

2m11.3021.1

Université de Montréal

**CARACTÉRISATION ET RÉGULATION DE LA PROSTAGLANDINE E  
SYNTHÉTASE DANS DES FOLLICULES PRÉOVULATOIRES BOVINS**

par

FRANCE FILION

Département de biomédecine vétérinaire

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Maître ès sciences (M.Sc.)  
en sciences vétérinaires  
option reproduction

Avril, 2002

©France Filion, 2002



SF

607

U54

2002

v.018

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**CARACTÉRISATION ET RÉGULATION DE LA PROSTAGLANDINE E  
SYNTHÉTASE DANS DES FOLLICULES PRÉOVULATOIRES BOVINS**

Présenté par  
France Filion

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr David Silversides  
Président-rapporteur

Dr Jean Sirois  
Directeur de recherche

Dr Jacques G. Lussier  
Codirecteur

Dr Pascal Dubreuil  
Membre du jury

Mémoire accepté le : \_\_\_\_\_

## Résumé

Les objectifs de cette étude étaient de cloner et de caractériser l'expression de la prostaglandine E synthétase (PGES) dans des follicules préovulatoires bovins. Il a été démontré que l'ADNc bovin de la PGES contient une région 5' non codante de 8 pb, un cadre de lecture ouvert de 462 pb et une région 3' non codante de 406 pb. La protéine déduite de la région codante est composée de 153 acides aminés et elle serait identique à 85%, 78% et 78% aux séquences de l'homme, de rat et de souris. L'expression de la PGES a été étudiée en utilisant les trois modèles *in vivo* suivants : 1) l'induction de l'ovulation suite à l'administration de hCG durant un cycle œstral normal; 2) l'induction de l'ovulation suite à l'administration de hCG après une stimulation ovarienne; 3) l'ovulation spontanée durant un cycle œstral normal. Les analyses de RT-PCR/buvarpage Southern ont démontré que l'augmentation des concentrations de hCG/LH cause une augmentation significative de l'ARNm de la PGES. Les niveaux de transcrits étaient faibles ou indécélables avant et ils augmentaient considérablement 18-24h post hCG/LH ( $p < 0,05$ ). L'analyse tissulaire a révélé des concentrations élevées d'ARNm dans les follicules et les vésicules séminales, modérées dans l'estomac, l'intestin, l'hypophyse et le foie, et relativement faibles dans les autres tissus. Les analyses des préparations isolées de cellules de granulosa et de thèque interne ont montré une expression prédominante dans la granulosa. L'expression de la protéine fut étudiée en utilisant un anticorps spécifique dirigé contre le fragment Glu<sup>49</sup> à Val<sup>146</sup> de la PGES bovine. Les analyses de type Western démontrèrent une induction de la PGES 18-24h post hCG/LH ( $p < 0,05$ ). La protéine fut détectée dans la granulosa mais pas dans la thèque. Collectivement, ces résultats démontrent que le processus ovulatoire serait associé à une induction de la PGES par les gonadotropines dans les cellules de la granulosa *in vivo*, établissant ainsi pour la première fois le contrôle de son expression dans un contexte physiologique.

Mots clés : clonage, prostaglandine, PGES, ovulation, gonadotropine, follicule préovulatoire bovin, PGE<sub>2</sub>.



## Summary

The objectives of this study were to clone bovine PGE synthase (PGES) and to characterize its regulation by gonadotropins in preovulatory follicles *in vivo*. The bovine PGES cDNA was shown to contain a 5'-untranslated region of 8 bp, an open reading frame (ORF) of 462 bp and a 3'-untranslated region of 406 bp. The putative bovine PGES ORF encodes a 153-amino acid protein that is 85%, 78% and 78% identical to the human, rat and mouse PGES homologs. The regulation of PGES was studied using three different models *in vivo*: 1) hCG-induced ovulation during a normal estrous cycle; 2) hCG-induced ovulation following ovarian hyperstimulation; 3) spontaneous ovulation during natural estrus. RT-PCR/Southern blotting analyses showed that the hCG/LH surge caused a significant increase in PGES mRNA. Levels of PGES transcripts were low or undetectable prior to hCG/LH, but increased markedly 18-24 h after hCG/LH ( $p < 0.05$ ). A tissue blot analysis revealed that levels of PGES mRNA were highest in follicles obtained 24 h post-hCG and in the seminal vesicle, moderate in the stomach, intestine, pituitary and liver, and relatively low in other bovine tissues. Analyses on isolated preparations of granulosa and theca interna cells indicated that the granulosa cell layer was the predominant site of follicular PGES expression. The protein was studied using a specific antibody raised against a fragment of PGES (Glu<sup>49</sup> to Val<sup>146</sup>). Immunoblots showed an induction of bovine PGES ( $M_r = 17\ 000$ ) 18-24 h after hCG/LH ( $p < 0.05$ ). PGES was detected in extracts of granulosa cells, but not in theca interna. Collectively, these results demonstrate that the ovulation is associated with a gonadotropin-dependent induction of PGES in granulosa cells *in vivo*, thus establishing for the first time the regulation of the enzyme in a physiological context.

Keys words : cloning, PGES, ovulation, gonadotropins, PGs synthesis, follicles, PGE<sub>2</sub>.

## Table des matières

Identification du jury .....	ii
Résumé .....	iii
Summary .....	iv
Table des matières .....	v
Listes des Figures .....	vii
Listes des Tableaux .....	ix
Liste des abréviations .....	x
Remerciements .....	xii
1. Introduction .....	1
2. Recension de littérature .....	4
2.1. Cycle oestral chez le bovin .....	4
2.2. Développement folliculaire .....	7
2.3. Les prostaglandines .....	11
2.3.1. Les prostaglandines et l'ovulation .....	11
2.3.2. La synthèse des prostaglandines .....	13
2.3.3. Mécanisme d'action des prostaglandines .....	19
2.4. La prostaglandine E <sub>2</sub> synthétase .....	21
3. Hypothèse et objectifs .....	26
4. Article : Molecular cloning and induction of bovine prostaglandine E synthase by gonadotropin in ovarian follicles prior to ovulation <i>in vivo</i> .....	27

**Table des matières (suite)**

5. Discussion générale .....	69
6. Conclusion .....	75
7. Bibliographie .....	76

## Liste des Figures

### Recension de la littérature :

Figure 1 : Le cycle œstral bovin.....	6
Figure 2 : Recrutement et vagues folliculaires.....	9
Figure 3 : Développement folliculaire. ....	10
Figure 4 : Cascade intracellulaire contrôlant la disponibilité de l'acide arachidonique. ....	16
Figure 5 : Métabolisme de l'acide arachidonique. ....	17
Figure 6 : Voies de biosynthèse et enzymes impliquées dans la conversion de la PGH <sub>2</sub> . ....	18
Figure 7 : Analyse de type Western de l'expression de la PGES. ....	22
Figure 8 : Séquence nucléotidiques du gène de la PGES humaine.....	24
 <b>Article</b> : Molecular cloning and induction of bovine prostaglandine E synthase by gonadotropin in ovarian follicles prior to ovulation <i>in vivo</i> . ....	27
 .....	54
Figure 1 : Nucleotide sequence of the bovine PGES cDNA.....	
Figure 2 : Deduced amino acid sequence of bovine PGES and comparison with other mammalian homologs. ....	56
Figure 3 : Expression of PGES mRNA in bovine tissues.....	58

**Liste des Figures (suite)**

Figure 4 : Time-dependent induction of PGES mRNA by hCG in bovine preovulatory follicles.	60
Figure 5 : Cellular localization of PGES mRNA in bovine preovulatory follicles. ....	62
Figure 6 : Induction of PGES mRNA by gonadotropins in bovine preovulatory follicles after ovarian hyperstimulation and during spontaneous ovulation. ....	64
Figure 7 : Time-dependent induction of PGES protein by hCG in bovine preovulatory follicles. ....	66
Figure 8 : Regulation and cellular localization of PGES protein in bovine preovulatory follicles during spontaneous ovulation. ....	68
 <b>Discussion générale :</b>	
Figure 9 : Un modèle schématique illustrant la relation fonctionnelle entre les deux COXs et les deux PGES. ....	70

**Liste des Tableaux**

Tableau I : Signaux de transduction des récepteurs aux prostanoïdes..... 20

### Listes des abréviations

A.A.	Acide arachidonique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AINS	Médicaments anti-inflammatoires non-stéroïdiens
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
C.J.	Corps Jaune
COX-1 et -2	Cycloxygénase 1 et 2
c et mPGES	PGES cytoplasmique et membranaire
cPLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub> cytoplasmique
DP	Récepteur aux prostaglandines D
EP	Récepteur aux prostaglandines E
FP	Récepteur aux prostaglandines F
FSH	Hormone folliculostimuline
iCa <sup>2+</sup>	Calcium intracellulaire
IL-1 $\beta$	Interleukine-1 $\beta$
IP	Récepteur aux prostaglandines I
kb	Kilobases
kDa	KiloDalton
LH	Hormone lutéinisante
LPS	Lipopolysaccharides

**Liste des abréviations (suite)**

MAPEG	Protéines associées à la membrane et impliquées dans le métabolisme du glutathion et des eicosanoïdes
MGST1	Microsomal glutathion S transferase 1
pb	Paire de bases
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandine E <sub>2</sub>
PGF <sub>2α</sub>	Prostaglandine F <sub>2α</sub>
PGH <sub>2</sub>	Prostaglandine H <sub>2</sub>
PGs	Prostaglandines
PGHS-1 et 2	Prostaglandine H synthétase-1 et -2
PIG12	Gène # 12 induit par la p53
PKA	Protéine kinase A
RT-PCR	Transcription inverse - Réaction de polymérisation en chaîne
TNF-α	Facteur nécrosant des tumeurs-α
TP	Récepteur aux tromboxanes



## Remerciements

Je voudrais sincèrement remercier mon directeur de recherche, le Dr Jean Sirois pour m'avoir permis d'effectuer ma maîtrise dans son laboratoire. Ses connaissances, son expertise, sa patience et sa bonne humeur ont grandement facilité mon apprentissage en me permettant d'évoluer dans un contexte agréable et stimulant.

Un merci spécial aussi à mon codirecteur Jacques G. Lussier pour m'avoir permis de travailler dans son laboratoire en collaboration avec ses étudiants. Cet échange fut des plus enrichissant pour mon cheminement.

J'aimerais remercier particulièrement Nadine Bouchard. Je lui serai éternellement reconnaissante de m'avoir endurée pendant ces deux années car sans elle, cette étude n'aurait jamais vu le jour. Mon questionnement sans relâche ne l'a pas découragée à m'enseigner son savoir. Merci Nadine pour ta patience à mon égard mais surtout pour ton amitié qui j'espère restera.

Un merci spécial à Julie Bédard et à Sophie Brûlé pour leur assistance, leurs encouragements mais surtout pour leur amitié et les soirées inoubliables...

Je voudrais aussi remercier toutes les personnes que j'ai eu le plaisir de côtoyer dans ce laboratoire : Fabienne Côté pour sa tentative de m'apprendre l'anglais, pour son soutien durant les congrès et pour son amitié, Kham Pouné et Derek (les deux seuls hommes de ce labo) pour leurs judicieux conseils.

Finalement, une pensée spéciale pour mon fils Félix F. Bouchard pour son amour inconditionnel.

## **1. Introduction**

Chez la femelle, les fonctions reproductrices sont le résultat de plusieurs événements prenant place dans divers organes tel le cerveau, l'hypophyse, les ovaires et le tractus reproducteur. Bien que le cycle oestral soit engendré par l'hypothalamus, il dépend aussi d'une séquence ordonnée d'événements survenant au niveau des ovaires (Ferin, 1999). L'ensemble de ces événements cycliques requiert une remarquable coordination entre les changements morphologiques et la sécrétion hormonale. Cette coordination requiert l'existence des boucles de rétrocontrôle entre les ovaires et l'unité hypothalamo-hypophysaire (Ferin, 1999).

L'unité fondamentale de l'ovaire est le follicule qui contient le gamète femelle ou ovocyte (Kilen et al, 1999). Au début de la vie, les ovaires sont composés exclusivement de follicules primordiaux (Fortune, 1994). Lorsque la vie reproductive commence, les follicules primordiaux se transforment en follicules primaires et secondaires avant d'acquérir une cavité antral et devenir des follicules antraux ou tertiaires. Sous l'effet des hormones hypophysaires FSH et LH, ils continuent leur maturation et leur croissance pour devenir de gros follicules préovulatoires (Van Voorhis, 1999). Le pic de LH initie les événements qui se termineront par la rupture du follicule et l'expulsion de l'ovule. Le processus ovulatoire, dont l'intervalle se situe entre le pic de LH et la rupture du follicule, dure en moyenne 30 heures chez le bovin et il s'accompagne d'un remodelage intensif du tissu folliculaire (Ferin, 1999). Certains événements se produisant dans le follicule préovulatoire tels que, l'hyperémie, l'œdème, l'invasion de leucocytes et l'induction d'activités protéolytiques et collagénolytiques, s'apparentent à une réaction inflammatoire aiguë

(Espey, 1980 ; Espey et al, 1994). Les prostaglandines, lesquelles jouent un rôle crucial dans les réactions inflammatoires, sont aussi des médiateurs clés dans le processus ovulatoire (Armstrong et al, 1972 ; Sirois, 1994). Dans les heures précédant l'ovulation, il y a une augmentation significative des prostaglandines intrafolliculaires chez plusieurs espèces animales (Lemaire et al, 1975 ; Sirois et al, 1997) et l'utilisation d'inhibiteurs de la synthèse des prostaglandines bloque l'ovulation *in vivo* et *in vitro* (Armstrong et al, 1972 ; Mikuni et al, 1998). Le rôle essentiel de la PGE<sub>2</sub> dans le processus ovulatoire fut mis en évidence dans un modèle de souris déficiente de récepteurs à la PGE<sub>2</sub> (EP2) qui démontraient un phénotype anovulatoire (Tilley et al, 1999). De plus, il a été démontré que la PGE<sub>2</sub> exogène, mais pas la PGF<sub>2α</sub>, avait la capacité de restaurer l'ovulation chez des souris déficientes en prostaglandine G/H synthétase-2 (PGHS-2) (Davis et al, 1999). Bien que les fonctions spécifiques des prostaglandines durant l'ovulation ne soient pas tout à fait élucidées, elles sembleraient impliquées dans l'activation de la cascade protéolytique et collagénolytique (Huslig et al, 1987).

Le contrôle moléculaire de la synthèse des prostaglandines durant le processus ovulatoire a été principalement étudié au cours des dernières années. Les études furent principalement axées sur la régulation de la PGHS-2, la première enzyme limitant la biosynthèse des prostaglandines dérivant de l'acide arachidonique (Hedin et al, 1987 ; Wong et al, 1989). Toutefois, même si la synthèse des prostaglandines précédant l'ovulation implique clairement l'induction de la PGHS-2, la régulation potentielle d'une enzyme impliquée dans la conversion de la PGH<sub>2</sub> en PGE<sub>2</sub>, soit, une PGE synthétase, n'a pas encore été investiguée.

La PGES humaine a été récemment clonée et caractérisée. Elle semble correspondre à une protéine identifiée auparavant comme la MGST1-L1 (Jakobsson et al, 1999) et comme le produit d'un gène nommé PIG12 (Polyak et al, 1997). Ces données furent suivies par l'isolement d'homologues chez le rat et la souris (Murakami et al, 2000 ; Mancini et al, 2001 ; Yamagata et al, 2001). Cette enzyme s'avère être liée aux membranes cellulaires et posséder une masse d'environ 16 kDa. Le gène s'étend sur une longueur de 14,8 kb, il est composé de trois exons (Jakobsson et al, 1999, Forsberg et al, 2000). L'enzyme est induite *in vitro* par certains stimuli pro inflammatoires connus pour induire l'expression de la PGHS-2, tels que les lipopolysaccharides (LPS), l'interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) et le facteur nécrosant des tumeurs- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Jakobsson et al, 1999 ; Murakami et al, 2000 ; Mancini et al, 2001 ; Thoren et al, 2000 ; Soler et al, 2000). L'induction de la PGES a aussi été rapportée récemment dans deux modèles inflammatoires *in vivo* soit un modèle d'induction de la fièvre par injection de LPS et un modèle d'induction de l'arthrite par l'injection d'adjuvant (Murakami et al, 2000 ; Mancini et al, 2001).

## 2. Recension de la littérature

### 2.1. Cycle œstral chez le bovin

Le cycle œstral est une cascade d'événements hormonaux, comportementaux progressifs et répétitifs. Les cycles reproductifs sont remarquablement précis mais démontrent une grande diversité entre les espèces animales (Fuller, 1984). La durée du cycle œstral de la vache est en moyenne de 21 jours mais il peut varier entre 17 et 24 jours (Curry et al, 1999). Les événements ovariens importants soulignant le cycle œstral sont la maturation et la croissance progressive des follicules, l'ovulation et la lutéinisation subséquente à la rupture du follicule, produisant le corps jaune (Thatcher, 1999).

Voilà déjà un siècle que le zoologiste anglais, Walter Heape, divisa le cycle oestral en quatre étapes centrées autour de la période de l'œstrus : l'œstrus, le metœstrus, le dicœstrus et le proœstrus (Figure 1). Ces étapes se succèdent d'une manière cyclique en absence de conception (Kilen et al, 1999).

Chez les mammifères, l'œstrus est un signe externe et visible d'un événement interne et invisible soit, l'ovulation. C'est une stratégie comportementale qui assure l'accouplement de la femelle au moment de l'ovulation. La femelle est attirée par le mâle et est réceptive à ses avances (Fuller, 1984). Chez le bovin, cette période dure environ 12 à 18 heures et détermine le jour zéro du cycle oestral. Elle est aussi caractérisée par la présence du pic de LH. Des changements vasculaires surviennent dans le follicule préovulatoire dans les minutes qui suivent le pic de LH amenant une augmentation du débit sanguin. Le pic de LH initie aussi la synthèse d'enzymes

protéolytiques impliquées dans la rupture de la paroi folliculaire (Espey et al, 1994). L'ovocyte répond au pic de LH préovulatoire en complétant sa division méiotique réductionnelle et en entrant dans sa seconde division méiotique, la division équationnelle (Van Voorhis, 1999). L'œstrus, chez le bovin, se termine juste avant l'ovulation et pour un taux de conception maximal l'insémination artificielle se pratique durant cette période (Thatcher, 1999).

Le metoestrus suit l'œstrus et s'étale sur approximativement trois jours soit du jour 2 au jour 5. L'ovulation survient durant les premières 15 heures du metoestrus (Thatcher, 1999). Le follicule se rompt et libère l'ovocyte. À cet instant, la méiose s'arrête de nouveau pour se terminer au moment de la fertilisation (Van Voorhis, 1999). L'expulsion de l'ovocyte est suivie d'une transformation spontanée du follicule en corps jaune (Kilen et al, 1999). Cette nouvelle structure résulte de changements morphologiques et fonctionnels dans les cellules de la granulosa et de la thèque interne incluant une vascularisation de la granulosa, avasculaire antérieurement. La fonction principale du corps jaune est la sécrétion de progestérone nécessaire pour préparer l'endomètre utérin à l'implantation de l'embryon. La progestérone provoque une augmentation de la vascularisation utérine qui s'accompagne souvent de saignements visibles, surtout chez les génisses. Ces saignements sont dus à la brisure de petits capillaires et ils surviennent 1,5 à 2 jours après le début du metoestrus (Thatcher, 1999).

La période du dioestrus est celle où le corps jaune est pleinement fonctionnel. Elle s'étend du jour 5 au jour 17-18. La concentration de la progestérone est maximale dans le milieu du dioestrus (Dailey, 1999). Chez les vaches non gestantes,

le corps jaune est fonctionnel de 10 à 14 jours. La sécrétion par l'utérus de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  initie la régression du corps jaune (Silvia, 1999).

Le proœstrus débute avec la régression du corps jaune (lutéolyse) et continue jusqu'à l'œstrus pour ainsi fermer la boucle d'un cycle œstral complet (jour 17 à 21). Cette période dure de trois à quatre jours. Elle est marquée par une croissance et une maturation folliculaire et une augmentation de la sécrétion d'œstradiol circulante induisant les comportements œstraux (Thatcher, 1999).

La terminologie de Heape fut très utilisée pour décrire les étapes du cycle œstral. Ce zoologiste a aussi inventé le terme «anoœstrus» qui signifie le temps où se manifeste aucun comportement d'accouplement. Donc, un cycle œstral complet consiste en une période d'œstrus suivit d'une période d'anoœstrus.

