

Université de Montréal

CARACTÉRISATION DE SERPINE2 BOVINE:  
UN GÈNE DIFFÉRENTIELLEMENT EXPRIMÉ  
LORS DE LA DOMINANCE FOLLICULAIRE  
OVARIENNE

Par

JULIE BÉDARD

Programme de biologie moléculaire  
Faculté des études supérieures

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

Décembre 2001

©Julie Bédard, 2001



QH

506

U54

2002

v.012

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

CARACTÉRISATION DE SERPINE2 BOVINE:  
UN GÈNE DIFFÉRENTIELLEMENT EXPRIMÉ  
LORS DE LA DOMINANCE FOLLICULAIRE  
OVARIENNE

Présenté par  
JULIE BÉDARD

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr David S. SILVERSIDES  
président-rapporteur

Dr Jacques G. LUSSIER  
directeur de recherche

Dr Christopher A. PRICE  
codirecteur

Dr Hugh Clarke  
membre du jury

## Résumé

Les mécanismes moléculaires impliqués dans la sélection et la dominance folliculaire ainsi que l'ovulation chez la vache nous échappent encore. Nos objectifs spécifiques étaient donc de caractériser des ADNc différenciellement exprimés dans les follicules dominants à J5 du cycle oestral et de démontrer leur association à la dominance folliculaire. Nous avons identifié par DDRT-PCR puis caractérisé pour la première fois le gène SERPINE2 bovin qui est un membre de la superfamille des inhibiteurs des protéinases aux résidus sérine (Serpine). Nous avons démontré par analyse Northern une expression différentielle du transcrite de 2.4 kb de SERPINE2 dans divers tissus bovins. Des anticorps polyclonaux ont été générés contre le fragment recombinant (S<sup>12</sup>-R<sup>196</sup>) de SERPINE2. Nous avons observé par immunohistochimie que SERPINE2 est exprimée selon un patron cellulaire spécifique: granulosa, ovocyte, certaines cellules lutéales, cellules épithéliales bordant les canaux de l'épididyme et de la vésicule séminale, cellules de Leydig, cellules de Purkinje et gliales. La SERPINE2 est sécrétée dans le liquide folliculaire, les sécrétions de l'épididyme et de la vésicule séminale. Nous avons démontré par RT-PCR semi-quantitatif que la concentration d'ARNm pour SERPINE2 était d'au moins six fois plus élevée dans les follicules dominants à J5 du cycle oestral comparativement aux petits follicules ( $\leq 4$  mm) ou les follicules pré-ovulatoires induits à l'hCG. Toutefois, cette différence n'a pas été observée lors des analyses de la concentration de la protéine SERPINE2 dans les liquides folliculaires correspondant ce qui suggère un contrôle additionnel en relation à sa traduction, à sa sécrétion ou à sa libération en fonction de la perfusion sanguine du follicule. Les Serpins sont impliquées dans le contrôle de la protéolyse de la matrice extracellulaire médiée par la cascade catalytique de la plasmine. Nous concluons que SERPINE2 est un gène différenciellement exprimé lors de la dominance folliculaire chez la vache et que sa fonction biologique connue à ce jour comme inhibiteur de protéinases à sérine est cohérent au remodelage tissulaire contrôlé que nécessite le développement folliculaire, l'ovulation et la formation du corps jaune au sein de l'ovaire. **Mots clefs** : Vache, ovaire, follicule, dominance, granulosa, DDRT-PCR, SERPINE2.

## Summary

Ovarian follicular growth in cattle involves recruitment, selection and dominance phases followed by ovulation. Molecular mechanisms involved in follicular dominance and ovulation are not understood. The objectives of these studies were to characterize differentially expressed cDNAs in granulosa cells of dominant follicles at day 5 of the estrous cycle, and to demonstrate their association with follicular dominance. We have identified by DDRT-PCR and further characterized for the first time the bovine SERPINE2 cDNA which is a member of the serine protease inhibitor (Serpin) superfamily. We have shown by Northern analysis that the 2.4 kb transcript for SERPINE2 is differentially expressed in different bovine tissues. Polyclonal antibodies were raised against a recombinant fragment (S<sup>12</sup>-R<sup>196</sup>) of SERPINE2. Immunohistochemical localization of SERPINE2 showed specific expression: granulosa cells, oocytes, luteal cells, epithelial cells of the epididymis and seminal vesicle, Leydig cells and Purkinje and glial cells in the cerebellum. SERPINE2 is secreted in follicular fluid, and in epididymal and seminal plasma. Semiquantitative RT-PCR analysis showed at least a six fold increase in granulosa cells of dominant follicles compared to small ( $\leq 4$  mm) follicles or preovulatory hCG-induced follicles. However, no difference was found in the Western blot analysis of SERPINE2 concentrations between these follicle groups, suggesting additional control at the level of translation, secretion or in relation to blood perfusion of the follicle. The SERPINS are involved in the control of proteolysis of the extracellular matrix mediated by plasmin. We conclude that SERPINE2 is a gene that is differentially expressed in granulosa cells during follicular dominance in cattle. The known biological function of SERPINE2 as a serine protease inhibitor is consistent with the necessity of controlling tissue remodeling associated with follicular growth, ovulation and corpus luteum development within the ovary. **Keywords:** Cattle, ovary, follicle, dominance, granulosa, DDRT-PCR, SERPINE2.

## Table des Matières

	Page
<b>Page de titre</b>	i
<b>Page d'identification du jury</b>	ii
<b>Résumé</b>	iii
<b>Summary</b>	iv
<b>Table des Matières</b>	v
<b>Liste des tableaux</b>	viii
<b>Liste des figures</b>	ix
<b>Liste des sigles et abréviations</b>	xi
<b>Dédicaces</b>	xiv
<b>Remerciements</b>	xv
<b>1. Introduction</b>	1
<b>2. Recension de la littérature</b>	4
2.1 Aspects morphologiques	4
2.1.1 La structure et la fonction de l'ovaire chez la vache	4
2.1.2 La folliculogénèse	5
2.2 Aspects cinétiques	8
2.2.1 Le cycle oestral	8
2.2.2 Mécanismes intervenant au sein d'une vague folliculaire	9
2.2.1.1 Recrutement	9
2.2.1.2 Sélection	11
2.2.1.3 Dominance	11
2.3 L'atrésie folliculaire	14
2.4 Mécanismes hormonaux	19
2.4.1 La régulation de la croissance folliculaire	19
2.4.1.1 Phase indépendante des gonadotropines	19
2.4.1.2 Phase dépendante des gonadotropines	20
2.4.2 Principaux rôles des hormones gonadotropes	20
2.4.3 Facteurs de croissance	21
2.5 Hypothèse et modèle d'étude	25
<b>3. Méthodologie</b>	27
3.1 Description du modèle expérimental animal	27
3.1.1 Traitements des animaux	27
3.1.2 Sélection des groupes de follicules	29
3.1.3 Récolte des cellules de la granulosa	29
3.2 Méthodes	30
3.2.1 Extraction de l'ARN total et messenger	30
3.2.2 Analyses de l'expression des ARNm différemment exprimés dans les follicules dominants	31
3.2.2.1 Technique de l'étalement différentiel des ARNm	31
3.2.2.2 Choix des ADNc différemment exprimés	32

3.2.3 Isolation des ADNc complets et criblage par étalement de la génothèque d'ADNc	32
3.2.3.1 Étalement de la génothèque d'ADNc	33
3.2.3.2 Synthèse des sondes radioactives d'ADNc	34
3.2.3.3 Hybridation et détection des clones positifs	34
3.2.3.3.1 Repiquage des colonies positives obtenues et élution des phages	35
3.2.3.3.2 Excision in vivo du phagémide BlueScript BK-CMV	35
3.2.4 Séquençage et analyse des acides nucléiques	36
3.2.5 Analyse d'expression de l'ARNm de SERPINE2 bovine	38
3.2.5.1 Analyse Northern	38
3.2.5.2 Analyse d'expression par RT-PCR semi-quantitatif en temps réel	39
3.2.5.2.1 Sélection des échantillons et récolte des cellules de la granulosa et de corps jaunes	39
3.2.5.2.2 RT-PCR semi-quantitatif en temps réel	40
3.2.6 Production de la protéine recombinante SERPINE2 bovine	42
3.2.6.1 Construction plasmidique de la protéine fusion	42
3.2.6.2 Induction de la protéine fusion	44
3.2.6.2.1 Production du lysat bactérien.	44
3.2.6.3 Purification de la protéine fusion et récupération de la protéine recombinante	44
3.2.7 Production d'anticorps polyclonaux	45
3.2.7.1 Protocole d'immunisation du lapin	45
3.2.7.2 Validation des anticorps	45
3.2.8 Analyses de l'expression de la protéine SERPINE2 bovine	46
3.2.8.1 Observations immunohistochimiques	46
3.2.8.2 Comparaison des concentrations de SERPINE2 bovine dans les liquides folliculaires	47
<b>4. Présentation et analyse des résultats</b>	49
4.1 Analyse moléculaire de l'expression des gènes au cours du développement folliculaire	49
4.1.1 Caractéristiques morphologiques et biochimiques des follicules analysés par la technique d'étalement différentiel des ARNm	49
4.1.2 Compilations des résultats de DDRT-PCR	50
4.1.3 Choix des ADNc exprimés dans les follicules dominants	50
4.1.4 Criblage de la génothèque par étalement	52
4.1.5 Analyse de restriction des clones d'ADNc de phage s'hybridant à l'ADNc DDRT-65	52
4.2 Caractérisation de SERPINE2 bovine	53

4.2.1	Caractérisation de l'ADNc de SERPINE2 bovine	53
4.2.2	Analyse d'homologie des séquences	54
4.3	Analyse de l'expression de SERPINE2 bovine	55
4.3.1	Analyse transcriptionnelle	55
4.3.1.1	Analyse Northern	55
4.3.1.2	Analyse par RT-PCR semi-quantitatif en temps réel	55
4.3.2	Analyse protéique de SERPINE2 bovine	57
4.3.2.1	Validation des anticorps	57
4.3.2.2	Immunolocalisation de SERPINE2 bovine	57
4.3.2.3	Comparaison de SERPINE2 bovine dans les liquides folliculaires	59
<b>5.</b>	<b>Discussion générale</b>	96
5.1	Analyse moléculaire de l'expression des gènes au cours du développement folliculaire	96
5.1.1	Caractéristiques morphologiques et biochimiques des follicules analysés par la technique d'étalement différentiel des ARN messagers (DDRT-PCR)	96
5.1.2	Compilations des résultats de DDRT-PCR	97
5.2	Caractérisation de SERPINE2 bovine	99
5.2.1	Caractéristiques structurales	99
5.2.2	La superfamille des Serpins	101
5.2.2.1	Les Serpins au sein de l'ovaire	103
5.2.3	Analyse de l'expression de SERPINE2 bovine dans divers tissus	107
5.2.3.1	Analyse transcriptionnelle	107
5.2.3.2	Analyse traductionnelle	109
5.2.4	Analyse de l'expression de SERPINE2 bovine dans l'ovaire au cours du cycle oestral	111
5.2.4.1	Analyse par RT-PCR semi-quantitatif	111
5.2.4.2	Comparaison de la concentration de SERPINE2 bovine dans les liquides folliculaires.	113
5.3	Intégration de SERPINE2 bovine dans le développement folliculaire	115
5.4	Récentes observations sur les inhibiteurs de protéinases à sérine dans l'ovaire de ratte	122
<b>6.</b>	<b>Conclusion</b>	125
<b>7.</b>	<b>Bibliographie</b>	127

## Liste des tableaux

	Page
Tableau I	Définition des amorces aléatoires utilisées lors de l'amplification par PCR radioactive des extrémités 3' des ADNc. 33
Tableau II	Description des conditions d'amplification par PCR sur LightCycler pour l'analyse de SERPINE2 bovine et de bG3PDH. 41
Tableau III	Description des conditions d'analyse de dissociation sur LightCycler pour l'analyse des produits de PCR de SERPINE2 bovine et de bG3PDH. 42
Tableau IV	Liste des oligos synthétisés pour la caractérisation et l'analyse de SERPINE2 bovine. 43
Tableau V	Caractéristiques morphologiques et biochimiques des follicules utilisés lors de l'analyse d'expression des gènes par DDRT-PCR. 84
Tableau VI	Séquences d'acides nucléiques des ADNc correspondant aux sondes de DDRT-PCR utilisées lors du criblage (27, 36, 37, 44, 46, 65). 86
Tableau VII	Résumé des comparaisons des séquences d'acides nucléiques obtenues pour les différents clones d'ADNc différentiellement exprimés aux séquences des bases de données GenBank (NR et EST) à l'aide du logiciel d'alignement des séquences BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). 89
Tableau VIII	Caractéristiques morphologiques et biochimiques des follicules utilisés dans le cadre de l'expérience de RT-PCR semi-quantitatif en temps réel. 92
Tableau IX	Corrélations entre les concentrations d'ARNm de SERPINE2 bovine, de G3PDH ou de leur ratio, aux concentrations en oestradiol-17 $\beta$ , en progestérone ou de leur ratio dans les liquides folliculaires. 94

## Liste des figures

		Page
Figure 1	Les différentes étapes de la folliculogénèse ovarienne.	7
Figure 2	Représentation d'une des vagues folliculaires au cours desquelles les follicules traversent des phases de recrutement, de sélection et de dominance folliculaire lors d'un cycle oestral chez la vache.	10
Figure 3	Les différentes voies d'activation de l'apoptose.	18
Figure 4	Représentation des vecteurs de clonage utilisés dans la fabrication de la génothèque d'ADNc de cellules de la granulosa bovine.	36
Figure 5	Séparations sur gel d'acrylamide des produits de la DDRT-PCR.	60
Figure 6	Patrons d'expression des ADNc sélectionnés (27, 36, 37, 44, 46, 65) pour le criblage d'une génothèque de cellules de la granulosa provenant de follicules dominants à jour 5 du cycle oestral.	62
Figure 7	Analyse de restriction des clones des ADNc de phage s'hybridant à la sonde DDRT-65.	64
Figure 8	Séquences en acides nucléiques et aminés de SERPINE2 bovine.	66
Figure 9	Comparaison de la séquence d'acides aminés de SERPINE2 bovine.	68
Figure 10	Résultats de l'analyse de comparaisons des séquences d'acides aminés par Clustal Walis.	70
Figure 11	Analyse Northern de SERPINE2 bovine dans divers tissus bovins.	72
Figure 12	Analyse d'expression de l'ARNm de SERPINE2 bovine par RT-PCR semi-quantitatif en temps réel.	74

Figure 13	La validation des anticorps dirigés contre la protéine recombinante SERPINE2 bovine.	76
Figure 14	Immunolocalisation de SERPINE2 bovine.	78
Figure 15	Comparaison de l'expression de la protéine SERPINE2 bovine dans les liquides folliculaires par analyse Western.	82
Figure 16	Représentation schématique de la dégradation de la matrice extracellulaire contrôlée par les activateurs de plasminogènes et leurs inhibiteurs	105
Figure 17	Représentation schématique des interactions de SERPINE2 dans les voies de modulation des protéinases au cours du développement folliculaire	121

## Liste des sigles et abréviations

aHSPG :	«Heparan sulfate proteoglycan»
A :	adénine
ADN :	acide désoxyribonucléique
ADNc :	acide désoxyribonucléique complémentaire
ADN T <sub>4</sub> ligase :	enzyme de ligation
ARN :	acide ribonucléique
ARNase :	enzyme de digestion de l'ARN
ARNm :	acide ribonucléique messenger
BamH1 :	enzyme de restriction
C :	cytosine
Ci :	curie
CL :	corpus luteum
Cpm :	coup par minute
CsCL :	chlorure de césium
C-terminus :	carboxy terminus
dATP :	désoxyadénosine triphosphate
dCTP :	désoxycytosine triphosphate
dGTP :	désoxyguanidine triphosphate
dNTP :	désoxynucléotide triphosphate
dTTP :	désoxythymidine triphosphate
D.O. :	densité optique
DDRT-PCR :	«differential display RT-PCR» (étalement différentiel)
EcoR1 :	enzyme de restriction
ECM :	«extracellular matrix» (matrice extracellulaire)
EGF :	«epidermal growth factor» (facteur de croissance épidermique)
FGF :	«fibroblast growth factor» (facteur de croissance fibroblastique)
FSH :	«follicle stimulating hormone» (hormone folliculo-stimulante)
G :	guanine
GnRH :	«Gonadotropin Releasing Hormone» (hormone de relâche des gonadotropines)
eCG:	«equine chorionic gonadotropin»
hCG:	«human chorionic gonadotropin»
IAP:	«inhibitor of apoptose»
IGF :	«insulin-like growth factor»
IPTG :	isopropyl-béta-D-thiogalactopyranoside
kb :	kilobase
kDa :	kiloDalton
LB :	agar Luria-Bertani
LDL :	«low density lipoprotein»
LH :	«luteinizing hormone» (hormone lutéinisante)
LRP:	«lipoprotein receptor-related protein»
M :	marqueur de poids moléculaire
MgCl <sub>2</sub> :	chlorure de magnésium

mHz :	mégaHertz
ml :	millilitre
MMLV :	transcriptase inverse
mM :	milliMole
mm :	millimètre
MOPS :	tampon acide 3-[N-morpholino]propanesulfonique
N-terminus :	amino terminus
NZY :	milieu de culture
ORF :	«Open Reading Frame» (cadre de lecture ouvert)
PA :	«plasminogen activator»
PAI-1 :	«plasminogen activator inhibitor type 1»
PAI-2 :	«plasminogen activator inhibitor type 2»
<sup>32</sup> P :	phosphore radioactif
pb :	paires de bases
pBK-CMV :	phagémide
PCR :	«polymerase chain reaction»
PGC :	«primordial germinal cell»
pGEM-T :	plasmide
pI :	point isoélectrique
pfu :	«plaque forming unit» (unité de formation de plaque de lyse)
PGF <sub>2α</sub> :	prostaglandine
Pst I :	enzyme de restriction
rFSH :	récepteur pour l'hormone folliculo-stimulante
rLH :	récepteur pour l'hormone lutéinisante
rpm :	rotation par minute
RC :	«reactive center»
RSL :	«reactive side chain loop»
RT-PCR :	«reverse transcription-polymérase chain reaction»
Sac II :	enzyme de restriction
SERPIN:	«serine protease inhibitor»
SET :	tampon sodium Tris-EDTA
SM:	tampon sodium
SSC :	tampon citrate de sodium
SSPE :	tampon sodium phosphate-EDTA
T :	thymidine
TAE :	tampon Tris-acétate-EDTA
Taq :	polymérase <i>Thermus aquaticus</i>
TBE :	tampon tris-borate
TE :	tampon tris-EDTA
TGF :	«transforming growth factor»
tPA:	«tissue-type plasminogen activator»
tPAr:	«tissue-type plasminogen activator receptor»
µm :	micromètre
uPA:	«urokinase-type plasminogen activator»
uPAr:	«urokinase-type plasminogen activator receptor»
UTR:	«untranslated region»

X-gal : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-béta-d-galactoside  
Xl-blue : *E. Coli*  
YT : milieu nutritif bacto-tryptone

## Dédicaces

À mes parents, amis et famille,  
Ainsi qu'à tous les gens qui m'entourent,  
pour toutes les richesses  
qu'ils m'apportent et m'apprennent  
de par ce qu'ils sont.

À mes deux comparses extraordinaires,  
sans lesquelles les moindres embûches auraient paru des montagnes.

## Remerciements

Mes remerciements au docteur Jacques G. Lussier  
pour m'avoir dirigée dans un projet innovateur  
ainsi qu'un apprentissage diversifiée et complet,  
pour son aide et ses conseils tout au long du projet.

Ma reconnaissance au docteur Christopher A. Price  
pour ses conseils et critiques constructives.

Ma reconnaissance au docteur David S.Silversides  
pour sa collaboration précieuse.

Merci à tous mes collègues  
de la Faculté de Médecine Vétérinaire de St-Hyacinthe  
pour leur soutien et leurs conseils.

## 1. INTRODUCTION

La folliculogénèse ovarienne est la croissance continue des follicules depuis l'initiation de leur croissance à partir de la réserve ovarienne, soit des follicules primordiaux, jusqu'à leur rupture au moment de l'ovulation ou à leur involution par atrophie. La folliculogénèse est marquée par la succession de différentes étapes: 1) la formation des follicules primordiaux; 2) l'initiation de la croissance des follicules primordiaux; 3) la phase pré-antrale; 4) la phase antrale précoce; 5) la phase antrale finale ou pré-ovulatoire ; 6) la phase ovulatoire ou la phase de dégénérescence (apoptose) pour 99% des follicules et 7) la phase de formation du corps jaune suivit de sa régression. Différents mécanismes moléculaires interviennent en synergie et/ou s'antagonisent à chacune de ces étapes. De façon générale, la folliculogénèse est contrôlée par des facteurs intrinsèques ou extrinsèques à l'ovaire. Les facteurs intrinsèques stimulent l'initiation de la croissance folliculaire et du développement coordonné de l'ovocyte, des cellules granulosas, et des cellules thécales au cours des stades précoces (Adashi, 1992). Les facteurs extrinsèques à l'ovaire, principalement les hormones folliculo-stimulante (FSH) et lutéinisante (LH), synchronisent la fonction des cellules granulosas et thécales au cours des stades plus avancés du développement (Richards, 1994). La balance entre les facteurs stimulants et inhibiteurs détermine le devenir du follicule. L'ensemble des données accumulées sur divers facteurs ayant une action sur l'ovaire, ne nous permettent pas de discerner ceux qui sont limitants pour la survie du follicule via leur modulation de la prolifération ou de la différenciation des cellules folliculaires. Également, le développement folliculaire en association à la balance entre la croissance et l'atrophie folliculaire, mécanisme qui contrôle le taux d'ovulation, demeure incompris.

Le développement des techniques associées au transgénisme nous permet d'obtenir des modèles de souris transgéniques ciblant des gènes spécifiques impliqués dans la gonadogénèse et la folliculogénèse. Les résultats associés nous permettent d'évaluer de façon précise le rôle de ces gènes dans le développement folliculaire et leurs effets sur la fertilité. Une revue récente de Elvin et Matzuk (1998) décrit les différents modèles connus et nous donne une vue d'ensemble de la

participation de certains gènes (facteurs intraovariens et extraovariens) dans la formation du nombre de follicules primordiaux, du développement folliculaire au cours du stade pré-antral et antral, lors de l'ovulation ainsi qu'à la formation du corps jaune. Par exemple, l'inactivation du gène correspondant au récepteur à l'hormone folliculo-stimulante (rFSH) chez la souris, a généré des femelles stériles en raison d'un arrêt de la croissance des follicules précédant la formation de l'antra du follicule (Dierich et al., 1998 ; Abel et al., 2000). Également, des études plus récentes d'inactivation pour le gène du récepteur à l'hormone lutéinisante (rLH) murin ont démontré que les ovaires de ces souris contenaient des follicules jusqu'au stade antral sans toutefois présenter de follicules pré-ovulatoires ni de corps jaune (Zhang et al., 2001 ; Lei et al., 2001). En résumé, le développement folliculaire s'arrête au stade préantral en l'absence du rFSH, tandis que sans le rLH, le développement folliculaire pré-ovulatoire est nul.

Le facteur de croissance insulinique (insulin-like growth factor ; IGF-I) est un exemple de facteur intraovarien essentiel au développement des follicules au-delà du stade pré-antral. Les ovaires des souris invalidées pour ce gène ont démontré une folliculogénèse bloquée au stade précédant la phase antrale de la croissance folliculaire (Baker et al., 1996 ; Zhou et al., 1997). L'IGF-I est donc essentiel au développement du follicule au-delà du stade antral. Son expression n'est pas dépendante des gonadotropines, mais serait plutôt initiée par des signaux intrafolliculaires provenant de l'ovocyte (Zhou et al., 1997). Le facteur intraovarien de différenciation (growth differentiation factor 9 ; GDF-9) est un élément essentiel au développement des follicules pré-antraux. Le GDF-9 est exprimé de façon spécifique dans l'ovocyte (McGrath et al., 1995). Lorsqu'il est absent, les cellules de la granulosa du follicule primordial ne prolifèrent plus et la stéroïdogénèse est altérée (Dong et al., 1996). Les résultats obtenus avec les souris invalidées pour ces deux gènes démontrent bien la communication nécessaire entre l'ovocyte et les cellules de la granulosa qui résulte en une modulation de la croissance des follicules indépendante des gonadotropines. En résumé, l'ensemble des études d'inactivation de gènes chez la souris ont démontré clairement que les événements survenant à

partir de l'initiation de la croissance du follicule primordial jusqu'à l'ovulation et la formation du corps jaune résultent de la contribution de l'expression de différents gènes selon un patron d'expression spécifique à chaque stade de développement.

En dépit de la quantité d'information que peut nous apporter le modèle d'inactivation de gènes chez l'espèce murine à la compréhension des mécanismes régissant le développement folliculaire, ces informations ne nous permettent pas d'extrapoler ces observations à l'espèce bovine. L'espèce murine ne présente pas de phase de sélection et de dominance folliculaire typique des espèces à ovulation simple. Les mécanismes associés à la croissance, la sélection et la dominance folliculaires chez la vache demeurent à l'étude.

## **2. RECENSION DE LA LITTÉRATURE**

### **2.1 Aspects morphologiques**

#### **2.1.1 La structure et la fonction de l'ovaire chez la vache**

La fonction majeure de l'ovaire est celle de la différenciation ainsi que la relâche d'un ovocyte mature pour la fécondation (McGee et Hsueh, 2000). Il représente l'organe de stockage des ovocytes formés lors de la vie fœtale. Cette réserve d'ovocytes est générée lors de l'ovogénèse dans la phase prénatale du développement de l'animal. Les modifications histologiques ainsi qu'hormonales se déroulant au sein de l'ovaire sont à l'origine de l'évolution de l'unité fonctionnelle du système reproducteur femelle : le follicule ovarien, réceptacle de l'ovocyte. Il est constitué d'un ovocyte, le gamète femelle, entouré de couches cellulaires influençant son développement au cours de la folliculogénèse, ce sont les cellules de la granulosa et thécales (McGee et Hsueh, 2000). Le follicule et son ovocyte sont immatures au départ et entrent progressivement dans une étape de maturation contrôlée par les sécrétions folliculaires (facteurs locaux) ainsi que par des boucles de rétrocontrôle hormonal impliquant l'hypothalamus, l'hypophyse et l'ovaire. Le développement de chaque follicule est donc contrôlé par des facteurs endocriniens ainsi que des facteurs paracrines (McGee et Hsueh, 2000). Le follicule passe par une phase de multiplication lors de l'ovogénèse, une phase de croissance (folliculogénèse), une phase de maturation essentielle à la production d'un ovule compétent et pour 99% des follicules, une phase d'atrésie. La FSH et la LH sont les principales hormones gonadotropes régissant respectivement le recrutement et la dominance folliculaire, au cours de la phase antrale du développement folliculaire.

L'ovogénèse résulte en la formation d'un ovocyte mature. C'est le phénomène par lequel les gamètes femelles initient leur formation au cours de la vie foetale de l'animal et complètent leur maturation jusqu'au stade d'ovule compétent au cours du cycle oestral (Dailey, 1999). L'ovogénèse est caractérisée par une importante phase de multiplication. Chez la vache, la phase de multiplication réfère à la prolifération des cellules germinales souches d'origine extra-embryonnaire, c'est-à-dire des cellules germinales primordiales (PGCs), à partir de la 6<sup>e</sup> semaine de gestation. Ces cellules souches migrent vers la crête génitale de l'embryon, se

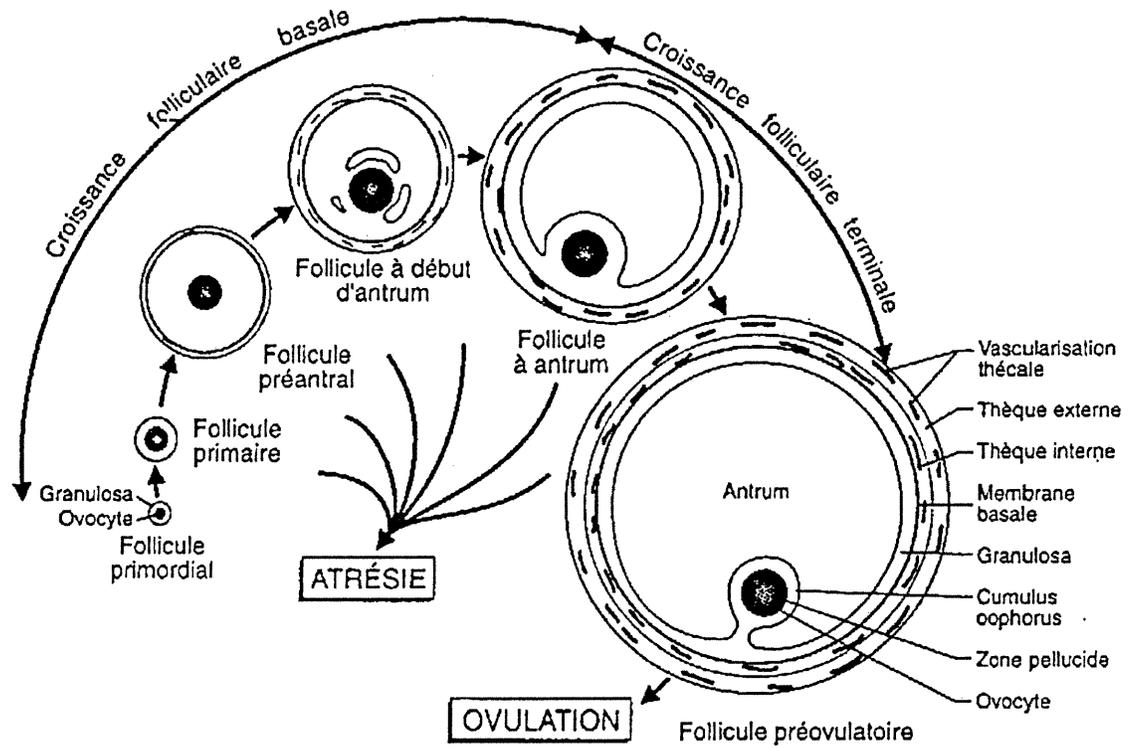
divisent par mitose et donnent naissance à plusieurs millions d'ovogonies, puis aux ovocytes primaires (I) bloqués en prophase I de la méiose (Dailey, 1999 ; Hanzen et al., 2000). À cette même période, une couche de cellules endothéliiformes entourent les ovocytes I, formant ainsi les follicules primordiaux. Les étapes subséquentes de la méiose ne se complèteront que lorsque les follicules atteindront le stade ovulatoire (Dailey, 1999) au cours duquel ils relâcheront l'ovocyte mature. Ainsi, à la naissance, la femelle possède une réserve limitée de follicules primordiaux générés lors de l'ovogénèse. Ils constituent la réserve de follicules en état de repos. Des cycles de passage du stade primordial au stade de croissance s'effectuent tout au cours de la vie de l'animal. Cette réserve diminuera sans cesse au cours de la vie de la femelle suite au recrutement et à l'entrée des follicules primordiaux en phase de croissance combiné à des vagues continues d'atrésie à chaque cycle oestral (Erickson, 1966a). Le mécanisme régissant le recrutement des follicules primordiaux en stade de repos vers le stade de croissance est inconnu (Fortune et al., 1999). Suite à différentes étapes de maturation, on estime à 1% la part des follicules primordiaux qui atteindra l'ovulation (stade pré-ovulatoire). La folliculogénèse est le développement du follicule à partir de son recrutement dans la réserve à partir des follicules primordiaux jusqu'à la rupture du follicule lors de l'ovulation ou de sa régression par atrésie. C'est la phase de croissance où l'on assiste à des changements morphologiques et histologiques importants.

### **2.1.2 La folliculogénèse**

Le follicule traverse différents stades de développement au cours de la folliculogénèse qui sont représentés à la figure 1 (Monniaux et al., 1999). Il initie sa croissance à partir du stade primordial vers les stades primaire et secondaire (préantral) avant d'acquérir une cavité antrale (McGee et Hsueh, 2000). Au cours de ces différents stades de développement autant le follicule que l'ovocyte sont concernés par les modifications caractérisant ces différents stades de développement (Monniaux et al., 1983 ; Lussier et al., 1987 ; Hulshof et al., 1994). Le follicule primordial contient l'ovocyte I et les quelques cellules de la granulosa forment une couche de cellules aplaties. Ces cellules sont entourées d'une membrane basale qui

n'est pas traversée par des vaisseaux sanguins. Les nutriments et les déchets voyagent donc par diffusion entre la couche thécale et l'ovocyte (Dailey, 1999). Ce stade correspond au stade folliculaire quiescent. Il est caractérisé par un diamètre moyen de 40  $\mu\text{m}$ . Le follicule primaire se caractérise quant à lui par une augmentation du diamètre de l'ovocyte, une couche cuboïdale de cellules de la granulosa et le début de la formation de la zone pellucide entourant l'ovocyte. Son diamètre moyen se situe entre 60 et 80  $\mu\text{m}$ . Des études *in vitro* ont démontré que les follicules primordiaux et primaires sont insensibles aux hormones gonadotropes puisque ces dernières ne sont pas essentielles pour leur développement (Wandji et al., 1996 ; Eppig et O'Brien, 1996 ; Braw-Tal et Yossefi, 1997). Au stade de follicule secondaire, l'ovocyte atteint son diamètre maximal. Ce dernier est entouré d'une zone pellucide bien distincte et de deux ou trois couches de cellules cuboïdales formant les diverses couches de cellules de la granulosa. Ces dernières sont délimitées par une membrane basale localisée à la face externe. À la fin du stade pré-antral, les cellules de la granulosa acquièrent les récepteurs à la FSH tandis que les cellules interstitielles s'organisent autour de la granulosa pour former la thèque (Monniaux et al., 1997). L'ensemble a un diamètre moyen de 200  $\mu\text{m}$  chez la vache (Lussier et al., 1987). Du stade primordial (pré-antral précoce) au stade de follicule secondaire (pré-antral tardif) tel que définit par Monniaux et al. (1999 ; figure 1), le développement folliculaire s'effectue lentement et s'étale sur plusieurs cycles folliculaires. Chez la brebis, on estime à environ 135 jours le temps requis pour croître du stade de follicule secondaire à deux couches de cellules de granulosa au début de la formation de l'antra (Cahill et Mauléon, 1980).

Le follicule tertiaire est le premier stade folliculaire antral. On assiste à l'apparition de petites cavités résultant de l'accumulation d'un transsudat plasmatique et de la sécrétion des diverses couches des cellules de la granulosa. L'antra se développe progressivement et provoque la séparation des cellules de la granulosa en cellules du cumulus et cellules formant la corona radiata entourant directement l'ovocyte. Les cellules de la granulosa sont reliées entre elles par de nombreuses jonctions de type lacunaire (GAP junctions) ce qui leur permet de communiquer entre



**Figure 1.** Les différentes étapes de la folliculogénèse ovarienne selon Monniaux et al. (1999).

elles tout au cours du développement folliculaire. À ce stade de développement, le follicule est entouré d'une double couche cellulaire constituée de la thèque interne dérivée de cellules interstitielles qui sont riches en enzymes essentielles à la stéroïdogénèse et de la thèque externe caractérisée par le tassement du tissu conjonctif du stroma de l'ovaire. Ce follicule possède un diamètre moyen de 4 à 5 mm.

Le follicule mature ou de De Graaf représente le stade terminal du développement folliculaire, et concerne un follicule sur 1000 qui a initié sa croissance (Saumande, 1991). La taille maximale du follicule mature ou pré-ovulatoire chez la vache est de 15 mm (Monniaux et al., 1997). Le follicule est caractérisé par un nombre maximal de cellules de la granulosa et une cavité antrale bien formée, ce qui a pour effet de repousser le follicule à la surface de l'ovaire. Les théques interne et externe sont bien différenciées, la première est une glande à part entière et la seconde est de nature stromale. Chez la vache, il faut environ 42 jours pour qu'un follicule initiant la formation de sa cavité antrale à 0.13 mm, atteigne la taille du follicule pré-ovulatoire (Lussier et al., 1987).

