoli qu'un facteur paracrine (PModS) réglait la transcription de la transferrine et que ses effets étaient bloqués par la CHX (Norton et Skinner., 1992). Dans cette étude, un pic du message *c-fos* a précédé celui de la transferrine et la stimulation de l'expression de la transferrine par le PModS peut être annulée par la neutralisation antisens de l'expression de la *c-fos*, suggérant que la *c-fos* est la protéine labile essentielle à la transcription de la transferrine. Liu et al. (1996) rapportent l'existence d'un pic semblable de la *c-fos* qui précède l'expression de la StAR dans des cultures de surrénale, pic qui n'est pas sensible à la CHX. Il se pourrait que la *c-fos* ou un facteur de transcription semblable soit l'élément protéique essentiel à l'expression du gène de la StAR dans les cellules de la granulosa.

Directions futures

La recherche sur les différents éléments qui agissent sur le contrôle de l'expression du gène de la StAR devraient porter surtout sur le mécanisme d'action des facteurs de mobilisation du cholestérol. Comme nous l'avons dit auparavant, la disponibilité du cholestérol pour la machinerie de la stéroïdogénèse est un facteur clé qui contrôle le taux de production des hormones stéroïdiennes. Avec des variations spécifiques, la plupart du cholestérol utilisé dans la stéroïdogénèse par les cellules qui produisent des grandes quantités d'hormones, y compris les cellules lutéales, est dérivée des lipoprotéines circulantes principalement les lipoprotéines de faible densité LDL (Gwynne et Strauss, 1982). Cependant, la synthèse *de novo* du cholestérol est aussi une source du substrat pour la stéroïdogénèse. Les mécanismes par lesquels les hormones trophiques contrôlent la synthèse du cholestérol ne sont pas bien compris, mais il paraîtrait qu'une

des voies par laquelle l'homéostasie du cholestérol est modulée serait la régulation négative par les stérols (Strauss et al., 1981)

En ce qui concerne la StAR, deux approches ont été envisagées pour expliquer l'action des stérols: son action directe sur l'élément de réponse aux stérols et une stimulation du SF-1. La première approche se base sur le fait que cette séquence octamérique, ou site d'action des stérols, est aussi présente dans la région du promoteur du gène de la StAR humain. Ce qui a été prouvé puisque la SREBP-1 α produit une augmentation reliée à la dose 5 à 100 fois sur l'activité du promoteur de la StAR. Par contre, dans les mêmes expériences, la SREBP-2 n'a pas eu d'effet (Christenson et al., 1998). Les données suggèrent aussi que les 95 bp proximales du promoteur du gène de la StAR contiennent l'élément de réponse de la SRBEP-1a

La deuxième hypothèse repose sur le fait que les stérols ont aussi été proposés comme ligands pour le facteur stéroïdogénique SF-1 et que la transcription de ce dernier module l'expression de la StAR dans les cellules surrénales. Pour tester cette hypothèse Reyland et White, (1998) ont traité des cultures cellulaires avec des oxystérols. Il en a résulté une augmentation de 2 à 4 fois dans l'expression de la protéine StAR et de son message. Le champ de rendement a été le suivant, 20a-OH>19-OH>22R-OH>25-OH cholestérol. Les LDL et HDL sont aussi capables d'augmenter l'expression de StAR 3 et 2 fois respectivement par rapport aux contrôles. Dans cette expérience, l'application du 22R-OH a produit une augmentation de 20 à 30% dans l'activité du promoteur du gène de la StAR, mais cette donnée n'indique pas si cela est dû à l'effet direct des stérols ou à l'effet indirect du SF-1.

On connaît mal le mécanisme par lequel la StAR est impliquée dans le transfert du cholestérol à la membrane mitochondriale interne, très peu est connue. De récentes études ont montré qu'en plus de l'augmentation du contenu en cholestérol dans les sites de contact de la membrane mitochondriale interne, les cellules du glomérule surrénal stimulées au Ca^{++} ont, en plus de la protéine StAR, les deux premières enzymes de la stéroïdogénèse, soit la P450_{scc} et la 3 β -HSD (Cherradi et al., 1997). Ce qui donne de la crédibilité aux prédictions de Lieberman et Prasad (1990) sur l'existence d'un complexe multiprotéique stéroïdogénique dans la mitochondrie. Donc, la colocalisation de ces trois protéines ouvre la possibilité que la StAR déclenche la formation d'un complexe de protéines qui provoquerait le transfert du cholestérol puis sa transformation directe en progestérone. En ajoutant les observations de Papadopoulus (1993), il est possible que si un tel complexe existe, il comprenne le PBR et son ligand. Ces considérations ouvrent la voie aux travaux sur le fonctionnement de l'association entre une ou plusieurs de ces protéines ainsi que sur sa fonction dans les sites de contact.

CONCLUSIONS

Par nos études, nous avons démontré qu'en plus de son ARNm, la protéine stéroïdogénique StAR récemment découverte, est présente dans le CL bovin et porcin. Nous avons aussi observé pour la première fois la présence de la StAR dans les tissus placentaires. Les niveaux du message de la StAR et sa protéine fluctuent de façon similaire pendant la phase lutéale: les deux manifestent un faible niveau pendant le développement lutéal, élevé dans le CL actif et virtuellement indétectable dans le CL en régression.

Nous démontrons avec nos recherches que les transcrits du gène de la StAR sont peu abondants dans les cellules de la granulosa porcine lutéinisées qui ne sont pas soumises à une stimulation hormonale trophique. Le traitement avec la FSH ou le dbAMPc produit des augmentations dépendantes du temps dans l'accumulation du message de la StAR qui implique la voie intracellulaire des PKA. Les réponses induites par la FSH sont inhibées par un co-traitement à l'ActD ou au PMA ainsi que par le pré-traitement à la CHX. L'interprétation de ces résultats indique que l'expression du gène de la StAR induite par la FSH est dépendante de la transcription, que la synthèse intermédiaire de protéines est nécessaire pour cette transcription et que la voie intracellulaire des PKC est inhibitrice dans ce processus.

Les résultats des recherches présentées ici ont aussi démontré que dans les tissus de l'ovaire porcin le début de l'expression du gène de la StAR et la perte de celle du P450arom accompagnent la lutéinisation *in vivo* et *in vitro*. L'acquisition de l'expression de la StAR peut être induite précocement par l'addition d'IGF-I aux cellules de la granulosa

porcine en culture. Nous avons pu déterminer que l'EGF produit des changements structuraux dans les cellules de la granulosa porcine lutéinisées et élimine les niveaux constitutifs des ARNm de StAR et du récepteur à la LH sans affecter ceux du P450_{scc}. Prises ensemble, ces données suggèrent que l'IGF-I accélère le processus de la lutéinisation, tandis que l'EGF a pour effet de produire une régression apparente de la lutéinisation.

En résumé, la StAR est un élément essentiel du système stéroïdogénique dans l'ovaire et n'a pas une forte expression sans stimulation malgré sa modulation par les facteurs de croissance. Les agents qui stimulent la stéroïdogénèse exercent leur action par la stimulation de la synthèse *de novo* de la StAR.