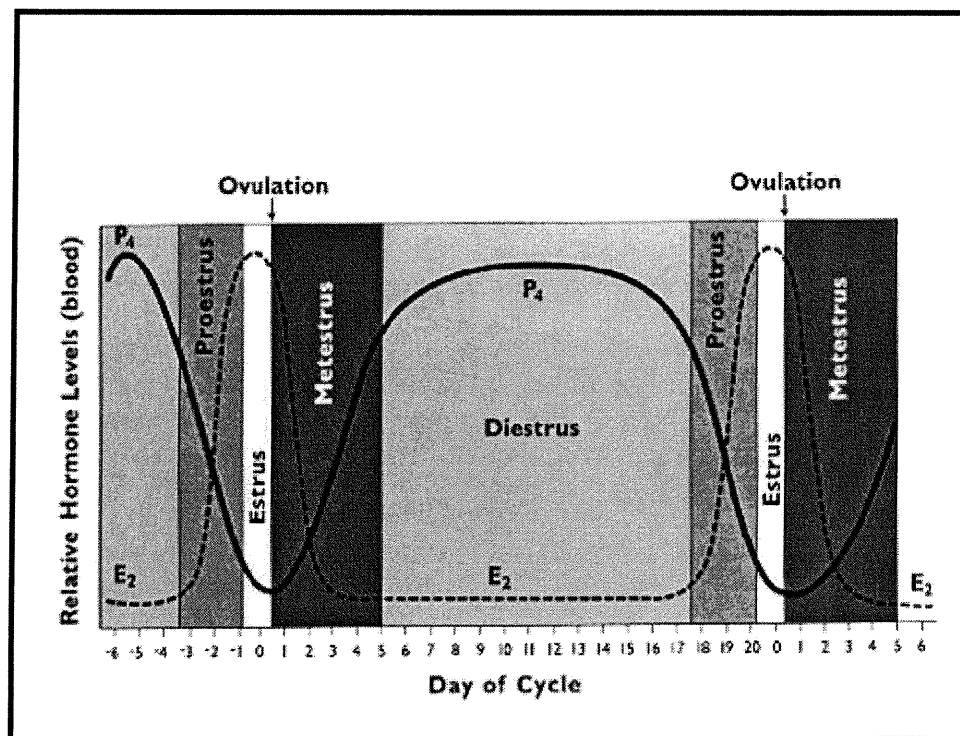


Figure 1 : Le cycle œstral bovin ([www.vet.orst.edu/vm718/female4/sld001.html](http://www.vet.orst.edu/vm718/female4/sld001.html)).

## 2.2. Développement folliculaire

Le développement folliculaire commence lorsque certains follicules quittent la réserve de follicules primordiaux et entament les processus de croissance, de division et de différenciation cellulaire pour se terminer par l'ovulation (Van Voorhis, 1999). L'ovaire d'un mammifère renferme une population hétérogène de follicules à différents stades non synchrones de croissance et de maturation (Blake, 1999). Dans plus de 99% des cas, les follicules qui entrent en croissance n'atteignent pas le stade ovulatoire mais dégénèrent par atresie à un stade de leur développement, l'ovulation étant l'exception à la règle (Blake, 1999).

Les follicules primordiaux renferment chacun un ovocyte, bloqué en prophase de la première division méiotique (Fortune, 1994). Ils sont entourés d'une couche de cellules de prégranulosa aplaties. Les processus par lesquels les follicules quittent la réserve ne sont pas entièrement élucidés mais ils sont toujours initiés pendant la vie foetale. À la naissance, la réserve de follicules primordiaux est considérablement réduite (Ferin, 1999). L'épuisement de la réserve signale la fin de la vie reproductive.

L'entrée des follicules primordiaux en croissance est caractérisée par la conversion des cellules de prégranulosa aplaties en une couche de granulosa cuboïdales. Ils se nomment maintenant follicules primaires (Van Voorhis, 1999). Le développement se poursuit avec la prolifération des cellules de la granulosa, l'augmentation de la taille de l'ovocyte et la formation d'une zone pellucide autour de l'ovocyte. Lorsque plusieurs couches de cellules entourent l'ovocyte, c'est un follicule secondaire (Van Voorhis, 1999). Par la suite, on peut observer l'alignement des cellules stromales près de la membrane basale pour former la thèque interne et



externe. Les cellules de la thèque jouent un rôle critique dans le développement folliculaire et dans la stéroïdogénèse en sécrétant les androgènes nécessaires à la synthèse d'œstrogènes par la granulosa (Van Voorhis, 1999). Jusqu'à cette étape, le développement folliculaire était indépendant des hormones hypophysaires. Pour qu'il puisse continuer, elles lui sont maintenant indispensables. Sous l'effet de la FSH, les cellules de la granulosa commencent à produire un fluide appelé liqueur folliculaire qui forme une cavité entre les cellules de la granulosa (Dailey, 1999). Ce type de follicules est maintenant appelé follicule tertiaire ou antral. Un support insuffisant en FSH à ce stade, conduit à l'atrésie du follicule. Le développement exponentiel des follicules tertiaires, sous la dépendance des gonadotropines, se nomme le recrutement. Contrairement aux follicules primordiaux qui entrent en phase de croissance continuellement, les follicules tertiaires sont recrutés par vagues. Il existe deux à trois vagues de croissance folliculaires par cycle oestral chez le bovin (Dailey, 1999). Les follicules recrutés dans une vague ont entre six et neuf mm de diamètre. Même si plusieurs follicules tertiaires sont recrutés, un seul continuera sa croissance et deviendra le follicule dominant (Figure 2). Les processus gouvernant la sélection du follicule dominant ne sont pas encore totalement élucidés mais ils sembleraient être associés au follicule qui posséderait la plus grande sensibilité à la FSH (possède un plus grand nombre de récepteurs ou des récepteurs d'affinités différentes) (VanVoorhis, 1999). Celui-ci aurait la capacité de survivre dans un environnement s'appauvrissant en FSH. Le follicule dominant se caractérise par une activité mitotique élevée dans les cellules de la granulosa, une augmentation de l'activité de l'aromatase, un ratio œstrogène sur androgène élevé et une grande taille comparativement aux autres follicules (Van Voorhis, 1999).

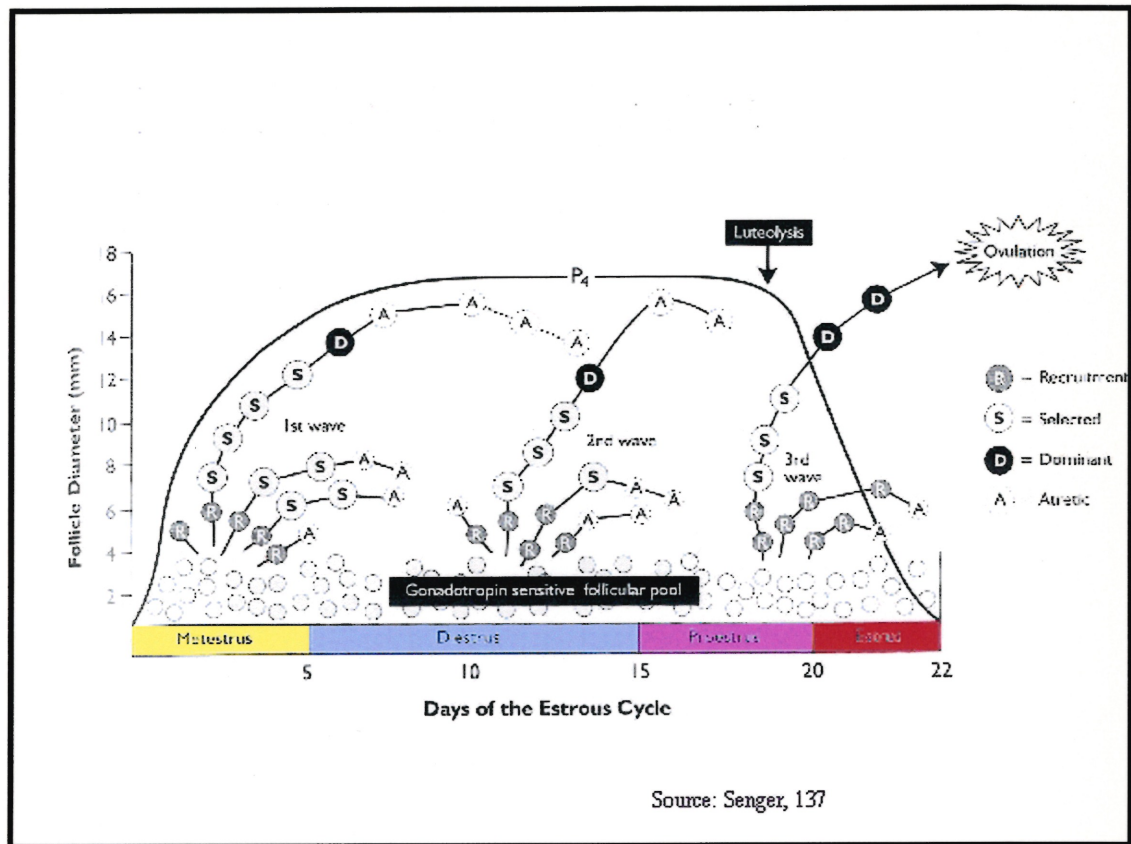


Figure 2 : Recrutement et vagues folliculaires  
 ([www.unipr.it/~fderensi/rip\\_bov/image14.gif](http://www.unipr.it/~fderensi/rip_bov/image14.gif))

À la fin de la phase folliculaire, le follicule préovulatoire a atteint sa pleine maturité et sa sécrétion d'œstrogène est maximale. Sous ces conditions, la boucle de rétrocontrôle positif de l'œstrogène sur l'hypothalamus s'active et donne le signal à l'hypophyse de sécréter massivement la LH. Ce pic de LH initie la reprise de la méiose dans l'ovocyte et déclenche les processus conduisant à l'ovulation et à la lutéinisation (Figure 3) (Ferin, 1999).

Chez le bovin, l'ovulation survient quelques 30 heures après le pic de LH. Pendant cet intervalle, le follicule subit des changements physiologiques et biochimiques : la synthèse d'œstrogène est détournée au profit de la synthèse de

progestérone, l'apport sanguin est augmenté due à une augmentation de la vascularité, et à l'induction de la synthèse d'enzymes protéolytiques et collagénolytiques et de prostaglandines indispensables au processus ovulatoire (Ferin, 1999). La phase de développement folliculaire se termine par la rupture des parois du follicule et l'expulsion de l'ovocyte dans l'oviducte.

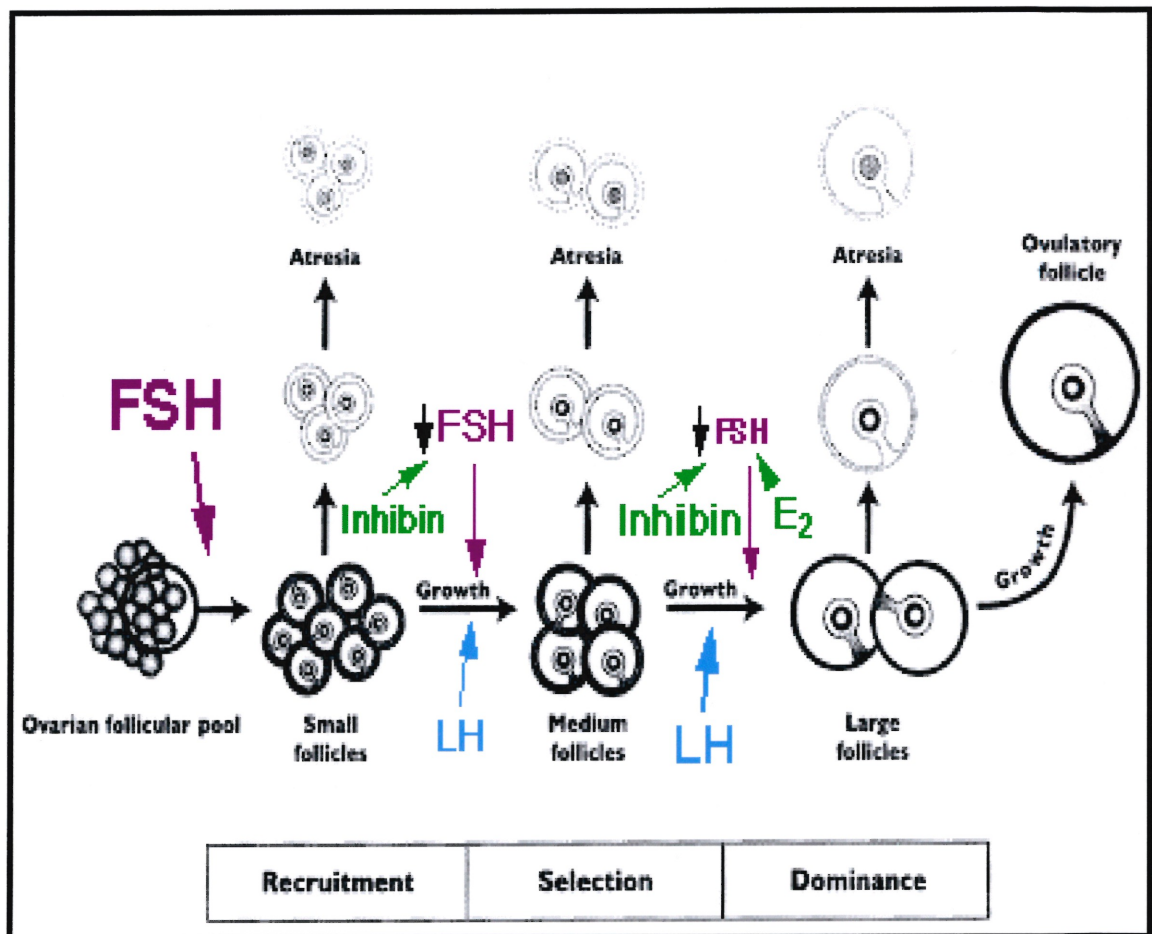


Figure 3 : Développement folliculaire  
[www.wisc.edu/ansci\\_repro/lec/lec\\_10/1,2,3%20follicle.gif](http://www.wisc.edu/ansci_repro/lec/lec_10/1,2,3%20follicle.gif)

## 2.3. Les prostaglandines

### 2.3.1. Les prostaglandines et l'ovulation

Le processus ovulatoire, indispensable à la perpétuation de l'espèce, est le sujet de recherches scientifiques intense depuis une centaine d'années. En conséquence, une meilleure compréhension de ce phénomène fascinant pourrait avoir une profonde implication dans la conception de nouvelles approches pour contrôler la fertilité et l'infertilité dans le règne animal.

Le rôle des prostaglandines dans le processus ovulatoire a été considérablement étudié depuis 25 ans. En 1972, il a été démontré qu'un inhibiteur de la synthèse des prostaglandines avait la capacité de bloquer l'ovulation chez le rat et le lapin (Orczyk et al 1972 ; Grinwich et al, 1972). Dans les quatre heures suivant le pic de LH, une augmentation significative des concentrations de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  et de  $\text{PGE}_2$  dans le tissu folliculaire chez les mammifères fut mesurée (Murdoch et al, 1993). Le rôle prédominant de la  $\text{PGE}_2$  dans le processus ovulatoire fut mis en évidence dans un phénotype anovulatoire observé chez des modèles de souris déficientes en récepteurs  $\text{EP}_2$   $\text{PGE}_2$  (Tilley et al, 1999) et par la capacité de la  $\text{PGE}_2$  exogène, mais non de la  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , de restorer l'ovulation dans un modèle de souris déficiente pour la  $\text{PGHS-2}$  (Davis et al, 1999). L'augmentation des concentrations de prostaglandines dans les follicules préovulatoires a été rapportée chez plusieurs espèces non mammifères, incluant les poulets, les reptiles, les poissons et chez quelques espèces invertébrées tels que les escargots et les mollusques. L'ovulation peut être bloquée dans plusieurs

de ces espèces par l'administration d'anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS) (Murdoch et al, 1993) Par conséquent, l'implication des prostaglandines dans la rupture folliculaire et la libération de l'ovocyte apparaît être un phénomène commun dans le règne animal. Cette augmentation de la synthèse des prostaglandines est associée à une induction simultanée de l'ARNm de la PGHS-2 induite par les gonadotropines (Silvia, 1999).

Les signaux biochimiques et intercellulaires durant l'ovulation s'apparentent beaucoup à ceux d'une réaction inflammatoire (Espey, 1980). La PGE<sub>2</sub> agit en stimulant l'activité de l'adénylate cyclase, particulièrement dans les cellules de la granulosa ce qui renforcerait l'action endocrinienne des stéroïdes sur le follicule. Elle contribue aussi à l'augmentation du débit sanguin folliculaire ainsi qu'à la perméabilité vasculaire, favorisant la diapédèse des molécules impliquées dans les réactions inflammatoires, survenant au début du processus ovulatoire (Murdoch et al, 1993). La PGF<sub>2α</sub> stimule l'activité de la phospholipase C et elle est impliquée dans la réduction du débit sanguin particulièrement au point de rupture durant la dernière phase du processus ovulatoire. Cette affirmation est basée principalement sur les propriétés vasoconstrictives très bien étudiées de la PGF<sub>2α</sub> et aussi par l'observation de l'échec de la réponse ischémique folliculaire lorsque l'ovulation est bloquée par des AINS (Silvia, 1999). Les prostaglandines peuvent aussi activer la cascade de synthèse des enzymes protéolytiques nécessaires à la rupture de la paroi folliculaire, particulièrement les collagénases (Murdoch et al, 1993).

Toutefois, le dogme que les prostaglandines sont obligatoires pour le processus ovulatoire fut remis en question par des études discordantes démontrant que l'action

anti-ovulatoire de l'indométhacine (inhibiteur des prostaglandines) pourrait ne pas être contrecarrée par l'administration de prostaglandines spécifiques (Murdoch, 1993 ; Espey, 1994). D'autres études rapportent aussi que l'ovulation peut survenir à des concentrations d'indométhacine capable d'inhiber l'augmentation normale des prostaglandines ovariennes préovulatoires (Murdoch, 1993 ; Espey, 1994). Ces études dressent un doute au sujet de l'hypothèse que les AINSs bloqueraient l'ovulation en inhibant seulement la synthèse des prostaglandines. Elles suggèrent un mécanisme impliquant un médiateur alternatif qui pourrait assurer un processus ovulatoire normal même en présence d'AINSs. Les fonctions spécifiques des prostaglandines dans les événements préovulatoires n'ont pas encore été entièrement caractérisées. Des études sur la caractérisation et la régulation des récepteurs aux prostaglandines pourraient aider à préciser les sites d'action des prostaglandines durant le processus ovulatoire (Sirois et al, 2000).

### 2.3.2. La synthèse des prostaglandines

Les prostaglandines sont connues depuis le début des années 1930. Von Euler (Kilen, 1999) nomma cette substance prostaglandine suite à des expériences sur des extraits de prostate. Plus tard, il fut déterminé que la majeure source de production des prostaglandines était la vésicule séminale. Le nom resta même s'il était erroné.

Le large éventail d'activités biologiques découlant des prostaglandines démontre leur importance tant en physiologie normale qu'en pathologie. Elles modifient la contraction des muscles lisses, le débit sanguin, la reproduction, la

fonction plaquettaire, la respiration, la transmission des influx nerveux, le métabolisme des graisses et les réponses immunitaires (Tortora et al, 1994). Elles jouent également un rôle dans l'inflammation, l'apparition de la fièvre et l'augmentation de la douleur (Tortora et al, 1994).

En 1971, Vane découvre que l'aspirine inhibe la synthèse des prostaglandines et plus tard, il démontre que la plupart des AINS agissent via l'inhibition de la synthèse des prostaglandines. Les prostaglandines sont dites ubiquitaires puisqu'on les retrouve dans toutes les cellules exceptées les globules rouges. Elles agissent habituellement de façon autocrine ou paracrine mais elles peuvent aussi agir de façon endocrine comme par exemple durant la régression du corps jaune (Silvia, 1999).

Les prostaglandines sont des acides gras à 20 carbones présentant un noyau cyclopentane entre les carbones 8 et 12, un acide  $\alpha$ -carboxylique et deux chaînes latérales aliphatiques. Les prostaglandines font partie de la famille des eicosanoïdes comprenant les prostaglandines, les tromboxanes et les leukotriènes. On les différencie selon le nombre de double liaison que contiennent les chaînes latérales et par le genre de groupe fonctionnel que renferme le cyclopentane. Les eicosanoïdes dérivent d'un précurseur commun : l'acide arachidonique (Tortora et al, 1994).

La première étape de la synthèse des prostaglandines est la libération de l'acide arachidonique des phospholipides membranaires par l'activation de la phospholipase  $A_2$  cytoplasmique (cPLA<sub>2</sub>). Cette activation découle d'une cascade complexe de phosphorylation protéique enclenchée par l'activation d'un récepteur spécifique à la surface cellulaire (figure 4). La plupart de ces récepteurs appartient à la famille de récepteurs ayant sept domaines transmembranaires. Ces récepteurs interagissent avec

une protéine liée au GTP qui à son tour active une phospholipase C (PLC) spécifique au phosphatidylinositol pour produire le diacylglycerol (DAG) et du inositol-1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>). Le IP<sub>3</sub> induit la relâche de Ca<sup>2+</sup> du réticulum endoplasmique et le DAG se lie à une protéine kinase C (PKC). Ceci favorise la liaison du Ca<sup>2+</sup> à la PKC, sa translocation à la membrane et son activation. La PKC activée peut maintenant phosphoryler et activer la protéine Raf qui est une sérine/thréonine kinase. La protéine Raf phosphoryle MEK qui à son tour phosphoryle MAP kinase. Un des substrats protéiques de MAP kinase est la cPLA<sub>2</sub>. Une fois phosphorylée, la cPLA<sub>2</sub> se lie au Ca<sup>2+</sup> et vient s'associer à la membrane intracellulaire. La cPLA<sub>2</sub> clive spécifiquement l'acide arachidonique de la phosphatidylcholine la rendant ainsi disponible pour la synthèse des prostaglandines (Figure 4). La seconde étape dans la synthèse des prostaglandines est l'oxygénation de l'acide arachidonique par une lipoxigénase. Il existe plusieurs lipoxigénases dans les cellules des mammifères, la plus importante est la prostaglandine H endoperoxyde synthétase (PGHS aussi appelé cyclooxygénase ou COX) (Silvia, 1999).