## **2.2 Aspects cinétiques**

### **2.2.1 Le cycle oestral**

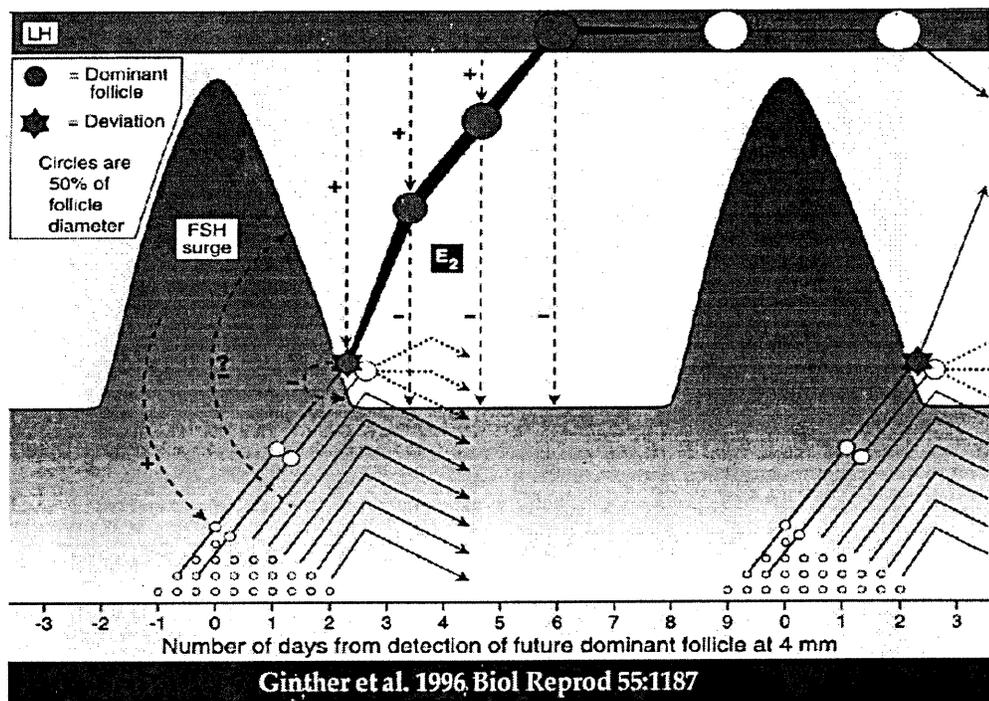
Le cycle oestral chez la vache se déroule sur une période de 18 à 24 jours. Au cours de cette période le follicule traverse les étapes finales de son développement, c'est-à-dire la phase folliculaire, suivit de la phase lutéale qui résulte en la formation et la régression du corps jaune. L'oestrus, c'est-à-dire les chaleurs de l'animal, s'observe donc en moyenne à tous les 21 jours. L'ovulation se produit à la fin de la période de l'oestrus qui dure en moyenne 18 h et marque la fin de la phase folliculaire et le début de la phase lutéale (Rajamahendran et al., 1979). La phase folliculaire est le développement des follicules antraux plus grands que 4 mm de diamètre et est caractérisé par des vagues folliculaires au cours desquelles ces follicules traversent des phases de recrutement, de sélection et de dominance folliculaire (Ginther et al., 1996 ; McGee and Hsueh, 2000 ; Driancourt, 2001). La figure 2 représente ces

vagues de croissance chez la vache. Elles apparaissent comme des périodes de croissance et de régression synchronisées de plusieurs follicules de diamètre  $> 4$  mm parmi lesquels apparaîtra un follicule dominant au bout de quelques jours (Sirois et Fortune, 1988; Fortune et al., 1988). On observe chez la vache de deux à trois vagues folliculaires précédant l'ovulation au cours du cycle oestral (Ginther et al., 1997). Le follicule est dit sensible aux gonadotropines (Driancourt, 2001) jusqu'au stade de follicule secondaire (1 à 3 mm chez le bovin ; Driancourt et al., 1993) et dépassé ce stade il est dit gonadotropine dépendant ( $> 4$  mm de diamètre), il entre alors dans la phase terminale de croissance folliculaire.

## **2.2.2 Mécanismes intervenant au sein d'une vague folliculaire**

### **2.2.2.1 Recrutement**

La phase de recrutement est le moment où une cohorte de follicules sains (5 à 10), gonadotropines dépendants et de diamètre  $> 4$  mm, poursuivent leur maturation sous l'influence de la FSH. Ces follicules dépassent ainsi le stade de 4 à 5 mm où la plupart des follicules deviennent atrésiques (Lussier et al., 1994). Le recrutement d'une cohorte de petits follicules d'environ 4 mm de diamètre est imputable à l'hormone FSH (Picton et al., 1990 ; Driancourt, 2001). Une augmentation des concentrations en FSH avant chaque vague de croissance folliculaire a été notée chez le bovin (Adams et al., 1992 ; Sunderland et al., 1994; Lussier et al., 1994). Le recrutement pourrait être une conséquence de cette élévation ou être le résultat de l'amplification de son action par des facteurs de croissance. La garantie qu'au moins un follicule parmi la cohorte se retrouvera dans les conditions optimales de développement et de sensibilité à de faibles concentrations de FSH justifie le recrutement d'un nombre supérieur de follicules nécessaire à l'ovulation (Fortune, 1994). Cette phase dure 2 à 3 jours chez le bovin et la FSH joue un rôle clef dans cette étape (McGee and Hsueh, 2000). Ce recrutement est suivi d'une phase de sélection où les concentrations en FSH diminuent (Adams et al., 1992).



**Figure 2.** Représentation d'une des vagues folliculaires au cours desquelles les follicules traversent des phases de recrutement, de sélection et de dominance folliculaire lors d'un cycle oestral chez la vache selon Ginther et al. (1996).

#### **2.2.2.2 Sélection**

La sélection fait référence au phénomène qui permet seulement au nombre de follicules caractéristique de l'espèce de poursuivre leur développement jusqu'au stade pré-ovulatoire et l'atréxie y joue un rôle essentiel (Dailey, 1999 ; Hanzen et al., 2000). Ainsi, au cours de la phase de sélection, un seul follicule de la cohorte réussit à poursuivre sa croissance, alors que les autres régressent et dégèrent par atréxie (Lucy et al., 1992). Le follicule le plus large est généralement sélectionné pour devenir le follicule dominant et ovuler (Ginther et al., 1999 ; Ginther, 2000). Toutefois, les mécanismes moléculaires responsables de cette sélection demeurent incompris.

La phase de sélection se caractérise par une diminution de la concentration de la FSH circulante et une augmentation de la fréquence des décharges pulsatiles de la LH. Cette dernière est responsable de l'augmentation progressive de la synthèse d'oestradiol caractéristique de la dominance fonctionnelle du follicule sélectionné (Sunderland et al., 1994), car elle stimule la synthèse d'androgènes par la thèque interne (Driancourt et al., 1991). Ces androgènes sont par la suite transformés en oestradiol au sein des cellules de la granulosa en réponse à la FSH. La phase de sélection est également caractérisée par une augmentation des concentrations de l'inhibine dans le liquide folliculaire (Knight et Glister, 2001). La rétroaction de l'inhibine et de l'oestradiol sur l'hypophyse, variable selon les espèces, entraîne la réduction de synthèse de la FSH et contribue au processus de sélection folliculaire (Roche, 1996). La phase de sélection serait également associée dans le temps à l'expression par les cellules de la granulosa de l'ARNm codant pour les rLH (Bao et al., 1997a, 1997b). Le follicule d'une vague folliculaire qui acquiert le premier les récepteurs pour la LH devient le follicule dominant puisque les cellules de la granulosa répondent à la fois à la LH et à la FSH (Bao et Garverick, 1998).

#### **2.2.1.3 Dominance**

Une nouvelle terminologie est depuis peu utilisée pour décrire la dynamique de l'établissement de la dominance d'un follicule, soit la déviation du diamètre

folliculaire (Ginther et al., 1999 ; Kulick et al., 1999 ; Ginther, 2000). On définit ce phénomène par la poursuite de la croissance du follicule ayant le plus grand diamètre parmi les follicules d'une vague folliculaire combiné à la réduction ou l'arrêt de la croissance des follicules subalternes à plus petit diamètre et ce, suite à une diminution des concentrations en FSH circulante. Ce phénomène a lieu lorsque le follicule le plus gros atteint un diamètre critique d'environ 8 à 9 mm (Ginther et al., 1999). On a observé qu'au moment où le plus grand des follicules d'une vague folliculaire atteint le diamètre critique spécifique à la race, qu'une chute de concentration sanguine en FSH y soit liée dans le temps (Ginther et al., 1999). Le follicule le plus grand acquiert une capacité à restreindre les concentrations en FSH circulante à des niveaux faibles et ce, par rétroaction négative via la sécrétion de modulateurs tels l'oestrogène et l'inhibine. Le follicule sélectionné maintient son développement au détriment des follicules subalternes, car il a la capacité d'utiliser cette faible concentration en FSH pour poursuivre sa croissance jusqu'à l'ovulation (Ginther et al., 2000). Une augmentation des concentrations moyennes circulantes de LH est observée en parallèle à cette diminution de la concentration en FSH (Roche, 1996 ; Kulick et al., 1999). Il apparaît d'ailleurs que le follicule voué à la dominance serait le premier à exprimer les rLH sur ses cellules de la granulosa au cours de sa croissance. Cette notion, établie donc un lien dynamique entre la dominance folliculaire et la variation à la baisse de la FSH combiné à une augmentation de la LH qui provoquera l'ovulation.

Ainsi, le follicule dominant émerge de la vague folliculaire sous l'influence des hormones gonadotropes, libère de l'œstradiol en grande quantité (Staigmiller et al., 1982 ; Mc Natty et al., 1984 ; Skinner et Osteen, 1988) et de l'inhibine (Findlay et al., 1991) dans le sang périphérique. Ces deux hormones exercent un rétrocontrôle négatif sur l'axe hypothalamo-hypophysaire qui diminue la relâche de la FSH (Martin et al., 1991). Le follicule pré-ovulatoire est en pleine croissance et maturation. Il semble qu'il ait la capacité d'inhiber le recrutement d'autres follicules puisque dès que ce follicule dominant est enlevé, on assiste à une nouvelle phase de recrutement (Ko et al., 1991). La dominance est à la fois morphologique, parce qu'exercée par le

plus gros follicule présent sur l'un ou l'autre des ovaires, et fonctionnelle parce que le follicule dominant peut provoquer la régression d'autres follicules en croissance ou inhiber la croissance d'autres follicules (Sirois et Fortune, 1988 ; Lavoit et Fortune, 1990 ; Ko et al., 1991).

D'autre part, le follicule dominant acquiert une sensibilité accrue à la LH grâce à l'expression des rLH dans les cellules de la granulosa (Carson et al., 1979). Chez la vache, le follicule acquiert les rLH lorsqu'il atteint environ 8 mm de diamètre, la dimension critique à laquelle les follicules dominants sont sélectionnés (Ko et al., 1991). Des recherches plus récentes ont démontré que la fréquence des pulses de LH est la clef de la destinée du follicule dominant (Duffy et al., 2000). L'équipe de Duffy démontre qu'un traitement horaire à la LH à partir du jour 1 de la dominance du follicule de la première vague folliculaire provoque l'allongement de la phase de dominance.

La destinée du follicule dominant vers la croissance, la régression ou l'ovulation est influencée par les variations de la concentration en progestérone et de la LH circulante en phase lutéale (Sirois et Fortune, 1990; Stock et Fortune, 1993). Au cours de la phase finale de maturation du follicule pré-ovulatoire, on observe une nette augmentation de la capacité de synthèse des oestrogènes. Il y a coopération des cellules de la thèque et de la granulosa ainsi que l'intervention des hormones gonadotropes LH et FSH. La première induit la formation d'androgènes par la thèque interne et la seconde assure l'aromatisation de ces androgènes en oestrogènes par les cellules de la granulosa (Fortune et Quirk, 1988). Nous observons donc une nette augmentation du ratio E2/P4 dans le liquide folliculaire du follicule dominant ou pré-ovulatoire (Ireland et Roche, 1982a,b). Au début de la phase lutéale, il y a formation du corps jaune et l'activité de l'aromatase est inhibée par une augmentation progressive de la concentration en progestérone (Fortune et Vincent, 1983). Ceci provoque l'arrêt de cette synthèse d'androgènes et leur aromatisation par le follicule dominant de la première vague au-delà du 8<sup>e</sup> au 10<sup>e</sup> jour du cycle oestral (Badinga et al., 1992 ; Sunderland et al., 1994). Le follicule dominant perd alors sa capacité à

produire des oestrogènes, les rLH, ainsi que les rFSH, résultant en une levée de l'inhibition de la sécrétion hypophysaire de FSH (Adams et al., 1992). C'est la fin de la phase de dominance et cette période coïncide avec l'émergence d'une nouvelle vague de croissance folliculaire précédée par une augmentation transitoire de la FSH comme déjà mentionné (Roche et al., 1997).

Lorsque la lutéolyse a lieu en moyenne vers le 17<sup>e</sup> jour du cycle oestral chez la vache, on observe une augmentation drastique de la synthèse d'oestradiol dans le follicule dominant (Fortune et al., 1988). Ceci résulte d'une sensibilité accrue de la thèque à une augmentation de la pulsativité en LH coïncidant avec une diminution de la progestérone originant du corps jaune maintenant en régression (Rahe et al., 1980 ; Walters et Schallenberger, 1984). Cette augmentation de la concentration de la LH combinée à une sécrétion basale de la FSH est cruciale pour le devenir du follicule dominant (Turzillo et Fortune, 1993 ; Ginther et al., 1996). Il apparaît donc que c'est la réduction de la pulsativité de la LH qui serait responsable de l'atrésie des follicules dominants de la première et surtout de la deuxième vague folliculaire (Lucy et al., 1992). D'autres travaux ont également démontré que la demie-vie du follicule dominant peut être prolongée par l'augmentation des fréquences pulsatiles de la LH (Fortune et al., 1991 ; Savio et al., 1993 ; Stock et Fortune, 1993). Chez l'espèce bovine, la LH est critique pour la croissance des follicules dominants au delà de 7 mm de diamètre (Gong et al., 1997). Lorsque la fréquence des pulses de LH est basse, le follicule dominant croît et poursuit sa dominance pendant quelques jours puis régresse; cela est représentatif des événements observés lors de la phase lutéale d'un cycle oestral normal.

### **2.3 L'atrésie folliculaire**

Au cours de la folliculogénèse, on estime que plus de 99% des follicules primordiaux qui entrent en croissance dégèrent au cours de leur développement (Monniaux et al., 1999). L'atrésie constitue l'issue majeure des follicules présents dans l'ovaire, puisqu'un faible pourcentage de la population ovarienne y échappe et

abouti à une ovulation (Erickson, 1966b ; Saumande, 1991). L'atrésie joue donc un rôle indirect dans la modulation du taux d'ovulation.

Cytologiquement, l'atrésie est détectable dans les follicules primaires, secondaires mais est particulièrement importante dans les follicules tertiaires. L'atrésie est caractérisée par l'apparition de corps picnotiques (Hirshfield, 1989, Erickson 1966a) ou apoptotiques résultant de la condensation et de la fragmentation de la chromatine dans les cellules de la granulosa (Hughes et Gorospe, 1991) ou encore par l'opacification de l'ovocyte (Kruip et Dieleman, 1982). Biochimiquement, l'atrésie est caractérisée par une augmentation des concentrations en enzymes lysosomales et en glycosaminoglycans ainsi qu'une diminution des concentrations en oestradiol dans le liquide folliculaire (Mariana et al., 1991), ce qui entraîne une diminution de sa concentration dans le liquide folliculaire. Fonctionnellement, les follicules atrétiques peuvent donc être distingués des follicules sains par la mesure du rapport de leurs concentrations en oestradiol/progestérone au sein de leur liquide folliculaire (Ireland et Roche, 1982a,b). La fréquence d'apparition de l'atrésie chez la vache augmente au cours des stades suivant la formation de l'antra et est particulièrement évidente dans les cellules de la granulosa de follicules ayant un diamètre plus grand que 2 mm (Lussier et al., 1987, 1994).

En général, on distingue trois types de mort cellulaire, soit : la nécrose, l'apoptose et la différenciation terminale résultant en la mort de la cellule. Le phénomène de la kératinisation des cellules de la peau est un exemple de cette différenciation terminale résultant en la mort de la cellule (Kerr et al., 1995). La mort cellulaire programmée ou l'apoptose a une occurrence au cours des diverses étapes du développement folliculaire au sein des cellules de la granulosa (Byskov, 1978 ; Hirshfield, 1991). La fragmentation de l'ADN est typique de l'apoptose et permet de la distinguer de la nécrose (Hughes and Gorospe, 1991 ; Tilly et al., 1991). Cette observation a conduit de nombreux chercheurs à associer l'atrésie folliculaire à l'apoptose (Tsafiriri et Braw, 1984 ; Hirshfield, 1991 ; Tilly, 1996 ; Yang et Rajamahendran, 2000). L'apoptose joue probablement un rôle dans la réorganisation

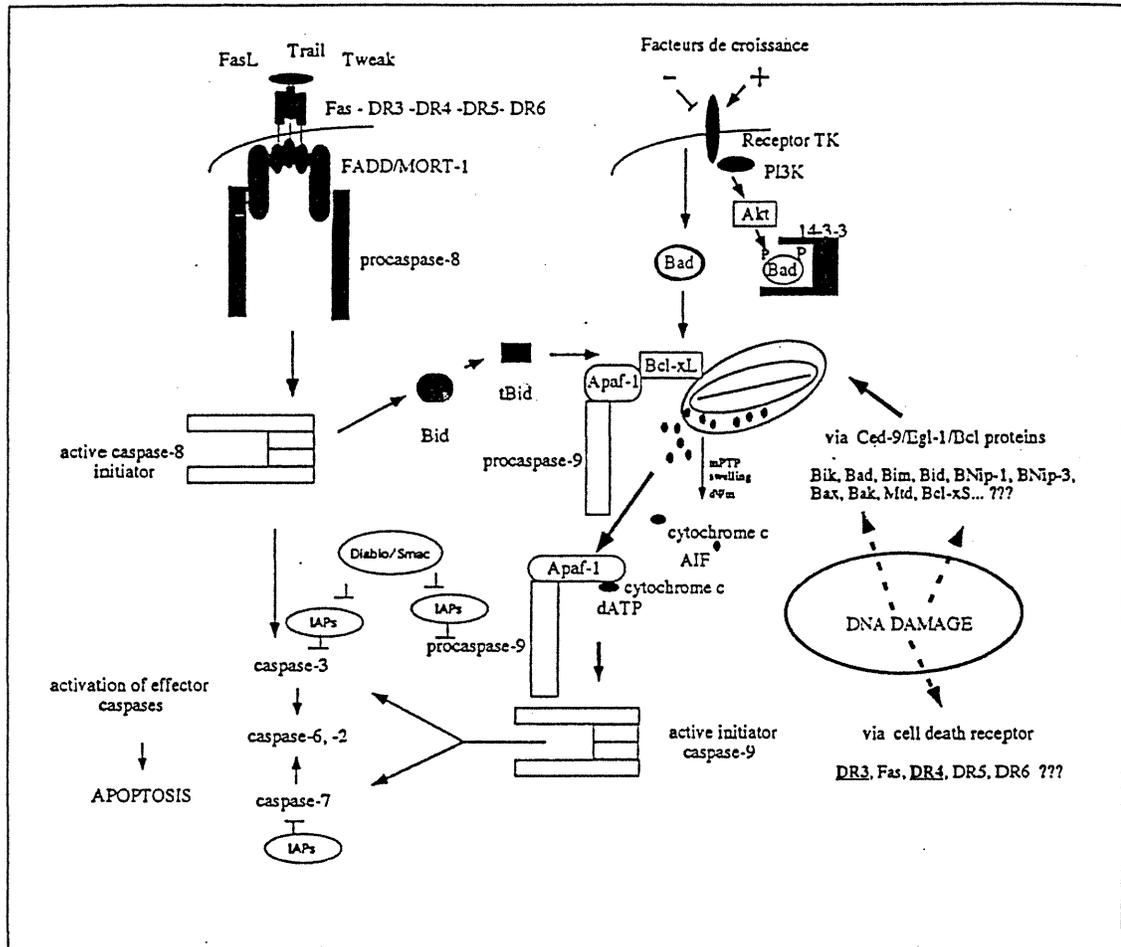
de la masse tissulaire durant chaque vague de croissance folliculaire, l'ovulation, la lutéinisation et la disparition du corps jaune (Hsueh et al., 1994). Par contre, des études ont démontré que la mort des cellules de la granulosa se fait via les trois types de mort cellulaire décrits auparavant dépendamment de leur localisation au sein des couches cellulaires entourant l'ovocyte (Van Wezel et al., 1999). Par exemple, les cellules de la granulosa se situant dans les couches mitoyennes du follicule dégénèrent par apoptose alors que les cellules de la granulosa se trouvant au pourtour de l'antre se détachent des couches cellulaires et entrent en phase de différenciation terminale au sein du liquide folliculaire. La nécrose semble jouer un rôle au sein des follicules en phase d'atrésie avancée (Van Wezel et al., 1999). Les mécanismes précis intervenant dans la mort cellulaire des follicules restent donc encore à être élucidés.

Généralement, le phénomène d'apoptose peut être initié par le manque de facteurs de croissance, des dommages à l'ADN ou simplement via la stimulation des récepteurs de mort cellulaire par leurs ligands respectifs. Les caspases sont les protéinases effectrices de la cascade d'activation de l'apoptose et les effecteurs principaux sont les caspases 3, 6 et 7. Ce sont des protéinases à cystéine intracellulaires qui clivent leur substrat sur les résidus aspartiques d'où leur appellation : Cysteine Aspartyl-Specific Proteases (caspases). Ce sont des pro-enzymes ou zymogènes qui doivent être clivées pour être activées (Reed, 2000). Elles peuvent être activées directement suite à la stimulation des récepteurs de mort cellulaire par leurs ligands respectifs. Une étude récente a démontré une augmentation de la concentration du récepteur de mort cellulaire Fas et de son ligand FasL dans les follicules atrétiques. Ce qui suggèrent un rôle potentiel de FasL dans l'induction de l'apoptose au cour de l'atrésie folliculaire (Porter et al., 2001). Ces pro-enzymes peuvent également être activées indirectement via la mitochondrie et le relargage du cytochrome c (figure 3). Les caspases sont responsables de la destruction des protéines de structure de la cellule (protéines d'adhésion, du cytosquelette, etc...), des protéines impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire et de la division cellulaire, des facteurs de transcription et de traduction ainsi que des systèmes de réparation de l'ADN. Il existe une grande famille d'inhibiteurs des caspases, c'est-à-

dire des suppresseurs d'apoptose, les « inhibitor of apoptosis » (IAP) et des inhibiteurs d'inhibiteurs de caspases afin d'assurer la modulation de l'apoptose (Solary, 1998 ; Reed, 2000).

Les protéinases non-caspases, les protéinases à sérine et les « caspase-like protease » sont d'autres agents apoptotiques entre autres parce qu'elles activent les caspases effectrices. Aussi, les protéinases non-caspases seraient nécessaires pour la dégradation de la chromatine chez le rat dans des cellules du thymus et son activité est inhibée par les protéines à sérine N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone et N alpha-p-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (Hughes et al., 1998). Chez l'humain, le facteur de croissance TNF $\alpha$  induirait l'apoptose via la caspase-3/ CPP32 et les protéinases à sérine dans des lignées cellulaires gastriques cancéreuses (Park et al., 2000). Les inhibiteurs des protéines non-caspases et des protéines à sérine sont donc d'importants modulateurs de l'apoptose, ils permettent de maintenir la balance entre la mort cellulaire (dégradation, apoptose) et la survie des cellules.

Il existe divers agents apoptotiques au sein de l'ovaire, c'est pourquoi la présence de modulateurs de ces agents apoptotiques est nécessaire. Comme expliqué plus en détails ultérieurement, les hormones gonadotropes agissent au sein de l'ovaire comme promoteur de la stéroïdogénèse et stimulent les cellules de la granulosa et thécales à produire des facteurs de croissance qui modulent à leur tour la stéroïdogénèse (section 2.4.2) (Tsafriri, 1988). Ces facteurs de croissance inhibent également l'apoptose au sein des cellules de la granulosa. Cette cascade d'hormones et de facteurs de croissance permet donc le maintien des cellules de la granulosa. Il a été observé que la progestérone (P4) serait un élément important dans cette cascade anti-apoptotique et agirait comme inhibiteur de l'apoptose via un récepteur membranaire situé sur les petites cellules de la granulosa (Peluso et Pappalardo, 1999). Les follicules ovariens sont constitués de cellules de la granulosa de deux types différents : les petites, peu différenciées et ayant une capacité limitée pour la stéroïdogénèse et les grandes, procédant à la stéroïdogénèse et ayant une excellente



**Figure 3.** Les différentes voies d'activation de l'apoptose : d'importants modulateurs de l'apoptose permettent de maintenir la balance entre la mort cellulaire (dégradation, apoptose) et la survie des cellules (adapté selon Reed, 2000).

capacité sécrétrice d'œstrogène et de progestérone (Sanbuissho et al., 1993 ; Rao et al., 1991 ; Lederer et al., 1995). Ce récepteur membranaire est une protéine de liaison de 60 kDa aussi retrouvée dans les cellules ovariennes exprimée et localisée de façon sélective à la surface des cellules de la granulosa (Sugino et al., 1997 ; Peluso et al., 1998).

## **2.4 Mécanismes hormonaux**

### **2.4.1 La régulation de la croissance folliculaire**

Au stade antral, la plupart des follicules dégénèreront par atresie alors que quelques-uns atteindront le stade pré-ovulatoire sous l'influence de la stimulation cyclique des hormones gonadotropes. Sous l'influence de la LH, le follicule mature relâche son ovocyte pour fins de fertilisation et les cellules de la granulosa se lutéinisent en grandes cellules lutéales tandis que les cellules thécales se lutéinisent en petites cellules lutéales pour former le corps jaune (Alila et Hansel, 1984).

#### **2.4.1.1 Phase indépendante des gonadotropines**

La phase de développement folliculaire indépendante des gonadotropines est assurée par des facteurs de croissance produits localement par les follicules (Bendell et Dorrington, 1990) et agissant de façon paracrine. L'activine est un candidat important agissant à ce stade de développement. Elle est synthétisée par les cellules de la granulosa dont elle assure la différenciation via un mécanisme autocrine (Drion et al., 2000). Il a été démontré que les souris invalidées pour le gène des récepteurs à l'activine de type 2B sont infertiles, les follicules étant bloqués à un stade antral précoce. Ceci démontre le rôle clef de l'activine dans la prolifération et la différenciation des cellules granulosa (Nishimori et Matzuk, 1996). Par ailleurs, l'activine serait responsable de l'acquisition par les cellules de la granulosa des récepteurs à la FSH chez la vache (Xiao et al., 1992) et sur les cellules de la granulosa non différenciées de rat (Hasegawa et al., 1988 ; Xiao et al., 1992). Ces observations suggèrent que l'activine agirait comme modulateur essentiel du passage des follicules du stade gonadotropine indépendant au stade dépendant des gonadotropines (Drion et al., 2000). L'activité de l'activine est modulée par l'inhibine. Une souris invalidée

pour l'inibine (sous-unité alpha) démontre une prolifération incontrôlée des cellules de la granulosa (Matzuk et al., 1992).

#### **2.4.1.2 Phase dépendante des gonadotropines**

La phase dépendante des gonadotropines débute chez la vache lorsque les follicules atteignent la taille limite de 4 mm de diamètre tel que démontré par une étude de réduction de la FSH circulante pour une période de quatorze jours (Lussier et al., 1994). À ce stade, le follicule subit des changements histologiques et hormonaux significatifs : la thèque subit une augmentation de sa vascularisation (angiogénèse), ce qui permet un meilleur échange avec l'environnement ovarien et sa capacité à former les hormones stéroïdiennes s'améliore. On assiste également à une augmentation de la synthèse d'oestradiol. La croissance du follicule est principalement dirigée par les hormones gonadotropes hypophysaires (FSH et LH) mais est modulée par des facteurs polypeptidiques locaux stimulants (Insulin Growth Factors (IGFs), activine, Transforming Growth Factor (TGFbeta)) et inhibiteurs (Insulin Growth Factor Binding Proteins (IGFBPs), follistatine, inhibine, interleukine-6, Tumour Necrosis Factor (TNF-alpha)). Ces facteurs interagissent dans le follicule en synergie et/ou s'antagonisent (Monniaux et Monget, 1997). Par exemple, à ce stade-ci, l'activine module à la hausse la formation des hormones stéroïdiennes par les cellules de la granulosa ainsi que la production d'oestradiol (Hutchinson et al., 1987 ; Miro et al., 1991 ; Shukovski et al., 1991).

#### **2.4.2 Principaux rôles des hormones gonadotropes**

L'hormone de libération des gonadotropines est l'hormone de relâche des gonadotropines, « la gonadotropine releasing hormone » (GnRH). La GnRH est produite en faible quantité par des cellules nerveuses localisées dans les noyaux hypothalamiques. La GnRH provoque la libération de la FSH et de la LH par l'adénohypophyse (Kalra et al., 1997). La LH et la FSH sont des glycoprotéines dont la structure est caractérisées par la présence de deux chaînes alpha similaires et deux chaînes beta différentes (Stanton et al., 1996). Les différences des séquences en acides aminés des chaînes beta entre les différentes glycoprotéines leur confèrent la

spécificité d'interaction avec leurs récepteurs respectifs. Les cellules cibles des gonadotropines sont les cellules de la thèque et de la granulosa. La FSH et la LH agissent de concert au cours du développement et de l'ovulation des follicules ovariens. Afin qu'un follicule se développe au-delà du stade pré-antral, il développe des récepteurs à la FSH qui sont exclusivement situés dans la granulosa alors que les récepteurs à la LH sont situés dans la thèque interne. La LH stimule la production d'enzymes stéroïdogéniques telles la P450 cholestérol side chain cleavage (P450SCC), la 3  $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase (3 $\beta$ -HSD) et la C17-hydroxylase-lyase au sein de la thèque interne. Le cholestérol constitue le principal substrat du processus de la stéroïdogénèse et il est véhiculé par les lipoprotéines de type LDL (basse densité) dans les espèces bovine, porcine et humaine (Savion et al., 1981 ; Soto et al., 1984 ; Tureck et Strauss, 1982). Sous l'effet de ces enzymes, la thèque interne produit des androgènes (testostérone et androstènedione) qui diffusent vers la granulosa où ils seront transformés en oestrogène par l'enzyme aromatasase. L'aromatase est stimulée par la FSH lors du recrutement folliculaire. Il a été démontré que chez le rat, le rôle majeur de la FSH hypophysaire est de stimuler l'activité de l'aromatase des cellules de la granulosa (Erickson et Hsueh, 1978) ce qui favorise l'aromatation des androgènes en oestrogènes. Il a également été observé chez la vache que l'activité de cette enzyme est plus importante dans les follicules dominants que dans les follicules voués à l'atrésie (Badinga et al., 1992). La synthèse d'œstradiol par le follicule antral et le follicule pré-ovulatoire nécessite une coopération étroite entre les cellules thécales et les cellules de granulosa (Flack 1959, Fortune et Quirk, 1988). L'activité stéroïdogénique du follicule, apparue lors de la phase hormono-dépendante du développement folliculaire, sous le contrôle des gonadotropines est indispensable à la reproduction chez la femelle.

#### **2.4.3 Facteurs de croissance**

Il est largement reconnu que la FSH et la LH contrôlent la fonction ovarienne. Cependant, il est difficile d'expliquer le processus de reproduction tels que la folliculogénèse, la sélection de follicules ovulatoires, l'atrésie et la maturation ovocytaire uniquement par des variations des concentrations sanguines en hormones

gonadotropes. Durant la décennie écoulée, l'intérêt de la recherche a été dirigé sur les facteurs produits localement et agissant par le biais de mécanismes autocrines et/ou paracrines qui contrôlent la réponse des cellules cibles. Ces agents autocrines et paracrines modulent les réponses des cellules ovariennes aux hormones gonadotropes dans le sens de l'inhibition ou de la stimulation.

De nombreux facteurs de croissance interviennent au sein de l'ovaire, par contre il est préférable de les présenter sous forme de systèmes de facteurs de croissance plutôt que d'un facteur en particulier puisque l'étendue de l'action de chacun des facteurs reste encore à déterminer. Quatre principaux systèmes sont distingués : l'« Epidermal Growth Factor » (EGF) (Ludlow et al., 1987) ; le système des « Fibroblast Growth Factors » (FGF) (Goldfarb, 1996); le système des « Insulin-like Growth Factors » (IGF) (Hammond et al., 1991) et les « Transforming Growth Factors » (TGF) (Kinn et Schomberg, 1989). Plusieurs ligands ont été identifiés pour ces différents systèmes (Monget 1993). Les facteurs de croissance faisant partie de ces systèmes se distinguent à la fois par leur mécanisme d'action, leur structure moléculaire fort apparentée et leur site d'action (autocrine, paracrine, endocrine, juxtacrine, et intracrine) (Knight et Glistler, 2001).

L'EGF est une protéine ayant une activité mitotique dans plusieurs types de cellules *in vivo* comme *in vitro*. L'EGF exerce un effet prolifératif puissant sur les cellules de granulosa (Savion et al., 1981 ; Jones et al., 1982) et particulièrement sur les cellules de granulosa des follicules primaires et secondaires (Morbeck et al., 1993 ; Roy, 1993). Ses récepteurs sont absents dans les cellules de granulosa de follicules préantraux chez le bovin (Wandji et al., 1992). L'EGF procure un effet positif sur la maturation de l'ovocyte et du développement de l'embryon chez les bovins (Harper et Brackett, 1993).

Les FGFs existent sous au moins 12 formes (Goldfarb, 1996). Ils ont des fonctions angiogénique et mitogénique (Baired et al., 1989 ; Evain-Brion, 1991). Dans l'ovaire, le FGF serait produit par les cellules de granulosa (Baired et al., 1989).

La synthèse des FGF dans l'ovaire stimule les cellules lutéales mais retardent la différenciation des cellules de granulosa bovines en culture (Hafez et al., 1999).

L'insuline et les facteurs insulinothropiques « Insulin-Like Growth Factors » (IGFs) se présentent sous deux formes : IGF-1 et IGF-2. Ils ont été mis en évidence dans l'ovaire. Selon Spicer et al. (1993), l'expression d'IGF-1 intra-ovarienne est retrouvée chez les bovins dans les cellules de la granulosa et de la thèque. Il est à noter que chez la vache les récepteurs des IGF-1 sont plus nombreux dans les cellules de granulosa des gros follicules antraux et beaucoup moins dans les cellules de granulosa des petits follicules (Spicer et al., 1994), alors que l'IGF-2 serait exprimé dans les cellules de la thèque. Des travaux ont démontré que les concentrations totales des IGFs retrouvés dans le liquide folliculaire ne sont pas influencées ni par le diamètre, ni par le degré d'atrésie (Monget, 1993). Les IGFs sont reconnues chez la vache comme activateurs de la fonction ovarienne (Gong et al., 1993). Chez les bovins, l'ajout d'IGF stimule la production d'œstradiol et de progestérone des cellules de granulosa en culture en plus de potentialiser l'effet stimulant de la FSH sur l'activité stéroïdogénique des cellules de granulosa (Gong et al., 1993). L'effet des IGFs est modulé par leurs protéines de liaison soit les « IGF-Binding proteins » (IGFBPs). Ces dernières en liant les IGFs peuvent contrôler la disponibilité ou la libération des IGFs sur les cellules cibles (Ackland et al., 1992). Le follicule voué à la dominance est d'ailleurs caractérisé par une faible concentration en IGFBP-4 permettant une plus grande disponibilité des IGFs ce qui entraînerait une réponse amplifiée du follicule à la FSH (Knight et Glister, 2001). Les « Relaxin-Like Factors » (RLFs) sont de nouveaux membres de la famille des Insulin/IGF. Ils sont produits dans les ovaires de différentes espèces par les cellules de la thèque folliculaire et dans le corps jaune au cours du cycle œstral ainsi qu'au moment de la gestation (Ivell, 1997).