BIBLIOGRAPHIE

- Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M (1996)** Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* 271: 518-520.
- Adams V, Bosch W, Schlegel J, Wallimann T, Brdiczka D (1989)** Further characterization of contact sites from mitochondria of different tissues: topology of peripheral kinases. *Biochim Biophys Acta.* 981: 213-225.
- Adams SR, Harootunian AT, Buechler YJ, Taylor SS, Tsien RY (1991)** Fluorescence ratio imaging of cyclic AMP in single cells. *Nature* 349: 694-697.
- Ainsworth L, Tsang BK, Downey BR, Marcus GJ, Armstrong DT. (1980)** Interrelationships between follicular fluid steroid levels, gonadotropic stimuli, and oocyte maturation during preovulatory development of porcine follicles. *Biol Reprod* 23: 621-627.
- Allen WM, Corner GW (1930)** Physiology of corpus luteum. VII. Maintenance of pregnancy in rabbit after very early castration by corpus luteum extracts. *Proc Soc Exp Biol Med* 27: 403-405.
- Amsterdam A, Suh BS (1991)** An inducible functional peripheral benzodiazepine receptor in mitochondria of steroidogenic granulosa cells. *Endocrinology* 129: 503-510.
- Amsterdam A, Phehn-Dujowich D, Suh BS. (1992)** Structure-function relationships during differentiation of normal and oncogene-transformed granulosa cells. *Biol Reprod* 46:513-522.
- Anderson E, Little B (1985)** The ontogeny of the rat granulosa cells. In Toft DO, Ryan RJ, eds. *Proc Fifth Ovarian Workshop.* Champaign, IL. Ovarian workshops 203-235.
- Arakane F, Sugawara T, Nishino H, Liu Z, Holt JA, Pain D, Stocco DM, Miller Wl, Strauss III JF (1996)** Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) retains activity in the absence of its mitochondrial import sequence: Implications for the mechanism of StAR action. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:13731-13736.
- Arakane F, King SR, Du Y, Callen Cb, Walsh LP, Watari H, Stocco DM, Strauss JF (1997a)** Phosphorylation of

- steroidogenic acute regulatory protein (StAR) modulates its steroidogenic activity. *J Biol Chem* 272: 32656-32662.
- Arakane F, Sugawara T, Kiriakidou M, Callen CB, Watari H, Christenson LK, Strauss III JF (1997b)** Molecular insights into the regulation of steroidogenesis: from laboratory to clinic and back. *Hum Reprod* 12 (suppl 1): 46-50.
- Ariyoshi N, Kim YC, Artemenkop I, Bhattacharyya KK, Jefcoate CR (1998)** Characterization of the StAR gene that encodes the predominant 3.5-kilobase pair mRNA. ACTH stimulation of adrenal steroids in vivo precedes elevation of StAR mRNA and protein. *J Biol Chem* 27: 7610-7619.
- Azamia R, Dahl G, Lowenstein WR (1981)** Cell junction and cyclic AMP: III. Promotion of junctional membrane permeability and junction membrane particles in a junction-deficient cell type. *J Membr Biol* 63: 133-146.
- Bakker GH, Hoogerbrugge W, Rommerts FF, van der Molen HJ (1983)** LH-dependent steroid production and protein phosphorylation in culture of rat tumor Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol* 33: 243-253.
- Balasubramanian K, Lavoie, HA, Garmey JC, Stocco DM, Veldhuis JD (1997)** Regulation of porcine granulosa cell steroidogenic acute regulatory protein (StAR) by insulin-like growth factor I: Synergism with follicle-stimulating hormone or protein kinase A agonist. *Endocrinology* 138:433-439.
- Bardoni B, Zanaria E, Guioli S, Florida G, Worley KC, Tonini G, Ferrante E, Chiumello G, McCabe ER, Fraccaro M (1994)** A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. *Nat Genet* 7: 497-501.
- Barnea ER, Fares F, Gavish M (1989)** Modulatory action of benzodiazepines on human term placental steroidogenesis in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 64: 155-159.
- Ben-Zèev A, Amsterdam A (1987)** In vitro regulation of granulosa cell differentiation. Involvement of cytoskeletal protein. *J Biol Chem* 262:5266-5376.
- Benyo DF, Pate JL (1992)** Tumor necrosis factor- α alter bovine luteal cell synthetic capacity and viability. *Endocrinology* 130: 854-860.

- Berkowitz LA, Gilman MZ (1990)** Two distinct forms to active transcription factor CREB (cAMP response element binding protein). *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 5258-5269.
- Bose HS, Sugawara T, Strauss JF III, Miller WL (1996)** The pathophysiology and genetic of congenital lipid adrenal hyperplasia. *International congenital adrenal hyperplasia consortium. New Engl J Med* 335: 1870-1878.
- Brdiczka D (1991)** Contact sites between mitochondrial envelope membrane: structure and function in energy - and protein- transfer. *Biochim Biophys Acta.* 1071: 291-312.
- Brentano ST, Miller WL (1992)** Regulation of human P450_{scc} and adrenodoxin mRNAs in JEG-3 cytotrophoblast cells. *Endocrinology* 131:3010-3018.
- Brown MS, Goldstein JL (1986)** A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232: 34-51.
- Budnik LT, Mukhopakhay AK (1996)** Modulatory action of epidermal growth factor on differentiated human granulosa lutein cells: cross-talk between ligand activated receptors for EGF and gonadotropin. *Mol Cell Endocrinol* 124:141-150.
- Camacho AM, Kowarski A, Migeon CJ, Brough A (1968)** Congenital adrenal hyperplasia due to a deficiency of one of the enzymes involved in the biosynthesis of pregnenolone. *J Clin Endocrinol Metab* 28: 153-161.
- Cao G, Garcia CK, Wyne KL, Schultz RA, Parker KL, Hobbs HH (1997)** Structure and localization of the human gene encoding SR-BI/CLA-1. Evidence for transcriptional control by steroidogenic factor 1. *J Biol Chem* 272: 33068-33076.
- Caron KM, Ikeda Y, Soo S-C, Stocco DM, Parker KL, Clark BJ (1997a)** Characterization of the promoter region of the mouse gene encoding the steroidogenic acute regulatory protein (StAR). *Mol Endocrinol* 11: 138-147.
- Caron KM, Clark BJ, Ikeda Y, Parker KL (1997b).** Steroidogenic factor 1 acts at all levels of the reproductive axis. *Steroids* 62: 53-56.
- Caron KM, Soo SC, Wetsel WC, Stocco DM, Clark BJ, Parker KL (1997c).** Targeted disruption of the mouse gene encoding steroidogenic acute regulatory protein