La PGHS catalyse la cyclooxygénation de l'acide arachidonique entre le carbone 9 et 11 pour former un produit instable, la PGG<sub>2</sub> (Figure 5). Ce produit est immédiatement transformé en PGH<sub>2</sub> par l'activité peroxyde de la PGHS. Chaque molécule de PGHS perd son activité enzymatique après la synthèse d'environ 1300 molécules de PGH<sub>2</sub>. Par conséquent, en présence d'une grande quantité d'acide arachidonique, la capacité de synthèse de nouvelles PGHS peut limiter la quantité d'acide arachidonique métabolisée (Mehendale et al, 1999).



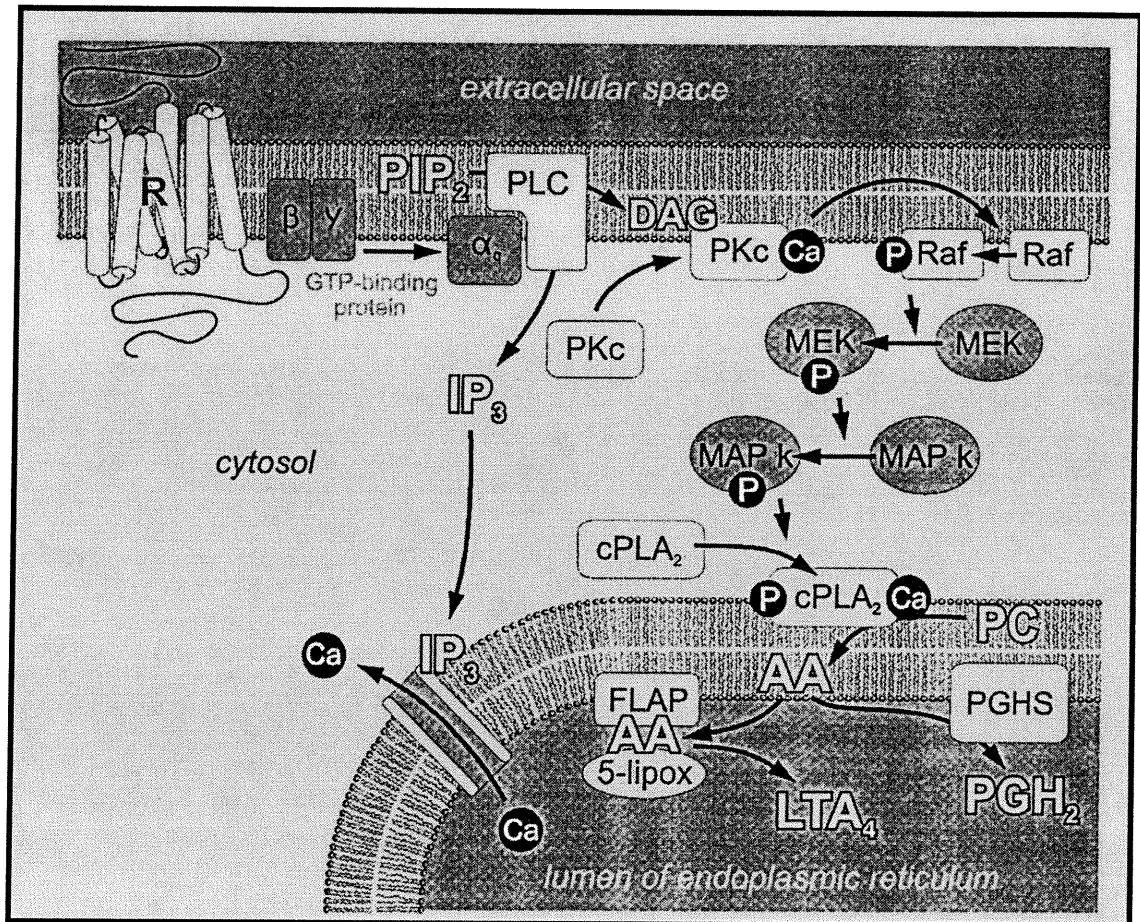


Figure 4: Cascade intracellulaire contrôlant la disponibilité de l'acide arachidonique. (Silvia 1999)

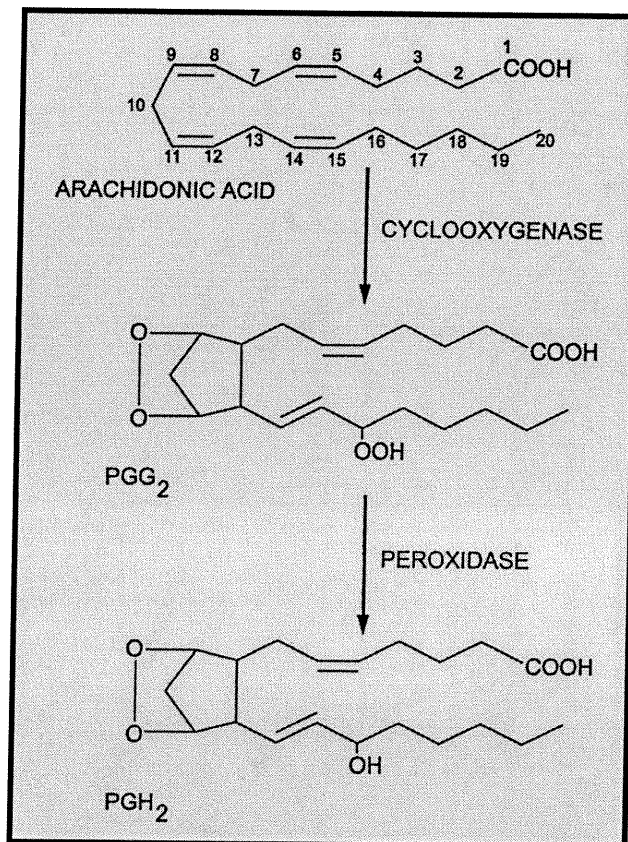


Figure 5 : Métabolisme de l'acide arachidonique (Silvia, 1999).

La PGHS existe sous deux isoformes, soit la PGHS-1 et la PGHS-2. Les deux isoformes démontrent certaines similitudes par leur poids (70 000-72 000 kDa) et leur quantité d'acides aminés (600-604). Les deux formes sont localisées sur les membranes du réticulum endoplasmique et du noyau. La PGHS-1 est exprimée d'une façon constitutive et contribue à la production des prostaglandines nécessaires au maintien de l'homéostasie. La PGHS-2 est induite en réponse à des stimuli pro-inflammatoires (Sirois et al, 1998).

La PGH<sub>2</sub> est rapidement convertie en prostaglandines biologiquement actives via l'action d'enzymes spécifiques telles la PGH<sub>2</sub>-PGD<sub>2</sub> isomérase, la PGH<sub>2</sub>-PGE<sub>2</sub>

isomérase, la  $\text{PGH}_2$ - $\text{PGF}_{2\alpha}$  réductase, la  $\text{TxA}_2$  synthétase et la  $\text{PGI}_2$  synthétase. (Figure 6) (Mehendale, 1999).

Des enzymes additionnelles peuvent interconvertir les prostaglandines. Par exemple, la  $\text{PGE}_2$  peut être transformée en  $\text{PGF}_{2\alpha}$  par l'action de la  $\text{PGE}_2$ -9-kétoréductase. La conversion inverse, soit l'oxydation du groupe C-9 hydroxyle de la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  en cétone, peut aussi s'effectuer (Murdoch et al, 1993). Les prostanoïdes jouent un rôle important dans les réactions inflammatoires et dans plusieurs processus associés au système reproducteur.

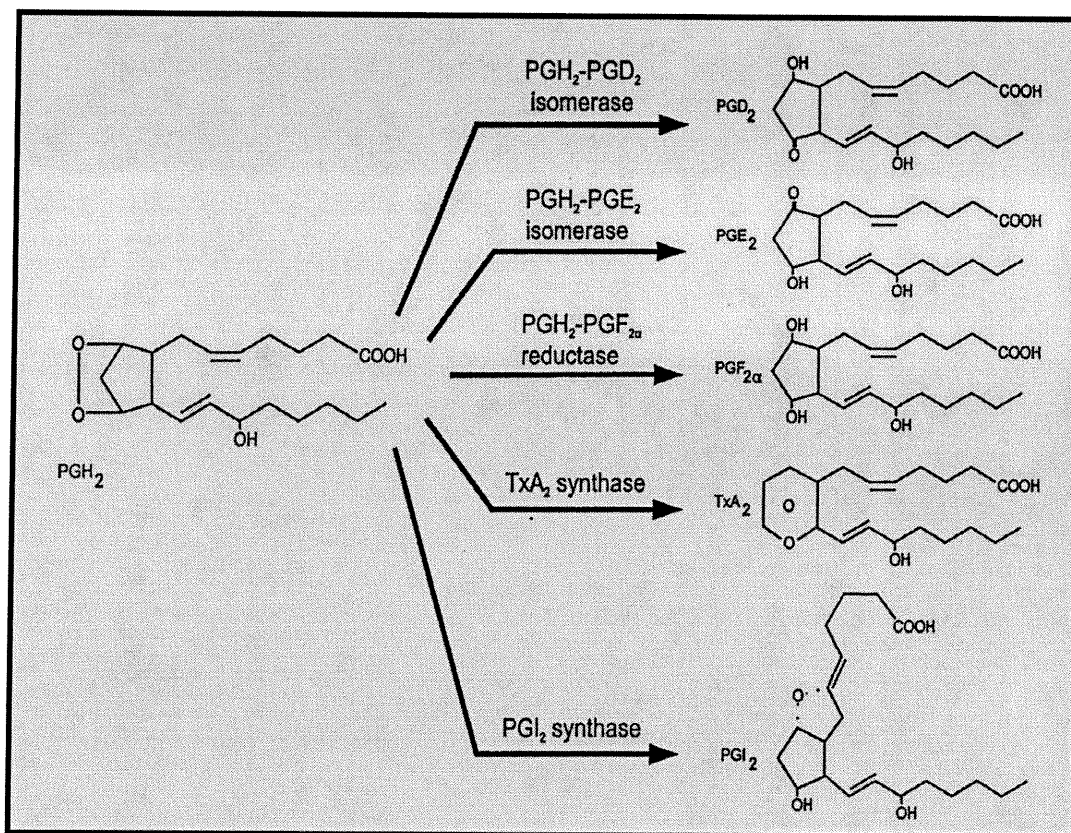


Figure 6 : Voies de biosynthèse et enzymes impliquées dans la conversion de la  $\text{PGH}_2$ . (Silvia, 1999)

La plupart des prostaglandines sont catabolisées près ou dans les cellules qui les ont synthétisées. Deux enzymes sont impliquées dans ce processus : la prostaglandine déshydrogénase, qui réduit le groupe 15-hydroxy en 15-kéto et la  $\Delta^{13}$ -réductase, qui réduit le double lien à la position 13-14. Une fois que le groupe 15-kéto est formé, la prostaglandine est biologiquement inactive (Silvia, 1999). Les métabolites sont libérés dans la circulation sanguine dans laquelle ils voyagent jusqu'au foie où ils subissent une  $\beta$  et une  $\phi$  oxydation formant des composés à 14 ou 16 carbones qui sont éliminés dans l'urine. Si les prostaglandines biologiquement actives sont libérées dans le sang, elles sont métabolisées par des enzymes dans le foie, les reins et particulièrement dans les poumons. Après un seul passage à travers les poumons de la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ou de la  $\text{PGE}_2$ , plus de 90 % des prostaglandines sont métabolisées. La demi-vie des prostaglandines dans le sang est très courte (< 1 min) (Murdoch et al, 1999). En plus des poumons, le placenta possède une grande concentration de prostaglandine déshydrogénase. Sous ces conditions, il est peu probable que des prostaglandines actives biologiquement traversent le placenta et affectent le fœtus (Mehendale et al, 1999).

### 2.3.3. Mécanisme d'action des prostaglandines

L'effet des prostaglandines sur les cellules s'effectue par des récepteurs membranaires. Les récepteurs aux prostanoïdes sont divisés en cinq types selon leur spécificité aux différents prostanoïdes : FP ( $\text{PGF}_{2\alpha}$ ), TP ( $\text{TXA}_2$ ), EP ( $\text{PGE}_2$ ), IP ( $\text{PGI}_2$ ) et DP ( $\text{PGD}_2$ ) (Mehendale et al, 1999). De plus, quatre récepteurs ont été

identifiés pour la PGE<sub>2</sub> (EP<sub>1</sub>-EP<sub>4</sub>). En se basant sur des essais sur le muscle lisse, on peut diviser les récepteurs en deux groupes : les récepteurs dont l'action est activatrice (EP<sub>1</sub>, EP<sub>3</sub>, TP et FP) et ceux dont l'action est inhibitrice (EP<sub>2</sub>, EP<sub>4</sub>, IP et DP). Le groupe relaxant est associé à l'adénylate cyclase comme signal de transduction afin d'augmenter la concentration de l'AMPc et l'activité de la PKA dans le but de séquestrer le Ca<sup>2+</sup> intracellulaire et relaxer le muscle lisse. Le groupe stimulant est couplé à l'hydrolyse de l'IP, à l'augmentation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire et à l'inhibition de l'adénylate cyclase favorisant ainsi les contractions du muscle lisse (Tableau 1). L'homologie de la structure des récepteurs entre ces groupes est de 30 % à 40 %. La séquence des récepteurs suggère qu'ils soient tous membres de la famille des récepteurs liés aux protéines-Gs possédant sept domaines transmembranaires (Narumiya et al, 1999).

Tableau 1 : Signaux de transduction des récepteurs de prostanoïdes. (Narumiya, 1999)

Type	Sous-type	Isoforme	Protéine G	Second messenger
DP			G <sub>s</sub>	AMPc ↑
EP	EP <sub>1</sub>		Non identifié	Ca <sup>2+</sup> ↑
	EP <sub>2</sub>		G <sub>s</sub>	AMPc ↑
	EP <sub>4</sub>		G <sub>s</sub>	AMPc ↑
	EP <sub>3</sub>	EP <sub>3A</sub>	G <sub>i</sub>	AMPc ↓
		EP <sub>3B</sub>	G <sub>s</sub>	AMPc ↑
		EP <sub>3C</sub>	G <sub>s</sub>	AMPc ↑
		EP <sub>3D</sub>	G <sub>i</sub> , G <sub>s</sub> , G <sub>q</sub>	AMPc ↓, AMPc ↑, PI réponse
FP			G <sub>q</sub>	PI réponse
IP			G <sub>s</sub> , G <sub>q</sub>	AMPc ↑, PI réponse
TP		TP <sub>α</sub>	G <sub>q</sub> , G <sub>i</sub>	PI réponse, AMPc ↑
		TP <sub>β</sub>	G <sub>q</sub> , G <sub>s</sub>	AMPc ↑

#### 2.4. La prostaglandine E<sub>2</sub> synthétase

La compréhension des réponses biologiques dépendantes de la PGHS a reçu beaucoup d'attention dans les années passées en raison du fait que plusieurs études pharmacologiques, biologiques et génétiques suggèrent que cette enzyme inductible est impliquée dans différentes maladies humaines incluant le cancer et des maladies inflammatoires (Herschman, 1996 ; Williams et al, 1996).

Une réaction inflammatoire inclut l'activation de la cascade arachidonique par les phospholipases et l'action subséquente des prostaglandines synthétases sur l'acide arachidonique (Espey, 1994). Depuis plusieurs années, les prostaglandines sont reconnues pour être des médiateurs clés dans le processus ovulatoire. Il a déjà été démontré que les concentrations intrafolliculaires de PGE<sub>2</sub> et de PGF<sub>2α</sub> sont significativement augmentées dans les heures précédant l'ovulation chez plusieurs espèces (Armstrong et al, 1972; Murdoch et al, 1993; Espey et al, 1994). De plus, la quantité de PGE<sub>2</sub> à n'importe quel moment du processus ovulatoire est habituellement le double de celle de la PGF<sub>2α</sub> (Espey, 1994). Il a aussi été démontré que la première enzyme limitant cette augmentation était la PGHS (DeWitt et al, 1993 ; Funk, 1993). Le métabolisme de la PGH<sub>2</sub> en prostanoides est contrôlé par différentes synthétases : les prostacyclines (PGI<sub>2</sub>), les prostaglandines (PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>) et les thromboxanes synthétases (Smith et al, 1991). Quelques une de ces enzymes sont bien caractérisées mais d'autres reste à étudier. La voie de biosynthèse de la PGE<sub>2</sub> dépendante de la PGHS pourrait être reliée plus sélectivement à une synthétase terminale soit la prostaglandine E synthétase (PGES).

La première équipe ayant identifié la PGES humaine fut celle du Dr Jakobsson en 1999. Les désignations antérieures étaient PIG12 (p53-induced gene #12) et MGST1-L1 (microsomal glutathion S-transférase 1-L1). Un système bactérien fut utilisé par l'équipe du Dr Jakobsson pour exprimer la PGES. En utilisant une technique de buvardage de type Western, ils détectèrent spécifiquement une protéine de 16 kDa dans la fraction membranaire (Figure 7).

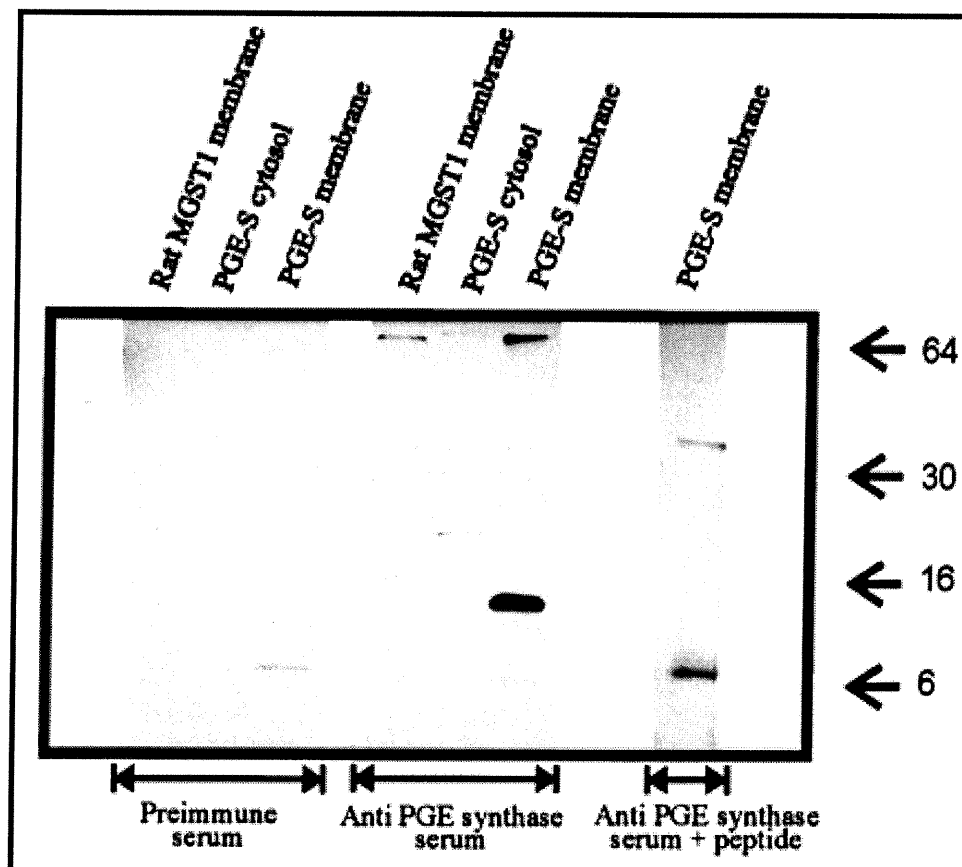


Fig. 7 : Analyse de type Western de l'expression de la PGES. (Jakobsson et al, 1999)

La PGES membranaire est un membre de la superfamille des MAPEGs (membrane associated proteins involved in eicosanoid and glutathion metabolism), comprenant aussi les MGST1-2-3, la 5-lipoxygénase et la leukotriène C<sub>4</sub> synthétase. Elle possède une forte identité de séquence avec la MGST1 (38%) (Jakobsson et al, 1999).

En incubant cette fraction membranaire avec de la PGH<sub>2</sub> en présence et en absence de glutathion, ils démontrèrent que la PGES possédait une forte activité dépendante du glutathion (0.25  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ). La distribution tissulaire humaine fut analysée par analyses de types Northern et elles révélèrent une forte expression de l'ARNm de PGES dans les lignées cellulaires cancéreuses A549 et HeLa, des taux intermédiaires dans le placenta, la prostate, les testicules, les glandes mammaires et dans la vessie tandis qu'une faible expression fut notée dans les autres tissus. Dans la même étude, il fut démontré que l'expression de la PGES pouvait être induite par l'IL-1 $\beta$  (Jakobsson et al, 1999).