On retrouve dans le regroupement des facteurs de type Transforming Growth Factor (TGF), le  $TGF\alpha$  et  $TGF\beta$ . Le  $TGF\alpha$ , produit par les cellules de la thèque, peut, de par sa structure semblable à l'EGF, se lier au récepteur EGF et jouer le rôle

d'un agoniste. Ceci a été démontré pour le TGF $\alpha$  chez le bovin, par immunohistochimie dans les cellules de la thèque des petits follicules et dont l'intensité du marquage diminue à mesure que le follicule augmente de taille (Lobb et al., 1989). L'expression du TGF $\alpha$  a été positivement corrélée à l'activité mitotique élevée dans les cellules de la granulosa. Le TGF $\alpha$  produit par les cellules de la thèque stimule la prolifération de ces dernières ainsi que les cellules de la granulosa (Skinner et Coffey, 1988) et permet de maintenir les cellules de granulosa à un stade indifférencié (Lobb et Dorrington, 1992). Il provoque aussi une inhibition de l'activité stéroïdogénique des cellules de l'ovaire. Le TGF $\beta$  est produit par les cellules de la thèque (Skinner et al., 1987 ; Bendell et Dorrington, 1988 ; Magoffin et al., 1989). Chez la vache, le TGF $\beta$  inhibe la prolifération des cellules de granulosa et de la thèque interne mais stimule les effets des gonadotropines sur la stéroïdogénèse (Roberts et Skinner, 1991). Chez les animaux domestiques, le TGF $\beta$  agit comme un inhibiteur de la prolifération cellulaire pour induire la différenciation du follicule ainsi que la maturation de l'ovocyte lors du développement (Lobb et Dorrington, 1992 ; Mulheron et Schomberg, 1993).

L'inhibine a été isolée chez les bovins dans le liquide folliculaire par Robertson et al. (1985). Les gonades constituent la source principale de l'inhibine et des autres protéines connexes qui vont contribuer à la régulation endocrinienne du système reproducteur. Chez les femelles, les cellules de granulosa sont le lieu de synthèse de l'inhibine et celle-ci est sécrétée dans le sang veineux (Setchell, 1993). L'inhibine est une protéine qui comprend deux sous unités  $\alpha$  et  $\beta$  reliées par un pont disulfure. L'inhibine joue un rôle très important dans la régulation de la folliculogénèse ovarienne durant le cycle œstral. L'inhibine agit comme un signal chimique à la glande hypophysaire, informant cette dernière sur le nombre de follicules en croissance dans l'ovaire. L'inhibine induit la réduction de la sécrétion de la FSH à une concentration qui maintient le nombre d'ovulation spécifique à chaque espèce (Taya et al., 1996). En inhibant la relâche de la FSH sans altérer celle de la LH, l'inhibine pourrait être en partie responsable des différences de décharge de la LH et de la FSH à partir de la glande hypophysaire.

L'activine est retrouvée dans le fluide folliculaire et c'est une protéine qui stimule la sécrétion de la FSH (Vale, 1994). L'activine a été identifiée comme un facteur de relâche de la FSH. C'est un homo ou hétérodimère formé des sous-unités  $\beta$  inhibine ( $\beta A$  ou  $\beta B$ ). L'activine est un membre pleinement fonctionnel des facteurs de croissance (Vale, 1994). La follistatine est une autre protéine isolée du liquide folliculaire. La follistatine inhibe non seulement la sécrétion de la FSH comme l'inhibine mais lie aussi l'activine et neutralise son activité biologique. Elle joue donc un rôle modulateur de la sécrétion de la FSH.

## 2.5 Hypothèse et modèle d'étude

Le développement folliculaire ovarien en phase terminale est caractérisé par des étapes de recrutement de plusieurs follicules de 2 à 4 mm suivit de la sélection d'un seul follicule qui se poursuit au cours de l'étape de la dominance. Chez la vache, le nombre de petits follicules antraux de moins de 3 à 4 mm de diamètre est élevé, tandis que le nombre de plus de 3 à 4 mm est réduit en raison des processus dégénératifs (Lussier et al., 1987 ; 1994). La dégénérescence de ces follicules est initiée dans les cellules de la granulosa par le mécanisme d'apoptose cellulaire qui contribue à éliminer ces follicules de la topographie ovarienne. Le processus de sélection folliculaire est donc très rigoureux puisqu'il a été rapporté que plus de 87% des follicules > 3.5 mm démontrent des signes de dégénérescence (Lussier et al., 1994). Chez les espèces mono-ovulatoires, l'étude des gènes exprimés par le follicule dominant nous permettra d'identifier les gènes qui contribuent à son développement et/ou à son maintien jusqu'au stade préovulatoire, dans un environnement où la majorité des follicules dégénèrent. L'hypothèse générale de notre travail stipule que la croissance du follicule dominant résulte de l'expression de gènes spécifiques par les cellules granulosa. Ces gènes contribueraient au maintien de l'intégrité du follicule sélectionné et le démarquerait ainsi de la cohorte de follicules recrutés.

Nous avons choisi la vache comme modèle expérimental puisque: 1) c'est une espèce mono-ovulatoire qui représente adéquatement les événements de la physiologie ovarienne rencontrés chez la femme ; 2) c'est une espèce d'importance

économique ; 3) son cycle oestral peut être synchronisé ; 4) son développement folliculaire a été caractérisé par histologie et échographie transrectale dans le cadre d'études ultérieures; 5) les manipulations animales sont aisées ; et 6) les récoltes de tissus permettent plusieurs analyses. Les cellules de la granulosa récoltées de divers follicules représentent le matériel initial à partir duquel nous avons extrait les ARN totaux. Les raisons qui ont fixées notre choix sur les cellules de la granulosa sont les suivantes : 1) elles jouent un rôle endocrinien de premier plan dans le follicule ; 2) elles contribuent à la maturation de l'ovocyte ; et 3) elles forment une population cellulaire homogène. Les cellules de la granulosa ont été récoltées de divers groupes de follicules soit : 1)  $\leq 4$  mm de diamètre ; 2) dominant au jour 5 du cycle oestral ; et 3) pré-ovulatoire soit 22 à 23 heures suivant l'injection de l'hormone à action lutéinisante, la « human chorionic gonadotropin » (hCG). Les ARN totaux des cellules de la granulosa ont été récoltés puis l'expression des gènes entre ces groupes de follicles a été comparée par la technique de l'étalement différentiel des ARN messagers ou DDRT-PCR. Les objectifs spécifiques du présent mémoire étaient: 1) de caractériser six ADN complémentaires (ADNc) non connus, démontrant un profil d'expression différentiel dans le groupe du follicule dominant ; et 2) d'analyser l'expression différentielle de ces gènes lors du développement folliculaire par l'application de la RT-PCR semi-quantitative en temps réel.

### **3. MÉTHODOLOGIE**

#### **3.1 Description du modèle expérimental animal**

##### **3.1.1 Traitements des animaux**

Des vaches taries de type croisé Holstein nullipares ou multipares ont servi de modèle dans l'ensemble de nos études. Elles étaient maintenues à la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal, recevaient une alimentation en moulée et en foin tel que recommandée par les normes en vigueur et avaient accès à l'eau *ad libitum*. Toutes les vaches sélectionnées ont été échographiées afin de vérifier la qualité de la matrice utérine ainsi que le fonctionnement normal des ovaires. Les animaux ont subi un traitement permettant de synchroniser le cycle oestral de chaque vache. Le critère de fonctionnement normal des ovaires constituait en la présence d'un corps jaune et de follicules antraux de différents diamètres. La régression et le changement de position du corps jaune ainsi que des follicules antraux ont été observés par deux échographies réalisées à une semaine d'intervalle suivant l'injection intra-musculaire de 25 mg de PGF<sub>2α</sub> (5 ml de Lutalyse; Upjohn Kalamazoo, MI), afin de s'assurer du fonctionnement normal de l'ovaire. De plus, les chaleurs ont été suivies à intervalles de 12 h dans la fenêtre de temps de 48 h à 96 h suivant l'injection de PGF<sub>2α</sub>. Les échographies ont été réalisées par voie trans-rectale à l'aide d'un appareil LS-300A (Tokyo Keiki Co. Ltd, Japon) équipé d'une sonde linéaire en temps réel de 5 MHz.

Les vaches (n=5) ont été traitées afin d'obtenir des cellules de la granulosa issues de follicules à des stades précis de leur développement. Les cellules de la granulosa qui ont été récoltées proviennent des groupes de follicules suivants : 1) follicules dominants en pleine croissance (> 9 mm) et 2) follicules préovulatoires (> 11 mm) induits à l'hCG. En plus, les cellules de la granulosa provenant de follicules < 4 mm ont été récoltées à partir d'ovaires d'abattoir, car le nombre de cellules de la granulosa est limité dans ces petits follicules. Ce groupe de follicules représente les follicules non-sélectionnés. Afin de générer les follicules dominants et préovulatoires induits à l'hCG, les vaches ont été échographiées puis ont reçu une injection de 25 mg de PGF<sub>2α</sub> en présence d'un corps jaune afin de provoquer l'oestrus. Les chaleurs ont été suivies tel que mentionné précédemment. Le jour de la chaleur

est défini comme étant le jour 0 (J0), soit le commencement du cycle oestral. Au jour 2, les échographies ovariennes ont été reprises de façon quotidienne jusqu'au jour 5 du cycle œstral afin d'observer le développement du follicule dominant issu de la première vague folliculaire. Les critères de sélection du follicule dominant étaient un diamètre de plus de 8 mm, qu'il soit en croissance continue pour au moins deux observations échographiques quotidiennes successives soit, à J4 et J5. À J5 du cycle œstral, l'ovaire portant le follicule dominant a été obtenu par colpotomie. Les follicules dominants pré-ovulatoires ont été induits à l'hCG et ont été obtenus suite aux mêmes traitements et observations initiaux que ceux réalisés pour le groupe du follicule dominant suivit des traitements suivants. Une dose de 25 mg de PGF<sub>2α</sub> fut injectée à 22:00 h du J7. Après 36 h, soit à 10:00 du J9, une dose ovulante de 3000 UI d'hCG (APL Ayerst Lab, Montréal, QC) a été injectée dans la jugulaire selon le protocole validé par Sirois (1994). Au cours de ces traitements, le développement folliculaire a été suivi quotidiennement afin de permettre l'identification du follicule pré-ovulatoire. L'ovariectomie par colpotomie a eu lieu entre 22 et 23 h suivant l'injection d'hCG. Selon cette horaire de traitement, le follicule pré-ovulatoire devait ovuler entre 24 et 28 h suivant l'injection d'hCG (Sirois, 1994).

Le protocole suivit pour l'ovariectomie par colpotomie avait été approuvé par le comité de bien-être des animaux de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal. L'animal a été mis au jeûne de 12 à 16 h avant la chirurgie tout en préservant l'accès à l'eau. Une épidurale a été effectuée (100 à 120 mg de lidocaïne-HCl 2%; Vétoquinol, Joliette, QC), puis la région du périnée a été rasée et lavée de façon successive avec un détergent de 4% de gluconate de chlorhexidine (Roughex-G, Roumier, Qc) suivit d'un lavage avec 10 % de providone iodée (Ivdovet, Roumier, Qc) puis d'une désinfection à l'alcool isopropylique à 70%. Le vagin a été rincé à la saline stérile (500 ml) additionnée de pénicilline cristalline (5 x 10<sup>6</sup> UI, Crystapen; Vetrepharm, ON). Une incision a été pratiquée dans la paroi vaginale puis agrandi manuellement afin de permettre l'accès à la cavité péritonéale. L'ovaire portant le follicule choisi a été enlevé à l'aide d'un ovariotome. La pression exercée par l'ovariotome au pourtour du pédicule ovarien a été laissée pour 10 min afin de

s'assurer d'une hémostasie complète. Suite à la chirurgie, l'animal a reçu une injection intramusculaire 40 mg de xylazine (Rompun; Bayvet Rexdale, ON) et 20 mg d'acépromazine (Atravet; Ayerst, Montréal, QC). Une antibiothérapie post-chirurgicale à la pénicilline G (30 ml, im, bid; Depocillin; Intervet) a été administrée au cours des 5 jours suivant l'ovariectomie.

### **3.1.2 Sélection des groupes de follicules**

Les différents groupes de follicules utilisés dans nos études ont été sélectionnés initialement selon un critère morphologique et en second lieu selon un critère de qualité basé sur la concentration des hormones stéroïdiennes. Le premier critère était associé au diamètre du follicule en fonction du traitement administré à l'animal tel que défini à la section 3.1. La qualité des follicules en rapport avec leur stade de développement (dominant ou induit à l'hCG) a été vérifiée par les dosages radio-immunologiques (RIA) d'oestradiol-17 $\beta$  et de progestérone à partir des liquides folliculaires correspondants. L'oestradiol-17 $\beta$  et la progestérone ont été dosées sans extraction par radioimmunoessais (RIA) selon les méthodes préalablement validées (Bélanger et al., 1990; Price et al., 1995). La sensibilité des essais a été de 0.25 ng/ml et de 1 ng/ml pour l'oestradiol-17 $\beta$  et la progestérone respectivement, tandis que les coefficients de variations pour ces deux essais ont été moins de 12%.

### **3.1.3 Récolte des cellules de la granulosa**

Les ovaires récupérés soit à l'abattoir ou suite à l'ovariectomie ont immédiatement été déposés dans la saline à 4°C puis déposés sur la glace. Le diamètre de chaque follicule a été mesuré. Les follicules choisis selon les critères morphologiques décrits à la section 3.1.1 ont été traités de la façon suivante. Premièrement, le liquide folliculaire a été aspiré à l'aide d'une aiguille 21G puis centrifugé (3 000 g, 2 min, 4°C). Le liquide folliculaire a été récupéré et congelé (-20 °C). Une fine incision a été pratiquée à la surface des follicules par des ciseaux à dissection. À l'aide d'une pipette pasteur dont l'embout a été préalablement passé à la flamme, un peu de milieu de culture DMEM (Life Technologies, Burlington, ON) conservé à 4°C a été injecté dans le follicule afin de permettre un lavage en douceur

de la cavité folliculaire. Trois à quatre lavages folliculaires successifs ont été réalisés et les récoltes des lavages regroupées. Les cellules de la granulosa ont été centrifugées (3 000 g, 2 min, 4°C), débarrassées de leur surnageant puis le culot de cellules a été immédiatement congelé dans l'azote liquide.

## **3.2 Méthodes**

### **3.2.1 Extraction de l'ARN total et messager**

La purification de l'ARN total des cellules de la granulosa a été réalisée selon la technique décrite par Chomczynski and Sacchi (1987) et validée dans notre laboratoire (Houde et al., 1994; Brûlé et al., 2000). Une attention particulière a été portée à l'ensemble des matériaux et solutions utilisées dans le cadre des extractions et des manipulations impliquant l'ARN. Les matières plastiques (emboûts de pipette, microtubes) ont été autoclavés à 121°C pendant 45 min en cycle sec tandis que la verrerie a été cuite pendant 8 h à 121°C. L'eau servant à faire les différentes solutions pour les manipulations de l'ARN a été traitée au diéthyl-pyrocarbonate (DEPC) à raison de 1% (v/v), puis autoclavée pendant 45 min à 121°C. Les différentes solutions réalisées ont aussi été traitées au DEPC.

Les culots de cellules de la granulosa congelés ont été homogénéisés dans 2 ml de tampon de lyse (4 M guanidium isothiocyanate, 0.5% Na-N-laurylsarcosine, 25 mM Na-citrate, pH 7) à l'aide d'une seringue de 5 ml et d'une aiguille de 21G. L'homogénat a été déposé sur un coussin de chlorure de césium (5.9 M ClCs, 0.1 M EDTA) puis centrifugé (348 000 g, 4 h, 20 °C). Le culot d'ARN a été solubilisé à l'aide du tampon de lyse (4 M guanidium isothiocyanate, 0.5% Na-N-laurylsarcosine, 25 mM Na-citrate, pH 7) puis extrait au phénol/chloroforme et précipité à l'isopropanol (Sambrook et al., 1989). Les ARN messagers ont été isolés à l'aide d'oligo-(dT) couplés à des billes magnétiques (Dynabeads ; Dynal, Lake Success, NY) tel que défini par le protocole de la compagnie. Les concentrations d'ARN total et messager ont été estimées par densité optique à 260 nm. Leur qualité a été estimée par le ratio des densités optiques à 260/280 ainsi que l'observation de la qualité des bandes d'ARN ribosomales (28S et 18S) tel que visualisée par électrophorèse sur gel

de 1% d'agarose en conditions dénaturantes (0.74 M formaldéhyde, 40 mM MOPS, 0.01 mM Na-acétate, 0.2 mM EDTA) contenant 0.01% de bromure d'éthidium (Sambrook et al., 1989).

### **3.2.2 Analyses de l'expression des ARNm différentiellement exprimés dans les follicules dominants**

#### **3.2.2.1 Technique de l'étalement différentiel des ARNm**

La technique d'étalement différentiel des ARN messagers ou DDRT-PCR est une technique de comparaison de l'expression des gènes entre divers tissus ou états physiologiques. Cette technique a été utilisée afin de comparer les patrons d'expression des gènes dans les cellules de la granulosa issues de groupes de follicules à différents stades de maturation tel que définit à la section 3.1, soit: 1)  $\leq 4$  mm de diamètre (n = 40 follicules); 2) dominants en pleine croissance ( $> 8-9$  mm; n = 3 follicules); ou 3) pré-ovulatoires induits à l'hCG ( $> 11$  mm; n = 2 follicules). Afin de diminuer l'effet de la variabilité de l'expression des gènes d'un animal à un autre, les ARN totaux provenant de plusieurs follicules du même groupe ont été regroupés.

La technique de l'étalement différentiel des ARNm a été validée et adaptée dans notre laboratoire (Fetni, 2001) tel que décrit par Liang & Pardee (1992) et Mou et al. (1994). Elle peut se diviser en quatre grandes étapes brièvement résumées. La première étape consiste en l'extraction et la purification des ARN totaux tel que décrit dans la section 3.2.1, puis les échantillons d'ARN totaux ont été traités à la DNase 1 (DNase 1 FPLC pure, Amersham Pharmacia Biotech) afin d'éliminer les fragments d'ADN génomique ou mitochondrial. Suite à l'analyse de la qualité des échantillons d'ARN total (section 3.2.1) pour chaque follicule (à l'exception des follicules  $\leq 4$ mm), ils ont été rassemblés par groupe de follicules correspondant à leur stade de maturation. La deuxième étape consistait en la transcription inversée (RT) des ARN messagers. Une sous-famille d'ARNm a été transformée en ADNc puisque l'on a utilisé seulement deux amorces oligo-dT ((oligo-(dT)<sub>11</sub>-GC et oligo-(dT)<sub>11</sub>-GG)) ancrées aux deux avant-derniers nucléotides précédant la queue poly-A<sup>+</sup> sur une possibilité de neuf oligo-dT. Ceci a permis de limiter les séquences obtenues et ainsi de faciliter l'analyse. La troisième étape consistait en l'amplification par PCR

radioactif des extrémités 3' des ARN messagers pour fins de visualisation des produits de PCR par autoradiographie suivant leur séparation sur gel d'acrylamide en conditions dénaturantes. Les amplifications par PCR des extrémités 3' des ADNc ont été réalisées à l'aide des amorces oligo-(dT)<sub>11</sub>-GC et oligo-(dT)<sub>11</sub>-GG en association avec l'une des 27 amorces aléatoires tel que défini au tableau I. La dernière étape consistait en la ré-amplification suivit du clonage des ADNc classifiés comme étant différentiellement exprimés. Les bandes d'ADNc ré-amplifiées et purifiées ont été clonées dans le vecteur plasmidique pGem-T (Promega, Madison, WI) et ont servi à la transformation des bactéries E. coli XL1-Blue (Stratagene) compétentes (Sambrook et al. 1989). L'ADN plasmidique (pGem-T) recombinant ainsi produit a été caractérisé par analyse de restriction et séquençage tel que décrit à la section 3.2.5.

### **3.2.2.2 Choix des ADNc différentiellement exprimés**

Sur un total de 132 ADNc différentiellement exprimés (Fetni et al., 2001), 14 étaient spécifiquement exprimés dans les follicules dominants. Six ADNc différentiellement exprimés (DDRT-27, 36, 37, 44, 46 et 65) parmi les 14 ont été sélectionnés au hasard afin de poursuivre les analyses dans le cadre de ce projet de recherche de maîtrise. La nomenclature des sondes se réfère à l'ordre de leur caractérisation. Les autres sondes ont fait le sujet d'une autre étude (Fetni, 2001).

### **3.2.3 Isolation des ADNc complets et criblage par étalement de la génothèque d'ADNc**

La technique de DDRT-PCR permet d'identifier des fragments de 150 à 500 pb à l'extrémité 3' non-codante, ces fragments d'ADNc sont donc incomplets. La portion 3' non-codante de l'ARN messenger est peu informative et présente une variabilité élevée de la séquence en nucléotides entre les diverses espèces. Il est donc nécessaire d'obtenir les séquences complètes de l'ADNc afin de permettre des analyses plus poussées. Nous avons donc procédé au criblage de la génothèque d'ADNc de phages lambda construite dans notre laboratoire (Fetni, 2001) à l'aide des six sondes précédemment définies. Cette génothèque a été construite à partir d'ARN messagers isolés de cellules de la granulosa de follicules dominants récoltés au jour 5

**Tableau I.** Définition des amorces aléatoires utilisées lors de l'amplification par PCR radioactive des extrémités 3' des ADNc.

Numéro	Oligo	Numéro	Oligo
03	ctgatccatg	18	cggataactg
04	cttgattgcc	19	ccaatgtgc
06	gctctttgtc	20	ggaaccaatc
07	cgtaagagtc	21	accctagaag
08	ctacattccg	22	tcgatacacg
09	catggagctt	23	agtgtcatgg
10	gatcggcata	24	ttccgaaccc
11	ggtactccac	25	tacctaagcg
12	gttgcgatcc	26	tggtaaaggg
13	gaccgcttgt	27	tcggcgatag
14	agccagctac	28	agccagcgaa
15	gtgcaatgag	29	caaacgggtg
16	tacaacgagg	30	gatcaatcgc
17	tcccttagc		

du cycle oestral suite aux traitements de treize vaches tel que décrit à la section 3.1. Le criblage d'une génothèque inclue les étapes suivantes : 1) l'étalement de la génothèque; 2) la synthèse des sondes radioactives d'ADNc; 3) l'hybridation et la détection des clones positifs; 4) la purification des clones positifs suivit de rondes successives de criblage; et 5) l'excision *in vivo* des bras de phage suivit de la production d'ADN de phagémide.

### 3.2.3.1 Étalement de la génothèque d'ADNc

Le titre de la génothèque d'ADNc a été déterminé dans notre laboratoire selon les protocoles standards de Lambert (1992) et Ausubel et al. (1994). Ainsi, un nombre donné de phages lambda Zap Express de la génothèque d'ADNc de cellules de la granulosa de follicules dominants (Fetni, 2001) ont servi à l'infection de

bactéries XL1-Blue MRF' (Stratagene). Les bactéries infectées par les phages ont été étalées sur des géloses contenant le milieu nutritif NZY (Difco Lab, MI, USA) de diverses grandeurs ( $4 \times 10^4$  pfu par boîte de 150 mm ou  $2 \times 10^5$  pfu par contenant de 23 x 23 cm; pfu: plaque forming unit) et incubées pour une période de 12 à 16 h à 37°C. Les membranes de nylon (Hybond N<sup>+</sup>; Amersham Pharmacia Biotech) ont été déposées sur les géloses pour 1 min afin de produire une réplification des colonies de phages. Les membranes de nylon ainsi que les géloses ont été marquées afin de permettre le recouvrement de la position des clones sur la gélose en fonction de la membrane de nylon. Les membranes ont ensuite été trempées dans une solution dénaturante (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) pour 2 min, suivi d'un trempage dans une solution neutralisante (1.5 M NaCl, 0.5 M Tris pH 8, 1 mM EDTA) pour 5 min et finalement dans une solution de rinçage de 2X SSC (0.3 M NaCl, 30 mM Na-citrate, pH 7) pour 30 secondes. L'ADN transféré sur la membrane de nylon y a été fixé par un traitement aux rayons ultraviolets à 150 mJoules (Gs Gene Linker, Bio-rad).

### 3.2.3.2 Synthèse des sondes radioactives d'ADNc

Les sondes radioactives d'ADNc ont été générées à partir des six ADNc sélectionnés issus de follicules dominants par la technique d'amorces aléatoires à l'aide de la trousse « T7 Quick prime kit » (Amersham Pharmacia Biotech). Les sondes d'ADNc (50 ng) ont été marquées en incorporant au milieu de marquage 50 µCi d'alpha [<sup>32</sup>P]-dCTP (NEN Life Sciences). Elles ont ensuite été purifiées de la radioactivité non incorporée sur colonne d'affinité de type « QIAquick Nucleotide Removal kit » (Qiagen, ON, Canada).

### 3.2.3.3 Hybridation et détection des clones positifs

Les membranes ont subi une étape de pré-hybridation dans une solution de 4X SET (0.6 M NaCl, 0.12 M Tris-HCl pH 7.4, 4 mM EDTA) additionné de 0.1% Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 0.2% SDS et 500 µg/ml d'héparine pendant 4 h à une température de 65°C. Les sondes d'ADN double brin marquées tel que décrit dans la section 3.2.3.2 ont été dénaturées par un traitement à la chaleur de 5 min à 100°C, puis ont été ajoutées à la solution d'hybridation de 4X SET additionné de 0.1% Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 0.2% SDS et 500

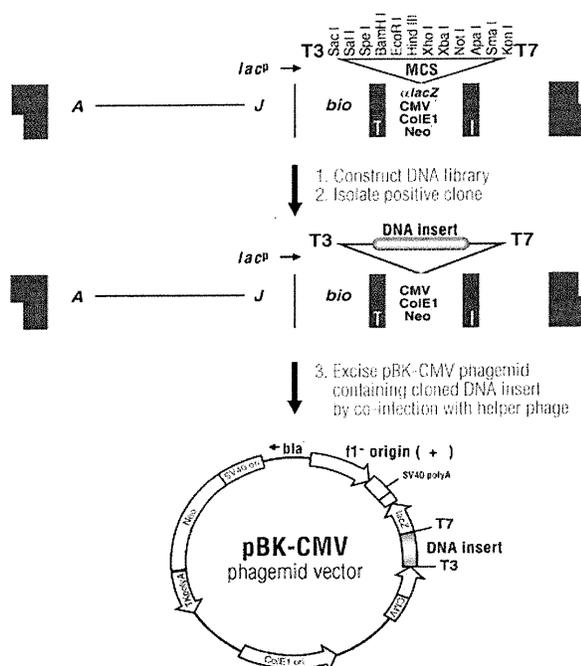
$\mu\text{g/ml}$  d'héparine. La réaction d'hybridation s'est effectuée sur une période de 14 à 16 h à une température de 48°C ou 65°C (quantité de solution d'hybridation : 100  $\mu\text{l/cm}^2$ ; concentration de la sonde :  $1 \times 10^6$  cpm/ml) dans un volume total de 20 ml. Les membranes ont ensuite subi trois périodes de lavage à une température de 65°C. Un premier lavage de 15 min dans une solution de 2X SSC (0.3 M NaCl, 30 mM Na-citrate, pH 7) et deux autres lavages de 45 min dans une solution de 0.1X SSC et 0.1% SDS. Les résultats d'hybridation ont été révélés par autoradiographie en exposant les membranes aux films autoradiographiques (Biomax-MR ; Eastman Kodak, Rochester, NY) pour une période de 12 h à -70°C à l'aide d'un écran intensifiant.

### **3.2.3.3.1 Repiquage des colonies positives obtenues et élution des phages**

Les films autoradiographiques ont été orientés en fonction des géloses respectives afin de repérer les clones positifs. Les plages de lyse positives ont été recueillies à l'aide de pipettes pasteur stériles, puis transférées dans le milieu SM (0.1 M NaCl, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.01% gélatine) afin de permettre l'élution des phages dans le SM (Ausubel et al., 1994). Les phages élués ont été entreposés à 4°C et utilisés dans une seconde ronde de criblage tel que décrit à la section 3.2.3 à afin de permettre la purification de phages contenant un seul insert d'ADNc.

### **3.2.3.3.2 Excision *in vivo* du phagémide BlueScript pBK-CMV**

La caractérisation des inserts d'ADNc contenus dans les colonies positives de phages a nécessité une étape d'excision *in vivo* afin d'éliminer l'ADN constitué des bras de phages (Webb et al., 1989) flanquant le phagémide pBK-CMV (figure 4). L'objectif de cette étape est la libération du phagémide pBK-CMV des bras de phages à l'aide du phage « Helper Ex Assist » (M13K07) afin de permettre la production de l'ADNc d'intérêt. Le protocole d'excision a été effectué tel que décrit par la compagnie Stratagene et validé dans notre laboratoire (Rabahi et al., 1999) et illustré à la figure 4.



**Figure 4.** Représentation des vecteurs de clonage utilisés dans la fabrication de la génothèque d'ADNc de cellules de la granulosa bovine. Les ADNc dérivés des ARNm de ces cellules ont été clonés dans les bras de phages lambda Zap Express (Stratagene). L'étape d'excision *in vivo* a permis d'éliminer l'ADN de phage et de recirculariser l'ADN phagémique pBK-CMV incluant l'insert d'ADNc d'intérêt.

Les phagémides pBK-CMV contenant l'ADNc d'intérêt ont servi à infecter les bactéries XL0LR pour fins d'amplification et sélection des phagémides sur une gélose sélective de kanamycine (50 µg/ml). Les colonies XL0LR résistantes à la kanamycine ont été repiquées et transférées dans un bouillon de LB contenant 10 µg/ml de kanamycine afin de permettre la croissance bactérienne. L'ADN phagémique a été extrait des bactéries par lyse alcaline (Sambrook et al., 1989) et purifié par la trousse QIAprep (Qiagen).

### 3.2.4 Séquençage et analyse des acides nucléiques

Les ADNc clonés dans les vecteurs de type plasmidique (pGem-T) ou phagémique (pBK-CMV) ont été caractérisés par digestion enzymatique afin de

connaître la taille en paires de base de l'insert d'ADNc. Les digestions ont été réalisées dans un volume total de 35  $\mu$ l constitué des éléments suivants: 1) 5 à 10  $\mu$ l de plasmide de mini-préparation d'ADN; 2) 3.5 (1X) ou 7  $\mu$ l (2X) de tampon One-phor-All (Amersham Pharmacia Biotech); 3) 0.5  $\mu$ l de chaque enzyme EcoR 1 et XhoI (pBK-CMV) ou PstI et SacII (pGem-T) ou 0.8  $\mu$ l d'un seul enzyme et 4) 17 à 25.7  $\mu$ l d'eau stérile. Les tubes ont été incubés à 37 °C pendant 2.5 h ou 16 h, puis les produits de la digestion ont été séparés sur gel de 1% d'agarose avec 0.5  $\mu$ g/ml de bromure d'éthidium dans un tampon 1X TAE (40 mM Tris-acétate, 1mM EDTA). Nous avons estimé la taille de notre insert d'ADNc en fonction des marqueurs de poids moléculaires 1kb ou 100 pb (Amersham Pharmacia Biotech). Les inserts ont été extraits du gel (band-prep; Amersham Pharmacia Biotech). Ils ont par la suite été séquencés à l'aide de la trousse T7-Sequencing (Amersham Pharmacia Biotech) et tel que validé dans notre laboratoire (Lambert, 1992). Le développement et la disponibilité du séquençage automatique par fluorescence a été effectuée par le laboratoire d'analyse de séquences et de synthèse d'acides nucléiques de l'Université Laval (SUOCF).

Les analyses informatiques des séquences d'ADNc ont été réalisées par le logiciel Hibio MacDNASIS Pro (Hitachi Software Engineering Co.) permettant la recherche du cadre de lecture ouvert, de déduire le poids moléculaire et le point isoélectrique théoriques de la protéine et d'établir son profil hydropathique. Les analyses des acides aminés ont été réalisées par l'intermédiaire du serveur ExpPAsy Proteomics tools (<http://ca.expasy.org/tools/>). Les analyses d'homologie des séquences nucléiques ou d'acides aminés ont été réalisées dans les banques de données de GenBank à l'aide de la fonction BLAST ou Psi-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). L'analyse phylogénique des acides aminés a été réalisée à l'aide du programme Clustal W (version 1.8; Thompson et al., 1994) sur le site de l'European Bioinformatics Institute ([www.2.ebi.ac.uk/clustalw/](http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/)). L'arbre phylogénique a été construit à l'aide du même logiciel selon la méthode « nj » (« neighbor-joining »; Saitou et Nei, 1987).

### 3.2.5 Analyse d'expression de l'ARNm de SERPINE2 bovine

Un ADNc complet a été obtenu par criblage de la génothèque à l'aide de la sonde DDRT-65 et correspond à la bovine « Serine Protease Inhibitor-E2 » (SERPINE2 bovine).

#### 3.2.5.1 Analyse Northern

L'analyse Northern a été effectuée selon le protocole validé dans notre laboratoire (Houde et al., 1994; Rabahi et al., 1999; Brûlé et al., 2000). L'analyse Northern permet de définir la taille, la présence d'isoformes ainsi que les variations de la concentration en ARNm dans les divers tissus ou cellules. Les solutions ainsi que les matériaux pour l'analyse de l'ARN ont été préparés tel que décrit à la section 3.2.1, sauf pour la solution de tampon MOPS qui a été filtrée à l'aide d'un filtre de 0.22 µm plutôt que traitée au DEPC puis autoclavée. L'ARN total a été extrait tel que décrit à la section 3.2.1. Vingt microgrammes d'ARN total ont été dénaturés à 65°C pendant 5 min à l'aide d'une solution constituée de 5 µl de formaldéhyde 37%, de 15 µl de formamide et de 3 µl de tampon 10X MOPS (0.4 M MOPS pH 7, 0.1 M de Na acétate pH 7, 5mM EDTA) avant d'être déposés sur un gel dénaturant de 1% agarose contenant 0.74 M de formaldéhyde, 40 mM MOPS pH 7, 0.01 mM Na-acétate pH 7 et 0.2 mM d'EDTA. La migration par électrophorèse a été réalisée sur une période d'environ 3 h à un voltage constant de 90 volts. Le tampon de réservoir était re-circulé tout au long de l'électrophorèse. Le standard de poids moléculaire 0.24-9.5 kb (« RNA Ladder »; Life Technologies) a servi de point de comparaison pour la migration des échantillons. Suivant la migration des échantillons, le gel d'électrophorèse a été trempé dans l'eau pour une période de 30 min et les échantillons transférés par capillarité sur une membrane de nylon non chargée (Hybond; Amersham Pharmacia Biotech) pour une période de 16 h dans le tampon 10X SSPE (3M NaCl, 0.23 M NH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 17 mM EDTA). L'ARN a été fixé sur la membrane à l'aide d'un traitement aux UV (150 mJoules) puis colorée au bleu de méthylène (Herrin and Schmidt, 1988) afin de s'assurer de la qualité du transfert. Une photo de la membrane a été captée afin de quantifier l'intensité des bandes d'ARN ribosomales de 28S et 18S par numérisation à l'aide du programme NIH Image. Les

membranes ont par la suite été préhybridées puis hybridées tel que décrit à la section 3.2.3.3 sauf que la solution d'hybridation contenait 10% de dextran sulfate. Le marquage des sondes radioactives d'ADNc a été décrit à la section 3.2.3.2.