- provides insights into congenital lipid adrenal hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 11540-11545.
- Chanderbhan BJ, Noland BJ, Scallen TJ, Vahouny GV (1982)** Sterol carrier protein 2: delivery of cholesterol from adrenal lipid droplets to mitochondria for pregnenolone synthesis. *J Biol Chem* 257: 8928-8934.
- Chanderbhan BJ, Tanaka T, Strauss III JF, Irwin D, Noland BJ, Scallen TJ, Vahouny GV (1983)** Evidence for sterol carrier protein 2-like activity in hepatic adrenal and ovarian cytosol. *Biochem Biophys Res Commun* 117: 702-709.
- Chanderbhan BJ, Kharroubi AT, Noland BJ, Scallen TJ, Vahouny GV (1986)** Sterol carrier protein 2: further evidence for its role in adrenal steroidogenesis. *Endocr Res* 12: 351-360.
- Chaudhary LR, Stocco DM (1991)** Effect of different steroidogenic stimuli on protein phosphorylation and steroidogenesis in MA-10 mouse Leydig tumor cells. *Biochim Biophys Acta* 1094: 175-184.
- Chedrese PJ, Zhang D, Luu The V, Labrie F, Juorio AV, Murphy BD (1990)** Regulation of mRNA expression of 3 β -hydroxy-5-ene steroid dehydrogenase in porcine granulosa cells in culture: A role for the protein kinase-C pathway. *Mol Endocrinol* 4: 1532-1538.
- Chedrese PJ, Stocco DM, Braileanu. GT (1996)** FSH, LH and estradiol-17 β expression in cultured porcine granulosa cells. *Biol Reprod* 54 (Suppl 1): 75, Abst. 75.
- Cherradi N, . Rossier MF, Valloton MB, Timberg R, Friedberg I, Orly J, Wang ZJ, Stocco DM, Capponi AM (1997)** Submitochondrial distribution of three key steroidogenic proteins (steroidogenic acute regulatory protein and cytochrome p450scc and 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase isomerase enzymes) upon stimulation by intracellular calcium in adrenal glomerulosa cells. *J Biol Chem* 272: 7899-7907.
- Cherradi N, Branderburger Y, Rossier MF, Valloton MB, Stocco DM, Capponi AM (1998)** Transcriptional control of steroidogenic acute regulatory protein gene expression by intracellular calcium in bovine adrenal glomerulosa cells. *Proc Annu Meet Endocrin Soc, Abst OR50-4* p118.

- Christeff N, Auclair M, Benassayag C. (1987)** Endotoxin-induced changes in sex steroid levels in male rats. *J Steroid Biochem* 26: 67-71.
- Christenson LK, Osborne TF, Strauss JF (1998)** Sterol regulatory element-binding protein-1 α regulation of human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene promoter activity. *Proc Annu Meet Endocrin Soc Abstr* P3-636. p 515.
- Chuzel F, Clark AM, Avallet O, Saez JM (1996)** Transcriptional regulation of the lutropin/human choriogonadotropin receptor and three enzymes of steroidogenesis by growth factors in cultured pig Leydig cells. *Eur J Biochem* 239:8-16.
- Clark BJ, Wells J, King SR, Stocco DM (1994)** The purification, cloning and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. *J Biol Chem* 269: 28314-28322.
- Clark BJ, Pezzi V, Stocco DM, Rainey WE (1995)** The steroidogenic acute regulatory protein is induced by angiotensin II and K⁺ in H295R adrenocortical cells. *Mol Cell Endocrinol* 115: 215-219.
- Clark BJ, Stocco DM (1997)** Steroidogenic acute regulatory protein: the StAR still shines brightly. *Mol Cell Endocrinol* 134: 1-8.
- Cole TJ, Blendy JA, Monaghan P, Krieglstein K, Schmid W, Aguzzi A, Fantuzzi G, Hummler E, Unsicker K, Schutz G (1995)** Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation. *Genes Dev* 9: 1608-1621.
- Conley AJ, Kaminski MA, Dubowsky SA, Jablonka-Shariff A, Redmer DA and Reynolds LP (1995)** Immunohistochemical localization of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase and P450 17 α -hydroxylase during follicular and luteal development in pigs, sheep, and cows. *Biol Reprod* 52:1081-1094.
- Cooke BA, Lindh ML, Janszen FH (1976)** Correlation of protein kinase activation and testosterone production after stimulation of Leydig cells with luteinizing hormone. *Biochem J* 160: 439-446.

- Couët J, Martel C, Dupont E, Luu-The V, Sirard MA, Zhao H-F, Pelletier G, Labrie F (1990)** Changes in 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 isomerase messenger ribonucleic acid, activity and protein levels during the estrous cycle in the bovine ovary. *Endocrinology* 127: 2141-2148.
- Crivello JF, Jefcoate CR (1978)** Mechanism of corticotropic action in rat adrenal cells. 1. Effects of inhibitors of protein synthesis and of microfilament formation on corticosterone synthesis. *Biochim Biophys Acta* 542: 315-329.
- Damas P, Reuter A, Gysen P, Demonty J, Lamy M, Franchimont P (1989)** Tumor necrosis factor and interleukin-1 serum levels during severe sepsis in humans. *Crit Care Med* 17: 975-978.
- Davis JS, Weakland LL, West LA, Farese RV (1986)** Luteinizing hormone stimulates the formation of inositol triphosphate and cAMP in rat granulosa cells: Evidence for phospholipase C generated second messengers in the action of luteinizing hormone. *Biochem J* 238: 597-604.
- Degenhart HJ, Visser KHA, Boon H, O'Doherty NJD (1972)** Evidence for deficiency of 20 α -cholesterol hydroxylase activity in adrenal tissue of a patient with lipid adrenal hyperplasia. *Acta Endocr* 71: 512-518.
- Dieleman SJ, Blankenstein DM (1984)** Changes in estrogen synthesizing ability of bovine follicles relative to the peak of LH. *J Reprod Fert* 72:487-494.
- Doisy EA, Veler CD, Thayer S (1929)** Folliculin from urine of pregnant women. *Am J Physiol.* 90: 329-330.
- Dooley KA, Millinder S, Osborne TF (1998)** Sterol regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase gene through direct interaction between sterol regulatory element binding protein and the trimeric CCAAT-binding factor/nuclear factor Y. *J Biol Chem* 273: 1349-1356.
- Enmark E, Gustafsson J-A (1996)** Orphan nuclear receptor - the first eight years. *Mol Endocrinol.* 10: 1293-1307.
- Epstein LF, Orme-Johnson NR (1991)** Regulation of steroid hormone biosynthesis: identification of precursors of a phosphoprotein targeted to the mitochondrion in

- stimulated rat adrenal cortex cells. *J Biol Chem.* 266: 19739-19745.
- Erickson GF, Ryan KJ (1975)** The effects of LH/FSH, dibutyryl cyclic AMP, and prostaglandins on the production of estrogen by rabbit granulosa cells in vitro. *Endocrinology* 97: 108-113.
- Farin CE, Moeller CL, Sawyer HR, Gamboni F, Niswender GD (1986)** Morphometric analysis of cell types in the ovine corpus luteum throughout the estrous cycle. *Biol Reprod.* 35: 1299-1308
- Ferguson JJ (1963)** Protein synthesis and adrenocorticotrophin responsiveness. *J Biol Chem* 238: 2754-2759.
- Fitz TA, Mayan MH, Sawyer HR, Niswender GD (1982)** Characterization of two steroidogenic cells types in the ovine corpus luteum. *Biol Reprod.* 27: 703-711.
- Fitzpatrick SL, Carlone DL, Robker RL, Richards JS (1997)** Expression of aromatase in the ovary: down-regulation of mRNA by the ovulatory luteinizing hormone surge. *Steroids* 62: 197-206.
- Fleury A, Cloutier M, Ducharme L, Lefebvre A, Lehoux JG (1996)** Adrenocorticotropin regulates the level of steroidogenic acute regulatory (StAR) protein mRNA in hamster adrenals. *Endocr Res* 22: 515-520.
- Ford JJ, Lunstra DD (1992)** Differential production of estradiol by subpopulations of porcine granulosa cells. *J Reprod Dev* 38: 91-98.
- Fraenkel L, Cohn F (1901)** Experimentelle untersuchungen über den einfluss des corpus Luteum auf die insertion des eies. *Anat Anz* 20: 294-300.
- French JS, Guengerich FP, Coon MJ (1980)** Interactions of cytochrome P-450, NADPH-cytochrome P-450 reductase, phospholipid, and substrate in the reconstituted liver microsomal enzyme system. *J Biol Chem* 255: 4112-4119.
- Garren LD, Davis WW, Crocco RM (1966)** Puromycin analogs: action of adrenocorticotrophic hormone and the role of glycogen. *Science* 152: 1386-1388.
- Garver WS, Erickson RP, Wilson JM, Colton TL, Hossain GS, Kozloski MA, Heindenreich RA (1997)** Altered expression of caveolin-1 and increased cholesterol in detergent insoluble membrane fractions from liver in mice