La structure, la localisation et certaines propriétés régulatrices du gène de la PGES humaine ont récemment été caractérisées (Figure 8). Ce gène est divisé en trois exons, s'étend sur 14,8 kb et est localisé sur le chromosome 9 (locus q34.3). La transfection de cellules A549 avec des constructions contenant certaines parties de la région 5' en amont de l'exon 1 démontre que cette région renferme une forte activité promotrice. De plus, l'IL-1 $\beta$  induit une augmentation transitoire de la PGES, un patron semblable à celui de la PGHS-2, suggérant une co-régulation de la PGHS-2 et de la PGES par l'IL-1 $\beta$  (Forsberg et al, 2000).



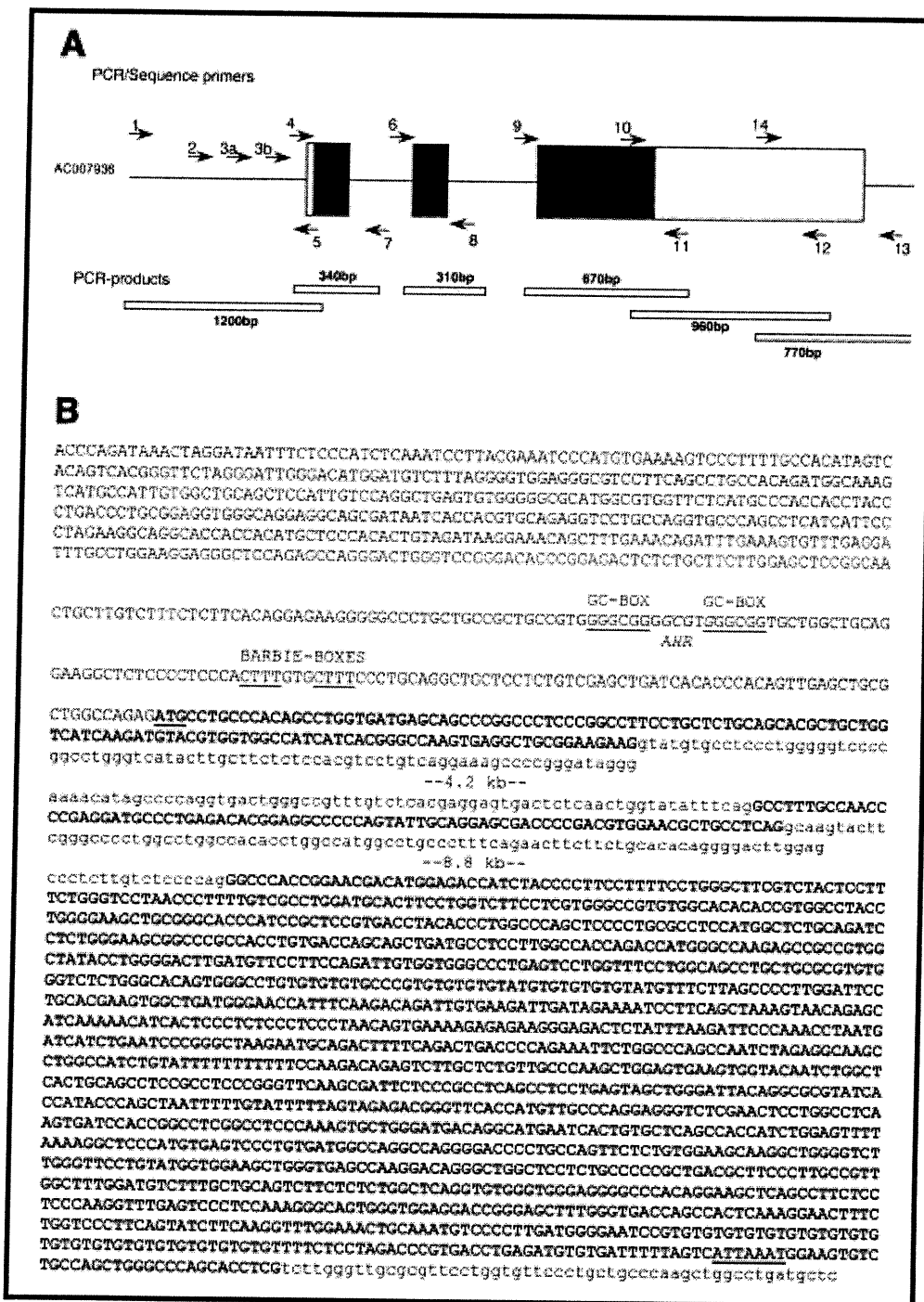


Fig. 8 : Séquence nucléotidique du gène PGES humain. Les exons sont en lettres majuscules et grasses, une partie des introns en minuscules et 632 pb de la région 5' en majuscule. Les boîtes GC et barbie sont soulignées ainsi que le signal de polyadénylation et le site de début de translation (Forsberg 2000).

L'expression de la PGES a aussi été étudiée chez le rat en utilisant deux modèles différents. Le premier modèle consistait à induire de la fièvre par injection intraveineuse de 0,12 mg/kg de LPS. Ce modèle démontra une augmentation des taux d'ARNm de PGES dans les poumons, le colon, le cerveau, le cœur, les testicules, la rate et la vésicule séminale. La PGHS et l'IL-1 $\beta$  étaient aussi augmentées dans ces tissus bien qu'à des niveaux différents de la PGES (Mancini et al, 2001). Le deuxième modèle consistait à induire les manifestations cliniques d'arthrite par injection d'adjuvant dans les articulations de rats. Ils notèrent une augmentation de l'expression de la PGES et de la PGHS de façon significative dans ce modèle. L'induction de l'ARNm de PGES dans les poumons était corrélée avec celle de la protéine dans ces deux modèles. Ces résultats démontrent que l'activité de la PGES est induite *in vivo* après administration de LPS ou d'adjuvant et suggère que celle-ci serait une enzyme clé impliquée dans la formation de PGE<sub>2</sub> dans les réponses pyrétiques et inflammatoires médiées par la PGHS-2 (Mancini et al, 2001). D'autres études ont démontré qu'une expression soutenue de PGHS et de PGES permettait une croissance cellulaire aberrante suggérant une implication de ces deux enzymes dans certaines maladies dont le cancer (Murakami et al, 2000).

### 3. Hypothèse et objectifs

L'hypothèse de ce présent projet vise à vérifier que l'augmentation dramatique et obligatoire de la PGE<sub>2</sub> dans les follicules ovariens précédant l'ovulation implique un contrôle de l'expression du gène de la prostaglandine E synthétase par l'hormone lutéinisante.

L'objectif général de la présente étude était de caractériser l'expression de la prostaglandine E synthétase dans les follicules bovins durant le processus ovulatoire *in vivo*.

Les objectifs spécifiques étaient :

- 1- Cloner et déterminer la structure primaire de la PGES bovine;
- 2- Étudier la régulation par les gonadotropines de l'ARNm et de la protéine de la PGEs dans différents modèles ovulatoires *in vivo* chez la vache.

**4. Article**

MOLECULAR CLONING AND INDUCTION OF BOVINE  
PROSTAGLANDIN E SYNTHASE BY GONADOTROPIN IN OVARIAN  
FOLLICLES PRIOR TO OVULATION *IN VIVO*

France Filion, Nadine Bouchard, Allan K. Goff, Jacques G. Lussier, Jean Sirois.

2001. Journal of Biological and Chemistry 276:34323-34330

Molecular Cloning and Induction of Bovine Prostaglandin E Synthase by  
Gonadotropin Ovarian Follicles prior to Ovulation *In Vivo*\*

France Fillion, Nadine Bouchard, Alan K. Goff, Jacques G. Lussier and Jean  
Sirois†

From the Centre de recherche en reproduction animale and the Département de  
biomédecine vétérinaire, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal,  
C.P. 5000, Saint-Hyacinthe, Québec J2S 7C6, Canada

\*This work was supported by Canadian Institutes of Health Research (CIHR)  
Grant MT-13190 (to J.S.) and Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la  
Recherche Grant 99-ER-3016 (to J.G.L. and J.S.). † Supported by a CIHR  
Investigator Award.

*The nucleotide sequence reported in this paper has been submitted to the  
GenBank™/EBI Data Bank with accession number AY032727.*

## SUMMARY

The marked and obligatory increase in ovarian follicular prostaglandin synthesis prior to ovulation involves a selective induction of prostaglandin G/H synthase-2 (PGHS-2). Since prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) is thought to be an ultimate prostaglandin effector during the ovulatory process, the objectives of this study were to clone bovine PGE synthase (PGES) and to characterize its regulation by gonadotropins in preovulatory follicles *in vivo*. The bovine PGES complementary DNA (cDNA), cloned by a combination of cDNA library screening and polymerase chain reaction (PCR), was shown to contain a 5'-untranslated region of 8 base pairs (bp), an open reading frame of 462 bp and a 3'-untranslated region of 406 bp. The putative bovine PGES open reading frame encodes a 153-amino acid protein that is 85%, 78% and 78% identical to the human, rat and mouse PGES homologs. The regulation of PGES during ovulation was studied using three different models *in vivo*: 1) human chorionic gonadotropin (hCG)-induced ovulation during a normal estrous cycle; 2) hCG-induced ovulation following ovarian hyperstimulation; and 3) spontaneous ovulation during natural estrus. Results from semi-quantitative reverse transcription-PCR/Southern blotting analyses showed that the hCG/LH surge caused a significant increase in PGES mRNA. Levels of PGES transcripts were low or undetectable prior to hCG/LH, but increased markedly 18-24 h after hCG in models 1 and 2, and 18-24 h after the onset of natural estrus in model 3 ( $p < 0.05$ ). A tissue blot analysis revealed that levels of PGES mRNA were highest in follicles obtained 24 h post-hCG and in the seminal vesicle, moderate in the stomach, intestine, pituitary and liver, and relatively low in other bovine tissues tested. Analyses on isolated preparations of granulosa and theca interna cells indicated that the granulosa cell layer was the predominant site of follicular PGES expression. The regulation of the protein was studied in the same models using a specific antibody raised against a

fragment of bovine protein ( $\Delta$ PGES; from Glu<sup>49</sup> to Val<sup>146</sup>). Results from immunoblots showed an induction of bovine PGES ( $M_r = 17\ 000$ ) 18-24 h after hCG treatment or onset of estrus ( $p < 0.05$ ). The protein was detected in extracts of granulosa cells, but not in theca interna. Collectively, these results demonstrate that the ovulatory process is associated with a gonadotropin-dependent induction of PGES in granulosa cells of ovarian follicles *in vivo*, thus establishing for the first time the regulation of the enzyme in a physiological context.

## INTRODUCTION

Ovulation is essential to all mammalian reproductive cycles, and involves a complex series of biochemical and biophysical events that ultimately lead to the rupture of the preovulatory follicle and the release of the maternal germ cell. The ovulatory process shows numerous signs of an acute inflammatory reaction, including hyperemia, edema, leukocyte extravasation, and induction of proteolytic and collagenolytic activities (1-3). Prostaglandins (PG), which play a central role in the inflammatory reaction, are also key mediators of ovulation (4-7). Intrafollicular levels of PGs are dramatically increased in the hours preceding ovulation in several species (8-13), and inhibitors of PG synthesis were shown to block ovulation *in vivo* and *in vitro* in most species tested (14-21). The predominant and obligatory role of PGE<sub>2</sub> is beginning to emerge, as evidenced from the anovulatory phenotype observed in mice deficient for the EP2 PGE<sub>2</sub> receptor (22), and the ability of exogenous PGE<sub>2</sub>, but not PGF<sub>2</sub>α, to restore ovulation in prostaglandin G/H synthase-2 (PGHS-2) deficient mice (23). Although the specific functions of PGs during ovulation remain to be fully characterized, one putative mechanism involves their role in the activation of the proteolytic/collagenolytic cascade leading to follicular rupture (24).

The molecular control of PG synthesis in ovarian cells prior to ovulation has received much attention in recent years, with efforts focusing primarily on the regulation of PGHS, the first rate-limiting enzyme in the biosynthetic pathway of all PGs from arachidonic acid (25-30). It has now been clearly established that the marked increase in PG synthesis prior to ovulation results from the selective induction of PGHS-2 (12, 13, 30-37). Several studies have shown that the



preovulatory surge of gonadotropins causes an induction of PGHS-2, but not PGHS-1, mRNA and protein in granulosa cells of ovarian follicles prior to ovulation *in vivo* (12, 13, 30-32). Interestingly, the time-course of PGHS-2 induction after exogenous human chorionic gonadotropin (hCG) treatment was shown to vary greatly amongst species, being very rapid in rats (2-4 h post hCG; 32) and relatively delayed in cattle (18 h post-hCG; 12) and horses (30 h post-hCG; 13, 37). This difference in timing of PGHS-2 induction appeared directly related to the species-specific length of the ovulatory process, thereby involving PGHS-2 as a potential regulator of the mammalian ovulatory clock (37, 38). Studies *in vitro* have established that although the gonadotropin-dependent induction of PGHS-2 in granulosa cells works primarily through the cAMP-dependent protein kinase pathway, other kinases such as protein kinase C and tyrosine kinases could be involved (33). Ultimately, the obligatory role of PGHS-2 expression during the ovulatory process was underscored in PGHS-2 deficient mice that were infertile and exhibited ovulation failure (39, 40). However, though the increase in PG synthesis prior to ovulation clearly involves PGHS-2 induction, the potential regulation of the terminal enzyme involved in the conversion of PGH<sub>2</sub> into PGE<sub>2</sub>, i.e. PGE synthase (PGES), has not been addressed.

The cloning and characterization of the first PGES was recently reported from human cells (41), and shown to correspond to a protein previously identified as microsomal glutathione *S*-transferase 1 like-1 (MGST1-L1, 41) or a gene product referred to as p53-induced gene (PIG12; 42). This initial report was rapidly followed by the isolation of the mouse and rat homologs (43, 44, 45). PGES is a member of the MAPEG (membrane associated proteins in eicosanoids and glutathione metabolism) superfamily, which also includes microsomal glutathione transferase 1

(MGST1), MGST2, MGST3, 5-lipoxygenase activating protein, and leukotriene C<sub>4</sub> synthase (46). The enzyme is a 16-kDa membrane-bound protein encoded by a transcript of about 2.0 kb and a gene spanning 14.8 kb and composed of three exons (41, 47). Interestingly, the enzyme was shown to be induced *in vitro* by various proinflammatory stimuli already known to induce PGHS-2 expression, including lipopolysaccharide (LPS), interleukin (IL)-1 $\beta$ , and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  (41, 43, 44, 48, 49). The induction of PGES has also been reported recently in two inflammatory models *in vivo*, including LPS-induced pyresis and adjuvant-induced arthritis (43, 44). However, the regulation of PGES has not been described under physiological conditions. The dramatic and obligatory increase in PGE<sub>2</sub> synthesis during the ovulatory process raises the possibility that PGES could act as a gonadotropin-regulated gene in the ovary and be involved in the regulation of this key physiological process. Therefore, the general objective of the present study was to characterize the expression of PGES in ovarian follicles during ovulation. The specific objectives were to clone and determine the primary structure of bovine PGES, and to study the regulation of PGES mRNA and protein by gonadotropins in bovine follicles in specific models of ovulation *in vivo*.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

*Materials.* The QuikHyb hybridization solution and the ExAssist/SOLR system were purchased from Stratagene Cloning Systems (La Jolla, CA). [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP was obtained from Mandel Scientific-New England Nuclear Life Science Products

(Mississauga, Ontario, Canada). Prime-a-Gene labeling system, Access RT-PCR kit, pGEM-T easy Vector System I were purchased from Promega (Madison, WI). TRIzol total RNA isolation reagent, 1-kb DNA ladder, and synthetic oligonucleotides were obtained from Life Technologies (Gaithersburg, MD). Biotrans nylon membranes (0.2  $\mu\text{m}$ ) were purchased from ICN Pharmaceuticals (Montréal, Québec, Canada), whereas Hybond-P PVDF membranes, Rainbow molecular weight markers, ECL plus, horseradish peroxidase linked donkey anti-rabbit secondary antibody, PGEX-2T vector, BL-21 protease-deficient *E. Coli* strain, and glutathione Sepharose beads were obtained from Amersham Pharmacia Biotech (Baie D'Urfé, Québec, Canada). Folltropin-V (FSH) was purchased from Vetrepharm Canada Inc (Ontario, Canada), whereas APL (hCG) was obtained from Ayerst laboratories (Montréal, Québec, Canada). Bio-Rad Protein Assay and all electrophoretic reagents were purchased from Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA). Expand High Fidelity DNA polymerase was purchased from Roche Molecular Biochemicals (Laval, Québec, Canada).

*Cloning of bovine PGES.* To clone the bovine PGES complementary DNA (cDNA), a bovine cDNA library prepared with mRNA isolated from a preovulatory follicle obtained 24 h post-hCG (50) was screened with a human PGES cDNA (42). The probe was labeled with [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]dCTP using the Prime-a-Gene labeling system (Promega) to a final specific activity greater than  $1 \times 10^8$  cpm/ $\mu\text{g}$  DNA. Approximately 250,000 phage plaques were screened, and hybridization was performed at 55 °C with QuikHyb hybridization solution (Stratagene). Four positive clones were plaque purified through secondary and tertiary screenings, and pBluescript phagemids containing the cloned DNA insert were excised *in vivo* with the Ex-Assist/SOLR system (Stratagene). DNA sequencing was performed commercially (Université Laval, Québec, Canada).

To obtain the missing 5'-end of bovine PGES, a three-step nested PCR approach was designed. Three sense primers specific for sequences located near the multiple cloning site of the pBluescript vector (S1 = 5'-ACAGGAAACAGCTATGACCTTGATTACG-3', S2 = 5'-CTCGAAATTAACCCTCACTAAAGGG-3', S3 = 5'-CCTGCAGGTCGACACTAGTGGATCC-3'), and three anti-sense primers derived from the bovine PGES cDNA clone (AS1 = 5'-TACATCCCTGGATTTCAG AAGGTCG-3', AS2 = 5'-TATCAATCGTGACGGTCCGTCTC-3', AS3 = 5'-ATGCCACGGTGTGTACCATACGG-3') were synthesized commercially (Life Technologies). For the first PCR reaction, a sample (5  $\mu$ l) of the bovine cDNA library was denatured for 15 min at 94 °C, and amplification was performed with 1  $\mu$ l of 20  $\mu$ M of external sense (S1) and anti-sense (AS1) primers, 1  $\mu$ l of 25 mM of dNTP (Amersham Pharmacia Biotech), 0.5  $\mu$ l of Expand High Fidelity DNA polymerase and 5  $\mu$ l of 10X PCR buffer (Roche Molecular Biochemicals) in a total reaction volume of 50  $\mu$ l. The reaction was run in an Omnigene TR3 SM5 thermal cycler (Hybaid Limited, Franklin, MA) for 20 cycles of 94 °C for 15 sec, 62 °C for 45 sec and 68 °C for 1 min. The second PCR reaction was performed using 2  $\mu$ l from the first PCR reaction, middle sense (S2) and anti-sense (AS2) primers, and 30 cycles of PCR conditions described above. The final nested PCR reaction was performed using 2  $\mu$ l from the second PCR reaction, internal sense (S3) and anti-sense (AS3) primers, and 40 cycles of PCR conditions described above. After electrophoresis on a 1% TAE-agarose gel, the DNA fragment was excised and ligated into pGEM-T easy vector (Promega) according to the manufacturer's protocol. DNA sequencing was performed commercially, and the missing 5'-end of the bovine PGES open reading frame was revealed.

A 850 bp fragment of the bovine GAPDH cDNA was generated by RT-PCR using a sense (5'-TGTTCCAGTATGATTCCACCC-3') and an anti-sense primer (5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3')(36), and the Access RT-PCR System (Promega)

according to the manufacturer's protocol. The PCR product was isolated after electrophoresis, subcloned into pGEM-T easy Vector, and sequenced to confirm its identity.

*In vivo models of ovulation.* The regulation of PGES expression during the ovulatory process *in vivo* was studied in three distinct models previously characterized by us (12, 35, 51). For all models, Holstein heifers 2-3 yr old that exhibited normal estrous cycles were used, and follicular development was monitored by real-time ultrasonography (12). Briefly, in the first model (hCG-induced ovulation during a normal cycle), bovine preovulatory follicles were obtained after induction of luteolysis on day 7 of the estrous cycle (12). An ovulatory dose of human chorionic gonadotropin (hCG, 3000 IU, intravenously) was administered after induction of luteolysis, and the ovary bearing the preovulatory follicle was isolated by ovariectomy (via colpotomy) at various time points after hCG (0-26 h post-hCG) (12). The interval of time from hCG administration to ovulation is 26 to 28 h post-hCG in this model. In the second model (hCG-induced ovulation following ovarian hyperstimulation), the development of multiple preovulatory follicles was stimulated by the administration of a standard four-day protocol of exogenous follicle-stimulating hormone (FSH; Folltropin-V, Vetrepharm Canada Inc) (51). After induction of luteolysis, hCG (2500 IU) was administered to induce ovulation, and ovariectomies were performed at 0, 18 and 24 h after hCG treatment (51). In this model, multiple ovulations are expected 28-30 h post-hCG (51). In the third model (spontaneous ovulation during natural estrus), corpus luteum regression was induced on day 7 of the cycle and animals were allowed to come into estrus (35). The preovulatory follicle was obtained by ovariectomy at specific times after the onset of estrus (0, 18 and 24 h after onset of estrus). In this model, the onset of estrus coincides with the endogenous LH surge, and the interval from the LH surge to

ovulation is approximately 30 h (35). For all three models, the preovulatory follicles were dissected from the ovary with a scalpel, and pieces of follicle wall (i.e. theca interna with attached granulosa cells) were prepared as previously described (12). In selected cases, some pieces of follicle wall were further dissected into isolated preparations of granulosa cells and theca interna (12). All tissue samples were stored at -70 °C. All animal procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Université de Montréal.