### **3.2.5.2 Analyse d'expression par RT-PCR semi-quantitatif en temps réel**

#### **3.2.5.2.1 Sélection des échantillons et récolte des cellules de la granulosa et de corps jaunes**

Des échantillons indépendants de ceux utilisés dans la technique de DDRT-PCR ont été générés pour permettre la quantification des ARNm par RT-PCR semi-quantitatif en temps réel. Cette analyse effectuée à l'aide de nouveaux échantillons de cellules de la granulosa issues de follicules et de corps jaunes a permis de vérifier si l'ADNc de SERPINE2 bovine (DDRT-65) était différentiellement exprimé. Les avantages d'une analyse par RT-PCR semi-quantitatif en temps réel résident dans sa sensibilité élevée et requiert l'utilisation de peu d'ARN total comparativement à une analyse Northern. Différents groupes de follicules et de corps jaunes ont été recueillis, soit : 1) follicules  $\leq 4$  mm de diamètre; 2) follicules dominants en pleine croissance ( $> 8-9$  mm); 3) follicules pré-ovulatoires induits à l'hCG ( $> 11$  mm); 4) corps jaunes à jour 5 du cycle oestral; 5) corps jaunes à jour 10 du cycle oestral; et 6) corps jaunes à jour 15 du cycle oestral

Les cellules de la granulosa des divers groupes de follicules ont été récoltées tel que décrit à la section 3.1.3. Les follicules de diamètre  $\leq 4$  mm ont été obtenus à partir d'ovaires d'abattoir et leurs cellules de la granulosa ainsi que les liquides folliculaires regroupés ( $n=20$  follicules par groupe). Les follicules dominants en pleine croissance et les follicules pré-ovulatoires induits à l'hCG ont été obtenus par ovariectomie suivant le traitement des animaux tel que décrit à la section 3.1.1. Leurs cellules de la granulosa et les liquides folliculaires ont été récoltés individuellement. Afin de s'assurer de la qualité des follicules en fonction de leur stade de développement, les dosages RIA d'oestradiol-17 $\beta$  et de progestérone ont été réalisés tel que décrit à la section 3.1.2 à partir des liquides folliculaires correspondants. Les corps jaunes à jour 5 du cycle oestral ont été obtenus suite à l'ovariectomie des vaches

selon les traitements décrits à la section 3.1.1. Les corps jaunes aux jours 10 et 15 du cycle oestral ont été obtenus à l'abattoir selon une classification morphologique des ovaires tel que décrit par Ireland et al. (1980). Les corps jaunes ont été disséqués du stroma ovarien puis immédiatement congelés dans l'azote liquide. L'extraction de l'ARN total des cellules de la granulosa et des corps jaunes ont été réalisés tel que décrit à la section 3.2.1.

### **3.2.5.2.2 RT-PCR semi-quantitatif en temps réel**

La quantification des ARNm isolés des cellules de la granulosa et des corps jaunes a été effectuée à l'aide de l'appareil LightCycler (Roche Molecular Biochemicals) et du marqueur fluorescent SYBR green I selon une méthode de RT-PCR en deux étapes. La première étape consistait en la rétrotranscription (RT) de 2 µg d'ARN total provenant des cellules de la granulosa et des corps jaunes. La réaction de RT a été effectuée à l'aide d'un oligo-dT tel que décrit dans la trousse Omniscript RT (Qiagen). Les ADNc ont été réalisés pour trois regroupements de petits follicules ≤ 4mm (n=20) et individuellement pour les follicules dominants (11-12 mm; n=4), les follicules pré-ovulatoires ayant reçu une dose d'hCG (11-14 mm; n=4) ainsi que les corps jaunes des jours 5 (n=3), 10 (n=3) et 15 (n=3) du cycle oestral.

La deuxième étape consistait en une réaction de PCR avec des amorces spécifiques pour les gènes SERPINE2 bovine et G3PDH bovine à l'aide de la trousse FastStart DNA master SYBR Green I (Roche Biochemicals). Les amorces pour SERPINE2 bovine (sens : 5'-tccgtgacgttgccctctgtg-3'; anti-sens: 5'-ccgtgatctccacaaccctt-3') et G3PDH (sens: 5'-tgttccagtatgattccacc-3'; antisens: 5'-tccaccaccctgttgctgta-3') ont été validées afin d'obtenir un seul produit de PCR suite à leur analyse sur gel d'agarose. Les bandes de PCR de SERPINE2 et G3PDH ont été purifiées (QIAquick gel extraction kit; Qiagen) puis quantifiées sur plaque de bromure d'éthidium (Sambrook et al., 1989) et ont servi à générer les courbes standards respectives (dilutions:  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ) pour la quantification de SERPINE2 et G3PDH. Les courbes standards spécifiques pour SERPINE2 et G3PDH ont donc

été générées à partir des mêmes fragments que ceux amplifiés dans les échantillons à analyser afin de s'assurer d'une efficacité identique d'amplification.

Les réactions de PCR ont été réalisées par groupe de 32 tubes de capillaires de façon à ce qu'une courbe standard soit incorporée à chaque analyse de PCR. Une analyse de PCR consistait en une courbe standard incluant un duplicata de chaque dilution tandis que les échantillons furent analysés en triplicata. La réaction de PCR pour chaque tube était constituée d'un volume total de 20  $\mu$ l comprenant 0.5  $\mu$ l d'enzyme FastStartTaq DNA polymérase, 0.5  $\mu$ M d'amorce sens, 0.5  $\mu$ M d'amorce anti-sens, 3mM de  $MgCl_2$ , 2  $\mu$ l du produit de réaction de RT diluée à 1:4 et 0.5 X du mélange SYBR green I puis le volume était complété à 20  $\mu$ l avec de l'eau traitée au DEPC. Les tubes capillaires ont été centrifugés 10 sec à 200 g (1000 RPM ; centrifugeuse de table (Eppendorf) puis transférés dans le carrousel de l'appareil LightCycler et la réaction de PCR mise en marche selon les conditions décrites au tableau II. Les produits amplifiés ont été mesurés par fluorescence suivant la dernière étape de chaque cycle de PCR afin de pouvoir analyser par fluorescence la réaction de PCR en temps réel. Les produits d'amplification ont été analysés en générant les courbes de dissociation (« melting ») par les lectures de fluorescence mesurées à chaque 0.2 sec de l'étape de dissociation selon les conditions décrites au tableau III.

**Tableau II.** Description des conditions d'amplification par PCR sur LightCycler pour l'analyse de SERPINE2 bovine et de G3PDH bovine.

Étapes	Conditions G3PDH	Conditions SERPINE2
Dénaturation	95 °C, 10 min, 20 °C/sec	95 °C, 5 min, 20 °C/sec
Cycles de PCR	95 °C, 0 sec, 20 °C/sec 63°C, 5 sec, 20 °C/sec 72 °C, 28 sec, 5 °C/sec	95 °C, 0 sec, 20 °C/sec 65 °C, 5 sec, 20 °C/sec 72 °C, 22 sec, 5 °C/sec
Lecture	89 °C, 5 sec, 20 °C/sec	86 °C, 5 sec, 20 °C/sec

**Tableau III.** Description des conditions d'analyse de dissociation sur LightCycler pour l'analyse des produits de PCR de SERPINE2 bovine et de G3PDH bovine.

Étapes	Conditions G3PDH	Conditions SERPINE2
Cycles de dissociation	95 °C, 0 sec, 20 °C/sec	95 °C, 0 sec, 20 °C/sec
	65°C, 45 sec, 20 °C/sec	65 °C, 45 sec, 20 °C/sec
	72 °C, 0 sec, 0.2 °C/sec	72 °C, 0 sec, 0.2 °C/sec
Refroidissement	40 °C, 30 sec, 20 °C/sec	40 °C, 30 sec, 20 °C/sec

Les concentrations d'ARNm de SERPINE2 et de G3PDH ont été évaluées pour chaque échantillon d'extraits de cellules de la granulosa et de corps jaune en fonction de leur courbe standard respective. Les concentrations d'ARNm de SERPINE2 ont été corrigées pour chaque échantillon selon les concentrations de G3PDH; un gène constitutivement exprimé. L'homogénéité de la variance a été vérifiée à l'aide des tests de O'Brien and Brown-Forsythe (JMP, 1989). Les ratios de SERPINE2/G3PDH ont été comparés entre les divers groupes de follicules par une analyse de variance (ANOVA) effectuée à l'aide du logiciel SAS de JMP (1989). Les différences entre les groupes de follicules et de corps jaune ont été analysées selon une comparaison multiple à l'aide du test de Tukey-Kramer (JMP, 1989). Les analyses de corrélation ont été réalisées entre les concentrations d'ARNm de SERPINE2, de G3PDH ou de leur ratio, et les concentrations en oestradiol-17 $\beta$  et en progestérone ou de leur ratio, dans les liquides folliculaires respectifs (tableau IX).

### 3.2.6 Production de la protéine recombinante SERPINE2 bovine

#### 3.2.6.1 Construction plasmidique de la protéine de fusion

Une portion de l'ADNc correspondant à la protéine SERPINE2 bovine (S<sup>12</sup> à R<sup>196</sup>) a été amplifiée par PCR afin de produire la protéine recombinante. La réaction de PCR a été réalisée à l'aide de l'oligo sens (JB-1A-Bexp: 5'-tccgtgacgttgccctctgtg-3'; tableau IV) et l'oligo antisens (JB-1A-2exp: 5'-ccgtgatctccacaaccctt-3'; tableau

IV) respectivement couplés aux sites de restriction BamH1 et EcoR1. La réaction de PCR a été effectuée sur l'ADNc cloné (phagémide pBK-CMV) de SERPINE2 bovine. Les conditions étaient les suivantes : 40 cycles de PCR (94°C, 15 sec ; 62°C, 45 sec ; 68°C, 60 sec) suivit d'un cycle à 68°C de 10 min. L'enzyme Expand High Fidelity (Roche Molecular Biochemicals) a été utilisée pour effectuer la réaction de PCR. Le fragment de 555 paires de bases (pb) a ensuite été purifié sur gel d'agarose (1.5%) contenant 0.5 µg/ml de bromure d'éthium et la bande découpée afin de récupérer l'ADN du gel à l'aide de la trousse QIAquick gel extraction kit (Qiagen). Le fragment a ensuite été cloné dans pGEM-T (Promega) puis digéré par les enzymes de restriction BamH1 et EcoR1 afin de permettre la visualisation des produits sur gel d'agarose. Le fragment de PCR a ensuite été sous-cloné dans le vecteur d'expression pGex-2T (Amersham Pharmacia Biotech) en phase de lecture à la séquence qui code pour la glutathione-S-transférase (GST), permettant ainsi l'induction de la protéine de fusion GST-SERPINE2 bovine recombinante. Un séquençage a été effectué sur le vecteur d'expression pGex-2T à l'aide de l'oligo pGex-5' afin de vérifier la construction et de s'assurer que la séquence insérée respectait le cadre de lecture de la protéine de SERPINE2 bovine.

**Tableau IV.** Liste des oligos synthétisés pour la caractérisation et l'analyse de SERPINE2 bovine.

Oligo	Séquence (5'→3')	Position (pb) ADNc SERPINE2
A-JB-1A	cctgtgcgatccatcaacg	620 à 637
A-JB-8B	cctgtgcgatccatcaacg	620 à 637
1-JB-1A	gcatcattgagtctctgaacc	1498 à 1518
JB-1A-Bexp	tccgtgacgttgccctctgtg	208 à 229
JB-1A-2exp	ccgtgatctccacaaaccctt	742 à 762
JB-1C	caggtgctgtcttattcatgg	686 à 707

### **3.2.6.2 Induction de la protéine de fusion**

Les bactéries transformées ont été mises en croissance dans 5 ml de milieu 2X YT (1.6 % tryptone, 1% d'extrait de levure, 0.5% NaCl, pH 7.0) contenant de l'ampicilline (100 µg/ml) pour une période de 12 h à 37°C. Un volume de 250 ml de milieu 2X YT contenant 100 µg/ml d'ampicilline a été inoculé à l'aide de 2.5 ml d'une culture bactérienne en phase stationnaire et mis à incuber à 37°C pour environ 4 h afin d'obtenir une croissance en phase logarithmique correspondante à une densité optique de 0.5 à 0.6 ( $DO_{600}$ ). La formation de la protéine a ensuite été induite par l'ajout de 0.1 mM d'IPTG et l'incubation s'est poursuivie pour une période de 5 h à 37°C. Les bactéries ont ensuite été centrifugées (2600 g, 10 min, 4°C), le surnageant décanté et le culot bactérien conservé à -20°C.

#### **3.2.6.2.1 Production du lysat bactérien.**

Le culot de bactéries a été dégelé et resuspendu dans le tampon phosphate 1X PBS (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM  $Na_2HPO_4$ , 1.8 mM  $KH_2PO_4$ , pH 7.3) et déposé sur la glace. On y a ajouté des lysozymes (100 µg/ml) suivit d'une incubation sur glace pendant 15 min avec quelques brassages doux à toutes les 5 min. Nous avons ensuite ajouté 5 mM de DTT, 2 mM de benzamidine et 1.5 % de sarcosyl au mélange de bactéries. Le lysat bactérien a été homogénéisé par sonication à l'aide de l'appareil Branson Sonifier 450 (output 3 ; duty cycle 50%, reprises à 40 fois). Un échantillon de l'extrait protéique total a été séparé en conditions dénaturantes sur gel de 11.5% d'acrylamide (SDS-PAGE) afin d'isoler la protéine fusion. Cette dernière a été visualisée par coloration du gel au bleu de Coomassie.

#### **3.2.6.3 Purification de la protéine de fusion et récupération de la protéine recombinante**

Le lysat bactérien (section 3.2.6.2.1) a été utilisé afin d'isoler la protéine de fusion de l'extrait de protéines totales. La purification de la protéine de fusion a été effectuée sur billes de glutathione sépharose CL-4B sur une base d'affinité de la GST à la glutathione. Les billes ont été laissées en contact avec le lysat bactérien pour une période de 50 min à 4°C avec agitation suivit d'une centrifugation (950 g, 10 min,

4°C), puis le surnageant a été décanté et jeté. Les billes ont été lavées au 1X PBS à six reprises. Les billes ont été traitées à la thrombine (10 U/mg de protéine de fusion) pour une période de 14 à 16 h à la température de la pièce afin de cliver la protéine recombinante SERPINE2 bovine de la GST. Le surnageant a été séparé par électrophorèse sur un gel SDS-PAGE de 11.5% afin de permettre une deuxième étape de purification basée sur le poids moléculaire. Les protéines séparées par électrophorèse ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose de 0.45 µm (Hybond-C; Amersham ; Pharmacia Biotech) et la protéine recombinante a été visualisée par coloration au rouge Ponceau.

### **3.2.7 Production d'anticorps polyclonaux**

#### **3.2.7.1 Protocole d'immunisation du lapin**

La bande de nitrocellulose contenant la protéine recombinante a été solubilisée dans 500 µl de diméthyl sulfoxyde à 10% (DMSO) et une quantité égale d'adjuvant de Freund complet a été ajouté et homogénéisé. Le mélange a été injecté au lapin en de multiples sites dans la région sous-cutanée dorsale lors d'une première immunisation (Harlow and Lane, 1988). Des rappels avec l'adjuvant de Freund incomplet ont été injectés aux 21 jours pour un total de cinq rappels. Le sérum a été recueilli 14 jours suivant le dernier rappel, a été coagulé à 4°C durant la nuit, centrifugé (2600 g, 20 min, 4°C) puis conservé à -20°C.

#### **3.2.7.2 Validation des anticorps**

La validation des anticorps dirigés contre la protéine recombinante SERPINE2 bovine a été effectuée par analyse Western. La protéine recombinante a été récupérée tel que décrit à la section 3.2.7. et isolée sur un gel SDS-PAGE de 11.5%. Elle a ensuite été transférée sur une membrane de nitrocellulose de 0.45 µm (Hybond-C; Amersham ; Pharmacia Biotech) afin de procéder à la visualisation de la réaction de l'anticorps et de la protéine.

L'immunodétection a été réalisée selon Harlow et Lane (1988). Les sites non-spécifiques ont été bloqués à l'aide d'un tampon TBS (10 mM Tris-HCl, 150 mM

NaCl pH 7.5) additionné de 0.2% Tween 20 pendant 2 h. Les anticorps anti-SERPINE2 recombinante dilués à 1:5000 dans un tampon TBS (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5) additionné de 0.1 % Tween 20 ont été mis en contact avec la membrane contenant les protéines adsorbées pour une période de 6 h à 4°C. Le complexe antigène/premier anticorps a été révélé à l'aide d'un anticorps polyclonal de chèvre couplé à la « horseradish peroxidase » (« goat anti-rabbit IgG linked with horseradish peroxidase antibody, H and L chains, human serum adsorbed » ; Life Technologies, Burlington, ON, Canada) à une dilution de 1 :2500 pour une période de 2 h à la température de la pièce. Le substrat de révélation de chemiluminescence NEN (NEN Life Science Products Inc., Boston, MA) a été utilisé pour visualiser les complexes.

### **3.2.8 Analyses de l'expression de la protéine SERPINE2**

#### **3.2.8.1 Observations immunohistochimiques**

Les études de localisation immunohistochimiques de SERPINE2 ont été effectuées sur différentes coupes de tissus bovins provenant de l'abattoir et fixés à la formaline tamponnée (3.7 % formaldéhyde, 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 64 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.2). Les tissus imprégnés de paraffine ont été coupés à une épaisseur de 8 µm et montés sur des lames histologiques Superfrost Plus (Fisher Scientific, ON). Ils ont ensuite subi un déparaffinage et une réhydratation. Les coupes histologiques ont ensuite été traitées comme décrit précédemment afin de révéler les antigènes tissulaires (Rabahi et al., 1999 ; Brûlé et al., 2000). Les tissus ont été incubés pour une période de 14 h à 4°C aux anticorps anti-SERPINE2 bovine recombinante (dilués 1:50) dans un tampon 10 mM Tris contenant 1% BSA et 1% de lait écrémé en poudre. Les complexes ont été révélés à l'aide d'un anticorps monoclonal de souris (dilué à 1 :100) couplé à la phosphatase alcaline (incubation de 2 h, température de la pièce). Le substrat nitro blue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (NBT/BCIP ; Roche Molecular Biochemicals) a été utilisé afin de visualiser les complexes. Les photos des coupes histologiques ont été réalisées sur un microscope optique Nikon E800 (Nikon DXM 1200) couplée à une caméra digitale à haute

résolution. Les images ont été captées par ordinateur puis montées dans les logiciels de présentation Photoshop et Illustrator.

### **3.2.8.2 Comparaison des concentrations de SERPINE2 bovine dans les liquides folliculaires**

La comparaison de l'expression de SERPINE2 bovine dans les liquides folliculaires des différents groupes de follicules déterminés à la section 3.2.5.2.1 ont été effectuées par analyse Western. La concentration en protéines des liquides folliculaires a été déterminée par la méthode de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) en utilisant l'albumine sérique bovine (BSA) comme standard (fraction V ; Sigma). Donc, les extraits protéiques (150 µg/puit) des mêmes follicules sélectionnés pour les études de RT-PCR ont été incubés à 100°C, 5 min, puis séparés selon leur poids moléculaire sur un gel SDS-PAGE contenant 11.5% d'acrylamide à une dimension dans des conditions dénaturantes. Suivant la migration, les protéines ont été électrotransférées pendant 4 h à 4°C sur une membrane de nitrocellulose (Hybond-C, 0.45 µm ; Amersham Pharmacia Biotech) et colorées au rouge Ponceau.

L'immunodétection a été réalisée selon Harlow et Lane (1988). Les sites non-spécifiques sur membrane de nitrocellulose ont été bloqués à l'aide d'un tampon TBS (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl pH 7.5) additionné de 0.2% Tween 20 pendant 24 h. Les anticorps anti-SERPINE2 recombinante dilués à 1:1000 dans un tampon TBS (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5) additionné de 0.1 % Tween 20 ont été préalablement incubés avec une membrane de nitrocellulose seule (Hybond-C, 0.45 µm ; Amersham Pharmacia Biotech) puis mis en contact avec la membrane contenant les protéines adsorbées. Le complexe antigène/premier anticorps a été révélé à l'aide d'un anticorps polyclonal de chèvre couplé à la « horseradish peroxidase » (« goat anti-rabbit IgG linked with horseradish peroxidase antibody, H and L chains, human serum adsorbed » ; Life Technologies, Burlington, ON, Canada). Le substrat de révélation colorimétrique, 4-chloro-1-naphtol (CN) a été utilisé pour visualiser les complexes. Les signaux correspondant aux bandes des protéines sur la membrane de nitrocellulose ont été numérisés puis analysés par mesure de leur densité à l'aide du

logiciel NIH Image. Les valeurs de densité obtenues pour chaque groupe de follicules ont été comparées par analyse de variance à l'aide du logiciel SAS (JMP, 1989). La valeur de densité la plus élevée reliée au groupe des follicules dominants a été fixée à 100% et comparée aux valeurs des autres groupes.

## **4. PRÉSENTATION ET ANALYSE DES RÉSULTATS**

### **4.1 Analyse moléculaire de l'expression des gènes au cours du développement folliculaire**

#### **4.1.1 Caractéristiques morphologiques et biochimiques des follicules analysés par la technique d'étalement différentiel des ARNm**

La technique d'étalement différentiel des ARNm (DDRT-PCR) a été appliquée aux ARN totaux extraits de cellules de la granulosa de petits follicules ( $\leq 4$  mm), de follicules dominants ( $> 8-9$  mm) ou de follicules pré-ovulatoires induits à l'hCG ( $> 11$  mm). Le choix des follicules a été basé sur des caractéristiques morphologiques bien définies en fonction d'étapes importantes du développement folliculaire final. Les follicules  $\leq 4$  mm représentaient les follicules non sélectionnés pour la phase de croissance finale vers la dominance ou l'ovulation. Les cellules de la granulosa proviennent d'un pool de 40 follicules  $\leq 4$  mm récupérés à partir d'ovaires d'abattoirs. Les cellules de la granulosa de follicules dominants ( $> 9$  mm) ont été récupérées à partir du follicule dominant sélectionné au jour 5 du cycle oestral déterminé selon le suivi échographique. Les cellules de la granulosa de follicules pré-ovulatoires induits à l'hCG ont été obtenues 22 à 23 h suivant l'injection de hCG au jour 9 du cycle oestral. Les concentrations en hormones stéroïdiennes des liquides folliculaires ont été analysées individuellement pour les groupes dominants et induits à l'hCG afin de s'assurer du stade physiologique dans lequel les follicules se trouvaient lors de leur récupération. Les caractéristiques des follicules qui correspondent à chacun des groupes sont présentés au tableau V. Les caractéristiques morphologiques associées au diamètre folliculaire et au temps du cycle oestral de la récolte du follicule diffèrent en fonction du traitement de chacun des groupes. De plus, les analyses biochimiques des concentrations en hormones stéroïdiennes des liquides folliculaires soutiennent clairement que le statut physiologique des groupes de follicules choisis diffèrent. Le ratio E2/P4 est très faible pour les petits follicules ( $\leq 4$  mm), est très élevé pour les follicules dominants récupérés au jour 5 du cycle oestral tandis qu'il est également faible dans les follicules pré-ovulatoires prélevés 22 à 23 h suivant l'injection d'une dose ovulante de hCG.

#### 4.1.2 Compilations des résultats de DDRT-PCR

L'application de la technique de DDRT-PCR a permis de comparer l'expression des gènes dans les cellules de la granulosa entre les trois groupes de follicules. Afin de diminuer la variabilité de l'expression des gènes entre les animaux pour un stade folliculaire donné, les ARN totaux extraits des cellules de la granulosa de trois follicules dominants ou de deux follicules pré-ovulatoires induits à l'hCG ont été regroupés avant leur analyse par DDRT-PCR (tableau V). Les ARN totaux isolés des follicules  $\leq 4$  mm représentent un pool des ARN totaux isolés d'environ 40 follicules d'ovaires d'abattoir et prélevés sur divers animaux.

L'étalement différentiel a été réalisé à l'aide de deux oligonucléotides (dT)<sub>11</sub>GG ou (dT)<sub>11</sub>GC en combinaison avec 27 amorces aléatoires (section 3.2.2.1). La figure 5 représente les divers patrons d'expression des gènes qui ont été observés lors de la comparaison des bandes d'ADNc entre les différents groupes de follicules. On peut y observer que certaines bandes d'ADNc correspondent à des ARNm exprimés uniquement dans un groupe de follicule donné, tandis que d'autres subissent des augmentations ou des diminutions de leur expression au cours du développement folliculaire. Plusieurs bandes d'ADNc ne présentaient aucun changement de leur niveau d'expression en fonction des trois groupes de follicules. La comparaison des bandes d'ADNc entre les follicules a permis d'observer 132 bandes différentiellement exprimées. La comparaison des bandes d'ADNc entre les groupes de follicules nous a permis de classer les observations en deux groupes soit : 1) des ADNc induits comparativement à des ADNc absents, représentés par les trois premiers patrons de la figure 5; et 2) des ADNc dont l'expression est variable (de faible à élevée), représentés par le quatrième patron au septième patron d'expression. Finalement, le dernier patron d'expression représente un exemple d'ADNc non-différentiellement exprimé, c'est-à-dire les contrôles internes.

#### 4.1.3 Choix des ADNc exprimés dans les follicules dominants

Nous avons retenu les bandes d'ADNc différentiellement exprimées dans les cellules de la granulosa issues de follicules dominants lorsque comparées aux

follicules  $\leq 4$  mm ou pré-ovulatoires induits à l'hCG, afin de vérifier notre hypothèse. Les bandes d'ADNc que nous avons considérées comme étant différentiellement exprimées devaient initialement présenter la même intensité dans les duplicata par groupe de follicules ( $\leq 4$  mm, dominant, hCG-induit). Deuxièmement, nous devions retrouver des bandes d'ADNc d'intensité similaire dans tous les groupes de follicules (figure 5), ce qui représentait les contrôles internes. Ainsi, quatorze bandes d'ADNc ont donc été retenues provenant du groupe de follicules dominants. Ces bandes d'ADNc ont été réamplifiées par PCR non radioactive, séparées sur gel d'agarose et clonées dans le plasmide pGEM-T. Ces derniers ont été utilisés pour la transformation de bactéries XL1-Blue compétentes. Les colonies bactériennes arborant un plasmide recombinant ont été utilisées pour la production d'ADN afin de permettre : 1) la caractérisation de leur insert par digestion enzymatique ; 2) la production de leur ADN pour fins de séquençage manuel et/ou automatique ; 3) ainsi que la production de sondes pour le criblage de la génothèque d'ADNc de cellules de la granulosa issues de follicules dominants. Dans le cadre de ce projet, six sondes choisies au hasard (27, 36, 37, 44, 46, 65) ont été utilisées pour le criblage de la génothèque, les autres ayant fait le sujet d'une autre étude. Les séquences ainsi que les profils d'expression des sondes lors du DDRT-PCR sont décrits au tableau VI et la figure 6.

Les recherches d'homologies des séquences correspondant aux bandes d'ADNc différentiellement exprimées (27, 36, 37, 44, 46, 65) ont été analysées par BLAST dans les bases de données NR et EST de GenBank. Afin de considérer les séquences comme homologues, les séquences devaient avoir un chevauchement d'au moins 50 pb associé à une valeur de probabilité statistique de E inférieure à  $e^{-06}$ . La valeur E représente une valeur statistique. Le programme BLAST rapporte la valeur E plutôt qu'une valeur de probabilité (P) parce qu'il est plus aisé de saisir une différence entre une valeur E de 5 comparée à 10 plutôt qu'une valeur de P de 0.993 lorsque comparée à 0.99995. Toutefois, lorsque  $E < 0.01$ , les valeurs de E et de P sont pratiquement identiques. La relation entre les valeurs E et P est définie par l'équation  $P = 1 - e^{-E}$ . Nous n'avons trouvé aucune homologie pour les clones DDRT-37 et 46 dans les banques de données GenBank

NR et EST tandis que les clones DDRT-27, 36, 44 et 65 ont révélés des séquences potentiellement homologues (tableau VII). De façon générale, lorsque les séquences bovines sont disponibles dans les banques de données, celles-ci démontrent un degré d'identité élevé tel que présenté pour le clone DDRT-65.

#### **4.1.4 Criblage de la génothèque par étalement**

L'étude de l'expression différentielle des gènes par DDRT-PCR a permis d'obtenir des fragments d'ADNc correspondant à l'extrémité 3' non-codante des ARNm. Afin de permettre l'identification de la totalité des ADNc, nous avons procédé au criblage de la génothèque de phage lambda Zap d'ADNc de cellules de la granulosa de follicules dominants. Nous avons utilisé six sondes correspondant aux clones DDRT-27, 36, 37, 44, 46 et 65. Ces sondes ont été radiomarquées individuellement puis regroupées en deux groupes de trois sondes qui ont servi pour une première ronde d'hybridation de 150 000 plages de lyse. Les plages de lyse qui ont démontré une réaction positive à l'hybridation ont été repiquées pour permettre un deuxième et un troisième criblage afin de purifier les phages recombinants et de déduire laquelle des sondes employées s'hybridait positivement au clone d'ADNc lambda Zap. La sonde d'ADNc correspondant au clone DDRT-65 s'est hybridé de manière spécifique aux inserts d'ADNc présents dans les phages lambda Zap. Ceci nous a permis d'obtenir 16 clones positifs s'hybridant à la sonde DDRT-65 que nous avons purifiés puis caractérisés. Les clones DDRT-27, 36, 37, 44 et 46 n'ont pas résulté au clonage de leur ADNc respectif, même si au total  $3 \times 10^5$  plages de lyses ont été criblées. De plus, les conditions d'hybridations et de lavage ont été changés à 48 °C, soit des conditions moins stringentes qui auraient dues favoriser l'hybridation.

#### **4.1.5 Analyse de restriction des clones d'ADNc de phage s'hybridant à l'ADNc DDRT-65**

Les ADNc clonés dans les vecteurs de type phagémique pBK-CMV dérivant de la génothèque lambda Zap et suite à l'excision *in vivo* des bras de phages, ont été caractérisés par digestion enzymatique afin de connaître la taille en paires de base de l'insert d'ADNc s'hybridant au clone DDRT-65. Les digestions ont été réalisées à l'aide des enzymes de restriction EcoR1 et Xho1, puis les

produits de la digestion ont été séparés sur gel d'électrophorèse (figure 7). Nous avons estimé la grandeur de l'insert d'ADNc à environ 2.2 kb en additionnant la bande majeure à environ 1.6 kb et la première des bandes mineures à environ 0.6 kb. Nous avons observé de légères différences dans la grandeur de l'insert parmi les 16 clones. On peut considérer que les clones 1A, 2A, 2B, 3A, 3B, 4A, 4B, 5A, 5B, 6A, 7A et 7B possèdent des poids moléculaires semblables. Par contre, les clones 6B, 8A et 8B se distinguent; les clones 8A et 8B de par le poids moléculaire de la bande majeure à environ 1.6 kb tandis que les clones 6B et 8B de par la présence d'une deuxième bande à intensité moyenne observée à une hauteur d'environ 0.45 kb. À la lumière de ces observations, les séquences des clones 1A, 2A, 6A et 8B ont été obtenues. Leur analyse a révélé que les séquences correspondaient au même ADNc. Les différences observées dans le profil de digestion des divers clones résultaient de séquences de longueurs variables dans la portion 3' non-traduite (3'UTR). Les séquences en portion 5' non-traduite (5'UTR) et celles correspondant au cadre de lecture ouvert (ORF) étaient identiques.

## **4.2 Caractérisation de SERPINE2 bovine**

### **4.2.1 Caractérisation de l'ADNc de SERPINE2 bovine**

L'ADNc du clone DDRT-65 a permis d'isoler par criblage de la génothèque de cellules de la granulosa provenant de follicules dominants à jour 5 du cycle oestral un ADNc de 2096 pb (figure 8). L'analyse de cette séquence a révélé un cadre de lecture ouvert de 1191 pb. Elle code pour une protéine de 397 acides aminés ayant un poids moléculaire théorique de 43.8 kDa et un point isoélectrique théorique de 9.95. Nous retrouvons la séquence Kozak de type 9(G)-6(G)-3(A/G) précédant le codon d'initiation de la traduction suivit d'un peptide signal qui serait clivé entre S<sup>20</sup> et Q<sup>21</sup>. La portion 3' non-codante renferme deux signaux de types ATTTA reconnus comme étant des motifs de modulation de l'instabilité de l'ARNm, ainsi que deux signaux AATAAA de polyadénylation suivit de la queue poly-A<sup>+</sup>.

#### 4.2.2 Analyse d'homologie des séquences

La comparaison de la séquence de SERPINE2 bovine dans GenBank par analyse BLAST a permis de repérer les orthologues chez la souris, le rat et l'humain (figure 9). La séquence en acides aminés de SERPINE2 bovine est identique à 91.4% à la séquence humaine (M17783), à 83.1% à la séquence murine (NM-009255) et à 83.9% à celle de rat (M17784). Ces protéines portent le nom de Glia-derived nexin (GDN) chez le rat et l'humain alors que chez la souris elle porte le nom de protéase nexin-1 (PN-1).

Les analyses des acides aminés de SERPINE2 effectuées à l'aide du serveur ProSite ont révélé divers motifs consensus: 1) deux sites de N-glycosylation N<sup>118</sup> et N<sup>159</sup>; 2) le motif de signature des inhibiteurs des protéinases à sérine (<sup>370</sup>F-I<sup>380</sup>), 3) la loupe enzymatique des Serpins (reactive side chain loop; RSL; <sup>350</sup>G-W<sup>359</sup>), 4) un site de liaison à l'héparine sulfate (<sup>87</sup>G-K<sup>105</sup>), 5) le centre de clivage enzymatique (reactive center; RC; <sup>364</sup>R-S<sup>365</sup>), 5) un site de liaison au récepteur LRP (low-density lipoprotein receptor-related protein; <sup>47</sup>P-I<sup>58</sup>) et 6) un signal de ciblage vacuolaire (<sup>292</sup>I-K<sup>295</sup>). Les analyses indiquent également la présence d'un peptide signal qui se retrouve en N-terminal et serait clivé entre S<sup>20</sup> et Q<sup>21</sup> (Scott et al., 1985). Le motif de signature des Serpins ou le RSL (Wright, 1996; Irving et al., 2000; Huntington et al., 2000), le site de liaison à l'héparine sulfate (Stone et Hermans, 1995; Knauer et al., 1997a), le centre de clivage par les protéinases à sérine, le site de liaison au récepteur LRP (Knauer et al., 1997b) et le signal de ciblage vacuolaire ont démontré une substitution conservée des acides aminés entre les séquences humaine, bovine, de rat et de souris.

Nous avons donc nommé le clone DDRT-65, SERPINE2 bovine, pour « bovine serine protease inhibitor type E2 » en conformité avec la récente nomenclature proposée par Silverman et al. (2001). Par ailleurs, les sites de glycosylation N<sup>118</sup> et N<sup>159</sup> ainsi que le motif de signature des Serpins sont très bien conservés d'une espèce à l'autre. De plus, la dernière séquence décrite à la figure 9 correspond à celle du « plasminogen activator inhibitor type1 » bovin (PAI-1) qui est une antiprotéinase de la même famille que SERPINE2. Le pourcentage d'identité n'est que de 42% entre les protéines PAI-1 et SERPINE2. La

comparaison des acides aminés par analyse Clustal W a permis d'établir l'arbre phylogénique présenté à la figure 10. Les résultats démontrent que la protéine SERPINE2 bovine (AF251153) que nous avons identifiée est apparentée aux séquences orthologues humaine (M17783), de souris (NM\_009255) et de rat (M17784). Cependant, d'autres protéines bovines déjà caractérisées comme PAI-1 (P13909) et B-43 (002739) sont plus distantes de SERPINE2 bovine (AF251153) et feraient partie d'une sous-famille des Serpins. Elles représentent les paralogues de SERPINE2 bovine (AF251153).

### **4.3 Analyse de l'expression de SERPINE2 bovine**

#### **4.3.1 Analyse transcriptionnelle**

##### **4.3.1.1 Analyse Northern**

L'expression de SERPINE2 bovine a été analysée à partir d'ARN total extrait de différents tissus bovins (figure 11). Ces analyses ont révélé un transcrit unique d'environ 2.4 kb. Le signal de SERPINE2 bovine a été corrigé en fonction de l'ARN 18S pour chacun des tissus analysés et a démontré une expression variable dans les divers tissus analysés. L'expression la plus élevée a été observée dans le corps jaune puis dans l'épididyme ainsi que dans l'ovaire foetal. Une expression modérée a été notée dans l'utérus, le placentome, les testicules foetales et le cerveau.