- with Niemann-Pick disease type C. *Biochim Biophys Acta* 1361: 272-280.
- Goldstein JL, Brown MS (1990)** Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 343: 425-430.
- Golos TJ, Miller WL, Strauss III JF (1987)** Human chorionic gonadotropin and 8-bromo-cyclic adenosine monophosphate promote an acute increase in cytochrome P450_{scc} and adrenodoxin messenger RNAs in cultured human granulosa cells by a cycloheximide insensitive method. *J Clin Invest* 80: 896-899.
- Gore-Langton RE, Armstrong DT (1994)** Follicular steroidogenesis and its control. In: *Physiology of reproduction Vol I*. Knobil E and Neill JD eds. 2e ed. Raven press, New York. pp. 571-627
- Gospadarowicz D, III CR, Birdwell CR (1977)** Effects of fibroblast and epidermal growth factors on ovarian cell proliferation in vitro. I. Characterization of the response of granulosa cells to FGF and EGF. *Endocrinology* 100: 1121-1128.
- Gospadarowicz D, Bialecki H (1979)** Fibroblast and epidermal growth factors are mitogenic agents for cultured granulosa cells of rodent, porcine and human origin. *Endocrinology* 104: 757-764.
- Goubau S, Murphy BD, Han VKM, Schultz GA (1996)** Insulin-like growth factor-I (IGF-I) colocalizes with IGF-binding proteins (IGFBPs) in mouse and rat ovary. *Endocrine* 4:231-221.
- Gwynne JT, Strauss III JF (1982)** The role of lipoproteins in steroidogenesis and cholesterol metabolism in steroidogenic cells. *Endocr Rev* 3: 299-329.
- Habener JF, Miller CP, Vallejo M (1995)** cAMP-dependent regulation of gene transcription by cAMP response element-binding protein and cAMP response element modulator. *Vit Horm.* 51: 339-370.
- Hansel W, Alila HY, David JP, Milvae RA (1991)** Differential origin and control mechanisms in small and large bovine luteal cells. *J Reprod Fert. Suppl* 43: 77-89.
- Hartigan JA, Green EG, Mortensen RM, Menachery A, Williams GH, Orme-Johnson NR (1995)** Comparison of protein phosphorylation patterns produced in adrenal cells by activation of cAMP-dependent protein kinase and Ca-

- dependent protein kinase. *J Steroid Biochem Molec Biol* 53: 95-101.
- Hartung S, Rust W, Balvers M, Ivell R (1995)** Molecular cloning and in vivo expression of the bovine steroidogenic acute regulatory protein. *Biochem Biophys Res Comm* 215: 646-653.
- Hawkins DE, Belfiore CJ, Kile JP, Niswender GD (1993)** Regulation of messenger ribonucleic acid encoding 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 isomerase in the ovine corpus luteum. *Biol Reprod* 48:1185-1190.
- Henderson KM, Moon YS (1979)** Luteinization of bovine granulosa cells and corpus luteum formation associated with loss of androgen-aromatizing ability. *J Reprod Fertil* 56:89-97.
- Hendrick JP, Hodges PE, Rosenberg LE (1989)** Survey of amino-terminal proteolytic cleavage sites in mitochondrial precursor proteins: Leader peptides cleaved by two matrix proteases share a three-amino acid motif. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:4056-4060.
- Hoeffler JP, Meyer TE, Yum Y, y los otros. (1988)** Cyclic AMP-responsive DNA-binding protein: structure based on a cloned placental cDNA. *Science* 242: 1430-1432.
- Honda S, Morohashi K, Nomura M, Takeya H, Kitajima M, Omura T (1993)** Ad4BP regulatin steroidogenic P-450 gene is a member of steroid hormone receptor superfamily. *J Biol Biochem* 268: 7494-7502.
- Hoyer PB, Niswender GD (1985)** The regulation of steroidogenesis is different in the two types of ovine luteal cells. *Can J Physiol Pharmacol* 63: 240-248.
- Janowski BA, Willy PJ, Devi TR, Falck JR, Mangelsdorf DJ (1996)** An oxysterol pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature* 383: 728-731.
- Jefcoate CR, DiBartolomeos MJ, Williams CA, McNAmara BC (1987)** ACTH regulation of cholesterol movement in isolated adrenal cells. *J Steroid Biochem* 27: 721-729.
- Johnson GL, Danasekaran N (1989)** The G-protein family and their interaction with receptors. *Endocr Rev* 10: 317-331.
- Johnson WJ, Reinhart MP (1994)** Lack of requirement for sterol carrier protein-2 in the intracellular trafficking of lysosomal cholesterol. *J Lipid Res* 35: 563-573.

- Jordan AW (1981)** Effects of prostaglandin F₂ α treatment on LH and dibutyryl cyclic AMP-stimulated progesterone secretion by isolated rat luteal cells. *Biol Reprod* 25: 327-331.
- Juengel JL, Guy MK, Tandeski TR, McGuire WJ, Niswender GD (1994)** Steady-state concentrations of messenger ribonucleic acid encoding cytochrome P450 side-chain cleavage and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase Δ^5/Δ^4 isomerase in ovine corpora lutea during the estrous cycle. *Biol Reprod* 51:380-384.
- Juengel JL, Meberg BM, Turzillo AM, Nett TM, Niswender GD (1995)** Hormonal regulation of messenger ribonucleic acid encoding steroidogenic acute regulatory protein in ovine corpora lutea. *Endocrinology* 136: 5423-5429.
- Kaminski, T, Akinola L, Poutanen M, Vihko R, Vihko P (1997)** Growth factors and phorbol 12-myristate-13-acetate modulate the follicle-stimulating hormone and cyclic adenosine-3',5'-monophosphate-dependent regulation of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression in rat granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 31:47-56.
- Katsumata N, Tanae A, Shinagawa T, Nagashima-Miyokawa A, Shimizu M, Yasunaga T, Tanaka T, Hibi I (1998)** Novel frameshift mutation 840delA and novel polymorphism D203A in steroidogenic acute regulatory protein gene in a Japanese patient with congenital lipoid adrenal hyperplasia. *Hum Mutat Suppl* 1: S304-S304.
- Keel BA, He Y, Maj JV (1994)** Regulation of porcine granulosa cell proliferation and differentiation in culture by purified human α -fetoprotein. Effects of low density lipoprotein. *Endocrine* 2: 929-936.
- Kelly AE (1984)** Structure and nomenclature. In: *Biochemistry of steroids hormones*. Makin HLJ ed. Blackwell scientific. Oxford, UK. pp.1-19.
- Kennelly PJ, Krebs EG (1991)** Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J Biol Chem* 266: 15555-15558.
- Kettelberger DM, Hoover D, Anderson L (1986)** Loss of aromatase activity in porcine granulosa cells during