*RNA extraction and semi-quantitative RT-PCR/Southern blotting.* Total RNA was extracted from bovine preovulatory follicles and various tissues using TRIzol (Life Technologies) and a Kinematica PT 1200C Polytron Homogenizer. All non-ovarian follicular tissues were obtained from a slaughterhouse. The Access RT-PCR System (Promega) was used for semi-quantitative analysis of PGES and GAPDH mRNA levels. Reactions were performed as directed by the manufacturer, using sense (5'-TGATGAACGGCCAGGTGCTC-3') and anti-sense (5'-AT GCCA CGGTGTGTACCATACGG-3') primers specific for bovine PGES, and sense (5'-TGTTCCAGTATGATTCCACCC-3') and anti-sense (5'- TCCACCACCCT GTTGCTGTA-3') primers specific for bovine GAPDH (36). These reactions resulted in the generation of PGES and GAPDH DNA fragments of 330 and 850 bp, respectively. Each reaction was performed using 100 ng of total RNA, and cycling conditions were one cycle of 48 °C for 45 minutes and 94 °C for 2 minutes, followed by a variable number of cycles of 94 °C for 30 seconds, 59 °C for 1 minute and 68 °C for 2 minutes. The number of cycles used was optimized for each gene to fall within the linear range of PCR amplification, and were 22 and 13 cycles for PGES and GAPDH, respectively. Following PCR amplification, samples were electrophoresed on 2% TAE-agarose gels, transferred to nylon membranes, and hybridized with corresponding radiolabeled PGES and GAPDH cDNA fragments using QuikHyb

hybridization solution (Stratagene). Membranes were exposed to a phosphor screen, and signals were quantified on a Storm imaging system using the ImageQuant software version 1.1 (Molecular Dynamics).

*Production of an anti-bovine PGES antibody.* A pair of sense (5'-GATGGATCC GAGGACGCTCAGAGACATGGA-3') and anti-sense (5'-TCAGAATTCGACAATCTGCA GGGCCATGGA-3') primers that incorporated a *Bam*HI and an *Eco*RI restriction site, respectively, were designed from the bovine PGES open reading frame to generate a fragment ( $\Delta$ PGES) spanning the region from Glu<sup>49</sup> to Val<sup>146</sup>. The fragment was amplified by PCR using the Expand High Fidelity polymerase (Roche Molecular Biochemicals), and following the manufacturer's protocol. The fragment was isolated after electrophoresis, digested with *Bam* HI and an *Eco*RI, subcloned into pGEX-2T in frame with the GST coding region (Amersham Pharmacia Biotech), and sequenced to confirm its integrity. Protease deficient *E. Coli* BL-21 (Amersham Pharmacia Biotech) were transformed with the  $\Delta$ PGES/pGEX-2T construct, expression of recombinant  $\Delta$ PGES/GST fusion protein was induced with IPTG, and bacterial protein extracts were obtained after sonication and centrifugation (52). The  $\Delta$ PGES/GST fusion protein was purified by affinity on glutathione Sepharose beads (Amersham Pharmacia Biotech), digested with thrombin to release the  $\Delta$ PGES, resolved by one-dimensional SDS-PAGE, transferred on nitrocellulose, and stained with Ponceau S Red (52). The  $\Delta$ PGES band ( $M_r=11,000$ ) was cut and used to immunize rabbits as previously described (52).

*Cell extracts and Immunoblot analysis.* Cell extracts were prepared as previously described (12). Briefly, tissues were homogenized in TED buffer (50 mM Tris, pH 8.0, 10 mM EDTA, 1mM DEDTC) containing 0.1% Tween 20, and centrifuged at 30,000 x g for 1 h at 4 °C. The crude pellets (membranes, nuclei,

mitochondria) were sonicated in TED sonication buffer (20 mM Tris, pH 8.0, 50 mM EDTA, 0.1 mM DEDTC) containing 1.0% Tween 20. The sonicates were centrifuged at 16,000 x g for 15 min at 4 °C. The recovered supernatant (cell extract) was stored at -80 °C until electrophoretic analyses were performed. Protein concentration was determined by the method of Bradford (53) (Bio-Rad Protein Assay). Samples (5-100 µg of proteins) were resolved by one-dimensional SDS-PAGE, and electrophoretically transferred to PVDF membranes (12). Membranes were incubated with the polyclonal anti-bovine PGES antibody (1:1000), and immunoreactive proteins were visualized by incubation with the horseradish peroxidase linked donkey anti-rabbit secondary antibody (1:3000 dilution) and the enhanced chemiluminescence system (ECL plus), and following the manufacturer's protocol (Amersham Pharmacia Biotech).

*Statistical analyses.* One-way anova was used to test the effect of time after hCG or after the onset of estrus on levels of PGES mRNA levels. When ANOVAs indicated significant differences ( $p < 0.05$ ), Dunnett's test was used for multiple comparisons with the control (0 h post-hCG or post-estrus). Statistical analyses were performed using JMP software (SAS Institute, Inc., Carry, NC).



## RESULTS

*Isolation and characterization of bovine PGES.* Two strategies were used to clone the bovine PGES cDNA. In the first approach, four positive clones were isolated from the screening of 250,000 phage plaques of a bovine follicular cDNA library with a human PGES cDNA probe. Sequencing results showed that the longest clone (clone Bo2-4) did not contain the full-length open reading frame, and started at a region corresponding to the amino acid Ala<sup>43</sup> of human PGES. Thus, a second approach involving nested PCR was used and allowed to obtain the missing 5'-end of bovine PGES. The deduced bovine PGES cDNA was shown to include a 5'-untranslated region of 8 bp, an open reading frame of 462 bp (including the stop codon), and a 3'-untranslated region of 406 bp (Fig. 1).

The amino acid sequence of bovine PGES was deduced from the cDNA, and comparisons were made with other mammalian homologs (Fig. 2). The coding region of the bovine PGES cDNA encodes a 153-amino acid protein, which is similar in length to rat and mouse PGES but one residue longer than human PGES. Overall comparisons between bovine PGES and the human, rat and mouse homolog revealed a 85%, 78% and 78% identity at the amino acid level, respectively. The central region of the protein appeared well conserved, whereas the 5'- and 3'-ends were more divergent (Fig. 2).

*Tissue distribution of bovine PGES.* The distribution of PGES mRNA expression was studied in various bovine tissues by RT-PCR/Southern blot. Results showed that levels of PGES transcripts varied across tissues (Fig. 3). Levels of PGES mRNA were highest in the seminal vesicle and in a preovulatory follicle obtained 24 h after hCG treatment, moderate to high in the stomach, intestine, pituitary and liver,

and relatively low in other tissues tested. In contrast, levels of GAPDH mRNA were relatively constant in the same tissues (Fig. 3).

*Induction and cellular localization of PGES mRNA in bovine follicles prior to ovulation.* To study the potential regulation of PGES mRNA in bovine follicles during the ovulatory process, preovulatory follicles were isolated every 6 h between 0 and 24 h after hCG treatment, and samples of total RNA were extracted from the follicle wall (theca interna with attached granulosa cells) and analyzed by semi-quantitative RT-PCR/Southern blotting. Results showed a marked regulation of steady state levels of PGES transcripts in bovine follicles after hCG treatment *in vivo*. Whereas low or undetectable levels of PGES mRNA were present at 0 h, a marked and progressive induction was observed after hCG treatment, with levels being maximal at 18 and 24 h post-hCG (Fig. 4A). When results from several follicles isolated at 0 (n = 4), 6 (n = 2), 12 (n = 4), 18 (n = 4) and 24 h (n = 4) post-hCG were expressed as ratios of PGES to GAPDH, a significant increase was observed in levels present at 18-24 h as compared to 0 h post-hCG ( $p < 0.05$ ; Fig. 4C).

To establish the cellular localization of PGES mRNA expression in bovine preovulatory follicles, isolated preparations of granulosa cells and theca interna were obtained from follicles isolated at 6, 12, 18, 20, 22 and 24 h post-hCG and analyzed by RT-PCR/Southern blotting (Fig. 5). The results indicated that the granulosa cell layer was the predominant site of PGES transcripts in bovine follicles obtained between 12 and 24 h post-hCG (Fig. 5). The presence of very low levels of PGES mRNA in granulosa cells at 6 h post-hCG (Fig. 5) is in keeping with results obtained with the intact follicle wall at the same time point (Fig. 4). Levels of PGES mRNA in theca interna remained low and relatively constant (Fig. 5).

*Gonadotropin-dependent induction of PGES mRNA in bovine follicles after ovarian hyperstimulation and during natural estrus.* The cow is generally a monoovulatory species, thus producing a single preovulatory follicle per animal during each reproductive cycle, as observed in the model described above (Figs. 4 and 5). However, the development of multiple preovulatory follicles can be induced in this species with proper exogenous gonadotropin treatments. To further investigate the regulation of PGES mRNA in bovine follicles *in vivo*, and to determine whether PGES is expressed during induced multiple ovulations, the expression of PGES mRNA was studied in follicles isolated 0, 18 and 24 h post- hCG in animals subjected to a conventional ovarian hyperstimulation protocol (51). Results showed a dramatic regulation of PGES transcripts during hCG-induced multiple ovulations (Fig. 6). Levels of PGES mRNA were undetectable at 0 h, but markedly increased at 18 and 24 h post-hCG (Fig. 6A). When results from multiple follicles isolated at 0 (n = 7), 18 (n = 8) and 24 h (n = 9) post-hCG were expressed as ratios of PGES to GAPDH, a significant induction was observed at 18 and 24 h post-hCG ( $p < 0.05$ ; Fig. 6C).

In the two previous models, i.e. hCG-induced ovulation during a normal cycle (Figs. 4 and 6A) and hCG-induced ovulation following ovarian hyperstimulation (Fig. 6), exogenous human CG was administered to animals to trigger the ovulatory process. To clearly establish that the induction of PGES in bovine preovulatory follicles is a physiological event triggered by the natural endogenous LH surge, the regulation of PGES mRNA was studied in follicles isolated 0, 18 and 24 h after the onset of estrus. In cattle, the onset of estrus coincides with the endogenous LH surge (35). Results showed that levels of PGES mRNA were low at 0 h, and significantly increased 18 and 24 h after the onset of estrus ( $p < 0.05$ ; Fig. 6 D-F).

*Gonadotropin-dependent induction and cellular localization of PGES protein in bovine follicles during ovulation.* To determine whether the gonadotropin-

dependent induction of PGES mRNA in bovine follicles prior to ovulation was associated with changes in levels of PGES protein, a specific antibody was generated against a fragment of recombinant bovine PGES and used in immunoblot analyses. Figure 7A shows the reactivity of the antibody against the purified PGES fragment ( $\Delta$ PGES;  $M_r = 11,000$ ) that served as immunizing antigen. In the subsequent experiment, an immunoblot analysis was performed on extracts prepared from various bovine tissues and from a preovulatory follicle obtained 24 h after hCG treatment. Results revealed the presence of a very strong immunoreactive PGES signal in the seminal vesicle extract, with the signal appearing as a  $M_r = 17,000$  band (Fig. 7B), in keeping with the predicted size of the protein. Among other tissues tested, a weak but detectable PGES signal ( $M_r = 17,000$ ) was detected only in the preovulatory follicle sample (Fig. 7B).

To study the regulation of PGES protein *in vivo*, extracts of preovulatory follicles isolated between 0 and 26 h after hCG were analyzed by Western blots. Results showed a marked induction of PGES protein ( $M_r = 17,000$ ) after hCG treatment (Fig. 7C). Whereas levels of PGES protein were low or undetectable at 0, 6 and 12 h, they first increased at 18 h and reached their maximum at 24 h post-hCG. Similar results were obtained when the analysis presented in Fig. 7 was repeated with another set of extracts prepared from eight different preovulatory follicles (data not shown).

In the last series of experiments, the regulation of PGES protein was studied in bovine preovulatory follicles during natural estrus. Results showed that immunoreactive PGES ( $M_r = 17,000$ ) was not present at the onset of estrus (0 h), but was induced 18 h and 24 h later (Fig. 8A). The cellular localization of PGES protein was studied in isolated preparations of granulosa cells and theca interna obtained from three preovulatory follicles collected 24 h after the onset of estrus. Results

revealed that immunoreactive PGES was detected only in extracts of granulosa cells (Fig. 8B).

## DISCUSSION

This study is the first to demonstrate the regulation of PGES in a physiological context *in vivo*. Previous studies have documented the effects of different proinflammatory agonists on the regulation of PGES expression *in vitro*, including induction by IL-1 $\beta$ , LPS, TNF- $\alpha$ , beta-amyloid, and phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) in A549 human lung adenocarcinoma cells (46, 48), rat osteoblasts, peritoneal macrophages and astrocytes (43, 54), and human dermal fibroblasts and vascular smooth muscle cells (49). Also, recent reports showed that PGES induction occurs *in vivo* in various rat tissues following an LPS challenge (43, 44), and in the paws of rats subjected to a pharmacological model of adjuvant-induced arthritis (44). However, the regulation of PGES under physiological conditions had not been described. Using the bovine preovulatory follicle model, the present study provides the first evidence of a marked regulation of PGES in the hours just prior to ovulation, a process during which PG synthesis is obligatory (7, 40). Our results indicate that PGES expression is not constitutive in follicular cells, but is induced by gonadotropins prior to follicular rupture. One could predict that the control of PGES expression is likely involved in other reproductive processes in which PGE<sub>2</sub> is known to play a role, including fertilization, decidualization and implantation (40, 55, 56).

One important outcome of the present study is the demonstration that the induction of PGES by gonadotropins in bovine preovulatory follicles directly parallels the induction of PGHS-2 previously described in the same three models *in*

*in vivo* (12, 35, 51). As observed for PGES, induction of PGHS-2 protein occurred between 18-26 h post-hCG in this model of induced ovulation during a normal estrous cycle (12). Similarly, PGHS-2 expression was shown to be upregulated 18 and 24 h after hCG-induced ovulation following ovarian hyperstimulation (51), as noted for PGES in the present study. Lastly, the physiological nature of this phenomenon was confirmed in a previous report where PGHS-2 induction was observed 18 and 24 h after the onset of estrus (i.e. the LH preovulatory surge)(35), as observed for PGES. It should also be noted that in all three models the induction of PGHS-2 (and PGES) is associated with a dramatic increase in intrafollicular concentrations of PGE<sub>2</sub> (12, 35, 51). Thus, collectively, these results suggest that the preovulatory rise in follicular prostaglandin synthesis is dependent on a coordinate induction of both PGHS-2 and PGES gene expression by gonadotropins. Future studies should establish whether common or distinct molecular mechanisms are responsible for the striking similarities observed in the control of these two genes. The functional coupling of PGHS-2 and PGES in the ovary appears as an efficient mean to regulate the conversion of arachidonic acid into PGE<sub>2</sub>, as both enzymes are inducible isoforms of membrane-bound proteins acting sequentially in the PG biosynthetic pathway (57). The apparent link between PGHS-2 and PGES induction after gonadotropin treatment in preovulatory follicles *in vivo* compares with the effect of LPS and other proinflammatory stimuli on the co-induction of both enzymes in various tissues and cell types *in vivo* and *in vitro* (43, 44, 45, 48). Such similarities are in keeping with the established parallel between the physiological process of ovulation and an acute inflammatory reaction (1-3).

The level of PGES mRNA expression in preovulatory follicles isolated 24 h post-hCG was very high when compared to other non-ovarian tissues tested, being equaled only by levels observed in the seminal vesicle. However, despite the equivalent amount of PGES transcript in both tissues, the level of PGES protein in

the seminal vesicle far surpassed the level present in the preovulatory follicle. Although the basis for this important difference remains to be clearly established, the very transient nature of PGES transcript induction in preovulatory follicles, as compared to its high constitutive expression in seminal vesicles, is likely to account, at least in part, to differences in protein accumulation. The detection of high levels of PGES in bovine seminal vesicles compares with results observed in humans (41) and rats (44), but this is the first report to document the localization of PGES in ovarian cells. Our results indicate that the first important rise in PGES mRNA expression occurred 12 h post-hCG, whereas increase in the protein was detected only after 18 h of treatment, which could relate to the sequential nature of transcription and translation events. However, the ability to detect the transcript several hours prior to the protein could be due, at least in part, to the higher sensitivity of the technique used to study the message (RT-PCR/Southern blotting) as compared to the one employed for the protein (immunoblotting). The preovulatory follicle contains two major cell layers, the granulosa and the theca interna, and this study establishes that the granulosa cell layer is the predominant site of follicular PGES expression. In contrast, the PGES transcript was present only at very low levels in theca interna, and our inability to detect low levels of PGES protein in this layer may again relate to the limit of sensitivity of the analysis. Since previous studies showed that PGHS-2 is selectively induced by gonadotropins in granulosa cells of bovine follicles (12, 35), as well as in other species (13, 31, 37), the present study suggests that the increase in PGE<sub>2</sub> synthesis prior to ovulation could also involve a concomitant induction of PGES in the same cell type (12). Future studies will be needed to characterize the subcellular localization of PGES expression in granulosa cells, but one could predict abundant perinuclear localization of the enzyme, as observed for PGHS-2 in these cells (35) and based on the recent perinuclear co-localization of PGES and PGHS-2 in HEK293 cells (43).

Lastly, this report is the first to describe the cloning and characterization of bovine PGES, and sequencing results further underscore emerging similarities and differences amongst the primary structure of the enzyme across species. Comparative analyses show that the amino acid sequence of the bovine protein is relatively similar to other known mammalian homologs, being more than 77% identical to human (41), mouse (43) and rat (43, 44, 54) PGES. These multiple comparisons may also help define putative functional domains. The Arg<sup>110</sup> amino acid residue shown to be crucial for catalytic function in human PGES (43) is conserved in the bovine enzyme (Arg<sup>111</sup>). Also, two internal regions (Arg<sup>39</sup>-Ala<sup>51</sup> and Asp<sup>63</sup>-Pro<sup>97</sup>) showing 100% identity across species may contain important structural/regulatory domains. In contrast, the amino terminal (Met<sup>1</sup>-Leu<sup>14</sup>) and carboxyl terminal (Lys<sup>121</sup>-Leu<sup>153</sup>) portions of the protein appear much less conserved, with an average of 59% and 61% identity, respectively, when these regions of bovine PGES are compared with the corresponding domains of the rodent enzymes. The PGES isoform isolated in the present study represents one the two PGES isoforms cloned thus far, and has been referred to as mPGES for membrane-bound PGES (43). The enzyme is glutathione-dependent, appears as an inducible isoform functionally linked to PGHS-2, and has been proposed as an important regulator of the inflammatory process (41, 43, 44, 45, 48). Interestingly, a second glutathione-dependent PGES isoform, referred to as cPGES for cytosolic PGES, has recently been identified (58). Besides its distinct localization (cytosolic *versus* membrane-bound), cPGES is constitutively expressed in various tissues, appears functionally coupled to PGHS-1, and is thought to be involved in the synthesis of PGE<sub>2</sub> needed to maintain tissue homeostatic functions. Although the absence of PGHS-1 expression and of constitutive PG synthesis in granulosa cells does not suggest that cPGES is present in this cell type, future studies will be needed to specifically investigate this issue.



In summary, this report demonstrates for the first time that the ovulatory process is accompanied by a gonadotropin-dependent induction of PGES in granulosa cells of ovarian follicles *in vivo*, thus establishing the regulation of the enzyme in a physiological context. Combined with results from previous work showing the induction of follicular PGHS-2 in preovulatory follicles (12, 35, 51), the present study suggests that the increase in PGE<sub>2</sub> synthesis prior to ovulation results from the coordinate induction of both enzymes. Since the cAMP-dependent protein kinase pathway is the primary second messenger system involved in transducing gonadotropin action (59), the present study also adds to the emerging variety of agonists and signaling pathways able to control PGES gene expression. Ovarian follicles and granulosa cells represent interesting models to study the fine molecular mechanisms involved in the regulation of the PGES gene, and considering the obligatory role of PGE<sub>2</sub> synthesis during the ovulatory process, they could also provide a valuable approach in the testing of new PG synthesis inhibitors.

*Acknowledgements* – We thank Dr. B. Vogelstein (Johns Hopkins University) for providing the human FIG12 (PGES) cDNA.