##### **4.3.1.2 Analyse par RT-PCR semi-quantitatif en temps réel**

Des échantillons de cellules de la granulosa indépendants de ceux utilisés lors de l'analyse par DDRT-PCR ont été générés pour permettre la quantification des ARNm par RT-PCR semi-quantitatif en temps réel. Cette analyse a permis, à l'aide de nouveaux échantillons de cellules de la granulosa, d'évaluer les variations de l'expression en ARNm codant pour SERPINE2 bovine en fonction du développement folliculaire et du corps jaune au cours du cycle oestral chez la vache. Différents groupes de follicules et de corps jaunes ont été recueillis, soit : 1) follicules  $\leq 4$  mm de diamètre; 2) follicules dominants en pleine croissance ( $> 8-10$  mm); 3) follicules pré-ovulatoires induits à l'hCG ( $> 11$  mm); 4) corps jaune à jour 5 du cycle oestral; 5) corps jaune à jour 10 du cycle oestral et 6) corps jaunes à jour 15 du cycle oestral. Les cellules de la granulosa des divers groupes de follicules ont été récoltées. Afin de s'assurer de la qualité des follicules en

fonction de leur stade de développement, les dosages RIA d'oestradiol-17 $\beta$  et de progestérone ont été réalisés à partir des liquides folliculaires correspondants et les résultats sont présentés au tableau VIII. Les caractéristiques morphologiques associées au diamètre folliculaire et au temps du cycle oestral de la récolte du follicule ainsi que les concentrations en hormones stéroïdiennes des liquides folliculaires démontrent clairement que le statut physiologique des groupes de follicules diffère. Le ratio E2/P4 est très faible pour les petits follicules ( $\leq 4$  mm), est très élevé pour les follicules dominants récupérés au jour 5 du cycle oestral tandis qu'il est également faible dans les follicules pré-ovulatoires prélevés 22 à 23 h suivant l'injection d'une dose ovulante de hCG.

L'extraction de l'ARN total des cellules de la granulosa et des corps jaunes nous ont permis d'effectuer des analyses d'expression de SERPINE2 bovine. Les concentrations d'ARNm de SERPINE2 bovine et de G3PDH ont été évaluées pour chaque échantillon d'extraits de cellules de la granulosa et de corps jaune en fonction de leur courbe standard respective. Les concentrations d'ARNm de SERPINE2 bovine ont été corrigées pour chaque échantillon selon les concentrations de G3PDH, un gène constitutivement exprimé. Les ratios de SERPINE2 bovine/G3PDH ont été comparés par analyse de variance (ANOVA) entre les divers groupes de follicules et de corps jaunes (figure 12). Une concentration d'au moins six fois plus élevée de SERPINE2 bovine a été mesurée dans les extraits de cellules de la granulosa de follicules dominants comparativement aux concentrations observées dans les petits follicules et les follicules induits à l'hCG. D'autre part, une tendance plus élevée des concentrations de SERPINE2 bovine a aussi été observée dans les corps jaunes à J10 mais celle-ci n'est pas statistiquement différente des concentrations dans les corps jaunes à jour 5 ou 15 du cycle oestral.

Les analyses de corrélation ont été réalisées entre les concentrations d'ARNm de SERPINE2, de G3PDH ou de leur ratio, en rapport avec les concentrations en oestradiol-17 $\beta$  (E2), en progestérone (P4) ou de leur ratio dans les liquides folliculaires respectifs (tableau IX). Les analyses ont démontré une corrélation positive entre les concentrations en ARNm de SERPINE2, ou les

concentrations en ARNm de SERPINE2 corrigées par rapport à G3PDH, en rapport avec les concentrations de E2 ou du ratio E2/P4. Une corrélation négative a été observée entre les concentrations en ARNm de SERPINE2, ou les concentrations en ARNm de SERPINE2 corrigées par rapport à G3PDH, en rapport avec les concentrations de P4. Aucune corrélation n'a été observée entre les concentrations d'ARNm de G3PDH en rapport avec les concentrations de E2 ou de P4.

### **4.3.2 Analyse protéique de SERPINE2 bovine**

#### **4.3.2.1 Validation des anticorps**

La validation des anticorps polyclonaux dirigés contre la protéine recombinante SERPINE2 bovine (S<sup>12</sup> à R<sup>196</sup>), d'un poids moléculaire théorique de 20.1 kDa, a été effectuée par analyse Western. L'immunodétection des complexes anticorps/protéine a révélé une réaction positive entre les anticorps produits et la protéine recombinante. La figure 13 démontre une bande spécifique réagissant à 20.1 kDa, ce qui correspond au poids moléculaire théorique déduit de la séquence en acides nucléiques codant pour le fragment S<sup>12</sup> à R<sup>196</sup>.

#### **4.3.2.2 Immunolocalisation de SERPINE2 bovine**

Nous avons réalisé les observations immunohistochimiques de SERPINE2 bovine afin d'identifier sa localisation principalement associée aux divers tissus reproducteurs bovins. Les résultats ont été présentés à la figure 14. Les observations réalisées sur l'ovaire proviennent d'ovaires récupérés au troisième jour suivant l'initiation d'un traitement à la « equine chorionic gonadotropin » (eCG). La eCG possède un effet folliculo-stimulant et lutéinisant. Le traitement de stimulation ovarienne à l'eCG a été effectué afin de produire plusieurs follicules antraux sains. Une expression de SERPINE2 a été observée dans les cellules de la granulosa de follicules primordiaux et pré-antraux. Les figures 14 A à D illustrent cette expression localisée aux cellules de la granulosa et de l'ovocyte. On peut observer aux figures 14 C et D le marquage des petits follicules primordiaux et pré-antraux primaires et secondaires au niveau du cortex de l'ovaire. Les gros follicules antraux ont démontré un marquage intense associé aux cellules de la granulosa et principalement dans le liquide folliculaire (figures 14 C à E). Les

cellules de la thèque interne et externe ainsi que le stroma ovarien s'est révélé négatif. Les follicules en atresie avancée n'ont pas démontré la présence de SERPINE2. Nous avons remarqué que le plasma des veinules drainant les gros follicules antraux ainsi que ceux présents dans le hile ovarien ont aussi réagit à l'anticorps anti-SERPINE2 bovine (figures 14 G et H). Le marquage observé dans le corps jaune bovin a été de nature hétérogène (figures 14 I à K). Certaines cellules ont démontré un marquage intense péri-nucléaire avec une apparence vésiculaire (figures 14 K et L). Il nous a été impossible de savoir si le marquage était associé aux grandes ou aux petites cellules lutéales. Cet intense marquage intracellulaire contraste avec le marquage uniforme et de plus faible intensité observé pour les cellules de la granulosa. Le stroma du corps jaune était négatif. Les follicules d'ovaire de rat ont aussi démontré un patron de marquage similaire à ce qui a été observé dans les follicules bovins (figure 14 M). Les cellules de la granulosa ont présenté un marquage de faible intensité tandis que celui du liquide folliculaire était plus intense. De façon similaire, le plasma contenu dans les veinules présentes dans le hile ovarien a démontré un signal pour SERPINE2. Les corps jaunes de rat n'ont pas démontré de marquage.

Nous avons observé une immunolocalisation de SERPINE2 dans les cellules de Leydig (figures 14 O et P). Le marquage était intense et péri-nucléaire ressemblant à celui obtenu pour les cellules lutéales. Chez la souris post-pubert (2 mois), SERPINE2 a aussi été détectée dans les cellules de Leydig (figure 14 U). Aucun marquage n'a été observé dans les tubules séminifères et le stroma testiculaire chez les deux espèces. Les glandes séminales bovines ont présenté un marquage intense associé au liquide séminal sécrété (figure 14 Q et R). Un marquage de faible intensité a été observé dans les cellules épithéliales des glandes vésiculaires. Ce type de marquage observé dans les cellules épithéliales et celui du liquide séminal ressemble à celui obtenu dans les cellules de la granulosa et le liquide folliculaire, les cellules étant faiblement marquées lorsque comparées au marquage intense dans le liquide de sécrétion. Les cellules épithéliales bordant le canal épидидymaire ainsi que les sécrétions retrouvées dans la lumière de la queue de l'épididyme ont démontré une réaction positive à la présence de SERPINE2. Le tissu nerveux tel que le cervelet a été utilisé puisque d'autres

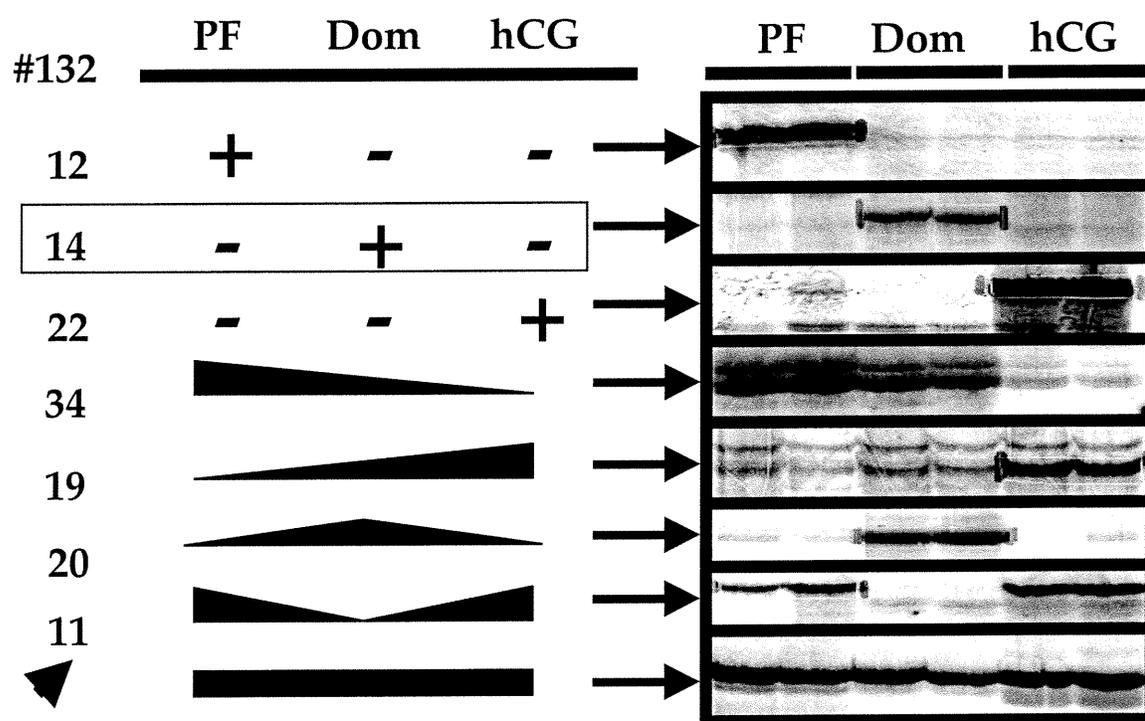
chercheurs avaient initialement identifié la présence d'orthologues à SERPINE2 dans les cellules nerveuses chez le rat et la souris. Les cellules de Purkinje bovines ainsi que leurs prolongements axonaux dans la couche moléculaire et les cellules dérivées de la glie (« glia-derived cells ») de la couche moléculaire ont démontré un signal intracellulaire pour SERPINE2.

#### **4.3.2.3 Comparaison de SERPINE2 bovine dans les liquides folliculaires**

La comparaison de la concentration de SERPINE2 dans les liquides folliculaires des différents groupes de follicules générés tel que décrit à la section 3.2.6.2.1 a également été déterminée par analyse Western (figure 15). Ces analyses nous ont permis d'établir le poids moléculaire observé de SERPINE2 bovine à 47.5 kDa. Les analyses statistiques ont révélé que l'expression de SERPINE2 bovine au cours du développement folliculaire ne change pas de façon significative. Aucune différence n'a été notée entre les petits follicules et les follicules dominants. Toutefois, le groupe induit à l'hCG a démontré une réduction de 30.5% en contenu de SERPINE2 bovine dans leur liquide folliculaire comparativement aux follicules dominants. Cette réduction n'est pas statistiquement différente, mais une tendance ( $P=0.13$ ) à la baisse a été observée.

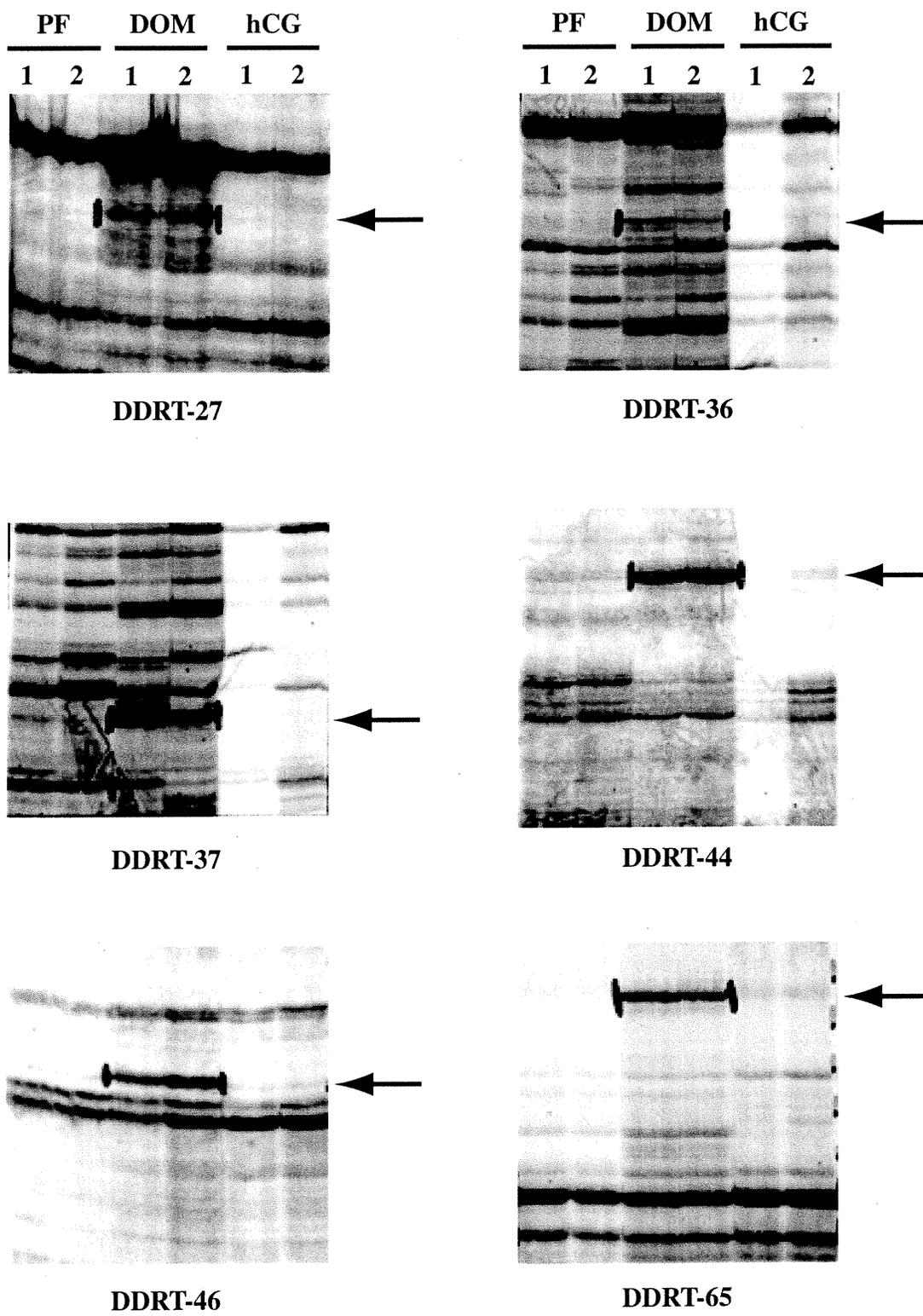
**Figure 5. Séparations sur gel d'acrylamide des produits de la DDRT-PCR.** Ils ont été obtenus en combinant un des deux oligos dT ((dT)<sub>11</sub>GG ou (dT)<sub>11</sub>GC) aux 27 amorces aléatoires. Nous avons observé 132 bandes d'ADNc associées à des patrons d'expression variables (PF : petits follicules ( $\leq 4$ mm); Dom : follicules dominants J5 ( $> 9$ mm); hCG : follicules recueillis 22 à 23 h suivant l'injection d'hCG ( $> 11$ mm)). Les chiffres précédant chaque catégorie indique le nombre de bandes d'ADNc différenciellement exprimées. La flèche signifie que plusieurs bandes ont été observées mais qu'elles n'ont pas fait l'objet d'une comptabilisation précise. Les signes « + » indiquent qu'il y a expression du gène contrairement à « - » où l'expression du gène n'est pas détectable. L'encadrement souligne le groupe de follicules utilisés pour ce projet afin de vérifier notre hypothèse.

Figure 5



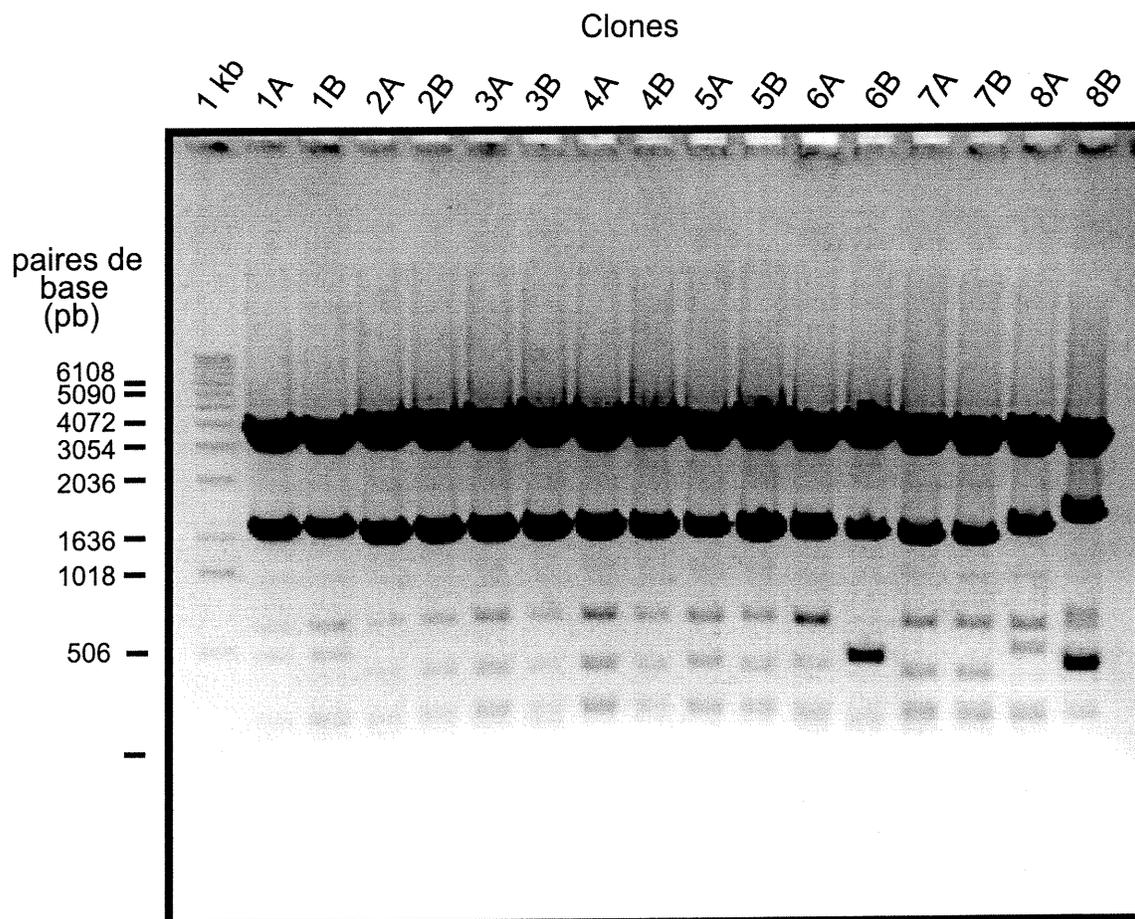
**Figure 6. Patrons d'expression des ADNc sélectionnés (27, 36, 37, 44, 46, 65) pour le criblage d'une génothèque de cellules de la granulosa provenant de follicules dominants à jour 5 du cycle oestral.** Les produits de DDRT-PCR ont été obtenus en combinant un des deux oligos dT ((dT)<sub>11</sub>GG ou (dT)<sub>11</sub>GC) aux 27 amorces aléatoires suivit de leur séparation simultanée sur un gel d'acrylamide. Les six sondes choisies au hasard correspondaient à des bandes d'ADNc différemment exprimées dans les follicules dominants (indiqué par les flèches). Les barres verticales représentent la portion de gel d'où l'ADNc a été extrait. (PF : petits follicules ( $\leq 4$ mm); Dom : follicules dominants J5 ( $> 9$ mm); hCG : follicules recueillis 22 à 23 h suivant l'injection d'hCG ( $> 11$ mm)).

Figure 6



**Figure 7. Analyse de restriction des clones des ADNc de phage s'hybridant à la sonde DDRT-65.** Les ADNc clonés 1A à 8B de la génothèque de cellules de la granulosa bovines ont été caractérisés par digestion enzymatique (EcoR1 et Xho1) afin de connaître la taille en paires de base de l'insert d'ADNc s'hybridant au clone DDRT-65. Nous avons estimé la grandeur de l'insert d'ADNc à environ 2.2 kb en additionnant la bande majeure à environ 1.6 kb et la première des bandes mineures à environ 0.6 kb. La bande localisée entre 3 et 4 kb représente le vecteur pBK-CMV.

Figure 7



**Figure 8. Séquences en acides nucléiques et aminés de SERPINE2 bovine.**

L'ADNc de SERPINE2 bovine correspond à 2096 pb dont 174 pb en 5' non-codant, un cadre de lecture ouvert de 1191 pb qui code pour une protéine de 397 acides aminés d'un poids moléculaire de 43.8 kDa et d'un point isoélectrique de 9.95. La portion 3' non-codant de 731 pb renferme deux signaux d'instabilité de l'ARNm (ATTTA ; surlignés) et deux signaux de polyadénylation (AATAAA ; soulignés).

Figure 8

```

-1 GGGCTGCCGGGCTGCGCGGCTTGTGCAGGCGCCGCCGCTTCTCTCCTCGCCGCTCTTCCT
-61 CCTCAGACTTCCCCCGCCCCGCAATACCCGGCTCCGGCTCGGGCCGCGCCGCCCCCGC
-121 GGCAGCCACCTGGGGATCACGATCGAGGGCGGTTGTCTTCCCGAAGGAACCAATGAAT
  1
  7 TGGCATTTCCTTCTCTCTGGTGGCCTCCGTGACGTGCGCTCTGTGTGTGCTCCAGTTC
  3 TrpHisPheProPhePheLeuValAlaSerValThrLeuProSerValCysSerGlnPhe
67 AACCTCTGTCTCTGGAGGAACCTCGGCTCCGACACGGGCATCCAAGTTTTCAATCAGATC
23 AsnProLeuSerLeuGluGluLeuGlySerAspThrGlyIleGlnValPheAsnGlnIle
127 GTCAAGTCCCAGCCTCATGACAACATCATCTTCTCCGATGGGATTGCGTCCGTCCTG
43 ValLysSerGlnProHisAspAsnIleIleIleSerProHisGlyIleAlaSerValLeu
187 GGGATGTACAGCTGGGAGCGGATGGCAGGACCAAGAAGCAGCTCACCACGGTGATGAGA
  63 GlyMetLeuGlnLeuGlyAlaAspGlyArgThrLysLysGlnLeuThrThrValMetArg
247 TACGGCGTGAACGGAGTCGGTAAGATGTTAAAGAAGATCAACAAGGCCATCGTCTCCAAG
  83 TyrGlyValAsnGlyValGlyLysMetLeuLysLysIleAsnLysAlaIleValSerLys
307 AAGAATAAAGACATTTGTGATGGTGGCCAACGCTGTGTTTGTGAAGAACGACTCTAAGATG
103 LysAsnLysAspIleValMetValAlaAsnAlaValPheValLysAsnAspSerLysMet
367 GAAGTGCCCTTCGTACAGGAAACAAGACGTGTCCAGTGTGAAGTCCGGAACGCGAAC
123 GluValProPheValThrArgAsnLysAspValPheGlnCysGluValArgAsnAlaAsn
427 TTCGAGGACCCGGCTCCGCTGTGCGTCCATCAACGCGTGGGTCAGGAACGAGACGCAG
143 PheGluAspProAlaSerAlaCysAlaSerIleAsnAlaTrpValArgAsnGluThrGln
487 GGTATGATCGACAGTCTGCTGTCCCAGATCTTCTCAACGGCGTCCCTCACCAGACTGGTC
163 GlyMetIleAspSerLeuLeuSerProAspLeuLeuAsnGlyValLeuThrArgLeuVal
547 CTGGTCAACGAGTGTATTTTAAGGGTTTGTGGAGATCACGGTTTCTGCCTGAGAACACC
183 LeuValAsnAlaValTyrPheLysGlyLeuTrpArgSerArgPheLeuProGluAsnThr
607 AAGAAGCGCACATTTGTGGCAGCTGACGGGAAATCCTACCAAGTGCCTATGCTGGCCAG
203 LysLysArgThrPheValAlaAlaAspGlyLysSerTyrGlnValProMetLeuAlaGln
667 CTCTCTGTGTCCGCTGCGGCTCTACAAGCACCCAGTGGCCTATGGTACAACCTTTATC
223 LeuSerValPheArgCysGlySerThrSerThrProSerGlyLeuTrpTyrAsnPheIle
727 GAGTGCCTTACCACGGCGAAAGCATCAGCATGCTGATCGCGCTGCCAACAGAGAGCTCC
243 GluLeuProTyrHisGlyGluSerIleSerMetLeuIleAlaLeuProThrSerSer
787 GTCCACTCTCGCCATTGTCCCTCACATCAGCACCAAGACCATAGACAGCTGGGTGAGC
263 ValProLeuSerAlaIleValProHisIleSerThrLysThrIleAspSerTrpValSer
847 ACCATGGTGCCCAAGCGGTGCAGGTCATCCTGCCAAGTTCACAGCCGTAGCACAGACA
283 ThrMetValProLysArgValGlnValIleLeuProLysPheThrAlaValAlaGlnThr
907 GATTTGAAGGAGCCCTGAAAGCTCCTTGGCATCACTGATATGTTTGTGATCCTAAGCGG
303 AspLeuLysGluProLeuLysValLeuGlyIleThrAspMetPheAspProSerLysAla
967 AATTTGCAAAAATAACAAGGTACAGAAAACCTTCATGTTTCTCACATCTTGCAAAAAGCA
323 AsnPheAlaLysIleThrArgSerGluAsnLeuHisValSerHisIleLeuGlnLysAla
1027 AAAATCGAAGTCAGTGAAGATGGAACCAAAGCTTCAGCAGCAACAACCTGCAATTCGATT
343 LysIleGluValSerGluAspGlyThrLysAlaSerAlaAlaThrThrAlaIleLeuIle
1087 GCAAGGTCATCACCTCCCTGGTTTATAGTAGACAGACCTTTTCTGTTTTTTCATCCGACAT
363 AlaArgSerSerProProTrpPheIleValAspArgProPheLeuPheIleArgHis
1147 AATCCTACAGGTGCTGTCTTATTCATGGGGCAGATAAACAACCCCTGAAGAATATACGGA
383 AsnProThrGlyAlaValLeuPheMetGlyGlnIleAsnLysPro***
1207 AGGAACCATGCAAAGCAAAGACTACTTTGCTATGAAGAAAAGACTCCCTTCTACATCTT
1267 TCCTAGTTCGTAAATATTTTTGTACATGACTTTCTTTTTCAAACCTAGTTCCTTAGGTT
1327 CAGAGACTCAATGATGCAGCATTTCTGTTCTGGGAGTCTTAAGTGGGGTAAAGGGCAGG
1387 ATGGTGGAACACTGTACTGAGAAATGAATAGAAAGGTTTCAAATGTCTAAAAGATTCTT
1447 TAACTACTGAGCAGTTACCTAGGTTAACAACCCCTTTGAGTATTTACTGTCAGTTCAG
1507 GATTTTGTTTTGTTTTGTATATATGTGTGGCTTTTCAGAAAAATTTAATCAGTGTGATG
1567 GGGGAGGGGAAAAAAGGACATTTTATGGTAGCTTTTACTTTTATATGAAAAAATATTA
1627 TTGCCTTTTAAAAAATTTTGGGTCTCATCCAAAGTCTTGAAGTAATCTTGCAATTAC
1687 TTTGGGGGTAGAAATAGTAAATCTTAGCTTCTTTGTGTGTTTTTGTGTGTTATTTT
1747 ATATAATGCATGTATCCACTAAAATAAAGTTTAAAAAATAATGTCTTGCTAGACAAGGT
1807 TTGCTGTTGTGCAGTGTGCCTGTCAACTACTGGTCTGTACTCTTTGGATTTGCATTTGTG
1867 TATTTTGTACAAAGTAAAAATAAAGTGTATGAGTAGTAAAAAAGAAGAAGAAG

```

**Figure 9. Comparaison de la séquence d'acides aminés de SERPINE2 bovine.**

L'analyse a été effectuée dans la banque de données GenBank NR à l'aide de la fonction Psi-BLAST. La séquence en acides aminés de SERPINE2 bovine est identique à 91.4% à la séquence humaine (M17783), à 83.1% à la séquence murine (NM\_009255) et à 83.9% à celle de rat (M17784). Ces protéines portent le nom de Glia-derived nexin (GDN) chez le rat et l'humain alors que chez la souris elle porte le nom de protéase nexin-1 (PN-1). Les points représentent les acides aminés identiques et les espaces (-) introduits permettent d'obtenir l'alignement optimal entre les séquences. Le peptide signal potentiellement clivé entre S<sup>20</sup> et Q<sup>21</sup> est indiqué par la flèche dans la région N-terminus tandis que les sites potentiels de glycosylation N<sup>118</sup> et N<sup>159</sup> sont indiqués par une étoile. Le centre catalytique (RC) est indiqué par une flèche dans la région C-terminus. Le motif de signature des SERPINs est surligné d'une boîte pleine. La « bovine plasminogen activator inhibitor type1 » (PAI-1) est une antiprotéinase de la même famille que SERPINE2 mais elle ne présente que 42% d'identité lorsque comparée à SERPINE2.

Figure 9

Bov SERPINE2	1	MNWHFPFFLVASVTLPSVCSQFNPLSLEELGSDTGIQVFNQIVKSQPHDN
Human GDN	1	....L.L..L.....I..H.....N.....R....
Rat GDN	1	.....ILTT...S..Y..L.S.....I.....E.
Mouse PN-1	1	.....ILTT...Y..H....S.....N.....I..R..E.
Bov PAI-1	5	PVFACLALGL.LIFGEGSA.YQPQSAAS.AT.F.VK..Q.V.RASKDR.
Bov SERPINE2	51	IIISPHGIASVLGMLQLGADGRTKKQLTTVMRYGVN--GVGKMLKKINKA
Human GDN	51	.V.....AM.....--....I.....
Rat GDN	51	VV.....I.....S.....N.--....V.....
Mouse PN-1	51	VVV.....I.....K.....S.....N.--....V.....
Bov PAI-1	55	VVF..Y.V....A....TTG.E.RQ.IQEA.QFKIEEK.MAPAFHRLY.E
Bov SERPINE2	99	IVSKKNKDIVMVA NAVFVK <sup>*</sup> ND SKMEVPFVTRNKDV FQCEVRNANFEDPAS
Human GDN	99	.....T.....A.EI.....V.....
Rat GDN	99	.....T.....R.GF.V...AA...E.....QSV..Q....
Mouse PN-1	99	.....T.....LR.GF.....AV.....Q.V..Q....
Bov PAI-1	105	LMGPW...EIST.D.I..QR.LELVHG.MPNFFRL.RTT.KQVD.SEVER
Bov SERPINE2	149	ACASINAWVRNETQGMIDSLSPDLLNGVLTRLVLVNAVYFKGLWRSRFL
Human GDN	149	..D.....K...RD...N.....ID.....K...Q
Rat GDN	149	..DA..F..K...R...N...N.IDSA..K.....K...Q
Mouse PN-1	149	..SE...F..K...R...N...N.ID.A..K.....K...Q
Bov PAI-1	155	..RFIV.D..KRH.K...SD..GEGA VD-Q.....L..N.Q.KMP.P
Bov SERPINE2	199	PENTKKRTFVAADGKSYQVPM LAQLSVFRCGSTSTPSGLWYNFIELPYHG
Human GDN	199	.....A.ND.....
Rat GDN	199	.....G.....S...K..N.....
Mouse PN-1	199	..S.....G.....S...R..N.....
Bov PAI-1	205	ES..HH.L.HKS..STIS...M..TNK.NYTEFT..D.RY.DIL.....
Bov SERPINE2	249	ESISMLIALPTESSVPLSAIVPHISTKTIDSWVSTMV PKRVQVILPKFTA
Human GDN	249	.....T.....I.....M.I.....
Rat GDN	249	.....T.....I.....N..MN.....M.LV.....
Mouse PN-1	249	.....T.....I...T.....MN.....M.LV.....
Bov PAI-1	255	NTL.....A.Y.KE....LTSILDAEL.SQ.KGN.TRLTRLLV....SL
Bov SERPINE2	299	VAQTDLKEPLKVLGITDMFDPSKANFAKITRSEN LHVSHILQKAKIEVSE
Human GDN	299	.....S.....
Rat GDN	299	L.....A...E..E.....S.....
Mouse PN-1	299	.....A...E..E.....T.....S.....
Bov PAI-1	305	ETEI..RR..EN..M...R..Q.D.SSFSDQ.F.Y..QA...V...N.
Bov SERPINE2	349	DGTKASAATTAILIARSSPPWFIVDRPFLFFIRHNPTGAVLFMGQINKP
Human GDN	349	.....
Rat GDN	349	....AVV.....C.....I..L..V...
Mouse PN-1	349	.....S.....I..L..V...
Bov PAI-1	355	S..L..SS.ALVVS..MA.EEI.M.....VV.....T.....VME.

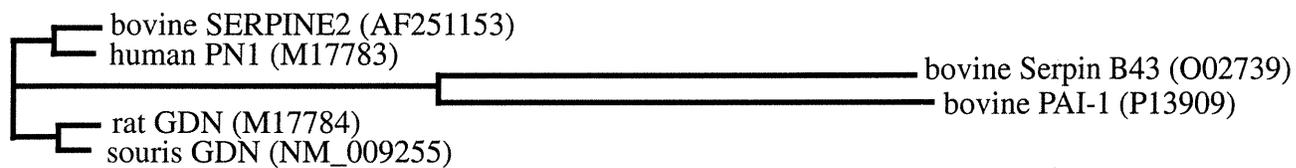
**Figure 10. Résultats de l'analyse de comparaisons des séquences d'acides aminés par Clustal Walis.** A) Chaque séquence d'acides aminés a été comparée par paire à la séquence SERPINE2 bovine (AF251153) à l'aide du logiciel Clustal Walis. La distance entre les séquences d'acides aminés est rapportée en pourcentage. B) Représentation graphique à l'échelle de l'arbre phylogénique entre les séquences AF251153, M17783, M17784 et NM\_009255 ainsi que O02739 et P13909 qui font partie de deux sous-familles distinctes.