- spontaneous luteinization in vitro. 19th Ann Mtng Soc Study Reprod, Ithaca NY Abs 160.
- Khanna A, Aten RF, Behrman HR (1994)** Heat shock protein induction blocks hormone sensitive steroidogenesis in rat luteal cells. *Steroids* 59: 4-9.
- Kharasch N, Thyagarajan BS (1983)** Structural basis for biological activities of dimethyl sulfoxide. *ANn NY Acad Sci* 411: 391-402.
- Kinally KW, Zorov DB, Antoneko YN, Snyder SH, McEnergy MW, Tedeschi H (1993)** Mitochondrial benzodiazepine receptor linked to inner membrane ion channels by nanomolar actions of ligands. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 1374-1378.
- King SR, Ronen-Fuhrmann T, Timberg R, Clark BJ, Orly J, Stocco DM (1995)** Steroid production after in vitro: transcription, translation and mitochondrial processing of proteins products of complementary deoxyribonucleic acid for steroidogenic acute regulatory protein. *Endocrinology*; 136: 5165-5176.
- Korneyev A, Pan BS, Polo A, Romeo E, Guidotti A. Costa E (1993)** Stimulation of brain pregnenolone synthesis by mitochondrial diazepam binding inhibitor receptor ligands in vivo. *J Neurochem* 61: 1515-1524.
- Krasnov J (1991)** Advances in understanding ovarian physiology: regulation of steroidogenic enzymes in ovarian follicular differentiation. *Sem Reprod Endocrinol* 9: 283-302.
- Lahav M, Garmey JC, Shupnik MA, Veldhuis JD (1995)** Dual actions of phorbol ester on cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage messenger ribonucleic acid accumulation in porcine granulosa cells. *Biol Reprod* 52: 972-981.
- Lala DS, Syka PM, Lazarchilk SB, Mangelsdorf DJ, Parker KL, Heyman RA (1997)** Activation of the orphan nuclear receptor steroidogenic factor 1 by oxysterols. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 4895-4900.
- Lalli E, Bardoni B, Zazopoulos E, Wurtz JM, Strom TM, Moras D, Sassone-Corsi P (1997)** A transcriptional silencing domain in DAX-1 whose mutation causes adrenal hypoplasia congenita. *Mol Endocrinol* 11: 1950-1960.

- Lange Y, Ye J, Chin J (1997)** The fate of cholesterol exiting lysosomes. *J Biol Chem* 272: 17018-17022.
- LaVoie HA, Benoit AM, Garmey JC, Dailey RA, Wright DJ, Veldhuis JD (1997)** Coordinate developmental expression of genes regulating sterol economy and cholesterol side-chain cleavage in the porcine ovary. *Biol Reprod* 57: 402-407.
- LaVoie HA, Garmey JC, Veldhuis JD (1998)** Sites of IGF-1 augmentation of FSH-induced activation of the porcine StAR gene promoter in granulosa cells. *Biol Reprod* 58 (suppl. 1): 162.
- Leers-Sucheta S, Morohashi K, Mason JI, Melner MH (1997)** Synergistic activation of the human type II 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4 isomerase promoter by the transcription factor steroidogenic factor-1/adrenal 4 binding protein and phorbol ester. *J Biol Chem*. 272: 7960-7967.
- Lehmann JM, Kliwer SA, Moore LB, Smith-Oliver TA, Oliver BB, Su J-L, Sundseth SS, Winegar DA, Blanchard DE, Spencer TA, Willson TM (1997)** Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J Biol Chem* 272: 3137-3140.
- Lemon M, Loir M (1997)** Steroid release in vitro by two luteal cell types in the corpus luteum of the pregnant sow. *J Endocrinol* 72: 351-358
- Leung PC (1985)** Mechanisms of gonadotrophic-releasing hormone and prostaglandin action on luteal cells. *Can J Physiol Pharmacol* 63: 249-256.
- Leung PC, Steele GL (1992)** Intracellular signaling in the gonads. *Endocr Rev* 13: 476-498.
- Li XA, Warren DW, Gregoire J, Pedersen RC, Lee AS (1989)** The rat 78,000 dalton glucose-regulated protein (GRP78) as a precursor for the rat steroidogenesis-activator polypeptide (SAP): the sap coding sequence is homologous with the terminal end of GRP78. *Mol Endocrinol* 3: 1944-1952.
- Li X-M, Juorio AV, Murphy BD (1993)** Prostaglandins alter the abundance of messenger ribonucleic acid for steroidogenic enzymes in cultured porcine granulosa cells. *Biol Reprod* 48:1360-1366.

- Li X-M, Juorio AV, Murphy BD (1995)** Angiotensin II interferes with steroidogenesis in porcine granulosa cells. *Biol Reprod* 53:791-799.
- Lieberman S, Prasad VV (1990)** Heterodox notions on pathways of steroidogenesis. *Endocr Rev* 11: 469-193.
- Lill R, Neupert W (1996)** Mechanism of protein import across the mitochondrial outer membrane. *Trends Cell Biol.* 55: 607-616.
- Lin D, Gitelman SE, Saenger P, Miller WL (1991)** Normal genes for the cholesterol side chain cleavage enzyme, P450_{scc}, in congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Invest* 88: 1955-1962.
- Lin D, Chang YJ, Strauss JF III, Miller WL (1993)** The human peripheral benzodiazepine receptor gene: cloning and characterization of alternative splicing in normal tissues and in a patient with congenital lipid adrenal hyperplasia. *Genomics* 18: 643-650.
- Lin D, Sugawara T, Strauss JF, Clark BJ, Stocco DM, Saenger P, Rogol A, Miller WL (1995)** Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. *Science* 267: 1828-1831.
- Linder ME, Gilman AG (1992)** G proteins. *Sci Am* 267: 56-61.
- Lindsell CE, Misra V, Murphy BD (1993)** Regulation of follistatin messenger ribonucleic acid in porcine granulosa cells by epidermal growth factor and the protein kinase-C pathway. *Endocrinology* 132:1630-1636.
- Liscum L, Dahl NK (1992)** Intracellular cholesterol transport. *J Lipid Res* 33: 1239-1254.
- Liu J, Heikkilä P, Kahri AI, Voutilainen R (1996)** Expression of the steroidogenic acute regulatory protein mRNA in adrenal tumors and cultured adrenal cells. *J Endocrinol* 150: 43-50.
- Liu Z, Stocco DM (1997)** Heat shock-induced inhibition of acute steroidogenesis in MA-10 cells is associated with inhibition of the synthesis of the steroidogenic acute regulatory protein. *Endocrinology* 138:2722-2728.
- Luu B (1995)** Du cholestérol aux oxystérols. *Données récentes. C R Soc Biol* 189: 827-837.
- Mackie EJB, Dywer NK, Vanier MT, Sokol J, Merrick HF, Comly ME, Argoff CE, Pentchev PG (1989)** Type C