## REFERENCES

1. Espey, L.L. (1980) *Biol. Reprod.* **22**, 73-106
2. Goetz, F.W., Berndtson, A.K. Ranjan, M. (1991) in *Vertebrate endocrinology: fundamentals and biomedical implications* (Pang, P.K.T., Schreiber, M.P., Jones, R., eds) pp.127-203, Academic Press, New York
3. Espey, L.L. Lipner, H. (1994) in *Physiology of reproduction* (Knobil, E., Neill, J.D. eds) pp. 725-781, Raven Press, New York
4. Armstrong, D.T. (1981) *J. Reprod. Fertil.* **62**, 283-291
5. Priddy, A.R., Killick, S.R. (1993) *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **49**, 827-831
6. Murdoch, W.J., Hansen, T.R., McPherson, L.A. (1993) *Prostaglandins* **46**, 85-115
7. Sirois, J., Liu, J., Boerboom, D., Antaya, M. (2000) in *Ovulation: Evolving scientific and clinical concepts* (Adashi, E.Y., ed) pp. 208-218, Springer-Verlag, New York
8. LeMaire, W.J., Yang, N.S.T. Behrman, H.H., Marsh, J.M. (1973) *Prostaglandins* **3**, 367-376
9. LeMaire, W.J., Leidner, R., Marsh, J.M. (1975) *Prostaglandins* **9**, 221-229
10. Tsang, B.K., Ainsworth, L., Downey, B.R., Armstrong, D.T. (1979) *Prostaglandins* **17**, 141-148
11. Lau, I.F., Saksena, S.K., Chang, M.C. (1974) *J. Reprod. Fertil.* **40**, 467-46
12. Sirois, J. (1994) *Endocrinology* **135**, 841-848
13. Sirois, J., Doré, M. (1997) *Endocrinology* **138**, 4427-4434
14. Armstrong, D.T., Grinwich, D.L. (1972) *Prostaglandins* **1**, 21-28
15. O'Grady, J.P., Caldwell, B.V., Auletta, F.J., Speroff, L. (1972) *Prostaglandins* **2**, 97-106

16. Ainsworth, L., Tsang, B.K., Downey, B.R., Baker, R.D., Marcus, G.J., Armstrong, D.T. (1979) *Biol. Reprod.* **21**, 401-411
17. Murdoch, W.J., Dunn, T.G. (1983) *J. Reprod. Fertil.* **69**, 671-675
18. De Silva, M., Reeves J.J. (1985) *J. Reprod. Fertil.* **75**, 547-549
19. Algire, J.E., Srikandakumar, A., Guibault, L.A., Downey, B.R. (1992) *Can. Vet. Res.* **56**, 67-69
20. Killick, S., Elstein, M. (1987) *Fertil. Steril.* **47**, 773-777
21. Mikuni, M., Pall, M., Peterson, C.M., Peterson, C.A., Hellberg, P., Brannstrom, M., Richards, J.S., Hedin, L. (1998) *Biol. Reprod.* **59**, 1077-1083
22. Tilley, S.L., Audoly, L.P., Hicks, E.H. Kim, H.S., Flannery, P.J., Coffman, T.M., Koller, B.H. (1999) *J. Clin. Invest.* **103**, 1539-1545
23. Davis, B.J., Lennard, D.E., Lee, C.A., Tiano, H.F., Morham, S.G., Wetsel, W.C., Langenbach, R. (1999) *Endocrinology* **140**, 2685-2695
24. Reich, R., Daphna-Iken, D., Chun, S.Y., Popliker, M., Slager, R., Adelman-Grill, M.C., Tsafiriri, A. (1991) *Endocrinology* **129**, 1869-1875
25. Hedin, L., Gaddy-Kurten, D., Kurten, R., DeWitt, D.L., Smith, W.L., Richards, J.S. (1987) *Endocrinology* **121**, 722-731
26. Huslig, R.L., Malik, A., Clark, M.R. (1987) *Molec. Cell. Endocrin.* **50**, 237-246
27. Curry, T.E., Malik, A., Clark, M.R. (1987) *Am. J. Obstet. Gynecol.* **157**, 537-543
28. Curry, T.E., Bryant, C., Haddix, A.C., Clark, M.R. (1990) *Biol. Reprod.* **42**, 307-316
29. Wong, W.Y.L., DeWitt, D.L., Smith, W.L., Richards, J.S. (1989) *Mol. Endocrin.* **3**, 1714-1723
30. Wong, W.Y.L., Richards, J.S. (1991) *Mol. Endocrinol.* **5**, 1269-1279
31. Sirois, J., Richards, J.S. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 6382-6388
32. Sirois, J., Simmons, D.L., Richards, J.S. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 11586-11592
33. Morris, J.K., Richards, J.S. (1993) *Endocrinology* **133**, 770-779

34. Ando, M., Kol, S., Kokia, E., Ruutiainen-Altman, K., Sirois, J., Rohan, R.M., Payne, D.W., Adashi, E.Y. (1998) *Endocrinology* **139**, 2501-2508
35. Liu, J., Carrière, P., Doré, M., Sirois, J. (1997) *Biol. Reprod.* **57**, 1524-1531
36. Tsai, S.J., Wiltbank, M.C., Bodensteiner, K.J. (1996) *Endocrinology* **137**, 3348-3355
37. Boerboom, D., Sirois, J. (1998) *Endocrinology* **139**, 1662-1670
38. Richards, J.S. (1997) *Endocrinology* **138**, 4047-4048
39. Dinchuk, J.E., Car, B.D., Focht, K.J., Johnston, J.J., Jaffee, B.D., Covington, M.B., Contel, N.R., Eng, V.M., Collins, R.J., Czerniak, P.M., Gorry, S.A., Trzaskos, J.M. (1995) *Nature* **378**, 406-409
40. Lim, H., Paria, B.C., Das, S.K., Dinchuk, J.E., Langenbach, R., Trzaskos, J.M., Dey, S.K. (1997) *Cell* **91**, 197-208
41. Jakobsson, P.J., Thoren, S., Morgenstern, R., Samuelsson, B. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 7220-7225
42. Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J.L., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. (1997) *Nature* **389**, 300-305
43. Murakami, M., Naraba, H., Tanioka, T., Semmyo, N., Nakatani, Y., Kojima, F., Ikeda, T., Fueki, M., Ueno, A., Oh, S., Kudo, I. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 32783-32792
44. Mancini, J.A., Blood, K., Guay, J., Gordon, R., Claveau, D., Chan, C.C., Riendeau, D. (2001) *J. Biol. Chem.* (in press)
45. Yamagata, K., Matsumura, K., Inoue, W., Shiraki, T., Suzuki, K., Yasuda, S., Sugiura, H., Cao, C., Watanabe, Y., Kobayashi, S. (2001) *J. Neurosci.* **21**, 2669-2677
46. Jakobsson, P.J., Morgenstern, R., Mancini, J., Ford-Hutchinson, A., Persson, B. (1999) *Protein Sci.* **8**, 689-692

47. Forsberg, L., Leeb, L., Thoren, S., Morgenstern, R., Jakobsson, P. (2000) *FEBS Lett.* **471**, 78-82
48. Thoren, S., Jakobsson, P.J. (2000) *Eur. J. Biochem.* **267**, 6428-6434.
49. Soler, M., Camacho, M., Escudero, J.R., Iniguez, M.A., Vila, L. (2000) *Circ. Res.* **87**, 504-507
50. Liu, J., Antaya, M., Goff, A.K., Boerboom, D., Silversides, D.W., Lussier, J.G., Sirois, J. (2001) *Biol. Reprod.* **64**, 983-991
51. Liu, J., Sirois, J. (1998) *Biol. Reprod.* **58**, 1527-1532
52. Brûlé, S., Rabahi, F., Faure, R., Beckers, J.F., Silversides, D.W., Lussier, J.G. (2000) *Biol. Reprod.* **62**, 642-654
53. Bradford, M.M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248-254
54. Satoh, K., Nagano, Y., Shimomura, C., Suzuki, N., Saeki, Y., Yokota, H. (2000) *Neurosci. Lett.* **283**, 221-223
55. Gurevich, M., Harel-Markowitz, E., Marcus, S., Shore, L.S., Shemesh, M. (1993) *Reprod. Fertil. Dev.* **5**, 281-283
56. Hizaki, H., Segi, E., Sugimoto, Y., Hirose, M., Saji, T., Ushikubi, F., Matsuoka, T., Noda, Y., Tanaka, T., Yoshida, N., Narumiya, S., Ichikawa, A. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 10501-10506
57. Smith, W. (1997) *Adv. Exp. Med. Biol.* **400B**, 989-1011
58. Tanioka, T., Nakatani, Y., Semmyo, N., Murakami, M., Kudo, I. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 32775-32782
59. Richards, J.S., Russell, D.L., Robker, R.L., Dajee, M., Alliston, T.N. (1998) *Mol. Cell. Endocrinol.* **145**, 47-54

**Fig. 1. Nucleotide sequence of the bovine PGES cDNA.** The bovine PGES cDNA was cloned by library screening, as described under “Experimental Procedures”. The bovine PGES cDNA is composed of a 5'-untranslated region of 8 bp (lowercase letters), an open reading frame of 462 bp (uppercase letters), and a 3'-untranslated region of 406 bp (lowercase letters). The translation initiation (ATG) and stop (TGA) codons are shown in bold types, and numbers on the right refer to the last nucleotide on that line. The nucleotide sequence was submitted to GenBank (accession number AY032727).

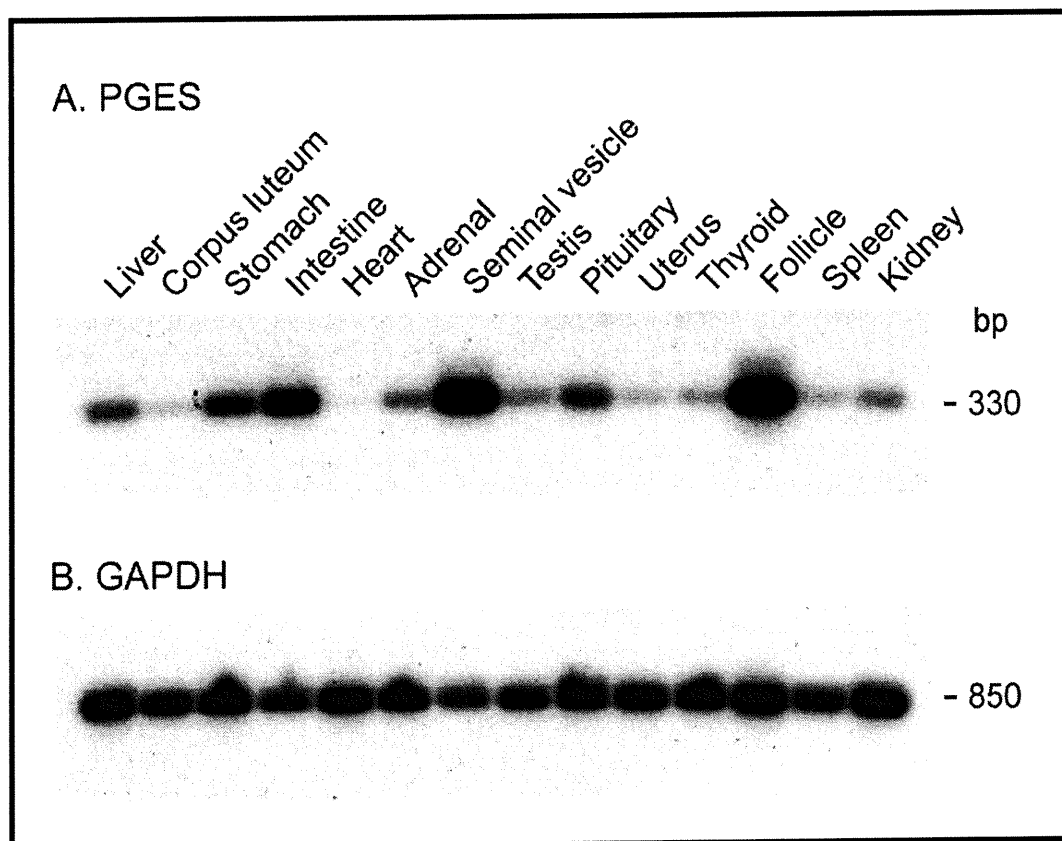
ccaccgag <b>AT</b>	GCCGCCCTCC	GGCCTGGAGC	TGATGAACGG	CCAGGTGCTC	50
CCCGCCTTCC	TGCTCTGCAG	CGCGCTGCTG	GTCATCAAAA	TGTACGTGGT	100
GGCCGTCATC	ACCGGCCAAG	TGAGGCTGCG	GAAGAAGGCT	TTTGCCAACC	150
CCGAGGACGC	TCAGAGACAT	GGAGGCCTCC	AGTATTGCCG	GAACGACCCA	200
GATGTGGAAC	GCTGCCTCAG	AGCCCACCGG	AATGACATGG	AGACCATCTA	250
CCCCTTCCTG	TTCCTGGGCT	TTGTCTACTC	TTTCCTCGGA	CCGAACCCCT	300
TCGTCGCCCC	GATGCACTTC	CTGGTCTTCT	TCCTGGGCCG	TATGGTACAC	350
ACCGTGCCAT	ACCTGGGGAA	ACTGCGGGCG	CCCACCCGCT	CCCTGGCCTA	400
CACCCTGGCC	CAGCTCCCCT	GCGCCTCCAT	GGCCCTGCAG	ATTGTCTGGG	450
AGGCAGCCCC	<b>CCACCTGTGA</b>	ccagccgtgg	acgccacctc	ggccgccaga	500
ccgctggcca	cgagccagcg	gggctgaacc	tgggggaccg	atggcccttt	550
gagattgtga	caggccctgg	ggctgggttc	ctggcaactg	gctgagcacg	600
tgatcttggg	cccagggggc	ctgtgtgtgt	ttccccgtgt	gtcccttggg	650
ttcctgggtg	aagcggctga	tttgggaactg	tttagagacg	gaccgtcacg	700
attgatagaa	aattcttcca	ctgtaaaaaa	ctctctccct	ccctccctcc	750
ctcctcctcc	ccaatgctgg	gaaaagcaaa	cagagactca	gttctggttt	800
tggaacataa	cgaccttctg	aatccagggg	tgtaataaat	gaggacttct	850
cacctacaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaa			876

**Fig. 2. Deduced amino acid sequence of bovine PGES and comparison with other mammalian homologs.** The amino acid sequence of bovine (bov) PGES is aligned with the human (hum), rat and mouse (mou) homologs. Identical residues are marked with a printed period, hyphens indicate gaps in protein sequences created to optimize alignment, and numbers on the right refer to the last amino acid on that line.

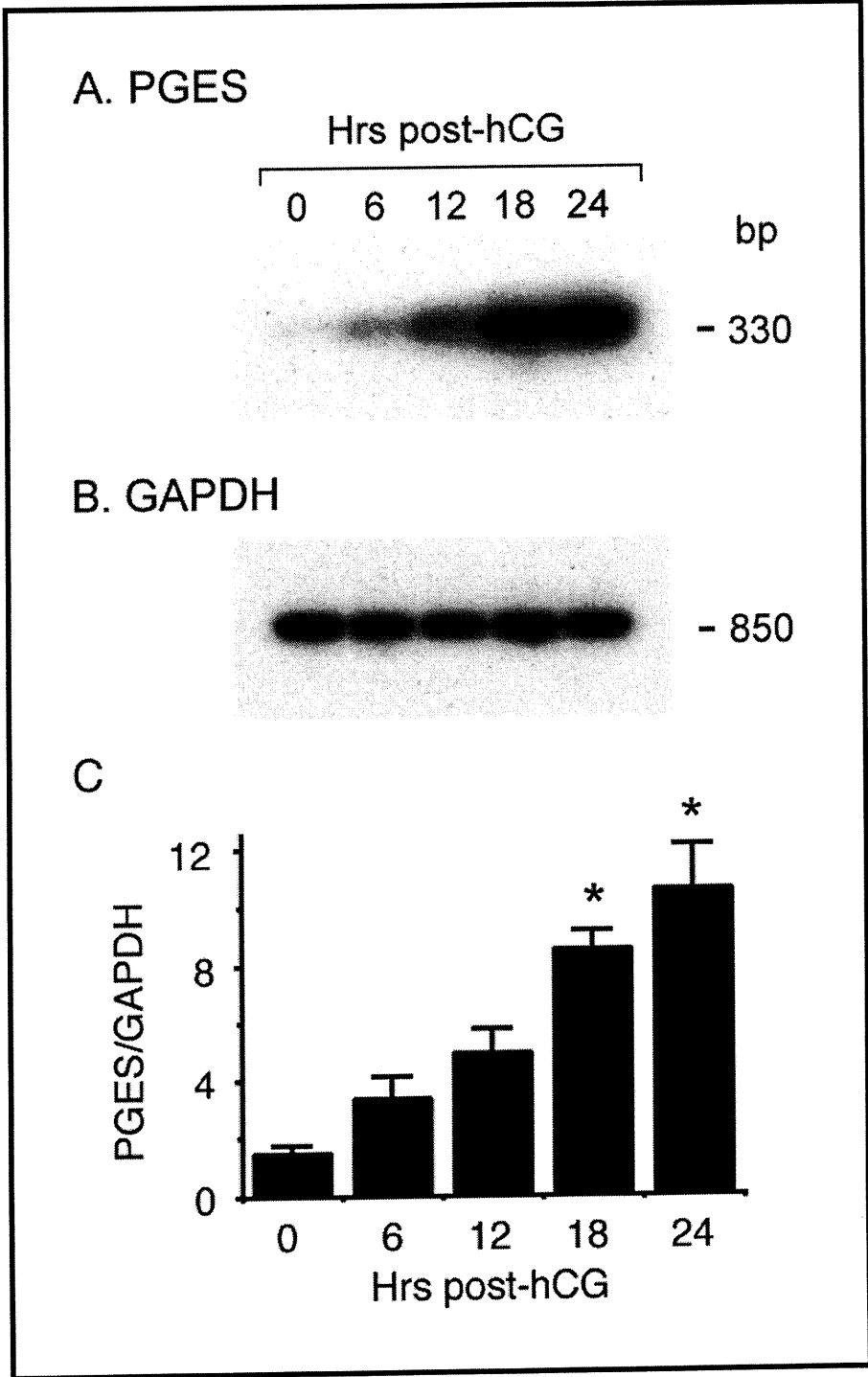


bov	MPP-S-GLEL-M-N-QVLPAPFLCSALLVIKMYVVAVITGQV	38
hum	..AH.--.V--.-S-SPA.....T.....I.....	37
rat	.T--.--.G.V.E.-S.....T.....A.....	38
mou	..--.P..V--.-ES.....T.....A.....M	38
bov	RLRKKAFANPEDAQ-RHGGLQYCRNDPDVERCLRAHRNDMETI	80
hum	.....L-....P....S.....	79
rat	.....LK.-.....S.....	80
mou	.....LK.-.....Y.S.....	80
bov	YPFLFLGFVYSFLGPNPFVARMHFLVFFL-GRMV-HTVAYLGK	121
hum	.....W.....-V..-A.....	120
rat	.....LI.WI....V-.T..V.-.....	121
mou	.....LI.WI....V-.T..V.-.....	121
bov	LRAPT-RSLAYTLAQLPCASMALQIVWEAARHL	153
hum	....I-..VT.....L.....	152
rat	MN-.RI..G..V...FA.F.....L..V.H..	153
mou	.N-.RL..G..V...FS.F.....L..V.H..	153

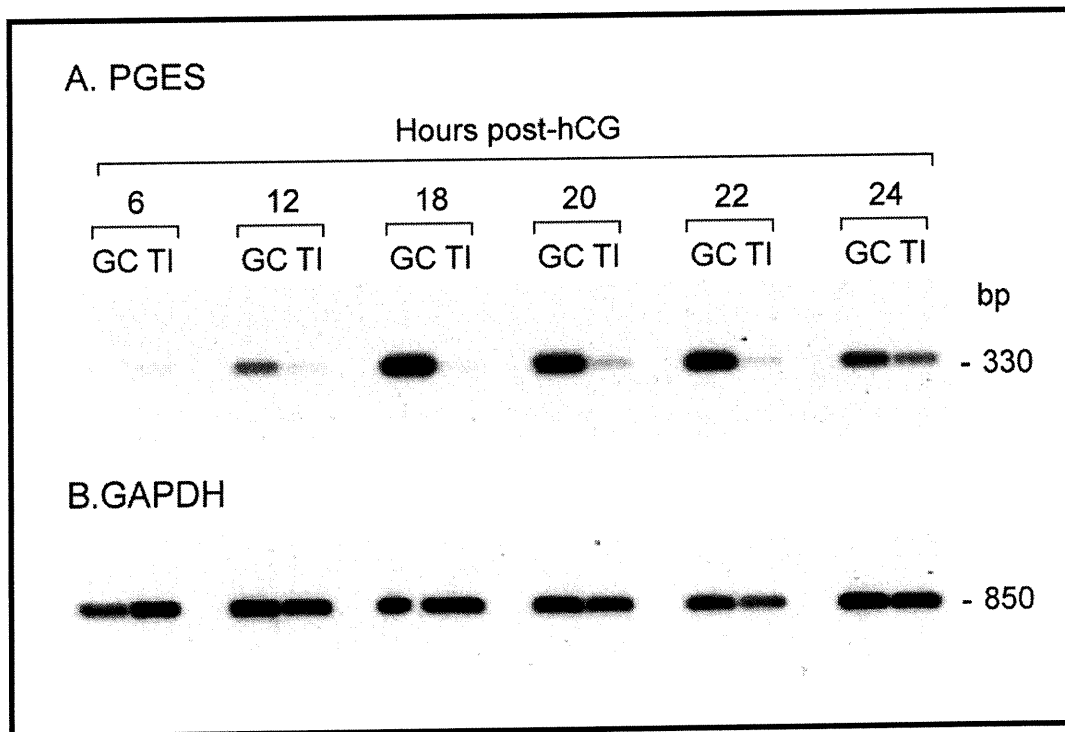
**Fig. 3. Expression of PGES mRNA in bovine tissues.** Total RNA was extracted from various bovine tissues, and samples (100 ng) were analyzed for PGES and GAPDH (control gene) content by a semiquantitative RT-PCR/Southern blotting technique, as described under “Experimental Procedures”. *A*, expression of PGES mRNA in bovine tissues. *B*, expression of GAPDH mRNA in bovine tissues. Numbers of PCR cycles for each gene were within the linear range of amplification, and they represented 22 and 13 cycles for PGES and GAPDH, respectively. Numbers on the right indicate the size of the PCR fragment. The sample denoted *Follicle* was obtained from a preovulatory follicle isolated 24 h after an ovulatory dose of hCG.