Figure 10

A)

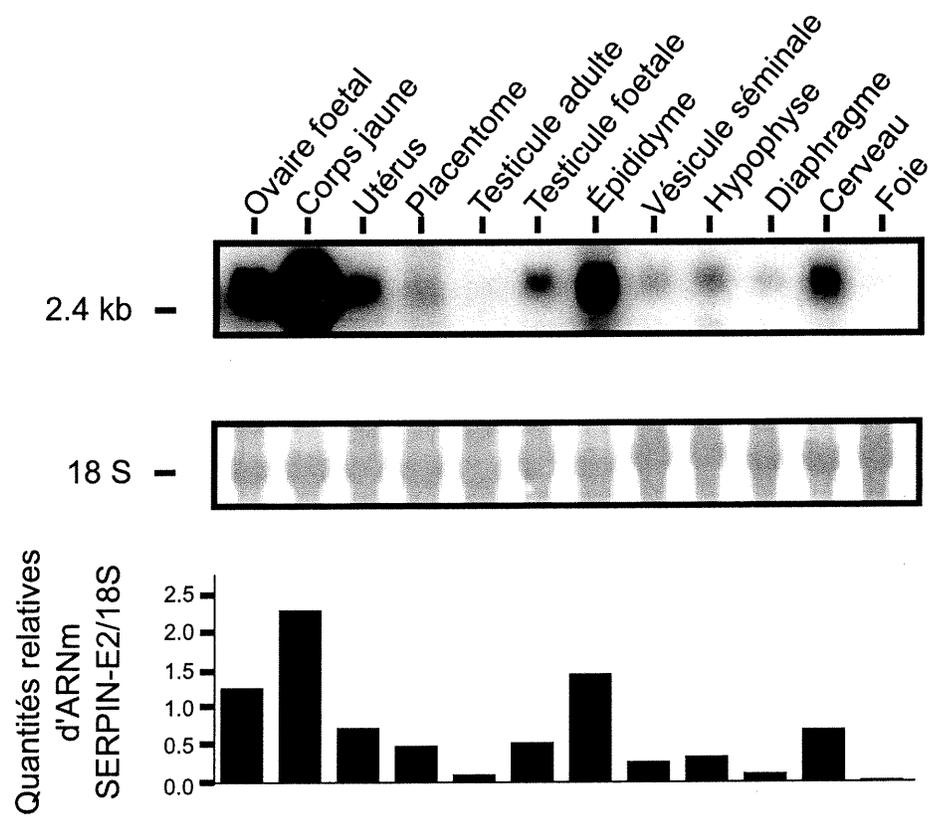
	SERPINE2 (AF251153) (% distance)
human PN1 (M17783)	8.3%
rat GDN (M17784)	16.6%
souris GDN (NM_009255)	15.8%
bovine PAI-1 (P13909)	95.7%
bovine Serpin B43 (O02739)	94.4%

B)



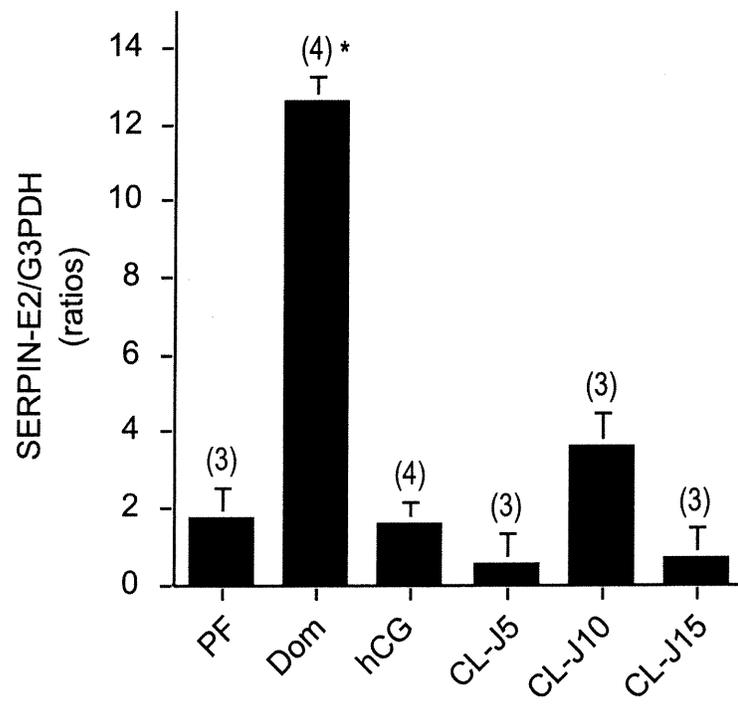
**Figure 11. Analyse Northern de SERPINE2 bovine dans divers tissus bovins.** Les ARN totaux (20  $\mu$ g) ont été analysés pour chaque tissu. Un transcrit unique d'environ 2.4 kb a été observé. Son niveau d'expression est variable dans les différents tissus analysés. On a noté l'expression la plus élevée dans le corps jaune, l'épididyme et l'ovaire foetal.

Figure 11



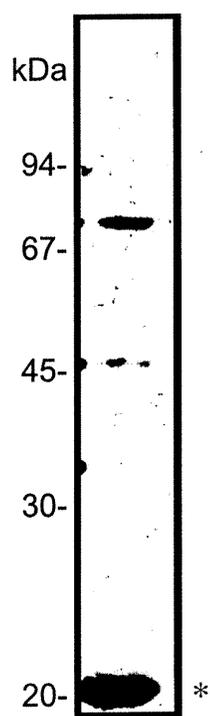
**Figure 12. Analyse d'expression de l'ARNm de SERPINE2 bovine par RT-PCR semi-quantitatif en temps réel.** Une expression d'au moins six fois plus élevée dans les follicules dominants comparativement aux petits follicules et aux follicules dominants induits à la hCG a été observée ( $P=0.0002$ ). L'expression de SERPINE2 dans les corps jaunes ne change pas de façon significative tout au long du cycle oestral. Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre d'échantillons indépendants analysés. Chaque échantillon a été analysé en triplicata en fonction de la courbe standard pour SERPINE2 ou G3PDH. (PF : petits follicules (< 4mm); Dom : follicules dominants J5 (> 9mm); hCG : follicules recueillis 22 à 23 h suivant l'injection d'hCG (> 11mm); CL-J5,J10,J15 : corps jaunes aux jours 5,10 et 15 du cycle oestral).

Figure 12



**Figure 13. La validation des anticorps dirigés contre la protéine recombinante SERPINE2 bovine.** Cette validation a été effectuée par analyse Western. L'immunodétection des complexes anticorps/protéine révèle une réaction positive entre les anticorps produits et la protéine recombinante qui possède un poids moléculaire de 20.1 kDa.

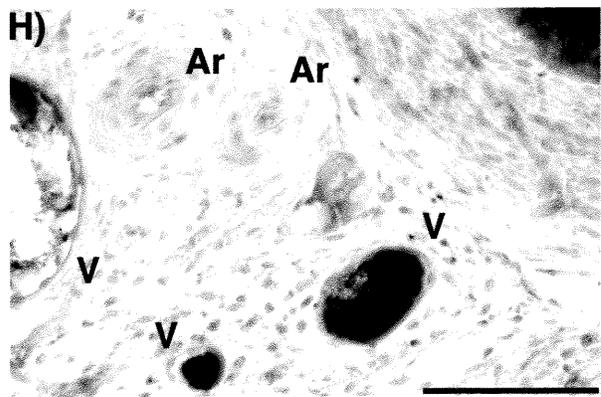
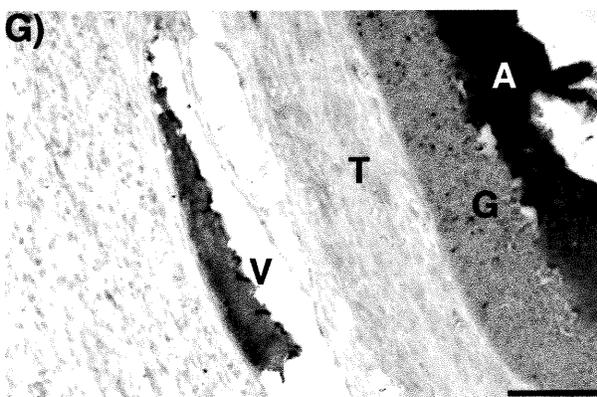
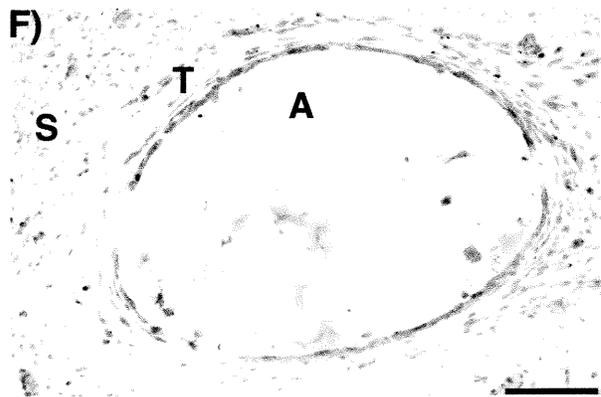
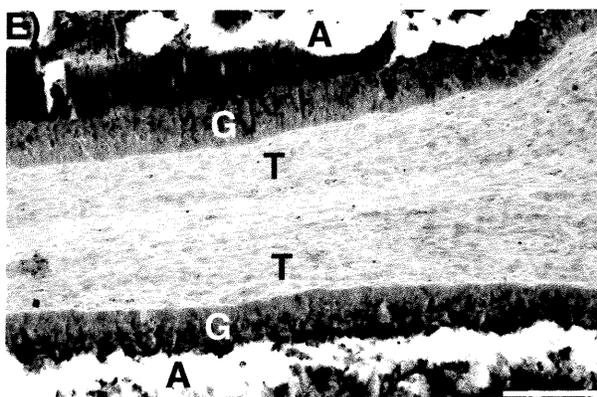
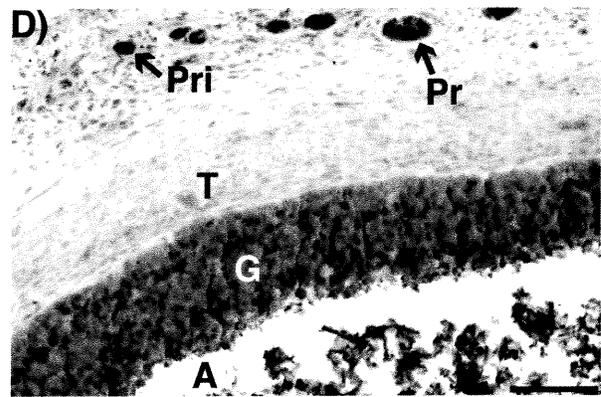
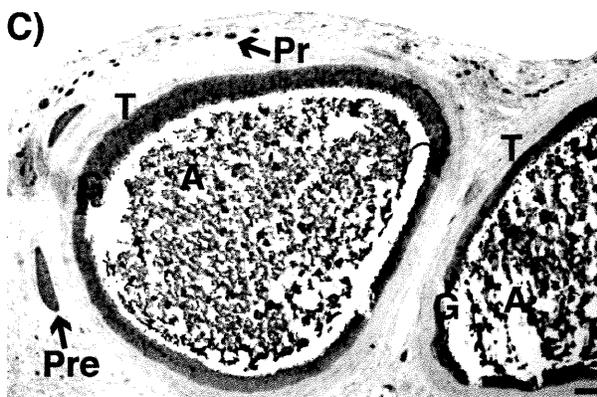
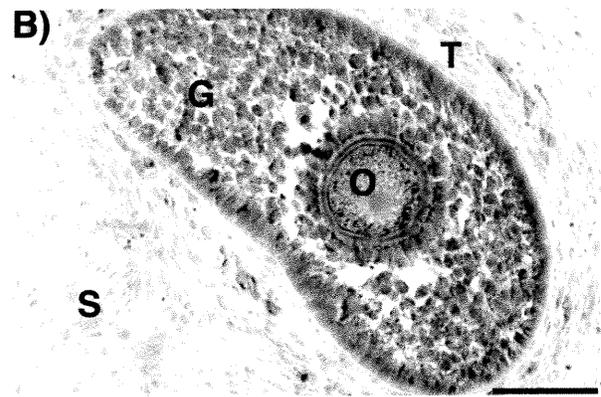
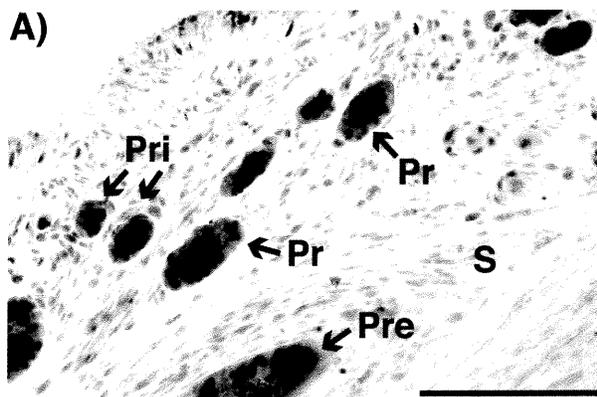
Figure 13

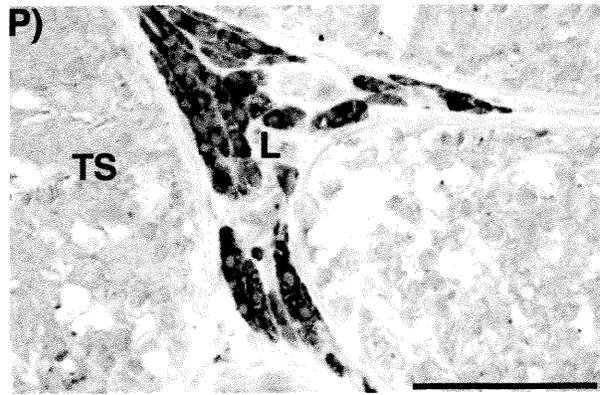
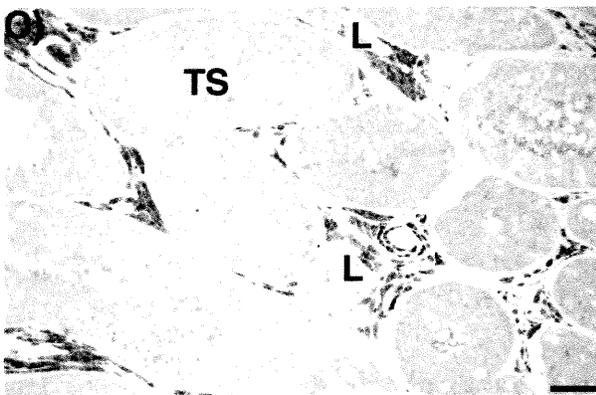
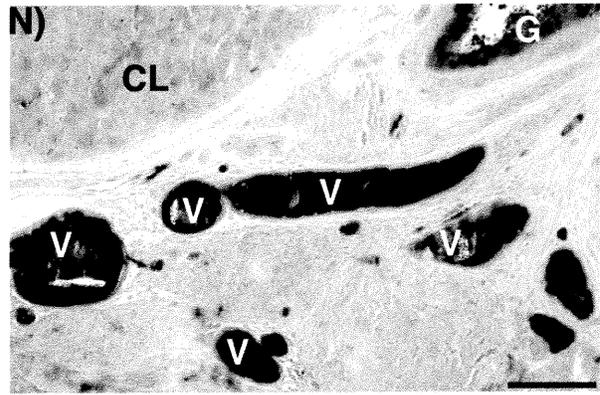
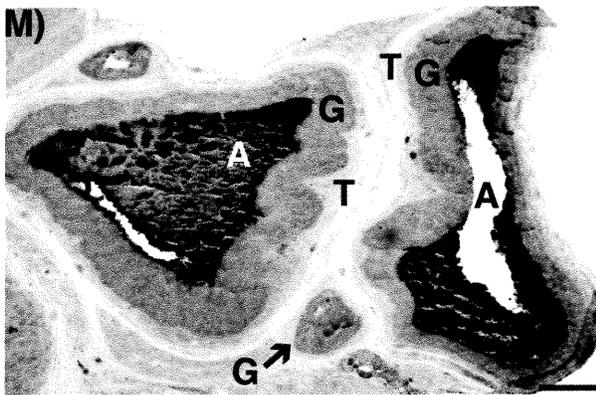
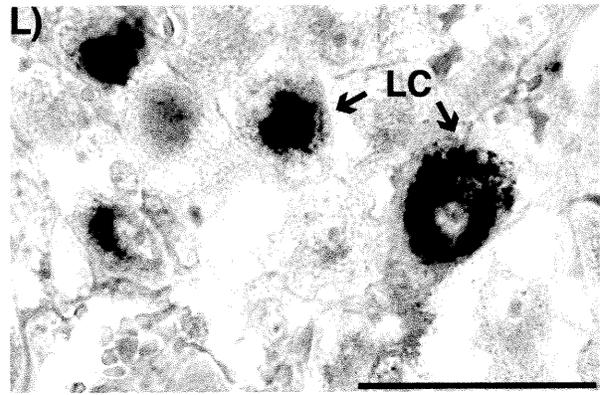
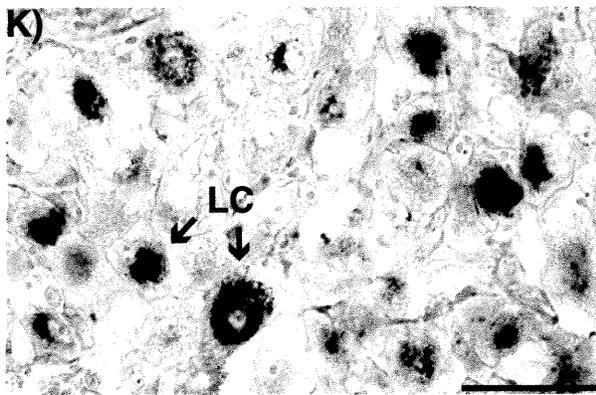
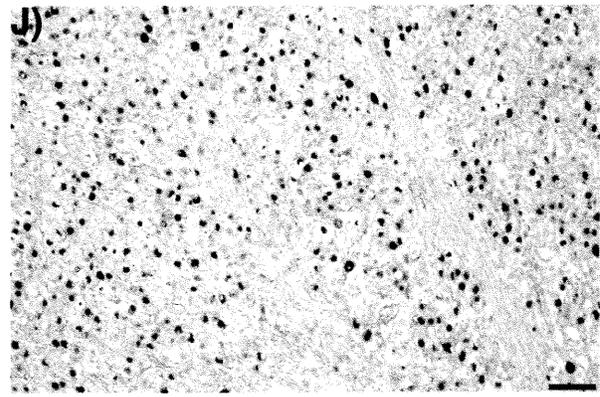
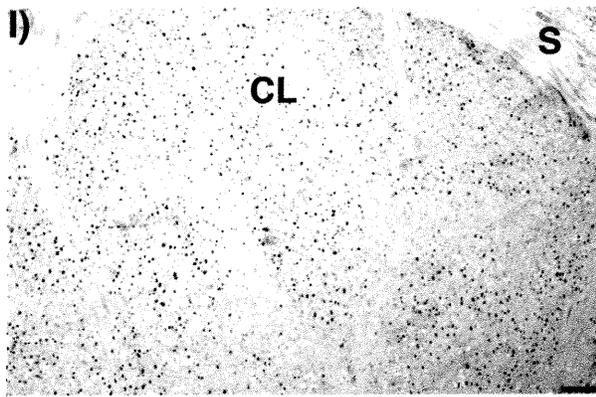


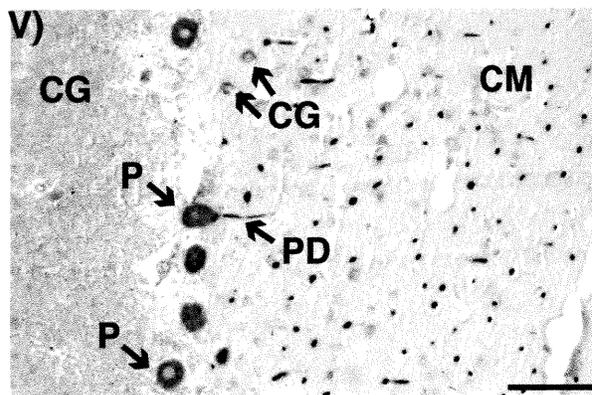
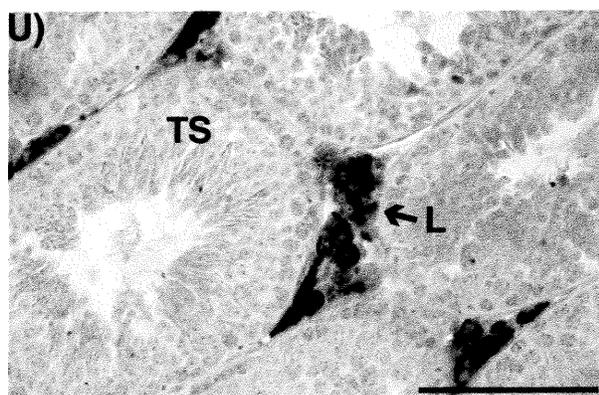
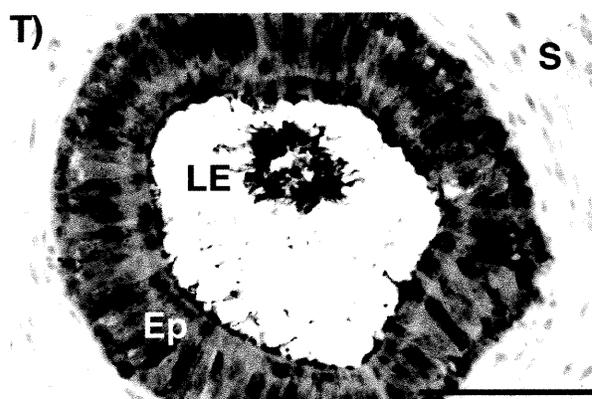
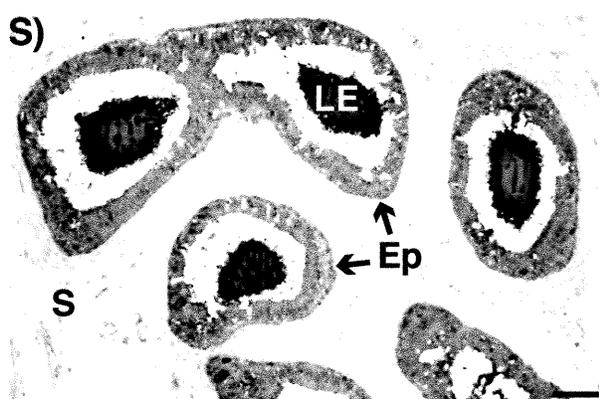
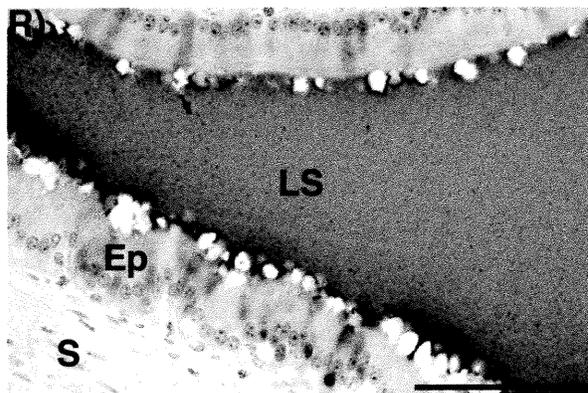
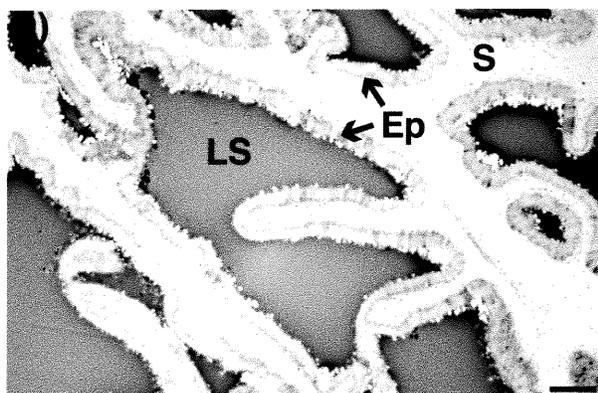
\* SERPINE2 recombinante purifiée

**Figure 14. Immunolocalisation de SERPINE2 bovine.**

Les tissus bovins ont été inclus dans la paraffine, déparaffinés puis ont été incubés avec l'anticorps levé contre le fragment S<sup>12</sup>-R<sup>196</sup> de la SERPINE2 bovine à une dilution finale de 1:50. Les complexes ont été révélés à l'aide d'un anticorps monoclonal couplé à la phosphatase alcaline dont a été ajouté le substrat NBT/BCIP. La localisation des anticorps dirigés contre la SERPIN-E2 est révélée par une coloration foncée. L'élément de mesure pour chaque figure équivaut à 0.1 mm sinon elle est spécifiée. **A)** Cortex de l'ovaire (Pri : follicule primordial; Pr : follicule primaire; Pre : follicule pré-antral; S : stroma); **B)** Follicule pré-antral (G : la granulosa; T : thèque; S :stroma); **C)** Follicules antraux (G : la granulosa; T : thèque; A : antre avec le liquide folliculaire; Pre :follicule pré-antral); **D)** Follicule antral; **E)** Follicules antraux; **F)** Follicule en atresie avancée; **G)** Follicule antral et veinule (V : veinule); **H)** Veinules du hile ovarien (V : veinule; Ar : artériole); **I)** Corps jaune (CL : corpus luteum; S : stroma); **J)** Corps jaune (); **K)** Cellules lutéales (LC); **L)** Cellules lutéales (LC); **M)** Ovaire de ratte (G : granulosa; A : antre rempli de liquide folliculaire; T : thèque); **N)** Veinules du hile ovarien chez la ratte (V : veinule ; CL : corpus luteum); **O)** Testicule (TS : tubules séminifères; L : cellules de Leydig); **P)** Testicule; **Q)** Vésicule séminale (LS : liquide séminal; Ep : cellules épithéliales des vésicules séminales; S : stroma); **R)** Vésicule séminale; **S)** Queue de l'épididyme (LE : liquide épидидymal; Ep : cellules épithéliales de l'épididyme; S : stroma); **T)** Queue de l'épididyme; **U)** Testicule de souris âgé de 2 mois (TS : tubule séminifère; L : cellules de Leydig); **V)** Cervelet (CG : couche granulaire; CM : couche moléculaire ; P : cellules de Purkinje; PD : dendrites de cellules de Purkinje; CG : cellule dérivée de la glie).

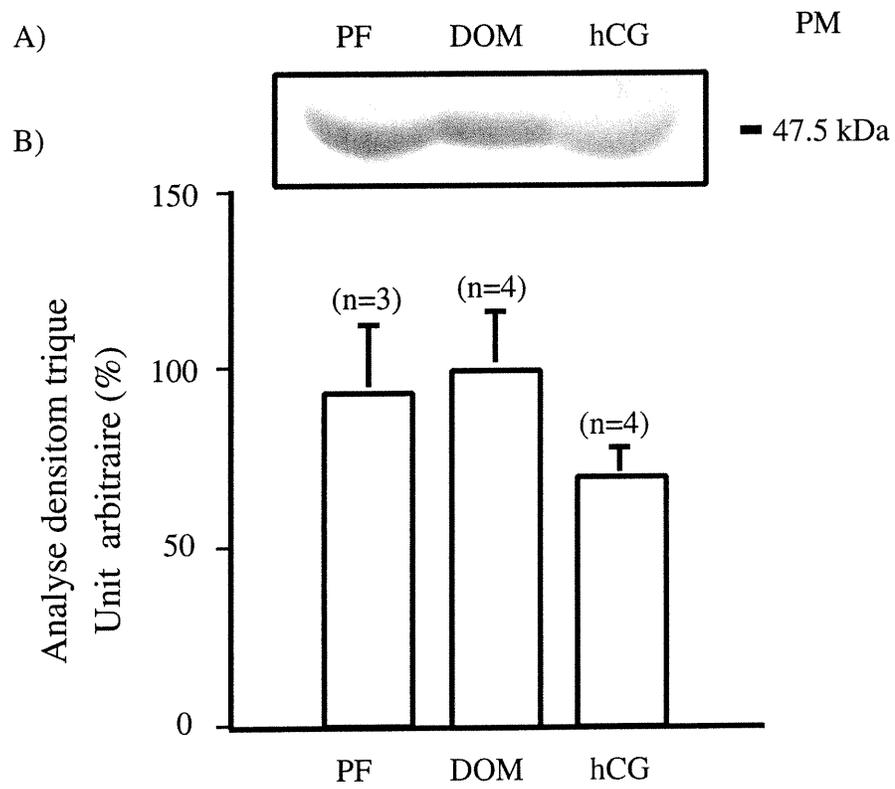






**Figure 15. Comparaison de l'expression de la protéine SERPINE2 bovine dans les liquides folliculaires par analyse Western.** Les liquides folliculaires de petits follicules  $\leq 4\text{mm}$  (PF ; n=3), de follicules dominants (Dom ; n=4) et de follicules pré-ovulatoires induits à l'hCG (hCG ; n=4) correspondent aux échantillons de follicules générés pour l'analyse par RT-PCR semi-quantitatif de l'ARNm de SERPINE2 bovine (section 3.2.6.2.1). Un exemple de résultats obtenus est illustré en A. La mesure de la densité des signaux est illustrée en B. Une tendance à la baisse de 30.5% (P=0.13) a été observée pour le groupe induit à l'hCG.

Figure 15



**Tableau V. Caractéristiques morphologiques et biochimiques des follicules utilisés lors de l'analyse d'expression des gènes par DDRT-PCR.** Les caractéristiques morphologiques et biochimiques des follicules diffèrent selon leur stade de développement. La qualité des follicules a été vérifiée par les dosages radio-immunologiques (RIA) d'oestradiol-17 $\beta$  et de progestérone à partir des liquides folliculaires correspondants. Le ratio E2/P4 est très faible pour les petits follicules (PF;  $\leq 4$  mm), est très élevé pour les follicules dominants récupérés au jour 5 du cycle oestral (Dom J5) tandis qu'il est également faible dans les follicules pré-ovulatoires prélevés 22 à 23 h suivant l'injection d'une dose ovulante de hCG.

Tableau V

<b>Origine</b>	<b>Classe</b>	<b>Diamètre (mm)</b>	<b>E2* (ng/ml)</b>	<b>P4* (ng/ml)</b>	<b>Ratio E2/P4</b>
Abattoir	PF	≤ 4 mm	<1	143.5	0.007
Vache 78	Dom J5	11.5	476	9.5	50.1
Vache 107	Dom J5	12	947.7	12.4	76.4
Vache 965	Dom J5	11	590.4	11.1	53.2
Vache 73	hCG	12	175.8	87.5	2
Vache 991	hCG	13.5	67.3	162.9	0.4

\* : concentrations en oestradiol-17 $\beta$  (E2) et en progestérone (P4) dans les liquides folliculaires.

**Tableau VI. Séquences d'acides nucléiques des ADNc correspondant aux sondes de DDRT-PCR utilisées lors du criblage (27, 36, 37, 44, 46, 65). (A : séquences obtenues par séquençage automatique en fluorescence; M : séquences obtenues par séquençage manuel).**

Tableau VI

Numéro	Séquences
<b>Clone 27 (A)</b>	gccc aaatagctgattctccaagtgaaaaagtac cctgctttgctcaaacaggatgcatcgtgttgaga tgtggctttggtttggtgctccttgcaacagtgtc ctttgtaagagtcttagcaatattgatagggtt taagaggacatgctaacatttcagattgactttg cactgttacgttgtgcattgtttaaccaaggccag gagacagtattatactgtagttatgtgtacaggtg aatgaagacgtactgagtttcctatcgaaaaaa aaaa
<b>Clone 36 (A)</b>	cgattcggataactgcacagaactgttttaactctt gagatgtggacatttatagatagcccaccagtta gtggctataggcaaagttacttttctgttgtgcat tgtctttgaaggtatcttgcctcatcctggataatg catattttcatgacagtaagataatattaatca aatcccttatgattatacagtggaaataagaaata gatttaagggactagatctgatagagtgcctgatg aactatggacagaggctcatgacattgtacaggag acagggatcaagaccattcccaaaaaaaaaaaaaa
<b>Clone 37 (A)</b>	cgattcggataactggatagccacttgagaaaaga taaaattaaatccacttcttgcctcatatacaaga ataaacaatttatcataggtctggaagcaaacat gactaaagggaccaaagagagtgataaattctt ctttaatctgagtgaaggaagggcgttctcacta tgaacaaaagtccagatgccacaaacagaatgat acgtttacataaagttgcataaaattaaaaattgt atggcaagaaccccccaaaaaaaaaaaaaa
<b>Clone 44 (A)</b>	cgattccaaatgtgctgaatgacactgaacttaag aatctataagaaaaaaatgttttatttttcttt ctagggccctatcttttatggaagtaaaagaaaat gcttaaatattttaaaatatttaactttcatagtt tctatctttgaaggtattgaaaaatataccaata tttgctagaaggtattttatttatcagaattgact cttataggacaataaaattatggttttaattgcca aaaaaaaaaaaa

<b>Clone 46 (M)</b>	aacacttcttgtttatagcacctgtgacaggtcag gaatcagcaggctcctgggtcaattcctaggtacca taagtaaaataagaagttgactggaattccctcgt ggtgcagcgggttaagtatttagcattgtcacagc taaggctgaggttcgatcctggcctggacttcaca tgctacggcatgc
<b>Clone 65 (A)</b>	tggtaaagggcaggatggtggaacactgtactgag aatgaatagaaaggtttcaaaatgtctaaaagat tctttaactactgagcagttacctaggttaacaa ccctcttgagtatttactgtccagttcaggat tgttttgttttgtttatatgtgtggcttttcagaa aaatttaatcagtgatgggggaggggaaaaaaa ggacattttatggtagcttttacttttatatgaaa aaaatattattggccttttaaaaaatttttgggt ctcatcaaagtcttgaaagtaatcttgcattact ttgggggtagaaatagtgaaatctttagcttcttt gtgtgtttttgtgtttgttattttatataatgcat gtatccactaaaataaagtttaaaaaactaatgtc ttgccaaaaaaaaaaaaaaaa

**Tableau VII. Résumé des comparaisons des séquences d'acides nucléiques obtenues pour les différents clones d'ADNc différentiellement exprimés aux séquences des bases de données GenBank (NR et EST) à l'aide du logiciel d'alignement des séquences BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).**

Tableau VII

# <sup>a</sup>	NR <sup>b</sup> EST	Comparaison dans les banques de données de GenBank NR ou EST <sup>c</sup> ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">www.ncbi.nlm.nih.gov/</a> )	Valeur E <sup>d</sup>	Id <sup>e</sup> PB/pb (%)	Gap <sup>f</sup> PB/pb (%)
		<b>Numéro d'accèsion et identification</b>			
27	NR	Aucune homologie			
27	EST	BE751212 MARC 2BOV Bos taurus cDNA 5' AW430052 MARC 4BOV Bos taurus cDNA 5'	7e-23 7e-23	57/57 (100%)	
36	NR	AC089993 Bos taurus clone RP42-553M7 BTA278907 Bos taurus partial ed1 gene for ectodysplasin A AF404302 Capra hircus sex-specific gonadal PISRT1	3 <sup>e</sup> -44 6e-42 3e-41	120/129 (93%)	
36	EST	BF231296 BARC 5BOV Bos taurus cDNA 5' AV592058 Bos taurus brain fetus Bos taurus AW313891 MARC 3BOV Bos taurus cDNA 5'	2e-48 2e-48 1e-46	125/133 (93%)	4/133 (3%)
37	NR	Aucune homologie			
37	EST	Aucune homologie			
44	NR	AC073082 Homo sapiens chromosome 2 clone RP11-310N16	1e-11	119/142 (83%)	3/142 (2%)
44	EST	Aucune homologie			
46	NR	Aucune homologie			
46	EST	Aucune homologie			
65	NR	AC073641 Homo sapiens chromosome 2 clone RP11-368E14 NM_005878 Homo sapiens trinucleotide repeat containing 3 (TNRC3) U80747 Homo sapiens CAGH3	1e-34 8e-33 8e-33	108/117 (92%)	1/117
65	EST	AV617633 Bos taurus ovary fetus Bos taurus cDNA clone E1OV012E11 3' AV595570 Bos taurus cartilage fetus Bos taurus cDNA clone E1CA020D12 3'	1e-113 1e-111	236/250 (94%)	

**Note a** : Le signe # représente le numéro correspondant aux fragments d'ADNc obtenus par DDRT-PCR.

**Note b** : Banques de données NR (all non-redundant data base of GenBank, EMBL, DDBJ, PDB sequences but no EST, STS, GSS, or HTGS sequences) et EST (expressed sequence tag; non-redundant database of GenBank, EMBL, DDBJ EST Divisions).