- Niemann-Pick disease: dimethyl sulfoxide moderates abnormal LDL-cholesterol processing. *Biochim Biophys Acta* 1006: 219-226.
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM (1995)** The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83: 835-839.
- Manna PR, Tena-Sempere M, Hunhtaniemi IT (1998)** Thyroid hormone modulates the expression of the steroidogenic acute regulatory (StAR) protein messenger ribonucleic acid in a mouse Leydig tumor cell line . *Proc Annu Meet Endocrin Soc Abstr.* P1-622.
- Manns JG, Murphy BD (1985)** Recent advances in the understanding of luteal function. *Can J Physiol Pharmacol* 63: 237-239.
- Mauduit C, Gasnier F, Rey C, Chauvin M-A, Stocco DM, Luisot P, Benahmed M (1998).** Tumor necrosis factor- α inhibits leydig cell steroidogenesis through a decrease in steroidogenic acute regulatory protein expression. *Endocrinology* 139: 2863-2868.
- May JV, Schomberg DW (1981)** Granulosa cell differentiation in vitro: effect of insulin of growth and functional integrity. *Biol Reprod* 25: 421-431.
- McEneaney MW, Snowman A, Trifiletti RR, Snyder SH (1992)** Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: association with the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 3170-3174.
- McFarland KC, Sprengel R, Phillips HS, Kohler M, Rosenblatt N, Nikolics K, Segalof DL, Seeburg PH (1989)** Lutropin-choriogonadotropin receptor: an unusual member of the G-protein coupled receptor family. *Science* 245: 494-499.
- McNamara BC, Jefcoate CR (1989)** The role of sterol carrier protein 2 in stimulation of steroidogenesis in rat adrenal mitochondria by adrenal cytosol. *Arch Biochem Biophys* 275: 53-62.
- Mealy K, Robinson B, Millette CF, Majzoub J, Wilmore DW (1990)** The testicular effects of tumor necrosis factor. *Ann Surg* 211: 470-475.

- Mellon S, Vaisse C (1989)** cAMP regulates P450scc gene expression by a cycloheximide-insensitive mechanism in cultured mouse Leydig MA-10 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 7775-7779.
- Mellon SH, Bair SR (1998)** 25-hydroxycholesterol is not a ligand for the orphan nuclear receptor steroidogenic factor-1 (SF-1). *Endocrinology* 139: 3026-3029.
- Mertz LM, Pedersen RC (1989)** The kinetics of steroidogenic activator polypeptide in the rat adrenal cortex. *J Biol Biochem* 264: 15274-15279.
- Miller WL (1988)** Molecular biology of steroid hormone biosynthesis. *Endocr Rev* 9: 295-318.
- Miller WL (1995)** Mitochondrial specificity of the early steps of steroidogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 55: 607-616.
- Miller WL (1997)** Congenital lipoid adrenal hyperplasia: the human gene knockout for the steroidogenic acute regulatory protein. *J Mol Endocrinol* 19: 227-420.
- Mizutani T, Sonoda Y, Minegishi T, Wakabayashi K, Miyamoto K (1997)** Cloning, characterization and cellular distribution of rat scavenger receptor class B type I in the ovary. *Biochem Biophys Res Commun*. 234: 499-505.
- Monget P, Monniaux D (1995)** Growth factors and the control of folliculogenesis. *J Reprod Fert Suppl* 49:321-333.
- Moog-Lutz C, Tomasetto C, Regnier CH, Wendling C, Lutz Y, Muller D, Chenard M-P, Basset P, Rio M-C (1997)** MLN64 exhibits homology with the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and is over-expressed in human breast carcinomas. *Int J Cancer* 1987 10: 183-191.
- Moore C, Hutson JC (1994)** Physiological relevance of tumor necrosis factor in mediating macrophages-Leydig cell interactions. *Endocrinology* 134: 63-69.
- Murphy BD, Rajkumar K (1985)** Prolactin as a luteotrophin. *Can J Physiol Pharmacol* 63: 257-264.
- Murphy BD, Chedrese PJ, Rajkumar K (1989)** Evidence for cross-talk between protein kinase C and cAMP pathways in porcine granulosa cells. *Biol Reprod* 40 (supp 1):162, Abst 345.

- Murphy BD, Silavin SL (1989)** Luteotrophic agents and steroid substrate utilization. in : Oxford reviews of reproductive biology 11: 180-223.
- Muscatelli F, Strom TM, Walker AP, Zanaria E, Recan D, Meindi A, Bardoni B, Guioli S, Zehetner G, Rabl W, Shwarz HP, Kaplan J-C, Camerino G, Monaco AP (1994)** Mutations in the DAX-1 gene give rise to both X-linked adrenal hypoplasia congenita and hypogonadotropic hypogonadism. Nature 15: 672-676.
- Musicki B, Aten RF, Behrman HR (1990)** The antigonadotropic actions of prostaglandin F₂ α and phorbol ester are mediated by separated process in rat luteal cells. Endocrinology 126: 1388-1395.
- Nelson S, Ascoli M (1992)** Epidermal growth factor, a phorbol ester, and 3',5'-cyclic adenosine monophosphate decreased the transcription of the luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor gene in MA-10 Leydig tumor cells. Endocrinology 131:615-620.
- Niswender GD, Nett TM (1994)** The corpus luteum and its control in infraprimates species. In: Knobil E, Neill JD (eds.), The Physiology of Reproduction. New York: Raven Press; Vol 1:781-816.
- Norton JN, Skinner MK (1992)** Regulation of Sertoli cell differentiation by the testicular paracrine factor PModS: potential role of immediate-early genes. Molec Endocrinol 6:2018-2026.
- Olsen SR, Uhler MD (1991)** Inhibition of protein kinase-A by overexpression of the cloned human protein kinase inhibitor. Mol Endocrinol 5: 1246-1256.
- Omura T, Sato R, Cooper DY, Rosenthal O, Estabrook RW (1965)** Function of cytochrome P-450 of microsomes. Fed Proc 24: 1181-1189.
- Papadopoulos V (1993)** Peripheral-type benzodiazepine/diazepam binding inhibitor receptor: biological role in steroidogenic cell function. Endocr Rev 14: 222-240.
- Papadopoulos V, Boujrad N, Ikonovic MD, Ferrara P, Vidic B (1994)** Topography of the Leydig cell mitochondrial peripheral-type benzodiazepine receptor. Mol Cell Endocrinol 104: R5-R9.
- Papadopoulos V, Boujrad N, Amri H, Garnier M, Vidic B, Reversat JL, Berassau JM, Drieu K (1996)**

- Peripheral benzodiazepine receptor in cholesterol transport and steroidogenesis. Proc 2th Int Symp Mol Steroid Monterey USA Abstr 3.
- Pate JL, Condon WA (1984)** Effects of prostaglandin F_{2α} on agonist-induced progesterone production in cultured bovine luteal cells. Biol Reprod 31:427-435.
- Pedersen RC, Brownie AC (1983)** Cholesterol side-chain cleavage in the rat adrenal cortex: Isolation of cycloheximide-sensitive activator peptide. Proc Natl Acad Sci USA 80: 1882-1886.
- Pezzi V, Clark BJ, Ando S, Stocco DM, Rainey WE (1996)** Role of calmodulin-dependent protein kinase II in the acute stimulation of aldosterone production. J Steroid Biochem Mol Biol 58: 417-424.
- Picado-Leonard J, Voutilainen R, Kao L, Chung, B, Strauss III JF and Miller WL (1988)** Human adrenodoxin: cloning of three cDNAs and cycloheximide enhancement in JEG-3 cells. J Biol Chem 263: 3240-3244.
- Pilon N, Daneau I, Brisson C, Ethier J-F, Lussier JG, Silversides DW (1997)** Porcine and bovine steroidogenic acute regulatory (StAR) protein gene expression during gestation. Endocrinology 138: 1085-1091.
- Pon LA, Epstein LF, Orme-Johnson NR (1986)** Acute cAMP stimulation in Leydig cells: rapid accumulation of a protein similar to that detected in adrenal cortex and corpus luteum. Endocr Res 12: 429-446.
- Pon LA, Orme-Johnson NR. (1986)** Acute stimulation of steroidogenesis in corpus luteum and adrenal cortex by peptide hormones: rapid induction of a similar protein in both tissues. J Biol Biochem 261: 6594-6599.
- Puglielli L, Rigotti A, Greco AV, Santos MJ, Nervi F (1995)** Sterol carrier protein-2 is involved in cholesterol transfer from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane in human fibroblasts. J Biol Chem 270: 18723-18726.
- Rennert H, Chang YJ, Strauss III JF (1993)** Intracellular cholesterol dynamics in steroidogenic cells: a contemporary view. In: Adashi EY, Leung PCK eds. The ovary. Raven Press, New York, pp 147-164.
- Reyland ME, White EK (1998)** Regulation of steroidogenic acute regulatory protein gene expression in Y1