**Fig. 4. Time-dependent induction of PGES mRNA by hCG in bovine preovulatory follicles.** Total RNA extracts were prepared from bovine preovulatory follicles isolated 0, 6, 12, 18 and 24 h after the administration of an ovulatory dose of hCG, and samples (100 ng) were analyzed for PGES and GAPDH (control gene) content by a semiquantitative RT-PCR/Southern blotting technique, as described under “Experimental Procedures”. *A*, regulation of PGES mRNA in bovine follicles (one representative follicle per time point). *B*, constitutive expression of GAPDH mRNA in the same bovine follicles. Numbers on the right indicate the size of the PCR fragment. *C*, relative changes in PGES transcripts in bovine follicles after hCG treatment. The intensity of PGES and GAPDH signals were quantified using a Storm imaging system (Molecular Dynamics), and data from PGES mRNAs were normalized with the control gene GAPDH ( $n = 4$  distinct follicles [i.e. animals] per time point at 0, 12, 18 and 24 h post-hCG, and  $n = 2$  distinct follicles at 6 post-hCG). Bars marked with an asterisk are significantly different from 0 h post-hCG ( $p < 0.05$ ).

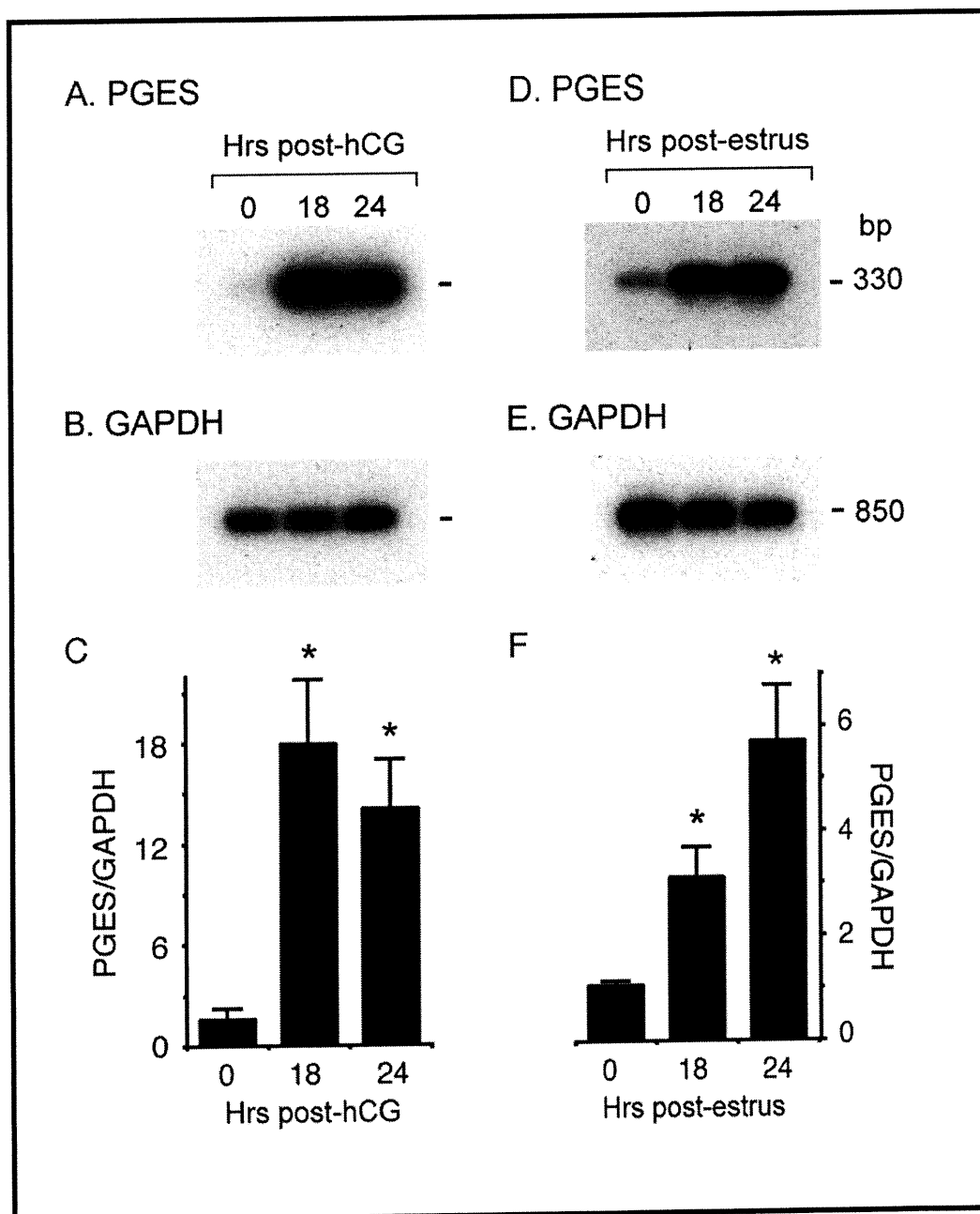


**Fig. 5. Cellular localization of PGES mRNA in bovine preovulatory follicles.** Bovine preovulatory follicles were isolated 6, 12, 18, 20, 22 and 24 h after the administration of an ovulatory dose of hCG. Each follicle was dissected into preparations of granulosa cells and theca interna, and samples (100 ng) of total RNA were analyzed for PGES and GAPDH (control gene) content by a semiquantitative RT-PCR/Southern blotting technique, as described under "Experimental Procedures". *A*, expression of PGES mRNA in granulosa cells (GC) and theca interna (TI). *B*, expression of GAPDH in the same follicular tissues. Numbers on the right indicate the size of the PCR fragment.

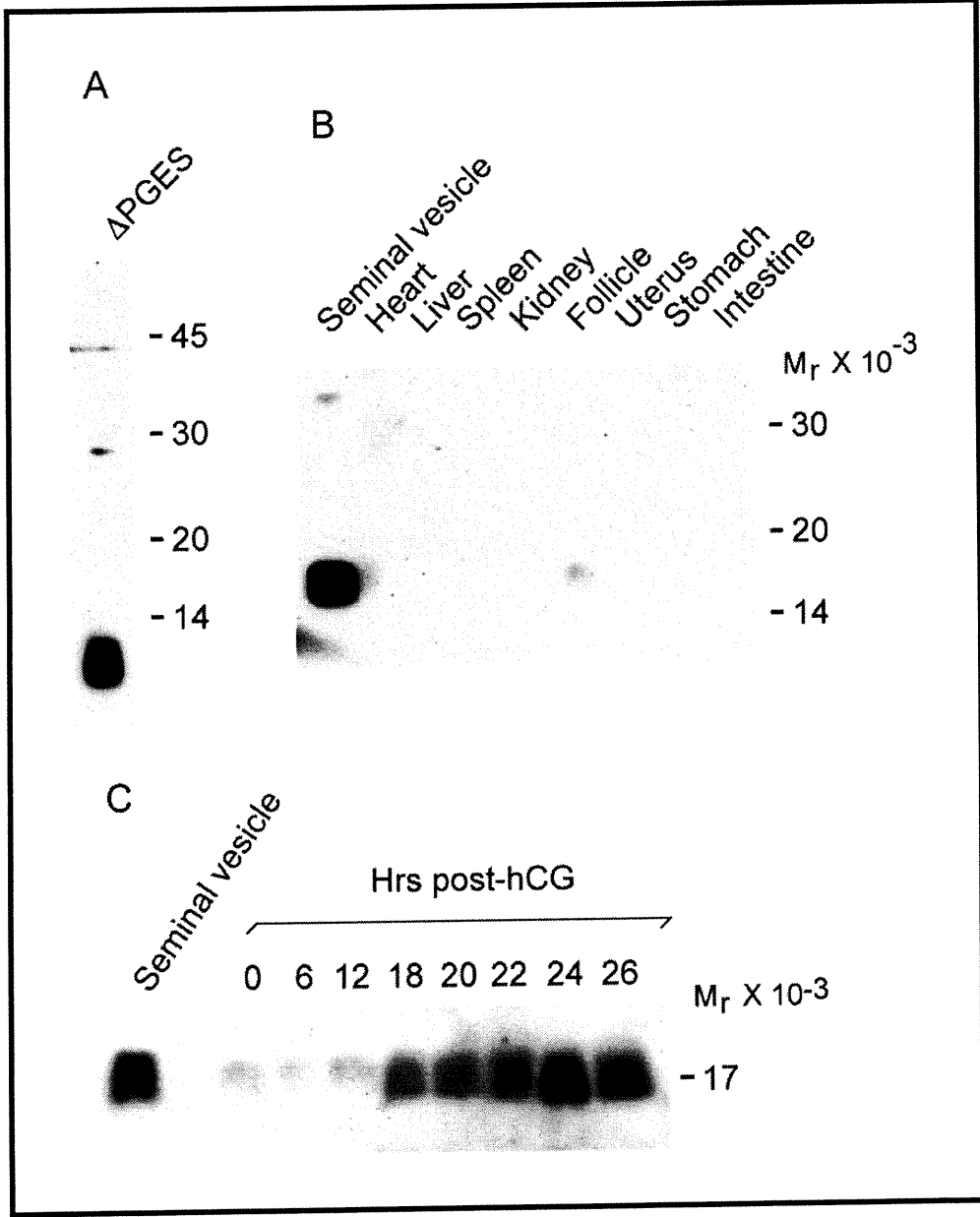


**Fig. 6. Induction of PGES mRNA by gonadotropins in bovine preovulatory follicles after ovarian hyperstimulation and during spontaneous ovulation.** Total RNA extracts were prepared from bovine preovulatory follicles, and samples (100 ng) were analyzed for PGES and GAPDH (control gene) content by a semiquantitative RT-PCR/Southern blotting technique, as described under "Experimental Procedures". *A*, regulation of PGES mRNA in bovine preovulatory follicles isolated during hCG-induced ovulation following ovarian hyperstimulation (one representative follicle per time point). *B*, constitutive expression of GAPDH mRNA in the same bovine follicles. Numbers on the right indicate the size of the PCR fragment. *C*, relative changes in PGES transcripts in bovine follicles after hCG treatment and ovarian hyperstimulation. The intensity of the PGES and GAPDH signal was quantified using a Storm imaging system (Molecular Dynamics), and data from PGES mRNAs were normalized with the control gene GAPDH (n = 7, 8 and 9 follicles per time point for 0, 18 and 24 h, respectively). Bars marked with an asterisk are significantly different from 0 h post-hCG ( $p < 0.05$ ). *D*, regulation of PGES mRNA in bovine preovulatory follicles isolated 0, 18 and 24 h after the onset of a natural estrus (one representative follicle per time point). *E*, constitutive expression of GAPDH mRNA in the same bovine follicles. *F*, relative changes in PGES transcripts in bovine follicles isolated during natural estrus. Results from PGES were normalized with the control gene GAPDH (n = 2, 3 and 4 follicles per time point for 0, 18 and 24 h, respectively). Bars marked with an asterisk are significantly different from 0 h post-estrus ( $p < 0.05$ ).

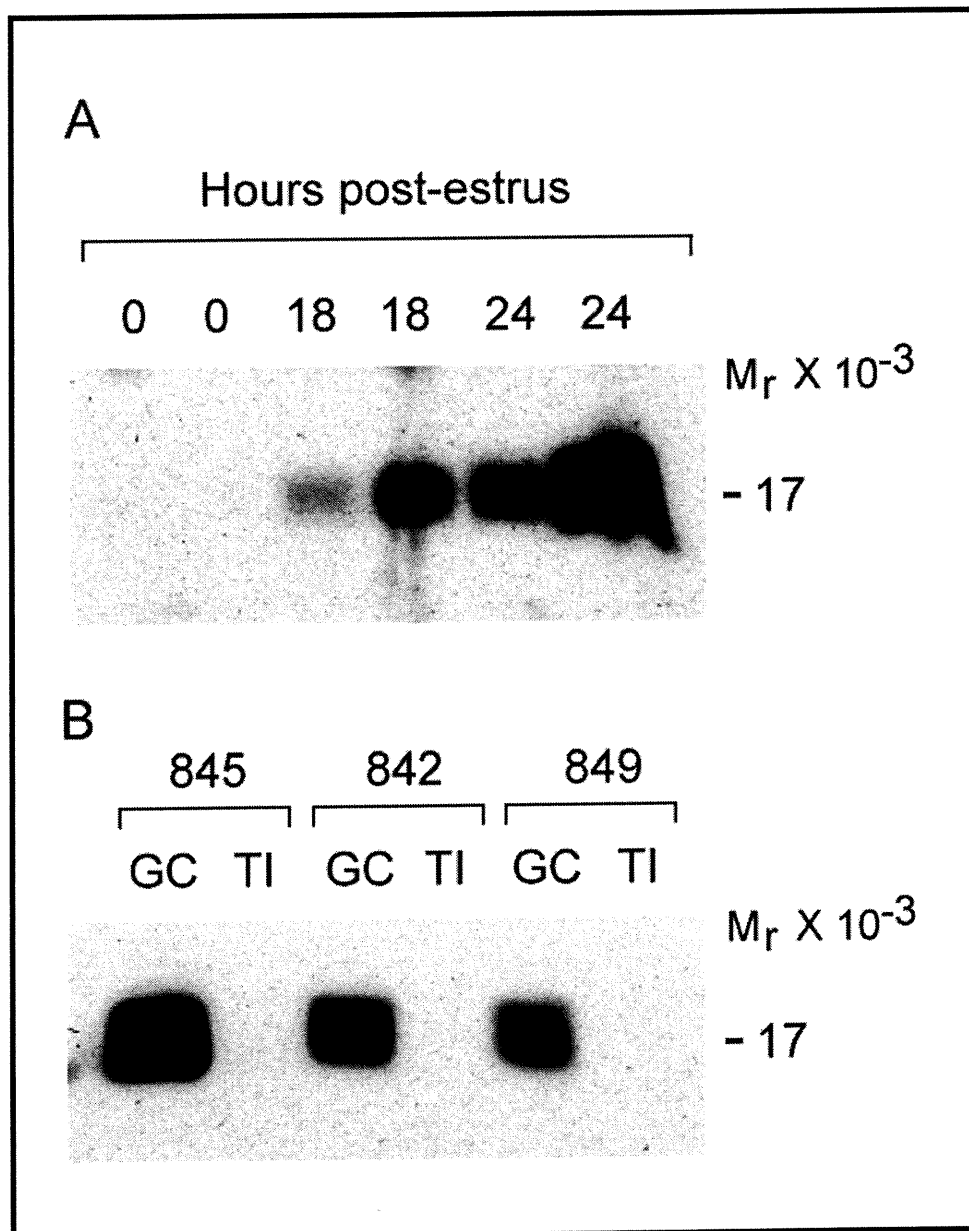




**Fig. 7. Time-dependent induction of PGES protein by hCG in bovine preovulatory follicles.** A specific polyclonal antibody against a fragment of the bovine PGES protein ( $\Delta$ PGES; from amino acid residue Glu<sup>49</sup> to Val<sup>146</sup>; Fig. 2) was generated as described under "Experimental Procedures". *A*, a sample of the recombinant PGES fragment ( $\Delta$ PGES) used as immunizing antigen was analyzed by one-dimensional SDS-PAGE and immunoblotting. The size of  $\Delta$ PGES PGES was approximately  $M_r = 11,000$ , as expected. *B*, protein extracts (10  $\mu$ g/lane) prepared from various bovine tissues and a preovulatory follicle isolated 24 h post-hCG were analyzed by one-dimensional SDS-PAGE and immunoblotting. A very strong PGES signal ( $M_r=17,000$ ) was observed in the seminal vesicle, whereas only a very weak band was present in the preovulatory follicle sample. *C*, extracts were prepared from bovine preovulatory follicles isolated 0, 6, 12, 18, 20, 22, 24 and 26 h after hCG treatment, and protein samples (100  $\mu$ g/lane) were analyzed by one-dimensional SDS-PAGE and immunoblotting. A sample of seminal vesicle (5  $\mu$ g) was included as a positive control. Markers on the right indicate the migration of molecular weight standards (panel *A* and *B*), or the size of immunoreactive PGES (panel *C*).



**Fig. 8. Regulation and cellular localization of PGES protein in bovine preovulatory follicles during spontaneous ovulation.** *A*, bovine preovulatory follicles were isolated 0, 18 and 24 h after the onset of estrus (n = 2 follicles per time point). In this model, the onset of estrus (0 h) coincides with the endogenous LH surge. Extracts were prepared, and protein samples (100 µg/lane) were analyzed by one-dimensional SDS-PAGE and immunoblotting, using the anti-bovine PGES antibody. *B*, isolated preparations of granulosa cells (GC) and theca interna (TI) were obtained from three preovulatory follicles (i.e. animals; 845, 842, 849) isolated 24 h after the onset of estrus, and samples of protein extracts (100 µg/lane) were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting. Markers on the right indicate the size of immunoreactive PGES.



## 5. Discussion générale

Durant cette étude, le dossier concernant la prostaglandine E synthétase s'est enrichi de quelques travaux. Une équipe démontra l'existence de deux réponses cinétiquement différentes dans la biosynthèse de la PGE<sub>2</sub> : la réponse immédiate et la réponse retardée (Murakami et al, 2000). Ces deux réponses sont présentes dans une même cellule et impliquent le recrutement d'enzymes dont l'expression et l'activation sont étroitement contrôlées par des signaux transmembranaires. La réponse immédiate survient quelques minutes après une stimulation avec un agoniste qui augmente la concentration de Ca<sup>2+</sup> cytoplasmique. Elle implique l'union d'enzymes constitutives dont la phospholipase A<sub>2</sub> cytoplasmique, la cyclooxygénase-1 et la prostaglandine E synthétase cytoplasmique (cPLA<sub>2</sub>-COX-1-cPGES) (Figure 9). Cette réponse immédiate est cruciale dans la production de PGE<sub>2</sub> nécessaire au maintien de l'homéostasie (Murakami et al, 1994 ; 1998 ; 1999). La réponse retardée se poursuit graduellement sur une longue période après un stimulus proinflammatoire. Cette cascade débute avec la libération d'acide arachidonique de la membrane cytoplasmique par la phospholipase A<sub>2</sub> cytoplasmique (cPLA<sub>2</sub>) et d'autres PLA<sub>2</sub> sécrétoires et inductibles. Elle est suivie d'une induction *de novo* de cyclooxygénase-2 (COX-2) et de prostaglandine E synthétase membranaire (mPGES) permettant la synthèse de PGE<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>-COX-2-mPGES) (Figure 9) (Smith et al, 1997 ; Naraba et al, 1998). La préférence de la COX-2 sur la COX-1 dans la réponse retardée s'explique en partie par la capacité de la COX-2 de métaboliser de plus petites quantités d'acide arachidonique en prostaglandine H<sub>2</sub> que celles requises dans la synthèse dirigée par la COX-1 (Shitashige et al, 1998). De plus, des études sur la

sensibilité de la mPGES à la dexaméthasone impliquent que les trois étapes enzymatiques (cPLA<sub>2</sub>-COX-2-mPGES) dans la réponse retardée sont des cibles potentielles de l'action antinflammatoire des glucocorticoïdes (Nakano et al, 1990 ; Murakami et al, 1999).

Finalement, les deux PGES (cytoplasmique et membranaire) pourraient constituer de nouvelles cibles pour des agents thérapeutiques et prophylactiques lors de réactions inflammatoires, l'ostéoporose et possiblement le cancer (Murakami et al, 2000)

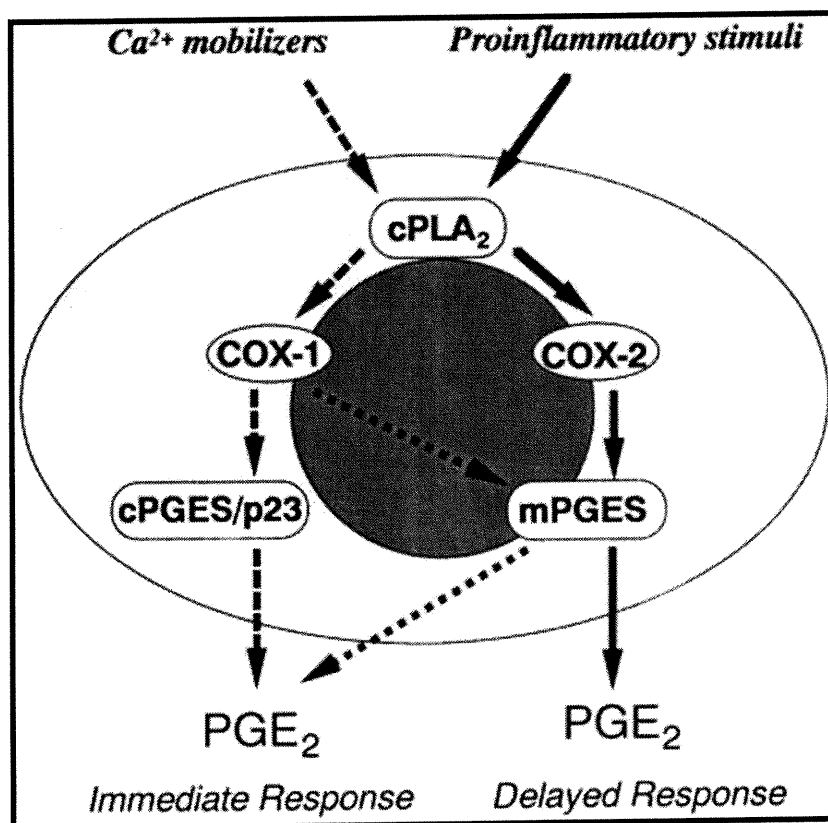


Figure 9 : Un modèle schématisé illustrant la relation fonctionnelle entre les deux COXs et les deux PGES (Murakami et al, 2000).