**Note c** : Les comparaisons ayant une valeur de  $E < 1e^{-06}$  ont été présentées, car plus la valeur de E est faible plus forte est la correspondance entre les séquences d'acides nucléiques.

**Note d** : La valeur E représente une valeur statistique. Le programme BLAST rapporte la valeur E plutôt qu'une valeur de probabilité (P) parce qu'il est plus aisé de saisir une différence entre une valeur E de 5 comparée à 10 plutôt qu'une valeur de P de 0.993 lorsque comparée à 0.99995. Toutefois, lorsque  $E < 0.01$ , les valeurs de E et de P sont pratiquement identiques. La relation entre les valeurs E et P est définie par l'équation  $P = 1 - e^{-E}$ .

**Note e** : « Id » signifie le pourcentage d'identité obtenue lorsque les séquences sont alignées. Le terme PB/pb signifie le nombre de paire de base de la séquence à comparer (PB) dérivé de l'ADNc de DDRT-PCR par rapport à la séquence cible dans la base de données (pb). Afin de simplifier la présentation de ce tableau nous avons rapporté les valeurs pour la meilleur comparaison obtenue.

**Note f** : « Gap » signifie le nombre d'espace introduit dans la séquence à analyser par rapport à la séquence cible dans la base de données afin d'obtenir un maximum d'identité. ). Afin de simplifier la présentation de ce tableau nous avons rapporté les valeurs pour la meilleur comparaison obtenue.

**Tableau VIII. Caractéristiques morphologiques et biochimiques des follicules utilisés dans le cadre de l'expérience de RT-PCR semi-quantitatif en temps réel.** Les caractéristiques morphologiques et biochimiques des follicules diffèrent selon leur stade de développement. La qualité des follicules en fonction de leur stade de développement a été vérifiée par RIA à partir des liquides folliculaires. PF : petits follicules  $\leq 4$ mm ; Dom J5 : follicule dominant à J5 du cycle oestral ; hCG : follicule pré-ovulatoire récupéré 22 à 23 h suivant l'injection de hCG.

Tableau VIII

Échantillon	Classe	E2* (ng/ml)	P4* (ng/ml)	Ratio E2/P4
Groupe 1	PF	1.1	143.53	0.008
Groupe 2	PF	<1	18.14	0.060
Groupe 3	PF	<1	101.85	0.010
Dominant #6	Dom J5	138.8	8.03	17.290
Dominant #10	Dom J5	302	15.35	19.674
Dominant #12	Dom J5	747.1	15.16	14.281
Dominant #17	Dom J5	560	8.84	63.384
hCG induit #7	hCG	94.65	214.37	0.442
hCG induit #22	hCG	140.95	161.72	0.872
hCG induit #33	hCG	170.4	265.7	0.641
hCG induit #48	hCG	55.12	202.98	0.272

\* : concentrations en oestradiol-17 $\beta$  (E2) et en progestérone (P4) dans les liquides folliculaires.

**Tableau IX. Corrélations entre les concentrations d'ARNm de SERPINE2 bovine, de G3PDH ou de leur ratio, aux concentrations en oestradiol-17 $\beta$ , en progestérone ou de leur ratio dans les liquides folliculaires.** Les analyses ont démontré une corrélation positive entre les concentrations en ARNm de SERPINE2, ou les concentrations en ARNm de SERPINE2 corrigées par rapport à G3PDH, en rapport avec les concentrations de E2 ou du ratio E2/P4. Une corrélation négative a été observée entre les concentrations en ARNm de SERPINE2, ou les concentrations en ARNm de SERPINE2 corrigées par rapport à G3PDH, en rapport avec les concentrations de P4. Aucune corrélation n'a été observée entre les concentrations en ARNm de G3PDH en rapport avec les concentrations de E2, de P4 ou de leur ratio. La valeur r représente le coefficient de corrélation de Pearson et la valeur statistique de probabilité (P) qui lui est associée.

Tableau IX

Comparaisons	r	r <sup>2</sup>	P
SERPINE2 vs E2	0.92	0.86	0.0000
SERPINE2 vs P4	-0.70	0.50	0.02
SERPINE2 vs E2/P4	0.90	0.87	0.001
G3PDH vs E2	0.47	0.22	0.14
G3PDH vs P4	-0.20	0.04	0.53
G3PDH vs E2/P4	0.24	0.06	0.46
SERPINE2/G3PDH vs E2	0.91	0.83	0.001
SERPINE2/G3PDH vs P4	-0.71	0.51	0.014
SERPINE2/G3PDH vs E2/P4	0.95	0.92	0.0000

## **5. DISCUSSION GÉNÉRALE**

### **5.1 Analyse moléculaire de l'expression des gènes au cours du développement folliculaire**

#### **5.1.1 Caractéristiques morphologiques et biochimiques des follicules analysés par la technique d'étalement différentiel des ARN messagers (DDRT-PCR)**

Le choix des follicules à analyser dans le cadre de cette expérience a été réalisé sur une base physiologique qui permet de dissocier des étapes importantes du développement folliculaire final, soit : 1) follicule non-sélectionné ( $\leq 4$  mm); 2) follicule en dominance folliculaire ( $> 9$  mm); et 3) follicule pré-ovulatoire ayant été stimulé à l'hCG ( $> 11$  mm). Le choix des échantillons biologiques initiaux ainsi que leur validation subséquente sur le plan biochimique par l'analyse des concentrations en hormones stéroïdiennes nous ont permis de répondre aux questions physiologiques initialement posées (section 2.5). La comparaison des gènes exprimés entre les petits follicules ( $\leq 4$  mm) et les follicules dominants en croissance (J5), nous permettra d'identifier les gènes qui contribuent à la croissance du follicule dominant dans un milieu où les follicules subalternes dégèrent. De plus, la comparaison des gènes exprimés dans les follicules dominants en croissance et les follicules pré-ovulatoires ayant reçu une dose ovulante d'hCG, nous permettra d'identifier les gènes qui contribuent à la modification de la paroi folliculaire pour permettre le processus d'ovulation. Tel que mentionné dans la section méthodologie, des critères morphologiques en relation au traitement et suivi échographique des vaches ont permis de générer ces divers types de follicules. De plus, les dosages des liquides folliculaires en hormones stéroïdiennes ont permis de confirmer les différences fonctionnelles entre ces groupes de follicules. Les concentrations en hormones stéroïdiennes obtenues pour les divers stades folliculaires sont en accords aux valeurs déjà publiées (Ireland et Roche, 1982a,b ; 1983; Fortune et Hansel, 1985). Les ARN totaux extraits des cellules de la granulosa provenant des divers animaux ont été regroupés avant de procéder à l'analyse par DDRT-PCR, afin de diminuer la variabilité dans l'expression des gènes entre les animaux pour un groupe de follicule donné. Nous concluons que les follicules récoltés dans le cadre de cette expérience nous ont permis de répondre aux questions biologiques précitées, car les

caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques sont en accord avec les données déjà publiées par d'autres groupes.

### 5.1.2 Compilations des résultats de DDRT-PCR

La comparaison du profil d'expression des ARNm entre les trois groupes de follicules a permis d'observer 132 bandes différentiellement exprimées associées à différents profils d'expression tel que décrit à la figure 5. Des bandes d'ADNc qui démontraient des profils d'expression différentielle ont été choisies dans les groupes de follicules dominants et hCG-induits pour fins de clonage suivit de leur caractérisation par séquençage. Les séquences de 64 ADNc clonés ont été générées puis comparées dans les banques de données GenBank NR et EST. Le nombre d'ADNc dont la séquence et la fonction demeurent inconnues à ce jour était de 37 clones sur 64, correspondant à 57.8% (Fetni et al., 2001).

Les groupes de follicules qui nous intéressent sont les follicules dominants et les follicules pré-ovulatoires induits à la hCG puisque nous souhaitons identifier les gènes qui contribuent à la croissance du follicule dominant dans un milieu où les follicules subalternes dégènèrent et à la modification de la paroi folliculaire pour permettre le processus d'ovulation. Dans le cadre de ce projet, nous nous sommes concentrés sur l'analyse de diverses bandes d'ADNc différentiellement exprimées dans les follicules dominants ayant potentiellement un rôle dans la croissance et la dominance folliculaire.

Il est important de souligner que nous avons considéré une bande d'ADNc comme étant différentiellement exprimée lorsqu'elle répondait aux trois critères suivants. Premièrement, les réactions de PCR étaient analysées en duplicata pour chaque groupe de follicule et la bande d'ADNc différentiellement exprimée devait se retrouver dans chaque duplicata. Deuxièmement, nous devons observer lors de la comparaison des duplicata entre les trois groupes de follicules, des bandes qui ne démontraient aucun changement. Troisièmement, les bandes d'ADNc différentiellement exprimées devaient avoir une taille supérieur à environ 150 pb

lorsque comparées à la migration du colorant xylène cyanol dans le gel dénaturant de 6% d'acrylamide. À l'aide de ces trois critères, les bandes d'ADNc qui démontraient des profils qualifiés d'expression de tout ou de rien, ou bien fortement augmentée ou diminuée, ont été réamplifiées, clonées puis caractérisées par séquençage. Des sondes choisies au hasard ayant un profil d'expression différentielle dans les follicules dominants ont été générées pour cribler une génothèque d'ADNc de cellules de la granulosa issues de follicules dominants à J5 du cycle oestral bovin qui a été élaborée dans notre laboratoire.

Le criblage de la génothèque d'ADNc nous permet d'isoler et de caractériser l'ADNc complet correspondant aux bandes d'ADNc différentiellement exprimées. L'objectif initial de ce projet était de caractériser les ADNc complets, correspondant aux six sondes de DDRT-PCR choisies au hasard, jugés comme étant différentiellement exprimés dans le groupe des follicules dominants. De l'ensemble des six clones d'ADNc choisis, uniquement le clone DDRT-65 a généré un signal positif lors du criblage par étalement de la génothèque. L'ADNc complet correspondant au clone DDRT-65 a permis de constater son identité au fragment différentiellement amplifié localisé en portion 3' non traduite en amont de la queue poly A+. L'étude de l'expression de ce gène en fonction du développement folliculaire a été poursuivie. Afin de connaître la taille en paires de base de l'insert d'ADNc s'hybridant au clone DDRT-65, les divers clones d'ADNc obtenus suite au criblage de la génothèque ont été caractérisés par digestion enzymatique. L'analyse de restriction a révélé des ADNc de grandeurs légèrement variables. Par contre, l'analyse des séquences a révélé qu'elles correspondaient au même ADNc malgré la disparité initialement observée suite à l'analyse du profil de digestion. Les différences observées résultaient de séquences de longueurs variables dans la portion 3' non-traduite. Les séquences en portion 5' non-traduite et celles correspondant au cadre de lecture ouvert étaient identiques.

Le faible nombre de clones d'ADNc obtenus suite au criblage de la génothèque de cellules de la granulosa à l'aide des six sondes générées par DDRT-

PCR pourrait être expliqué de deux façons. Ces résultats plutôt négatifs du criblage de la génothèque pourraient s'expliquer d'une part par la complexité de la génothèque d'ADNc de cellules de la granulosa et/ou parce que les clones d'ADNc obtenus par DDRT représentent des gènes faiblement exprimés. La qualité de la génothèque d'ADNc de cellules de la granulosa qui a été générée dans le laboratoire n'est probablement pas mise en cause puisque son analyse initiale a révélé une qualité adéquate de par la diversité et la longueur des ADNc caractérisés ainsi que la découverte de nouveaux gènes dans cette génothèque (Lussier et al., 2001). L'analyse plus poussée de l'ADNc d'un autre clone (DDRT-27 ; Fetni, 2001) suggère que la DDRT-PCR nous permette d'identifier des gènes faiblement exprimés. Il a donc été conclu que nos résultats négatifs de criblage de génothèque pourraient s'expliquer par l'identification de gènes faiblement exprimés par la DDRT-PCR et l'utilisation d'une génothèque complexe d'ADNc. La DDRT-PCR permet d'identifier les ADNc différentiellement exprimés par la caractérisation d'un fragment de 150 à 500 pb localisé en amont de leur queue polyA+. Par contre, il est nécessaire de caractériser l'ensemble de l'ADNc correspondant au fragment de DDRT-PCR isolé, car l'analyse des séquences dérivant du fragment nous renseigne peu sur l'identité de ce gène. Par exemple, l'analyse des séquences correspondant au fragment DDRT-65 n'a pas permis d'identifier les orthologues de SERPINE2 parmi les trois meilleures séquences obtenues de l'analyse par BLAST. Ces résultats s'expliquent par le fait que les séquences obtenues sont courtes et qu'elles sont localisées en portion 3' non-traduite de l'ARNm. Il est reconnu que la région 3' non-traduite est plus variable d'une espèce à l'autre que la portion codante du cadre de lecture ouvert.

## **5.2 Caractérisation de SERPINE2**

### **5.2.1 Caractéristiques structurales**

La caractérisation et l'analyse de la séquence de l'ADNc complet correspondant au clone DDRT-65 dans GenBank a permis d'identifier que cet ADNc codait pour une protéine faisant partie de la superfamille des Serpins (« serine protease inhibitor ») et plus précisément à la sous-famille de type E2 (Irving et al., 2000 ; Silverman et al., 2001). Nous avons donc nommé le clone DDRT-65, BBO

SERPINE2, selon la nomenclature proposée de la superfamille des Serpins récemment publiée par l'équipe de Silverman et al., (2001). L'acronyme BBO fait référence à l'espèce bovine. Cette nomenclature divise la superfamille des Serpins en 16 sous-classes sur la base de leurs relations phylogéniques (Irving et al., 2000 ; Silverman et al., 2001). Les Serpins connues à ce jour y sont répertoriées.

La comparaison de la séquence BBO SERPINE2 dans GenBank a permis de repérer les orthologues chez la souris, le rat et l'humain (figure 9). La séquence en acides aminés de la SERPINE2 est identique à 91.4% à la séquence humaine (M17783), à 83.1% à la séquence murine (NM\_009255) et à 83.9% à celle de rat (M17784). Il est reconnu qu'un pourcentage d'identité de deux protéines au-dessus de 40% fait en sorte que ces protéines sont apparentées (Sanchez et Sali, 1998). Ces protéines sont regroupées sous le nom de SERPINE2 selon la nouvelle nomenclature. Initialement ces protéines portaient le nom de « Glia-derived nexin » (GDN) chez le rat et l'humain puisque cette antiprotéinase a tout d'abord été caractérisée dans le système nerveux où elle a été associée à la croissance des neurites (Monard et al., 2000), alors que chez la souris elle portait le nom de protéase nexin-1 (PN-1) (Hagglund et al., 1996). Les analyses des acides aminés de SERPINE2 effectuées à l'aide du serveur ProSite ont révélé divers motifs consensus révélateurs des fonctions potentielles de SERPINE2 et bien conservés entre les espèces. Le motif de signature des Serpins (RSL; Wright, 1996; Irving et al., 2000; Huntington et al., 2000), le site de liaison à l'héparine sulfate (Stone et Hermans, 1995; Knauer et al., 1997a), le centre de clivage par les protéinases à sérine (RC), le site de liaison au récepteur LRP (Knauer et al., 1997b) et le signal de ciblage vacuolaire ont démontré une substitution conservée des acides aminés entre les séquences humaine, bovine, de rat et de souris.

La dernière séquence décrite à la figure 9, qui correspond à celle de PAI-1/SERPINE1, ne démontre que 42% d'identité avec la SERPINE2 bovine. Les analyses phylogéniques présentées à la figure 10 vont dans le même sens. Les résultats démontrent que la protéine bovine SERPINE2 (AF251153) que nous avons identifiée est apparentée aux séquences orthologues humaine (M17783), de souris

(NM-009255) et de rat (M17784). Cependant, les autres protéines bovines déjà caractérisées comme PAI-1/SERPINE1 (P13909) et B-43 (O02739) sont plus distantes de SERPINE2 (AF251153) et feraient partie d'une autre sous-famille des Serpins. Elles représentent les paralogues de la SERPINE2 (AF251153). La protéine B-43 est une autre Serpin bovine purifiée et caractérisée dans le cerveau bovin et elle possède des propriétés biochimiques différentes de PN1-/GDN (SERPINE2) (Nishibori et al., 1995).

Des analyses Western (figure 15) effectuées à l'aide des anticorps polyclonaux contre la protéine recombinante SERPINE2 (portion de l'ADNc correspondant au fragment protéique S<sup>12</sup> à R<sup>196</sup>) nous ont permis d'établir le poids moléculaire observé de SERPINE2 à 47.5 kDa. Cette valeur est cohérente à celle de 47 kD obtenue par d'autres auteurs avec PN-1 (Scott et Baker, 1983 ; Scott et al., 1985). Ce résultat diffère de la valeur théorique que nous avons initialement calculée par analyse informatique qui était de 43.8 kDa pour l'ADNc complet de SERPINE2 et de 41.6 kDa pour l'ADNc excluant le peptide signal. Nous avons démontré par immunohistochimie que la SERPINE2 est sécrétée dans le liquide folliculaire (section 4.3.2.2), ce qui suggère que son peptide signal en NH<sub>2</sub>-terminal soit clivé. La différence entre le poids moléculaire théorique et celui observé serait d'environ 5.9 kDa. Cette différence pourrait s'expliquer par une glycosylation sur les résidus N<sup>118</sup> et/ou N<sup>159</sup>. Afin de prouver que SERPINE2 est glycosylée, il serait nécessaire de réaliser un traitement à l'endoglycosidase H de SERPINE2 retrouvée dans le liquide folliculaire suivi d'une analyse Western.

### **5.2.2 La superfamille des Serpins**

Les Serpins (serine protease inhibitor) constituent une superfamille de protéines inhibitrices des protéinases à sérine. Elles sont formées d'une seule chaîne de 350 à 500 acides aminés dont la structure de repliement est conservée. Ces protéines emploient un mode d'action de substrat-suicide comme mécanisme d'inhibition (Huntington et al., 2000 ; Irving et al., 2000 ; Silverman et al., 2001). La plupart des Serpins sont des inhibiteurs des protéinases de la famille des

chymotrypsines. Par contre, d'autres fonctions ont émergé pour certaines Serpins telle la capacité d'inhiber les protéinases à cystéine (ex.: caspase 1 ; Komiyama et al., 1994). De plus, certaines Serpins ne fonctionnent pas en tant qu'inhibiteurs de protéinases mais comme transporteur hormonal des corticostéroïdes (SERPINA7, aussi nommée transcortin) et de la thyroxine (SERPINA6, aussi nommée « thyroid-binding globulin »). Certaines agissent comme des modulateurs de la pression sanguine (ex.: SERPINA8 ; Potempa et al., 1994). L'étude de la fonction biologique des Serpins est un domaine en développement, car la compréhension des mécanismes impliqués demeure incomplète (Silverman et al., 2001). La caractérisation structurale des 16 sous-familles de Serpins a permis de reconnaître que les divers membres de cette superfamille démontrent une conservation de la séquence en acides aminés ainsi que leur conformation. Quoique cette conformation soit bien conservée entre les sous-familles, ces dernières ont évolué différemment au plan fonctionnel. Le site enzymatique des Serpins (« reactive side chain loop » ; RSL) confère sa fonction d'inhibiteur à la Serpin puisque c'est le motif qui entre en contact avec la protéinase. Le RSL est un motif d'environ 17 acides aminés, qui interagit avec la protéinase via une triade catalytique constituée des résidus histidine, asparagine et sérine (Kraut, 1977). Lorsque le RSL entre en contact avec cette triade catalytique, un changement conformationnel de la Serpin provoque l'externalisation du RSL de la structure protéique tridimensionnelle et rend accessible à la protéinase son site de clivage. La protéinase clive alors le RSL en son centre catalytique (RC). Elle initie ainsi le repliement de la Serpin puis la formation d'un lien covalent entre le RSL et la triade catalytique de la protéinase. Ceci assure la formation d'un complexe stable. Ce complexe, Serpin/protéinase, est par la suite internalisé dans la cellule par endocytose soit à l'aide du récepteur LRP en association avec les héparines à la surface de la cellule (Willnow et al., 1999 ; Crisp et al., 2000 ; Strickland et al., 2002 ) ou via le récepteur de l'activateur de plasminogène de type urokinase (uPAR ; Nykjaer et al., 1997 ; Strickland et al., 2002) puis dirigé vers la voie de dégradation. C'est pourquoi on qualifie les Serpins de substrat-suicide puisqu'elles sont dégradées en même temps que la protéinase et ne sont donc pas récupérées (Knauer et al., 1997b).

### 5.2.2.1 Les Serpins au sein de l'ovaire

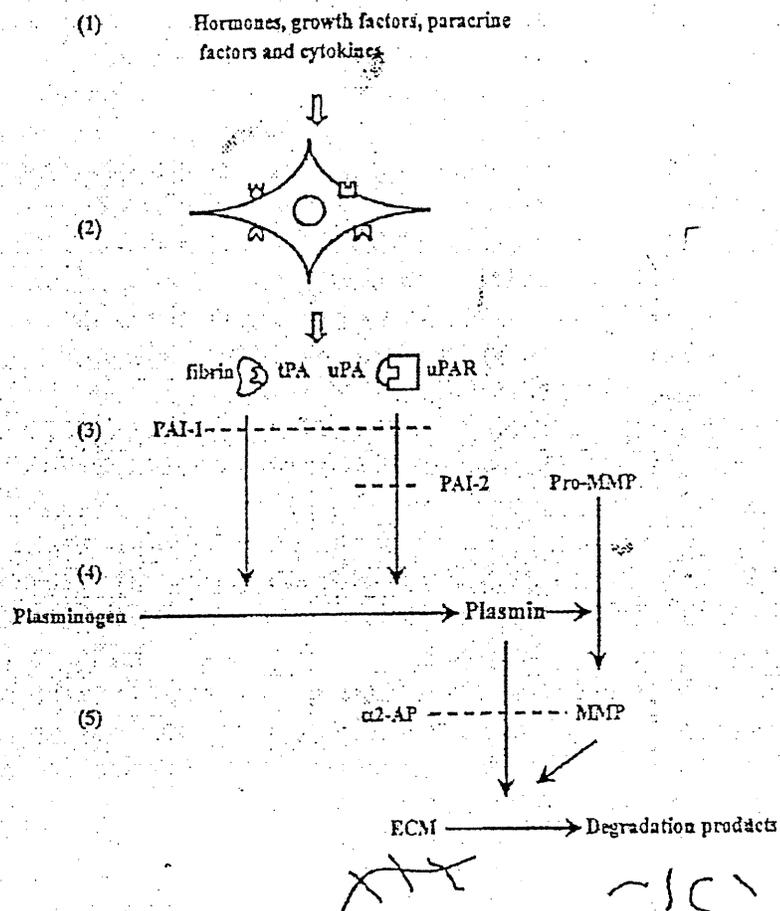
Les fonctions majeures de l'ovaire sont la production d'hormones stéroïdiennes par le follicule et le relâchement d'ovocytes matures lors de l'ovulation suivit de la formation du corps jaune. Ces processus se répètent à chaque cycle oestral et impliquent les mêmes étapes de prolifération et de différenciation cellulaires, de maturation de l'ovocyte, de la formation d'un follicule mature accompagné de l'atrésie des follicules subalternes, de la rupture du follicule lors de l'ovulation, de la formation et de la régression du corps jaune accompagnés d'angiogénèse et de la dégradation de vaisseaux sanguins. Ces changements tissulaires majeurs impliquent que la matrice de l'ovaire ainsi que le tissu stromal soient maniables de façon à accommoder tous ces changements structuraux. Tous ces phénomènes doivent également être activés de façon spécifique et ce, via une expression tissu-spécifique et coordonnée dans le temps des enzymes catalytiques et de leurs inhibiteurs spécifiques afin d'assurer l'intégrité tissulaire. Cette maniabilité dépend entre autres de la dégradation des constituants de la matrice ovarienne par le système catalytique des activateurs de plasminogènes (PA). Bien que les rôles de ce système au sein de l'ovaire ne soient pas encore complètement définis, une récente revue (Yi-Xun, 1999) permet d'apprécier son implication dans les processus ovulatoires. L'ensemble des résultats qui y sont rapportés, démontrent clairement la contribution de ce système modulé par les gonadotropines, lors de la période péri-ovulatoire, dans l'angiogénèse ainsi que lors de la formation et la régression du corps jaune. Par contre, les stades précoces de la croissance folliculaire pendant lesquels se déroulent les phases de recrutement et de sélection du follicule dominant sont peu étudiés.

Le système des PAs est composé de plusieurs éléments, constitué des enzymes de dégradation et de leurs éléments de modulation tels les inhibiteurs, les co-facteurs, les récepteurs membranaires et les protéines de liaison (Vassalli et al., 1991). L'enzyme clef de ce système est la plasmine (figure 16). La conversion du plasminogène en plasmine est modulée par les activateurs de plasminogène de type urokinase, les uPAs, ainsi que les activateurs de plasminogène de type tissulaire, les

tPAs. Ils sont eux-mêmes influencés par les hormones gonadotropines, les facteurs de croissance, les facteurs paracrine et les cytokines (Ny et al., 1993). Les inhibiteurs connus de cette cascade protéolytique sont le « plasminogen activator inhibitor type1 » (PAI-1/SERPINE1), le « plasminogen activator inhibitor type 2 » PAI-2/SERPINE2 et PN-1/SERPINE2 (Serpins). PAI-1 et PAI-2 ont également été renommée dans le cadre de la nouvelle nomenclature de Silverman et al., (2001), elles portent les noms respectifs de SERPINE1 et SERPINB2.

La plasmine est elle-même responsable de la dégradation de plusieurs protéines formant la matrice extracellulaire (ECM). De plus, elle fait le pont entre les activateurs de plasminogènes et les métalloprotéinases en activant ces dernières et initiant une cascade protéolytique responsable de la dégradation de la paroi folliculaire (Werb, 1977 ; He, 1989 ; figure 16). De plus, des études ont suggéré que les PAs et leurs inhibiteurs joueraient un rôle de protection des nouveaux vaisseaux en formation en les protégeant d'une protéolyse excessive au cours de l'angiogénèse (Bacharach et al., 1992). Par ailleurs, l'analyse de la composition du fluide folliculaire révèle une composition similaire à celle du plasma sanguin (Fortune et Hansel, 1985 ; Gosden et al., 1988). La plasmine est également présente au sein du liquide folliculaire et y est impliquée dans la cascade de coagulation au même titre que d'autres protéinases à sérine tels le facteur XIa ainsi que la thrombine (Yamada et Gentry, 1995 ; Gentry et al., 2000). Les protéinases de la cascade de coagulation transforme la prothrombine en thrombine qui à son tour active la plasmine et induit la formation de la fibrine.

Les principales Serpins retrouvées au sein de l'ovaire sont les inhibiteurs des activateurs de plasminogène PAI-1/SERPINE1 et PAI-2/SERPINE2 (Silverman et al., 2001). PAI-1/SERPINE1 est exprimée dans les cellules thécales et interstitielles 12 h suivant un traitement à l'hCG (Hagglund et al., 1996). Il est connu pour son rôle dans l'inhibition de la fibrinolyse, de la coagulation et potentiellement de l'angiogénèse (Silverman et al., 2001). PAI-2/SERPINE2 est pour sa part exprimée de façon localisée, principalement au sein des cellules thécales et interstitielles mais



**Figure 16.** Représentation schématique de la dégradation de la matrice extracellulaire contrôlée par les activateurs de plasminogènes et leurs inhibiteurs (adapté de Ny et al., 1993).

aussi dans quelques cellules se trouvant à l'intérieur du follicule et ce, 4 h suivant un traitement à l'hCG (Hagglund et al., 1996). PAI-2 est connu pour sa fonction inhibitrice de la fibrinolyse (Silverman et al., 2001). PAI-1/SERPINE1 et PAI-2/SERPINE2 sont en effet les grands modulateurs de la dégradation de la matrice extracellulaire via le système des PAs. Des résultats ont suggéré que le système PA en association avec les enzymes de dégradation de la matrice, soit les métalloprotéinases jouent un rôle essentiel dans la dégradation de la paroi folliculaire lors de l'ovulation (Lipner, 1988 ; Ny et al., 1993 ; Tsafiriri, 1995). Le système des activateurs de plasminogènes est impliqué dans différents phénomènes physiologiques et pathologiques puisque la matrice extracellulaire offre non seulement un support pour l'organisme mais est aussi le siège de la transduction des signaux intercellulaires. De plus, elle joue également un rôle dans la modulation de la prolifération et de la migration cellulaires, du développement et du métabolisme (Hynes, 1992).

SERPINE2 agit dans le système des activateurs de plasminogène en bloquant leur activité ainsi que celle de la plasmine même (Saksela et Rifkin, 1988 ; Ny et al., 1993). Afin de bloquer l'activité protéolytique de ces protéinases, elle se lie à ces dernières de façon covalente et assure ensuite la dégradation du complexe protéinase/inhibiteur au sein des lysosomes via la captation du complexe par les récepteurs LRP (« lipoprotein receptor-related protein » (LRP) ; Mentz et al., 1999) et les héparines solubles de surface agissant comme co-facteur (Knauer et al., 1997b) (figure 17, voie 3b). Le peptide signal de SERPINE2 lui permet donc d'être sécrétée hors de la cellule suite à sa maturation, où elle liera ses protéinases cibles à proximité de la cellule via son site enzymatique RSL (5.2.2) se complexant à la triade catalytique de la protéinase (Kraut, 1977). D'autre part, SERPINE2 agit dans la cascade de coagulation en inhibant la thrombine (Evans et al., 1991 ; Donovan et Cunningham, 1998). Elle permettrait le maintien de l'intégrité du contenu et de la fluidité du liquide folliculaire qui sont essentiels au développement folliculaire.

En résumé, une des fonction des protéinases à sérine est la dégradation de la matrice extracellulaire au même titre que les métalloprotéinases. Elles sont donc des agents de remodelage tissulaire (Saksela et Rifkin, 1988 ; He, 1989 ; Matrisian et Hogan, 1990 ; Matrisian, 1990). Les Serpins modulent l'activité protéolytique des protéinases et assurent ainsi le maintien du développement sain d'un tissu en gardant une balance adéquate entre les protéinases et leurs inhibiteurs.

### **5.2.3 Analyse de l'expression de SERPINE2 dans divers tissus bovins**

#### **5.2.3.1 Analyse transcriptionnelle**

L'analyse Northern de SERPINE2 a révélé un transcrit unique de 2.4 kb particulièrement exprimé dans les tissus reproducteurs bovins. Plusieurs protéinases à sérine ont d'ailleurs déjà été identifiées dans les voies reproductrices chez l'humain et les rongeurs (Chen et al., 1998 ; Charlesworth et al., 1999). Les protéinases présentes sont sécrétées dans les voies génitales mâles (Clements et al., 1988). L'observation d'une expression variable mais minimale de SERPINE2 dans les divers tissus analysés avec une expression marquée pour certains tissus pourrait être expliquée par le besoin d'une expression de base de SERPINE2 dans les tissus en général en lien avec sa fonction de maintien du développement sain d'un tissu et d'une expression accrue dans un tissu en développement. Nous avons observé une forte expression au sein du corps jaune qui fait place à une grande activité de remodelage. Cette observation est cohérente avec la fonction des Serpins en tant qu'un des éléments impliqués dans le contrôle du remodelage tissulaire. Nous avons observé dans le même sens une forte expression de SERPINE2 dans l'ovaire foetal.

Nous observons également une expression de SERPINE2 dans le cerveau où on a déjà démontré qu'elle agit comme agent stimulateur de la croissance des neurites (Monard et al., 2000). Il a également été suggéré que les protéinases apparentées à la thrombine jouent un rôle dans le développement du système nerveux vers la pathologie alors que les Serpins (inhibiteurs de la thrombine) permettent le développement et le maintien des cellules neuronales. Un changement dans la balance entre les protéinases et leurs inhibiteurs entraîne le développement de pathologies neurodégénératives telle que l'Alzheimer (Turgeon et Houenou, 1997). Dans le même

sens, des études récentes d'inactivation du gène PN-1 (SERPINE2) chez la souris ont démontré qu'une modification de la balance de PN-1 (SERPINE2) et ses protéinases dans le liquide séminal entraîne une baisse de la fertilité chez la souris mâle (Murer et al., 2001). Ceci s'expliquerait par un changement dans le contenu protéique du liquide séminal se traduisant par une coagulation inadéquate du liquide séminal et la mauvaise formation du bouchon vaginal lors de la copulation. Les changements morphologiques des vésicules séminales des souris dont le gène PN-1 (SERPINE2) a été invalidé ont été expliqués par l'absence de plusieurs protéines fonctionnelles occasionnée par une augmentation de l'activité protéolytique en absence de PN-1 (SERPINE2).

Les protéinases majeures retrouvées dans le liquide séminal des rongeurs sont les activateurs de plasminogènes à urokinase (uPA) et de type tissulaire (tPA) (Huarte et al., 1987). La SERPINE2 étant un modulateur de l'activité protéolytique de la thrombine, des activateurs de plasminogènes, de la trypsine et de la plasmine (Baker et al., 1980 ; Guenther et al., 1985 ; Gloor et al., 1986 ; Stone et al., 1992), elle pourrait également être un modulateur de l'activité protéolytique dans le liquide séminal (Murer et al., 2001) assurant une fertilité adéquate. D'autres substrats pourraient aussi exister, car ils n'ont pas tous été encore identifiés. Il a d'ailleurs déjà été démontré que l'expression de SERPINE2 est présente dans les cellules épithéliales de la vésicule séminale chez la souris mâle et que sa sécrétion dans le liquide séminal est dépendante de la stimulation par les androgènes (Vassalli et al., 1993). De façon similaire, la présence d'une expression élevée de SERPINE2 dans l'épididyme bovin (section 5.2.3.2) pourrait servir à protéger les spermatozoïdes en maturation contre l'activité protéolytique. L'augmentation de l'ARNm dans le testicule foetal par rapport à celui du testicule adulte va dans le sens de la nécessité d'un plus grand contrôle de l'activité protéolytique dans un tissu en développement tel qu'observé chez le fœtus. De plus, on a récemment rapporté que SERPINE2 jouerait un rôle dans la détermination du sexe chez les mammifères (Grimmond et al., 2000). Il a été démontré que Vanin-1 et PN-1 (SERPINE2) sont des gènes exprimés de façon spécifique chez les mâles en prémisses à la différenciation gonadale et peu

exprimés dans les tissus adultes (Grimmond et al., 2000). En résumé, nos observations réalisées sur l'expression de SERPINE2 en lien avec les résultats publiés dans la littérature, nous permettent d'affirmer que ce gène est particulièrement exprimé dans les tissus reproducteurs en remodelage ou nécessitant un contrôle du contenu protéique de leur liquide de sécrétion.

### **5.2.3.2 Analyse traductionnelle**

L'expression tissulaire de SERPINE2 corrobore les résultats de l'analyse Northern en lien avec sa fonction de maintien du développement sain d'un tissu et d'une expression accrue dans un tissu en remodelage. Les différentes coupes d'immunohistochimie utilisées dans nos analyses révèlent que les tissus reproducteurs sont des tissus en constant remodelage. Nos observations immunohistochimiques révèlent une expression spécifique de SERPINE2 pour certains types cellulaires. De façon générale, SERPINE2 se retrouve surtout dans les cellules épithéliales et dans le liquide de sécrétion de la lumière associé à cet épithélium. Dans l'ovaire, les cellules de la granulosa de follicules primordiaux et pré-antraux ont présenté une expression localisée aux cellules de la granulosa et de l'ovocyte, tandis que les gros follicules antraux présentaient un marquage associé aux cellules de la granulosa et un marquage plus intense dans le liquide folliculaire. Nos observations chez la vache et la souris démontrent clairement un marquage plus intense dans les follicules antraux sains comparativement aux follicules non-antraux. Ceci suggère que plus le développement folliculaire est important, plus grande est la production de SERPINE2. Les follicules en atresie avancée ne présentaient pas de marquage. Les glandes séminales bovines ont démontré un signal intense dans le liquide séminal sécrété tandis que le signal était plus faible dans les cellules épithéliales. Les cellules épithéliales bordant le canal épидидymaire ainsi que les sécrétions retrouvées dans la lumière de la queue de l'épididyme ont été marquées. L'ensemble de ces observations soutiennent que SERPINE2 est exprimée dans les cellules épithéliales et que son peptide signal est fonctionnel et clivé dans ces cellules, lui permettant d'être sécrétée dans la lumière associée à ces épithéliums. Les signaux sont plus intenses dans les sécrétions, car la SERPINE2 serait rapidement sécrétée et s'y accumulerait.