- adrenocortical cells by oxysterol and lipoprotein. Proc Annu Meet Endocrin Soc Abstr P2-343 p340.
- Rice DA, Mouw AR, Bogerd AM, Parker KL (1991)** A shared promoter element regulates the expression of three steroidogenic enzymes. *Mol Endocrinol* 5: 1552-1556.
- Richards JS (1994)** Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocr Rev* 15: 725-751.
- Richards JS, Rolfes AI (1980)** Hormonal regulation of cyclic AMP binding proteins in granulosa cells of rat ovarian follicles: characterization by photoaffinity labeling. *J Biol Biochem* 255: 5481-5489.
- Rigotti A, Trigatti BL, Penman M, Rayburn H, Herz J, Krieger M (1997)** A target mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor Class B type I reveals its key role in HDL metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 12610-12615.
- Ringler GE, Kao LC, Miller WL, Strauss JF III (1989)** Effects of 8-bromo-cAMP on expression of endocrine functions by cultured human trophoblast cells. Regulation of specific mRNAs. *Mol Cell Endocrinol* 61: 13-21.
- Rodgers RJ, Waterman MR, Simpson ER (1986)** Cytochromes P-450_{scc}, P-450_{17 α} , adrenodoxin, and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome P-450 reductase in bovine follicles and corpora lutea. Changes in specific contents during the ovarian cycle. *Endocrinology* 118: 1366-1374.
- Rodgers RJ, Waterman MR, Simpson ER (1987)** Levels of messenger ribonucleic acid encoding cholesterol side-chain cleavage cytochrome P-450, 17 α -hydroxylase cytochrome P450, adrenodoxin and low density lipoprotein receptor in bovine follicles and corpora lutea throughout the ovarian cycle. *Molec Endocrinol* 1: 274-279.
- Rothchild I (1981)** The regulation of the mammalian corpus luteum. *Recent Prog Horm Res* 37: 183-283
- Russell DW (1992)** Cholesterol biosynthesis and metabolism. *Cardiovasc Drugs Ther* 6: 103-110.

- Ryan KJ, Petro Z (1996)** Steroid biosynthesis by human ovarian granulosa and theca cells. *J Clin Endocrinol Metab* 26: 46-52.
- Sakai Y, Yanase T, Okabe Y, Hara T, Waterman MR, Takayanagi R, Haji M, Nawata H (1994)** No mutation in cytochrome P450 side chain cleavage in a patient with congenital lipoid adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 79: 1118-1201.
- Sandhoff TW, McLean MP (1996)** Hormonal regulation of steroidogenic acute regulatory protein messenger ribonucleic acid expression in the rat ovary. *Endocrine* 4: 259-267.
- Sato M, Yoshida Y, Sakuragawa N, Arima M (1988)** Effects of dimethylsulfoxide on sphingomyelinase activities in normal and Niemann-Pick type A, B, and C fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 962: 59-65.
- Scarpeta MA, Uhler MD (1993)** Evidence for two additional isoforms of the endogenous protein kinase inhibitor of cAMP-dependent protein kinase in mouse. *J Biol Chem* 268: 10927-10931.
- Shen W-H, More CCD, Ikeda Y, Parker KL, Ingraham HA. (1994)** Nuclear receptor steroidogenic factor 1 regulates MIS gene expression: a link to the sex determination cascade. *Cell* 77: 651-661.
- Short RV (1977)** The discovery of the ovaries. In: *The ovary* vol I. Zuckerman S and Weir BJ eds. Academic press, New York. pp. 1-39.
- Simon MI, Strathmann MP, Gautam N. (1991)** Diversity of G-proteins in signal transduction. *Science* 252: 802-808.
- Simpson ER, Boyd GS (1966)** The cholesterol side-chain cleavage system of the adrenal cortex: a mixed function oxidase. *Biochem Biophys Res Comm* 24: 10-17.
- Simpson ER, McCarthy JL, Peterson JA (1979)** Evidence that the cycloheximide-sensitive site of ACTH action is in the mitochondrion. *J Biol Chem* 253: 3135-3139.
- Simpson ER, Waterman MR (1988)** Regulation of the synthesis of steroidogenic enzymes in adrenal cortical cells by ACTH. *Annu Rev Physiol* 50: 247-440.
- Skalnik DG, Narita H, Kent C, Simoni RD (1988)** The membrane domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase confers endoplasmic reticulum

- localization and sterol-regulated degradation onto β -galactosidase. *J Biol Chem* 263: 6836-6841.
- Slotta KH, Ruschig H, Fels E (1934)** Reindarstillirung des hormone aus dem corpus luteum. *Ber Dtsch Chem Ges* 67: 1270-1273.
- Smith MF, McIntush EW, Smith GW (1994)** Mechanisms associated with corpus luteum development. *J Anim Sci* 72: 1857-1872.
- Soumano K, Lussier JG, Price CA (1998)** Levels of messenger RNA encoding ovarian receptors for FSH and LH in cattle during superovulation with equine chorionic gonadotrophin versus FSH. *J Endocrinol* 156: 373-378.
- Spicer LJ, Ireland JJ, Roche JF (1981)** Changes in serum LH, progesterone, and specific binding of ^{125}I -hCG to luteal cells during regression and development of bovine corpora lutea. *Biol Reprod* 25:832-841
- Stocco DM, Kilgore MW (1988)** Induction of mitochondrial proteins in MA-10 mouse Leydig tumor cells with human choriogonadotropin. *Biochem J* 249: 95-103.
- Stocco Dm, Chen W (1991)** Presence of identical mitochondrial proteins in unstimulated constitutive steroid-producing R2C rat Leydig tumor and stimulated nonconstitutive steroid-producing MA-10 mouse Leydig tumor cells. *Endocrinology* 128: 1918-1926.
- Stocco DM, King S, Clark BJ (1995)** Differential effects of dimethylsulfoxide on steroidogenesis in mouse MA-10 and rat R2C Leydig tumor cells. *Endocrinology* 136: 2993-2999
- Stocco DM, Clark BJ (1996)** Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. *Endocr Rev* 17: 221-244.
- Stocco DM (1997a)** The steroidogenic acute regulatory (StAR) protein two years later. An update. *Endocrine* 6: 99-109.
- Stocco DM (1997b)** A StAR search: implications in controlling steroidogenesis. *Biol Reprod* 56: 328-336.
- Strauss III JF, Shuler LA, Rosenblum MF, Tamaka T (1981)** Cholesterol metabolism by ovarian tissue. *Adv Lipid Res* 18: 99-157.
- Strauss III JF, Martinez F, Kiriakidou M (1996)** Placental steroid hormone synthesis: Unique features and unanswered questions. *Biol Reprod* 54:303-311.