D'autres équipes ont étudié l'effet de différents agonistes proinflammatoires sur l'induction de l'expression de mPGES *in vitro*. En effet, l'interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), les lipopolysaccharides (LPS), le «tumor necrosis factor- $\alpha$ » (TNF- $\alpha$ ), et le  $\beta$ -amyloïde furent testés sur des cellules A549 d'adénocarcinome de poumon humain (Jakobsson et al, 1999 ; Thoren et al, 2000), sur des ostéoblastes, des astrocytes, des macrophages péritonéales de rats (Murakami et al, 2000 ; Satoh et al, 2000), sur des fibroblastes de derme humain et des cellules musculaires lisses (Soler et al, 2000). De plus, en utilisant les LPS, d'autres rapports démontrent une induction de PGES *in vivo* dans des tissus de rats (Murakami et al, 2000 ; Mancini et al, 2001). Toutefois, aucune de ces études ne décrit la régulation de la PGES dans un contexte physiologique normal. Notre étude est donc la première à démontrer la régulation de PGES sans utiliser d'agonistes proinflammatoires dans des follicules préovulatoires bovins. Plus précisément, nous avons étudié la régulation de PGES durant le processus ovulatoire dans des follicules préovulatoires bovins en utilisant trois modèles différents : 1) l'induction de l'ovulation par l'administration de hCG durant un cycle normal; 2) l'induction de l'ovulation par l'administration de hCG après une hyperstimulation ovarienne; 3) l'ovulation spontanée suite à la montée préovulatoire de LH endogène.

Il est déjà clairement établie que la synthèse des prostaglandines (non constitutives) est limitée par la PGHS-2 (Sirois, 1994 ; Liu et al, 1997, 1998). Par contre, si on compare les patrons d'expression de la PGES et de la PGHS-2, on constate qu'ils sont directement parallèles. L'induction de la protéine PGHS-2 survient entre 18h et 26h post-hCG dans le modèle d'induction de l'ovulation durant



un cycle normal (Sirois, 1994) comme pour la PGES dans cette étude. Le modèle de stimulation ovarienne (Liu et al, 1998) et le modèle d'ovulation spontanée viennent eux aussi confirmer la nature physiologique de ce phénomène (Liu et al, 1997). De plus, les concentrations intrafolliculaires de PGE<sub>2</sub> étaient significativement augmentées dans ces trois modèles. Donc, la liaison préférentielle entre les deux enzymes inductibles PGHS-2 et PGES représente un système cellulaire bien contrôlé qui facilite en synergie la biosynthèse de PGE<sub>2</sub>.

Cette forte similarité observée dans le contrôle de ces deux gènes a aussi été notée dans des études avec des stimuli proinflammatoires et ce dans différents tissus et types cellulaires *in vitro* et *in vivo* (Murakami et al, 2000 ; Mancini et al, 2001 ; Yamagata et al, 2001 ; Thoren et al, 2000). L'approfondissement de nos connaissances des mécanismes moléculaires impliqués dans le contrôle de ces deux gènes pourrait permettre de confirmer le couplage de ces deux enzymes dans la biosynthèse de la PGE<sub>2</sub>.

Les follicules préovulatoires sont principalement formés de deux couches de cellules : la granulosa et la thèque interne. Cette étude est la première à localiser la synthèse de la PGES dans les follicules préovulatoires. Les résultats indiquent que les cellules de la granulosa sont le site principal de l'expression de la PGES. Notre incapacité à détecter la protéine dans la thèque est peut être due à la limite de sensibilité de la technique « d'immunoblotting » comparativement à celle du RT-PCR/buvardage de type Southern. Il a déjà été démontré que la PGHS-2 est sélectivement induite par les gonadotropines dans les cellules de la granulosa bovine (Sirois, 1994 ; Liu et al, 1997). L'induction simultanée de la PGES dans le même type cellulaire fournit les bases biochimiques expliquant l'augmentation de la PGE<sub>2</sub>

avant l'ovulation. Une connaissance plus approfondie de la localisation subcellulaire de la PGES dans les cellules de la granulosa serait nécessaire mais, nous pouvons parier sur une localisation périnucléaire, telle que la PGHS-2 dans ces cellules, basée sur la récente co-localisation de la PGES et la PGHS-2 dans les cellules HEK293 (Murakami et al, 2000).

Finalement, cette étude est aussi la première à décrire le clonage et la caractérisation de la PGES bovine. L'ADNc de la PGES bovine est composé d'une région 5' non codante de 8 paires de base (pb), d'un cadre de lecture ouvert de 462 pb et d'une région 3' non codante de 406 pb. La séquence nucléotidique a été soumise à GenBank sous le numéro d'accèsion : AY032727. En comparant la séquence d'acides aminés à celles d'autres mammifères tels que l'humain, la souris et le rat, on constate une identité supérieure à 77%. Ces multiples comparaisons entre les structures primaires ont permis d'identifier certains domaines hautement conservés suggérant des rôles potentiellement fonctionnels ou structuraux importants. En effet, les régions Arg<sup>39</sup>-Ala<sup>51</sup> et Asp<sup>63</sup>-Pro<sup>97</sup> démontrent une homologie parfaite entre les espèces étudiées. Au contraire, les régions amino terminales et carboxy terminales semblent moins bien conservées. De plus des études de mutagenèse dirigées (Murakami, 2000) ont permis de déterminer que le résidu Arg<sup>110</sup> est crucial pour l'activité catalytique de l'enzyme (Arg<sup>111</sup> chez le bovin).

En ce qui a trait à la structure secondaire de la protéine, il existe sur internet des sites<sup>1</sup> qui peuvent analyser si certaines structures secondaires bien connues se retrouvent dans une séquence donnée. En effectuant cette recherche avec la séquence

<sup>1</sup>[www.PSORT.com](http://www.PSORT.com) et [www.PHD.com](http://www.PHD.com)

de PGES, les analyses ont démontré qu'un motif « leucine zipper » se situerait dans la région carboxy terminale de notre protéine. Dans la littérature, il est mentionné que les motifs « leucine zipper » s'assemblent en homodimère ou hétérodimère et qu'ils seraient souvent présents dans les facteurs de transcription (Branden et al, 1998). La PGES pourrait être impliquée dans la régulation et la transcription de d'autres gènes. Des études supplémentaires sur les possibles liaisons que peut faire la PGES avec d'autres protéines et sur sa structure secondaire sont nécessaires pour mieux comprendre toutes les subtilités de son activité.

Jusqu'à aujourd'hui, deux isoformes de PGES ont été clonées, soit la cPGES pour l'isoforme cytosolique (Tanioka et al, 2000) et la mPGES pour l'isoforme liée à la membrane (Jakobsson et al, 1999). La cPGES est fonctionnellement liée à la PGHS-1 et elle est essentielle à la production de PGE<sub>2</sub> utile au maintien de l'homéostasie. La protéine étudiée ici se rapporte à la mPGES et s'avère être dépendante du glutathion (Jakobsson, 1999). Elle est fonctionnellement liée à la PGHS-2 et serait un important régulateur du processus inflammatoire corroborant à l'hypothèse que l'ovulation s'apparenterait à une réaction inflammatoire.

En ce qui a trait aux perspectives découlant de cette étude, il s'avèrerait très intéressant d'examiner la région promotrice de ce gène. Des études de liaisons pourraient permettre de découvrir les facteurs « trans » impliqués dans le contrôle de l'expression du gène. De plus, des études de délétions permettraient de déterminer les régions critiques du promoteur. Finalement, la caractérisation des différents domaines fonctionnels de la protéine pourrait permettre la création de certaines molécules inhibitrices.

## 6. Conclusion

En conclusion, cette étude établie pour la première fois que le processus ovulatoire est accompagné d'une induction de la PGES et est dépendante des gonadotropines. Plus précisément, dans un contexte physiologique normal, cette induction se manifeste dans les cellules de la granulosa des follicules préovulatoires bovins *in vivo*. De plus, elle démontre que l'induction de la PGES est directement parallèle à celle de PGHS-2. C'est aussi la première à présenter le clonage et la caractérisation de la PGES bovine. Le patron d'expression émergeant de cette étude suggère fortement un rôle limitant pour la PGES dans la biosynthèse de la PGE<sub>2</sub> folliculaire.

Les follicules préovulatoires et les cellules de la granulosa représentent des modèles intéressants pour étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation du gène PGES. Considérant le rôle indispensable de la PGE<sub>2</sub> dans le processus ovulatoire, ces modèles pourraient être utilisés afin de mettre au point de nouveaux inhibiteurs de la synthèse des prostaglandines.

## 7. Bibliographie

**Armstrong D.T., Grinwich D.L.** 1972. *Blockade of spontaneous and LH-induced ovulation in rats by indomethacin, an inhibitor of prostaglandin biosynthesis.* Prostaglandins 1:21-28.

**Blake C.A.** 1999. *Control of gonadotropin secretion.* In: Knobil E. Neill J.D. eds. Encyclopedia of Reproduction New York Academic Press 2:229-237.

**Branden C., Tooze J.** 1998. Second Edition. *Introduction to Protein Structure.* Garland Publishing. Inc. New York & London 410 pages.

**Dailey R.A.** 1999. *Female reproductive system, nonhuman mammals.* In: Knobil E., Neill J.D. eds. Encyclopedia of Reproduction. New York Academic Press 2:229-237.

**Davis B.J., Lennard D.E., Lee C.A., Tiano H.F., Morham S.G., Wetsel W.C., Langenbach R.** 1999. *Anovulation in cyclooxygenase-2-deficient mice is restored by prostaglandin E2 and interleukin-1beta.* Endocrinology 140:2685-2695.

**Espey L.L.** 1980. *Ovulation as an inflammatory reaction--a hypothesis.* Biol Reprod 22:73-106.

**Espey L.L.** 1994. *Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction.* Biol Reprod 50:233-238.

**Ferin M.** 1999. *Ovarian cycle.* In: Knobil E., Neill J.D. eds. Encyclopedia of Reproduction New York Academic Press 3:547-552.

**Fortune J.E.** 1994. *Ovarian follicular and development in mammals.* Biol Reprod 50:225-232.

**Forsberg L., Leeb L., Thoren S., Morgenstern R., Jakobsson P.** 2000. *Human glutathion dependent prostaglandin E synthase : gene structure and regulation.* FEBS Letters 471:78-82.

**Fuller R.J.** 1999. *Hormonal control of reproduction* In: Austin C.R., Short, R. V. eds. Reproduction in mammals Seconde édition Book 3 Cambridge Cambridge University Press 6:115-152.

**Funk C.D.** 1993. *Molecular biology in the eicosanoid field.* Prog Nuclei Acid Res Mol Biol 45:67-98.

**Grinwich D.L., Kennedy T.G., Armstrong DT.** 1972. *Dissociation of ovulatory and steroidogenic actions of luteinizing hormone in rabbits with indomethacin, an inhibitor of prostaglandin biosynthesis.* Prostaglandins 1:89-96.

**Hedin L., Gaddy-Kurten D., Kurten R., DeWitt D.L., Smith W.L., Richards J.S.** 1987. *Prostaglandin endoperoxide synthase in rat ovarian follicles: content, cellular distribution, and evidence for hormonal induction preceding ovulation.* Endocrinology 121:722-731.

**Herschman H.R.** 1996. *Prostaglandin synthase 2.* Biochim Biophys Acta 1299:125-140.

**Huslig R.L., Malik A., Clark M.R.** 1987. *Human chorionic gonadotropin stimulation of immunoreactive prostaglandin synthase in the rat ovary.* Molec Cell Endocrinol 50:237-246.

**Jakobsson P.J., Thoren S., Morgenstern R., Samuelsson B.** 1999. *Identification of human prostaglandin E synthase: A microsomal, glutathion dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target.* Proc Natl Acad Sci USA 96:7220-7225.

**Kilen M.S., Schwartz B.N.** 1999. *Estrous cycle*. In: Knobil E., Neill J.D. eds. Encyclopedia of Reproduction New York Academic Press 2:127-135.

**LeMaire W.J., Leidner R., Marsh J.M.** 1975. *Pre and post ovulatory changes in the concentration of prostaglandins in rat graafian follicles*. Prostaglandins 9:221-229.

**Liu J., Carrière P., Doré M., Sirois J.** 1997. *Prostaglandin G/H synthase-2 is expressed in bovine preovulatory follicles after the endogenous surge of luteinizing hormone*. Biol Reprod. 57:1524-1531.

**Liu J., Sirois J.** 1998 *Follicle size-dependent induction of prostaglandin G/H synthase-2 during superovulation in cattle*. Biol Reprod 58:1527-1532.

**Mancini J.A., Blood K., Guay J., Gordon R., Claveau D., Chan C.C., Riendeau D.** 2001. *Cloning, expression, and up-regulation of inducible rat prostaglandin E synthase during lipopolysaccharide-induced pyresis and adjuvant-induced arthritis*. J Biol Chem 276:4469-4475.

**Mehendale R., Wilson L.** 1999. *Oxytocics*, In: Knobil E., Neill J.D. eds. Encyclopedia of Reproduction New York Academic Press 3:620-629.



- Mikuni M., Pall M., Peterson C.M., Peterson C.A., Hellberg P., Brannstrom, M., Richards J.S., Hedin L.** 1998. *The selective prostaglandin endoperoxide synthase-2 inhibitor, NS-398, reduces prostaglandin production and ovulation in vivo and in vitro in the rat.* Biol Reprod 59:1077-1083.
- Murakami M., Nakatani Y., Kudo I.** 1996. *Type II secretory phospholipase A2 associated with cell surfaces via C-terminal heparin-binding lysine residues augments stimulus-initiated delayed prostaglandin generation.* J Biol Chem 271:30041-30051.
- Murakami M., Kuwata H., Amakasu Y., Shimbara S., Nakatani Y., Atsumi G., Kudo I.** 1997. *Prostaglandin E2 amplifies cytosolic phospholipase A2- and cyclooxygenase-2-dependent delayed prostaglandin E2 generation in mouse osteoblastic cells. Enhancement by secretory phospholipase A2.* J Biol Chem 272:19891-19897.
- Murakami M., Kambe T., Shimbara S., Higashino K., Hanasaki K., Arita H., Horiguchi M., Arita M., Arai H., Inoue K., Kudo I.** 1999. *Different functional aspects of the group II subfamily (Types IIA and V) and type X secretory phospholipase A(2)s in regulating arachidonic acid release and prostaglandin generation. Implications of cyclooxygenase-2 induction and phospholipid scramblase-mediated cellular membrane perturbation.* J Biol Chem 274:31435-31444.

- Murakami M., Naraba H., Tanioka T., Semmyo N., Nakatani Y., Kojima F., Ikeda T., Fueki M., Ueno A., Oh-ishi S., Kudo I.** 2000. *Regulation of prostaglandin E<sub>2</sub> biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E<sub>2</sub> synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2.* J Biol Chem 275:32783-32792.
- Murdoch W.J., Hansen T.R., McPherson L.A.** 1993. Review: *Role of eicosanoids in vertebrate ovulation.* Prostaglandins 46:85-115.
- Murdoch W.J., Lund S.A.** 1999. *Prostaglandin-independent anovulatory mechanism of indomethacin action: inhibition of tumor necrosis factor alpha-induced sheep ovarian cell apoptosis.* Biol Reprod 61:1655-1659.
- Nakano T., Ohara O, Teraoka H, Arita H.** 1990. *Glucocorticoids suppress group II phospholipase A<sub>2</sub> production by blocking mRNA synthesis and post-transcriptional expression.* J Biol Chem 265:12745-8.
- Naraba H., Murakami M., Matsumoto H., Shimbara S., Ueno A., Kudo I., Oh-ishi S.** 1998 Segregated coupling of phospholipases A<sub>2</sub>, cyclooxygenases, and terminal prostanoid synthases in different phases of prostanoid biosynthesis in rat peritoneal macrophages. J Immunol 160:2974-2982.

**Narumiya S., Sugimoto Y., Ushikubi F.** 1999. *Prostanoids receptors : Structures, properties and fonctions.* *Physiolo Rev* 79:1193-1226.

**Orczyk G.P., Behrman H.R.** 1972. *Ovulation blockade by aspirin or indomethacin--in vivo evidence for a role of prostaglandin in gonadotrophin secretion.* *Prostaglandins* 1:3-20.

**Orczyk G.P., Behrman H.R.** 1972. *Effect of synthetic gonadotrophin-releasing hormone (Gn-RH) on ovulation blockade by aspirin and indomethacin.* *Prostaglandins* 1:245-258.

**Polyak K., Xia Y., Zweier, J.L., Kinzler K.W., Vogelstein B.** 1997. *A model for p53-induced apoptosis.* *Nature* 389:300-305.

**Satoh K., Nagano Y., Shimomura C., Suzuki N., Saeki Y., Yokota H.** 2000. *Expression of prostaglandin E synthase mRNA is induced in beta-amyloid treated rat astrocytes.* *Neurosci Lett* 283:221-223.

**Shitashige M., Morita I., Murota S.** 1998. *Different substrate utilization between prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2 in NIH3T3 fibroblasts.* *Biochim Biophys* 5:57-66.

- Silvia W.J.** 1999. *Eicosanoids*. In: Knobil E., Neill J.D. eds. Encyclopedia of Reproduction New York Academic Press 1:1991-2001.
- Sirois J.** 1994. *Induction of prostaglandin endoperoxide synthase-2 by human chorionic gonadotropin in bovine preovulatory follicles in vivo*. Endocrinology 13:841-848.
- Sirois J., Doré M.** 1997. *The late induction of prostaglandin G/H synthase-2 in equine preovulatory follicles supports its role as a determinant of the ovulatory process*. Endocrinology 138:4427-4434.
- Sirois J., Liu J., Boerboom D., Antaya M.** 2000. In *Ovulation: Evolving scientific and clinical concepts*. Adashi E.Y. ed. Springer-Verlag New York 208-218.
- Smith W.** 1997. *Molecular biology of prostanoid biosynthetic enzymes and receptors*. Adv Exp Med Biol 400B:989-1011.
- Soler M., Camacho M., Escudero J.R., Iniguez M.A., Vila L.** 2000. *Human vascular smooth muscle cells but not endothelial cells express prostaglandin E synthase*. Circ Res 87:504-507.

- Tanioka T., Nakatani Y., Semmyo N., Murakami M., Kudo I.** 2000. *Molecular identification of cytosolic prostaglandin E<sub>2</sub> synthase that is fonctionnaly coupled wiyh cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E<sub>2</sub> biosynthesis.* J Biol Chem 275:32775-32782.
- Thatcher W.W.** 1999. *Ruminants.* In: Knobil E., Neill J.D. eds. Encyclopedia of Reproduction. New York Academic Press 4:302-310.
- Thoren S., Jakobsson P.J.** 2000. *Coordinate up- and down-regulation of glutathione-dependent prostaglandin E synthase and cyclooxygenase-2 in A549 cells Inhibition by NS-398 and leukotriene C4.* Eur J Biochem 267:6428-6434.
- Tortora G.J.** 1994. *Principes d'anatomie et physiologie.* nouvelle édition Biological sciences textbooks inc. Principes d'Anatomie et de Physiologie 18:584.
- Tilley S.L., Audoly L.P., Hicks E.H. Kim H.S., Flannery P.J., Coffman T.M., Koller B.H.** 1999. *Reproductive failure and reduced blood pressure in mice lacking the EP2 prostaglandin E2 receptor.* J Clin Invest 103:1539-1545.
- Van Voorhis B.J.** 1999. *Follicular development.* In: Knobil E., Neill J.D. eds. Encyclopedia of Reproduction New York Academic Press 2:376-389.

**Williams C.S., Dubois R.N.** 1996. *Prostaglandin endoperoxide synthase: why two isoforms?* Am J Physiol 270:393-400.

**Wong W.Y.L., DeWitt D.L., Smith W.L., Richards J.S.** 1989. *Rapid induction of prostaglandin endoperoxide synthase in rat preovulatory follicles by luteinizing hormone and cAMP is blocked by inhibitors of transcription and translation.* Mol Endocrin 3:1714-1723.

**Yamagata K., Matsumura K., Inoue W., Shirak T., Suzuki K., Yasuda S., Sugiura H., Cao C., Watanabe Y., Kobayashi S.** 2001. *Coexpression of microsomal-type prostaglandin E synthase with cyclooxygenase-2 in brain endothelial cells of rats during endotoxin-induced fever.* J Neurosci 21:2669-2677.