- Sugawara T, Holt JA, Driscoll D, Strauss III JF, Lin D, Miller WL, Patterson D, Clancy KP, Hart IM, Clark BJ, Stocco DM (1995)** Human steroidogenic acute regulatory protein: functional activity in COS-1 cells, tissue-specific expression, and mapping of the structural gene to 8p11.2 and a pseudogene to chromosome 13. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 4778-4782.
- Sugawara T, Kiriakidou M, McAllister JM, Holt JA, Arakane F, Strauss III JF, (1997)** Regulation of expression of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene: A central role for steroidogenic factor 1. *Steroids* 62: 5-9.
- Tamasawa N, Hayakari M, Murakami H, Matsui J, Suda T (1997)** Reduction of oxysterols levels up-regulates HMG-CoA reductase activity in rat liver. *Atherosclerosis* 131: 237-242.
- Tang W-J, Gilman AG (1992)** Adenylyl cyclases. *Cell* 70: 869-872.
- Tash JS, Welsh MJ, Means AR (1981)** Regulation of protein kinase inhibitor by follicle stimulating hormone in Sertoli cells *in vitro*. *Endocrinology* 108: 427-434.
- Temel RE, Trigatti B, DeMattos RB, Azhar S, Krieger M, Williams DL (1997)** Scavenger receptor class B, Type I (SR-BI) is the major route for the delivery of high density lipoprotein cholesterol to the steroidogenic pathway in cultured mouse adrenocortical cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 13600-13605.
- Thomson M (1998)** Molecular and cellular mechanisms used in the acute phase of stimulated steroidogenesis." *Horm Metab Res* 30: 16-28.
- Thomson M, Korn M, Hall PF (1995)** GTP-binding proteins in adrenocortical mitochondria. *Biochem Biophys Acta* 1248: 159-169.
- Tian XC, Berndtson AK, Fortune JE (1994)** Changes in levels of messenger ribonucleic acid for cytochrome P450 side-chain cleavage and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase during prostaglandin F₂ α -induced luteolysis in cattle. *Biol Reprod* 50:349-356.
- Truss M, Beato M (1993)** Steroid hormone receptors: interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors. *Endocrine Reviews* 14: 459-479.

- Trzeciak WH, Duda T, Waterman MR, Simpson ER (1987)** Tetradecanoyl phorbol acetate suppresses follicle-stimulating hormone-induced synthesis of the cholesterol side-chain cleavage enzyme complex in rat ovarian granulosa cells. *J Biol Chem* 262: 15246-15250.
- Tulassay Z, Viczian M, Bojthe L, Czeizel A (1970)** Quantitative histological studies on the injury of spermatogenesis induced by endotoxin in rats. *J Reprod Fert* 22: 161-164.
- Vahouny GV, Chanderbhan R, Kharroubi A, Noland BJ, Pastuszyn A, Scallen TJ (1987)** Sterol carrier and lipid transfer proteins. *Adv Lipid Res* 22: 83-113.
- van der Heyden MA, Nievers M, Verkleij AJ, Boonstra J, Van Bergen Henegouwen PM (1997a)** Identification of an intracellular domain of the EGF receptor required for high-affinity binding of EGF. *FEBS Lett* 410:265-268.
- van der Heyden MA, Van Bergen en Henegouwen PM, de Ruiter N, Verdaasdonk MA, van den Tweel JG, Rijksen G, Boonstra J, Joling P (1997b)** The actin binding domain of the epidermal growth factor receptor is required for EGF-stimulated tissue invasion. *Exp Cell Res* 234: 521-526.
- Vernikos-Dannelis J, Hall M (1965)** Inhibition of adrenocortical response to ACTH by actinomycin-D in vivo. *Nature* 207:766.
- Voss AK Fortune JE (1993a)** Levels of messenger ribonucleic acid for cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase and P450 aromatase in preovulatory bovine follicles decrease after the luteinizing hormone surge. *Endocrinology* 132: 2239-2245.
- Voss AK Fortune JE (1993b)** Levels of messenger ribonucleic acid for cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in bovine preovulatory follicles decrease after the luteinizing hormone surge. *Endocrinology* 132: 888-894.
- Wallimann T, Wys M, Brdiczka D, Nicolay K (1992)** Intracellular compartmentation structure and function of creatine kinase isoenzyme in tissues with high fluctuating

- energy demands: the "phosphocreatine circuit" for cellular energy homeostasis. *Biochem J* 281: 21-40.
- Wang H, Segaloff DL, Ascoli M (1991)** Epidermal growth factor and phorbol esters reduce the levels of the cognate mRNA for the LH/CG receptor. *Endocrinology* 128: 2651-2653.
- Wang N, Weng W, Breslow JL, Tall AR (1996)** Scavenger receptor BI (SR-BI) is up regulated in adrenal gland in apolipoprotein A-I and hepatic lipase knock-out mice as a response to depletion of cholesterol stores. In vivo evidence that SR-BI is a functional high density lipoprotein receptor under feedback control. *J Biol Chem* 271: 21001-21004.
- Wang X, Sato R, Brown MS, Hua X, Goldstein JL (1994)** SREBP-1, a membrane bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis. *Cell* 77: 53-62.
- Wang X, Liu Z, Eimerl S, Timberg R, Weiss AM, Orly J, Stocco DM (1998)** Effect of truncated forms of the steroidogenic acute regulatory protein on intramitochondrial cholesterol transfer. *Endocrinology* 139: 3903-3912.
- Watari H, Arakane F, Moog-Lutz C, Kallen CB, Tomasetto C, Gertol GL, Rio M-C Baker ME, Strauss JF III (1997)** MLN64 contains a domain with homology to the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) that stimulates steroidogenesis. *Biochemistry* 94: 8462-8467.
- Wehrenberg U, Ivell R, Jansen M, von Doedecke S, Walther N (1994)** Two orphan receptors binding to a common site are involved in the regulation of oxytocin genes in the bovine ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 1440-1444.
- Yamamoto KK, Gonzalez GA, Biggs WH, Montminy MR (1988)** Phosphorylation-induced binding and transcriptional efficacy of nuclear factor CREB. *Nature* 334: 494-498.
- Yanagibashi K, Ohno Y, Kawamura M, Hall PF (1988)** The regulation of intracellular transport of cholesterol in bovine adrenal cells: purification of a novel protein. *Endocrinology* 123: 2075-2082.

- Yoshinaga K (1973)** Gonadotropin-induced hormone secretion and structural changes in the ovary during the nonpregnant reproductive cycle. In: Handbook of physiology. American Physiological Society, Washington, Dc. pp. 363-388.
- Zanaria E, Muscatelli F, Bardoni B, Strom TM, Guioli S, Guo W, Lalli E, Moser C, Walker APP McCabe ERB, Meitinger T, Monaco AP, Sassone-Corsi P, Camerino G (1994)** An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita. *Nature* 15: 635-641.
- Zazopoulos E, Lalli E, Stocco DM, Sassone-Corsi P (1997)** DNA binding and transcriptional repression by DAX-1 blocks steroidogenesis. *Nature* 390:311-315.
- Zhou, J, Refuerzo J, Bondy C (1995)** Granulosa cell DNA synthesis is strictly correlates with the presence of insulin-like growth factor I and absence of c-fos/c-jun. *Mol Endocrinol* 9:924-931.