Nous avons observé un signal intense pour SERPINE2 dans le plasma des veinules drainant les gros follicules antraux ainsi que ceux présents dans le hile ovarien. Ces observations ont été obtenues chez la vache et chez la souris. Ces observations suggèrent que SERPINE2 sécrétée par les cellules de la granulosa des gros follicules antraux en développement rapide serait sécrétée vers le liquide folliculaire mais aussi vers les vaisseaux sanguins drainant ces follicules. Ces résultats suggèrent que SERPINE2 pourrait contribuer au maintien de l'intégrité des vaisseaux perfusant les follicules en développement.

Nous avons observé que des cellules spécifiques dans divers tissus ont aussi démontré un marquage intense. Certaines cellules du corps jaune chez la vache ont démontré un marquage péri-nucléaire de type vésiculaire tandis que cette distribution spécifique chez la ratte n'a pas été observée. Ces résultats suggèrent que SERPINE2 est synthétisée par des cellules spécifiques dans le corps jaune bovin, ce qui ne semble pas être le cas chez la ratte. De plus, on n'observe pas d'accumulation extracellulaire de SERPINE2 comme c'est le cas dans les follicules, la vésicule séminale ou l'épididyme. Le corps jaune est une glande richement vascularisée et il se peut que la SERPINE2 synthétisée par les cellules lutéales chez la vache ou la ratte soit rapidement éliminée par une perfusion sanguine accrue.

Notre analyse Northern a démontré que c'est dans le corps jaune que l'ARNm pour SERPINE2 était le plus élevé. Le faible signal obtenu en immunohistochimie pour le corps jaune contraste avec celui obtenu pour les gros follicules antraux en croissance. La comparaison des niveaux en ARNm pour les corps jaunes et les follicules n'ayant pas été réalisée, il nous est impossible de comparer les niveaux d'expression entre ces tissus tel que nous l'avons fait à la section 5.2.4.1. Toutefois, il est à noter que l'analyse de la séquence en acides nucléiques a démontré deux motifs de types ATTTA dans la portion 3' non-codante. Ces motifs sont reconnus comme étant des éléments pouvant contribuer au contrôle de l'instabilité de l'ARNm (Kruys et al., 1989; Chen et Shyu, 1995; Xun Chen et Ahyu, 1997). Ils pourraient représenter des points de modulation de la traduction de l'ARNm en protéine SERPINE2

produite. La présence de SERPINE2 dans les cellules de Leydig, soit bovine ou de souris, est difficile à expliquer. Le patron de marquage péri-nucléaire et vésiculaire ressemble à celui des cellules lutéales bovines tandis que peu de marquage extracellulaire a été observé. De façon similaire, nous avons observé que le contenu intracellulaire des cellules de Purkinje et leurs prolongements axonaux ainsi que les cellules de la glie étaient marquées. Il a été démontré que la présence de SERPINE2 est nécessaire à la formation des neurites (Monard et al., 2000). Nos observations d'immunolocalisation dans les cellules nerveuses et de Leydig suggèrent un rôle important de SERPINE2 dans ces types cellulaires. L'ensemble de nos observations permettent de soulever la question suivante. Pourquoi observe-t-on un marquage intense de SERPINE2 en association aux sécrétions de certaines cellules tandis que ces mêmes cellules sont faiblement marquées, alors que le contenu intracellulaire est intensément marqué chez d'autres cellules tandis que leur environnement extracellulaire immédiat est faiblement ou non marqué ? Nous ne pouvons que spéculer sur les raisons qui pourraient expliquer ces différences. Il est possible que la sécrétion même de SERPINE2, de par le clivage de son peptide signal ou le mécanisme d'exocytose, diffère selon le type cellulaire. De plus, il se peut que dans certains types cellulaires, SERPINE2 serait retenue dans la cellule, et son action anti-protéolytique serait ciblée dans la cellule plutôt qu'extracellulaire. A cet effet, il a été démontré pour certaines Serpin de type B qu'elles agissent comme anti-protéinases intracellulaires. Toutefois, ces Serpins ne possèdent pas de peptide signal (Coughlin et al., 1993 ; Morgenstern et al., 1994 ; Sprecher et al., 1995 ; Sun et al., 1996).

#### **5.2.4 Analyse de l'expression de SERPINE2 dans l'ovaire au cours du cycle oestral**

##### **5.2.4.1 Analyse par RT-PCR semi-quantitatif**

Un des grands avantages de la technique de PCR réalisée à l'aide du Lightcycler est la possibilité d'analyser la production des amplicons en temps réel à l'aide d'un moniteur de fluorescence directement relié au PCR grâce au marqueur SYBR green. Le SYBR green un marqueur qui devient fluorescent lorsque lié à de l'ADN double brin. Nous éliminons ainsi les étapes d'analyses du PCR traditionnel correspondant à l'électrophorèse sur gel et de détection des amplicons par le bromure

d'éthidium ou par analyse Southern. Cette technique nécessite également moins d'ARNm pour procéder à sa quantification. Ceci en fait une technique beaucoup plus sensible et rapide. Nous avons utilisé le Lightcycler dans une analyse semi-quantitative de SERPINE2 entre les divers échantillons de follicules et de corps jaunes recueillis tel que décrit à la section 4.3.1.2. Ce sont des échantillons indépendants de ceux utilisés dans la technique de DDRT-PCR qui nous ont permis d'évaluer les variations de l'expression en ARNm codant pour SERPINE2 en fonction du développement folliculaire et du corps jaune au cours du cycle oestral. Le principal avantage d'avoir utilisé des échantillons indépendants, est l'assurance de la répétabilité des résultats obtenus par différentes techniques (DDRT-PCR et RT-PCR) en relation au patron général d'expression des gènes au cours du développement folliculaire, en l'occurrence de SERPINE2. Nous avons corrigé l'expression de SERPINE2 pour chacun des tissus analysés en fonction de l'expression du gène constitutif G3PDH.

Une concentration en ARNm d'au moins six fois plus élevée de SERPINE2 a été mesurée dans les cellules de la granulosa de follicules dominants à J5 du cycle oestral comparativement aux concentrations observées dans les petits follicules et les follicules induits à l'hCG. D'autre part, une tendance plus élevée des concentrations de SERPINE2 a aussi été observée dans les corps jaunes à J10 mais celle-ci n'a pas été statistiquement différente des concentrations dans les corps jaunes aux jours 5 et 15. Le profil d'expression de SERPINE2 obtenu par RT-PCR diffère légèrement du profil initialement obtenu dans la technique de DDRT-PCR (figure 5) où SERPINE2 semblait totalement absente des petits follicules et des follicules induits à l'hCG et seulement présente dans les follicules dominants. Ceci peut être expliqué par le fait qu'il a probablement été impossible de détecter lors de la DDRT-PCR les signaux des ADNc des petits follicules et des follicules induits à l'hCG sur le film autoradiographique, à l'intensité où le signal dans les follicules dominants était maximal et non saturé. La technique de DDRT-PCR est une technique très sensible et amplifie effectivement les moindres différences d'expression. Toutefois, il se peut aussi que le nombre de cycles de la réaction de PCR n'ait pas été suffisant pour

permettre aux petits follicules et les follicules hCG-induits (hCG) de produire assez d'amplicons spécifiques à SERPINE2 par rapport à l'ensemble des amplicons correspondant aux autres gènes amplifiés. La DDRT-PCR amplifie différents gènes dont les produits sont séparés sur gel d'acrylamide tandis que la RT-PCR semi-quantitative est dirigée pour l'amplification d'un seul gène qui contribue à sa spécificité et à sa sensibilité plus élevée.

Nous avons observé que l'expression en ARNm de SERPINE2 dans les petits follicules et les follicules hCG-induits (hCG) sont équivalentes et correspondent à une expression basale. Cette expression basale peut procurer aux follicules, au cours de leur développement, une quantité minimale d'inhibiteur de protéinases à sérine afin de maintenir un développement adéquat. Le follicule dominant est caractérisé par une forte croissance et dont le diamètre est le plus large de la cohorte de follicules recrutés. On sait que le follicule dominant acquiert des récepteurs LH sur ses cellules de la granulosa. Nous pouvons suggérer que l'acquisition des récepteurs LH pourrait contribuer à l'augmentation drastique des concentrations en ARNm pour SERPINE2. Cette dernière permettrait la mise en place de conditions favorables au développement du follicule dominant. En ce sens, il a déjà été suggéré que les PAs produits dans l'ovaire en réponse aux hormones gonadotropes stimulent la conversion du plasminogène en plasmine dans le liquide folliculaire (Strickland et Beers, 1976 ; Werb et al., 1977 ; He et al., 1989). Ce qui vient appuyer la notion de la nécessité de moduler l'activité des inhibiteurs des protéinases à sérine, afin d'assurer une fenêtre étroite d'activation pour chaque phénomène physiologique se déroulant au cours du cycle oestral

#### **5.2.4.2 Comparaison de la concentration de SERPINE2 dans les liquides folliculaires.**

Nous n'avons pas démontré de différence significative entre les concentrations de SERPINE2 lorsque les liquides folliculaires des divers groupes de follicules ont été comparés par analyse Western. La concentration de la protéine SERPINE2 dans les liquides folliculaires n'est donc pas corrélée au patron d'expression en ARNm isolé des cellules de la granulosa de ces mêmes follicules. Aucune différence n'a été

observée entre les follicules  $\leq 4$  mm et les follicules dominants. Toutefois, une tendance à la baisse a été observée dans les follicules hCG-induits (hCG) et cette tendance serait devenue statistiquement significative si la valeur d'un follicule avait été omise de l'analyse. Comment expliquer ce manque de différence dans la concentration protéique de SERPINE2 entre les groupes de follicules comparativement aux différences marquées que nous avons observées dans les concentrations en ARNm? Ce manque de différence entre les groupes de follicules dans la concentration en protéine pourrait être occasionné par une différence dans la perfusion sanguine des follicules. Il est reconnu que les follicules dominant ou pré-ovulatoire reçoivent une perfusion sanguine plus élevée que les autres follicules (Zeleznick et al., 1981). Une perfusion sanguine plus élevée entraînerait aussi une perte plus élevée de SERPINE2 hors du follicule. La présence de SERPINE2 dans les veinules des follicules antraux en croissance (figure 14 G) supporte cette explication. Les petits follicules ( $\leq 4$  mm) ont un taux de transcription plus faible que les follicules dominants mais la perfusion sanguine étant plus faible, la concentration de SERPINE2 atteindrait donc des concentrations comparables aux follicules dominants. Toutefois, un faible taux de transcription tel qu'observé dans les follicules hCG-induits (hCG) associé à une perfusion sanguine élevée sinon équivalente à celle des follicules dominants, contribueraient à la plus faible concentration de SERPINE2 observée dans leur liquide folliculaire. Les observations associées au profil d'expression différent de la protéine SERPINE2 par rapport au profil d'expression en ARNm suggèrent une autre étape de contrôle de SERPINE2. Des résultats dans la littérature indiquent une modulation de PN-1 (SERPINE2) aux niveaux de sa traduction et de sa sécrétion. Des études réalisées sur des cultures cellulaires de cellules musculaires humaines ont démontré que la sécrétion de PN-1 (SERPINE2) est stimulée par le « tumour necrosis factor-alpha » (TNF-alpha), le « transforming growth factor-beta » (TGF-beta) et l'interleukin-1 (IL-1) (Mbedi et al., 1999). L'ensemble des résultats obtenus par l'équipe de Mbedi supportent l'existence d'une modulation de la concentration de PN-1 aux niveaux traductionnel et post-traductionnel. D'autre part, Lagriffoul et al., (1996) ont démontré à partir de cellules gliales, que la sécrétion de PN-1 est proportionnelle à la concentration de protéine

hétérotrimérique Go1alpha. Cette dernière est impliquée dans le trafic vésiculaire de PN-1 (SERPINE2) et influencerait ainsi son transport et sa sécrétion. Les résultats obtenus par l'équipe de Lagriffoul supportent ainsi l'existence d'une modulation de la concentration de PN-1 au niveau de sa sécrétion.

La présence de SERPINE2 dans le liquide folliculaire tout au long de la maturation suggère son implication dans le contrôle du contenu protéique de l'exsudat folliculaire via l'inhibition des protéinases à sérine et ainsi via le contrôle du passage des proenzymes telle que la prothrombine (Yamada et Gentry, 1995 ; Gentry et al., 2000) vers la forme active. En ce sens, la contribution au contrôle du contenu protéique du liquide séminal des souris par la PN-1 (SERPINE2) pour une fertilité adéquate a déjà été démontrée (Murer et al., 2001). De plus, on a récemment rapporté que la viscosité variable du liquide folliculaire influence le taux et la durée du phénomène d'ovulation chez le cochon, le bovin et l'humain (Luck et al., 2000).

### **5.3 Intégration de SERPINE2 dans le développement folliculaire**

À la lumière de nos résultats ainsi que des informations disponibles dans la littérature, la comparaison des gènes exprimés entre les petits follicules ( $\leq 4$  mm), les follicules dominants en croissance (J5) et pré-ovulatoires induits à l'hCG, nous a permis d'identifier un gène qui pourrait contribuer à la croissance du follicule dominant dans un milieu où les follicules subalternes dégénèrent. Il serait nécessaire de quantifier l'expression de ce gène nouvellement identifié dans l'ovaire bovin en fonction de la déviation du follicule dominant de la cohorte de follicules initialement recrutés à chaque vague folliculaire. Il est envisageable que le follicule dominant caractérisé entre autres par le diamètre le plus large de la cohorte de follicules recrutés et acquérant ses récepteurs LH en premier pourrait être également caractérisé par une augmentation de ses concentrations en inhibiteurs de protéinases à sérine dont la SERPINE2 (section 4.3.1.2). Ceci contribuerait à la mise en place de conditions favorables au développement du follicule dominant tandis que les autres dégénèrent. La concentration d'oestradiol-17 $\beta$  dans le liquide folliculaire sert de marqueur dans l'identification d'un follicule sain en plein développement (Ireland et Roche,

1982a,b ; Fortune et Hansel, 1985). Nous avons démontré que les concentrations en ARNm pour SERPINE2 sont corrélées aux concentrations en oestradiol-17 $\beta$  dans les liquides folliculaires. Le développement du follicule dominant nécessite un environnement où le remodelage tissulaire et l'activité protéolytique doivent être contrôlés. Nous pouvons postuler que les hormones gonadotropes et/ou certains facteurs de croissance à action paracrine pourraient stimuler l'expression de SERPINE2 afin de favoriser la croissance folliculaire. Il faut tout de même souligner que SERPINE2 est exprimée à un niveau basal dans les petits follicules et les follicules induits à l'hCG (section 4.3.1.2), car ces follicules nécessitent un minimum de contrôle de la protéolyse pour le maintien de leur intégrité. Toutefois, les hormones gonadotropes et/ou certains facteurs de croissance à action paracrine favoriseraient l'expression de SERPINE2 au sein des follicules dominants sous le contrôle de l'acquisition des récepteurs LH par les cellules de la granulosa.

Des études démontrant un contrôle par les hormones gonadotropes sur l'expression de SERPINE2 n'ont pas encore été réalisées. Ces hypothèses devront être validées par la mise en relation des résultats obtenus au cours de ce projet avec les hormones gonadotropes dans un modèle d'étude incluant des groupes folliculaires aussi finement déterminés que ceux utilisés dans les études de DDRT-PCR et RT-PCR. L'équipe de Hagglund (1996) stipule que l'expression de l'ARNm de PN-1/SERPINE2 chez la souris femelle n'est pas modulée par les hormones gonadotropines au contraire de la souris mâle dont la sécrétion de PN-1 dans le liquide séminal est modulée par les androgènes (Vassali et al., 1993). Ils observent tout de même une expression hétérogène de PN-1/SERPINE2 (ARN ou protéine) au sein des différentes populations de cellules de la granulosa dans les follicules pré-ovulatoires ainsi qu'une forte expression tout au long de la période péri-ovulatoire, indiquant un rôle de SERPINE2 dans le contrôle de l'activité protéolytique de l'ovaire. Ils ont utilisé des ovaires complets afin de réaliser des études d'hybridation *in situ* ainsi que des études d'immunohistochimie. Leur modèle d'étude ne leur permettait pas de réaliser l'évaluation de cette expression à des stades plus précoces

du développement folliculaire, ni de vraiment différencier la contribution des petits, moyens et gros follicules.

Les divers mécanismes physiologiques se déroulant dans l'ovaire nécessitent l'expression tissu-spécifique et coordonnée dans le temps entre les activateurs de plasminogènes et leurs inhibiteurs, principaux responsables du contrôle du remodelage de la matrice extracellulaire. Le meilleur exemple de ce phénomène est l'expression coordonnée de tPA et PAI-1/SERPINE1, sous l'influence des gonadotropines, de façon à permettre la mise en place d'une fenêtre étroite dans le temps pendant laquelle se produit l'ovulation. Nous observons effectivement une expression coordonnée des deux protéines avant l'ovulation et une chute radicale de l'inhibiteur (PAI-1/SERPINE1) quelques heures avant l'ovulation pour permettre la dégradation de la paroi folliculaire chez le singe et le rat (Liu et al., 1991a ; Liu et al., 1991b). D'autre part, une étude des patrons d'expression *in vivo* de l'ARNm de l'activateur de plasminogène uPA et de l'inhibiteur PAI-1/SERPINE1 lors de la néovascularisation des follicules en croissance, du corps jaune et de la *decidua materna* (angiogénèse physiologique) a révélé une expression transitoire et couplée de uPA et PAI-1/SERPINE1 dans les vaisseaux en formation du corps jaune après l'ovulation et dans la *decidua materna* (Bacharach et al., 1992). Ces études suggèrent que les PAs et leurs inhibiteurs joueraient un rôle de protection des nouveaux vaisseaux en formation en les protégeant d'une protéolyse excessive au cours de l'angiogénèse (Bacharach et al., 1992). Par contre, le fait que cette équipe n'a pas observé l'expression couplée de uPA et PAI-1/SERPINE1 dans les vaisseaux en formation des follicules en développement suggère que d'autres inhibiteurs de PA doivent intervenir au cours du cycle oestral afin de contrôler la protéolyse associée à l'angiogénèse. Puisque SERPINE2 est également un inhibiteur de uPA nous spéculons qu'elle pourrait donc jouer un rôle à ce niveau. Cette modulation serait importante puisque il a été observé que l'angiogénèse aurait un rôle important à jouer dans la dominance folliculaire et l'atrésie des follicules subalternes (Jaffe, 2000 ; Plend, 2000).

D'autre part, des analyses phylogénétiques ont permis de classer les Serpins connues à ce jour en 16 classes différentes (Irving et al., 2000 ; Silverman et al., 2001) plaçant SERPINE2 dans la même famille que PAI-1/SERPINE1. Les protéines PAI-2/SERPINE2 et les Serpins de l'utérus sont classifiées dans des familles différentes (Irving et al., 2000). PAI-1/SERPINE1 serait impliquée surtout au niveau de la fibrinolyse, de la coagulation et de l'angiogénèse (Silverman et al., 20001). Comme décrit auparavant, PAI-1/SERPINE1 joue un rôle prépondérant dans le système des activateurs de plasminogènes associé à la protéolyse de la surface cellulaire dans les phénomènes d'angiogénèse, de migration cellulaire (Pepper et al., 1987) et plusieurs processus d'invasion cellulaire (Bacharach et al., 1996). Ce système semble être sollicité dans des circonstances nécessitant une protéolyse ciblée des constituants de la matrice extracellulaire (Hebert et Baker, 1988 ; Pollanen et al., 1988 ; Estrieher et al., 1990).

SERPINE2 est exprimée dans le follicule au niveau des cellules de la granulosa et lutéales ainsi que dans l'ovocyte. Les uPAs sont exprimés par les cellules de la granulosa et les tPAs sont exprimés par les cellules thécales et l'ovocyte (Sappino et al., 1989 ; mouse; Hagglund et al., 1996). L'expression de uPA et tPA est augmentée dans les follicules pré-ovulatoires 4 h suivant le pic de LH (Hagglund et al., 1996 ; Li et al., 1997 ; Liu, 1999). L'inhibiteur connu pour uPA est PAI-1 (SERPINE1), il est exprimé dans les cellules thécales (Hasan et al., 2002). Son expression est augmentée 12 h suivant le pic de LH, surtout dans les cellules thécales mais également dans les cellules de la granulosa (Hagglund et al., 1996 ; Li et al., 1997). Dans les follicules en croissance, uPA est exprimé par les cellules de la granulosa alors que PAI-1 est exprimé par les cellules thécales. Nos résultats suggèrent donc que SERPINE2 produit par les cellules de la granulosa inhibe l'activité protéolytique de uPA. Une diminution de l'expression de SERPINE2 après le pic de LH, combinée à l'augmentation de l'expression de uPA permettrait l'activation de la protéolyse essentielle pour les mécanismes d'ovulation. Le complexe formé de uPA et SERPINE2 serait éliminé par endocytose via les récepteurs à uPA situés sur les cellules de la granulosa et dirigé vers la voie de

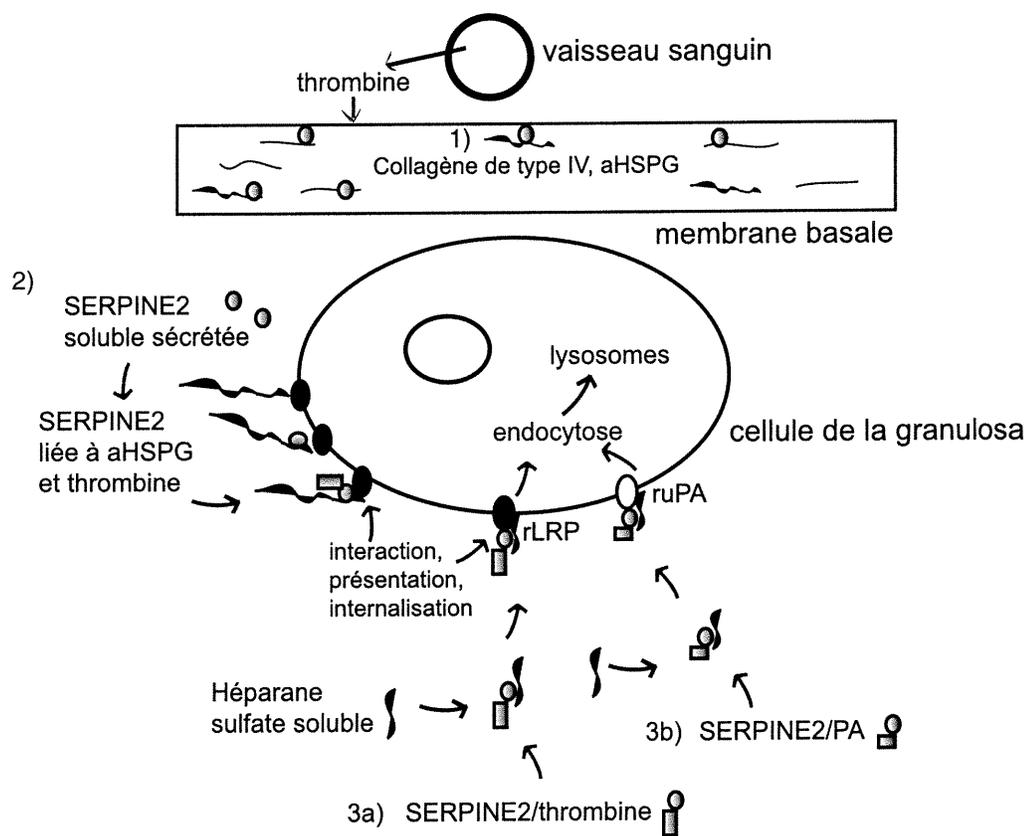
dégradation des lysosomes (Nykjaer et al., 1997 ; Willnow et al., 1999 ; Strickland et al., 2002). Chez le rat, les cellules épithéliales de l'épididyme, le vas deferens ainsi que les cellules sécrétrices de la vésicule séminale expriment le facteur uPA, alors que ce dernier n'est pas retrouvé dans les testicules (Huarte et al., 1987). Chez la vache, SERPINE2 a démontré un patron d'expression semblable, ce qui suggère également que l'activité protéolytique de l'activateur uPA serait inhibé par SERPINE2 chez le mâle aussi.

Ces observations suggèrent la présence de fonctions complémentaires et compensatoires entre les inhibiteurs de PA au sein de l'ovaire assurant une protéolyse induite et non excessive. D'autres études (Hagglund et al., 1996) suggèrent l'importance des phénomènes de compensation dans l'ovaire. Des souris invalidées pour un des gènes des activateurs de plasminogènes démontrent une efficacité d'ovulation réduite mais non absente. Ces observations indiquent que la perte d'un activateur de plasminogène est compensée par d'autres enzymes protéolytiques lors de l'ovulation (Ny et al., 1997). Des souris invalidées pour un des gènes de PAI-1/SERPINE1, de uPA ou de tPA ont démontré un taux d'ovulation normal suite au traitement à l'hormone PMSG/hCG alors que les souris invalidées pour les gènes tPA et uPA ont démontré un taux d'ovulation réduit de 26% (Leonardson et al., 1995). Ces résultats suggèrent que des mécanismes de compensation sont présents pour assurer une ovulation efficace (Hagglund et al., 1996). Le rôle de la SERPINE2 dans l'ovaire est encore mal défini. Elle semble être présente pour assurer une régulation fine de la protéolyse. Il serait donc intéressant d'étudier un modèle d'invalidation pour PAI-1/SERPINE1, PAI-2/SERPINE2 et PN-1/SERPINE2 afin d'analyser les implications des mécanismes de compensation au sein de l'ovaire en association au contrôle de la protéolyse et du remodelage de la matrice ovarienne.

Finalement, l'enzyme clef du système des PA, la plasmine, est également présente au sein du liquide folliculaire et y est impliquée dans la cascade de coagulation au même titre que d'autres protéinases à sérine tels le facteur XIa ainsi que la thrombine (Yamada et Gentry, 1995 ; Gentry et al., 2000). Les protéinases de

la cascade de coagulation transforme la prothrombine en thrombine qui à son tour active la plasmine et induit la formation de la fibrine. SERPINE2 inhibe la thrombine (Evans et al., 1991 ; Donovan et Cunningham, 1998) et le facteur XIa (Knauer et al., 2000) de cette cascade. D'autre part, les anticoagulants protéoglycans héparan sulfate (aHSPG), constituants de la matrice extracellulaire, sont synthétisés par les cellules de la granulosa à partir du stade de petit follicule jusqu'au follicule pré-ovulatoire (Hosseini et al., 1996 ; Princivalle et al., 2001 ; Hasan et al., 2002). Les aHSPG sont retrouvés ancrés à la membrane des cellules de la granulosa au niveau tissulaire et sous forme soluble dans le liquide folliculaire (Donovan et al., 1994). Les héparan sulfate (aHSPG ou soluble) lient SERPINE2 et augmentent ainsi son affinité envers la thrombine (Evans et al., 1991 ; figure 17, voies 2 et 3a). Le complexe formé de la thrombine et de SERPINE2 serait dégradé par endocytose médiée par son internalisation via les récepteur LRP (Mentz et al., 1999 ; figure 17, voies 2 et 3a). De plus, SERPINE2 interagit avec le collagène de type IV (Donovan et al., 1994) qui est le constituant majeur de la membrane basale entourant les couches de cellules granulosa (Rodgers et al., 2000). À la lumière de ces observations, SERPINE2 jouerait un rôle dans le maintien de la fluidité du liquide folliculaire en prévenant l'effet de la thrombine (figure 17, voie 3a) et permettrait de maintenir l'intégrité de la membrane basale en inhibant les protéinases à sérine originant des vaisseaux sanguins de la couche thécale (figure 17, voie 1).

Enfin, nous avons démontré que la quantité d'ARNm de SERPINE2 est plus élevée dans les follicules dominants et est corrélée positivement aux concentrations d'oestradiol-17 $\beta$ . Nous pouvons émettre l'hypothèse que SERPINE2 pourrait être un gène candidat associé au taux d'ovulation chez la vache. Deux études de génétiques quantitatives ont récemment associé les régions du génome bovin qui seraient responsables de la double ovulation chez la vache. Ces loci quantitatifs ou « quantitative trait loci » (QTL) ont été localisés sur les chromosomes 5 et 7 par deux équipes (Kirkpatrick et al., 2000 ; Lien et al., 2000) tandis que les chromosomes 12 et 23 (Lien et al., 2000) ou 19 (Kirkpatrick et al., 2000) ont été identifiés dans une seule étude. Toutefois, il faut souligner qu'entre ces deux études, les régions des



**Figure 17.** Représentation schématique des interactions de SERPINE2 dans les voies de modulation des protéinases au cours du développement folliculaire.

chromosomes 5 et 7 diffèrent. Le gène SERPINE 2 est localisé sur le chromosome 2 humain et de brebis (locus 2q33-35 ; Carter et al., 1995 ; Silverman et al., 1998) et sur le chromosome 1 murin (Carter et al., 1995). La comparaison des cartes de syntenie du génome humain et bovin indique que SERPINE2 bovin serait aussi localisé sur le chromosome 2 bovin. Nous concluons donc que SERPINE2 n'est pas un gène candidat associé à l'ovulation double chez la vache.

#### **5.4 Récentes observations sur les inhibiteurs de protéinases à sérine dans l'ovaire de ratte (Intégration d'une publication récente suite au dépôt du mémoire)**

Une étude récente sur l'expression des inhibiteurs de protéinases à sérine dans l'ovaire de ratte, soit SERPINE2/PN-1, SERPINE1/PAI-1 et anti-thrombine III (ATIII), a fait l'objet d'une publication (Hasan et al., 2002) suite au dépôt de ce mémoire en décembre 2001. Une intégration des résultats obtenus chez la ratte à ceux que nous avons générés chez la vache s'avère nécessaire afin de confirmer ou d'infirmer l'interprétation que nous avons donné à nos résultats. Chez la ratte, il a été démontré que l'ARNm de SERPINE2/PN-1 est présent dans les cellules de granulosa de follicules pré-ovulatoires principalement soit, en cycle normal ou suite à une stimulation ovarienne par les hormones gonadotropes. Le niveau d'expression en ARNm entre les follicules pré-ovulatoires de cycle normal ou stimulé n'était pas différent. Ils ont noté une chute de 30% du signal associé à SERPINE2/PN-1, 24 h suivant l'injection de hCG. Les résultats obtenus chez la ratte confirment nos résultats obtenus chez la vache en relation aux concentrations en ARNm de SERPINE2/PN-1 précédant et suivant l'injection de hCG.

Hasan et al. (2002) ont immunolocalisé SERPINE2/PN-1 dans les ovaires au cours du cycle oestral normal et stimulé par les hormones gonadotropes. Ils ont observé un marquage pour SERPINE2/PN-1 associé aux cellules de granulosa de follicules en développement à partir du stade secondaire (résultats non-publiés) jusqu'à l'ovulation. Ils ont observé que l'immunomarquage diminuait suite au pic de LH. Selon leur méthode d'étude, ils ont conclu que la protéine SERPINE2/PN-1 suite

à sa synthèse par les cellules de granulosa demeurerait associée à ces dernières possiblement par une interaction à la matrice extracellulaire. La SERPINE2/PN-1 serait associée principalement aux aHSPG. Le fait qu'ils ont remarqué la présence de SERPINE2/PN-1 uniquement en périphérie des cellules de granulosa résulte possiblement de leur technique d'analyse. Ils ont utilisé des coupes de tissus congelées non-fixées; dans ce cas, le liquide folliculaire est donc perdu. Nos résultats d'immunolocalisation de SERPINE2/PN-1 dans le liquide folliculaire des follicules en croissance démontrent bien la présence de cette protéine que ce soit dans l'ovaire de vache ou de ratte. En résumé, les résultats rapportés pour SERPINE2/PN-1 chez la ratte par Hasan et al. (2002) corroborent les observations que nous avons obtenues chez la vache: 1) l'expression d'ARNm dans les cellules de granulosa; 2) localisation de la protéine associée aux cellules de granulosa; 3) expression de la protéine plus marquée dans les follicules en croissance; et 4) diminution de l'expression 24 h suivant la relâche pré-ovulatoire de LH (induite par l'injection de hCG).

Les observations rapportées pour l'expression de SERPINE2/PN-1 dans le corps jaune chez la ratte en termes d'ARNm ou de protéine diffèrent des résultats que nous avons obtenu chez la vache. Hasan et al. (2002) n'ont pas détecté l'expression de SERPINE2/PN-1 que ce soit au niveau de l'ARNm ou de la protéine dans les corps jaunes de rattes. Nos résultats d'immunohistochimie corroborent leurs résultats puisque nous n'avons pas observé la présence de SERPINE2/PN-1 dans les corps jaunes de ratte à l'aide de notre anticorps. Toutefois, notre analyse Northern a démontré une expression d'ARNm de SERPINE2/PN-1 la plus élevée dans le corps jaune bovin lorsque comparée aux autres tissus. Notre analyse de RT-PCR semi-quantitatif a démontré une expression variable de SERPINE2/PN-1 en fonction du temps du cycle oestral. De plus, nos observations immunohistochimiques démontrent clairement que la protéine SERPINE2/PN-1 est synthétisée par certaines cellules lutéales bovines. Toutefois, comme nous l'avons souligné antérieurement, sa localisation intracellulaire dans les cellules lutéales contraste avec sa localisation observée en association aux cellules de la granulosa et du liquide folliculaire dans les follicules pré-ovulatoires. Au moment présent, nous ne pouvons expliquer cette

différence entre l'expression de SERPINE2/PN-1 dans le corps jaune bovin versus celle du rat que par une différence d'espèce et possiblement associé à la dynamique physiologique différente du corps jaune au cours du cycle oestral.

## 6. CONCLUSION

L'application de la technique d'étalement différentiel des ARNm (DDRT-PCR) pour la caractérisation des gènes exprimés dans les cellules de la granulosa nous a permis d'identifier des gènes démontrant un patron d'expression différentiel en association au processus de dominance folliculaire chez la vache. Au cours de cette étude, nous avons cloné et caractérisé partiellement six ADNc exprimés différentiellement dans les cellules de la granulosa de follicules dominants. Un seul ADNc a été cloné et caractérisé au complet suite au criblage d'une génothèque d'ADNc de cellules de la granulosa issue de follicule dominant à J5 du cycle oestral. L'analyse de la séquence partielle des cinq autres clones d'ADNc dans les banques de données n'a pas révélé de séquences homologues. L'analyse de nos résultats obtenus de ces cinq clones et notre incapacité de cloner leur ADNc correspondant à partir d'une génothèque suggère que : 1) les banques de données de séquences de gènes sont encore incomplètes ; 2) les séquences obtenues à l'extrémité 3' non-codant de l'ADNc permet une identification de séquences orthologues plus difficiles car les régions non-codantes sont moins bien conservées entre les espèces d'où la nécessité de cloner l'ADNc correspondant dans son ensemble; 3) la génothèque d'ADNc de cellules de la granulosa était trop complexe ; et 4) le processus d'amplification de gènes utilisé lors de la DDRT-PCR permet d'identifier des gènes faiblement exprimés qui sont plus difficiles à caractériser par le criblage d'une génothèque. Nous concluons que la DDRT-PCR a permis d'identifier et de caractériser des gènes différentiellement exprimés dans les cellules de la granulosa lors de la dominance folliculaire ovarienne chez la vache.

Nous avons caractérisé un ADNc exprimé différentiellement dans les cellules de la granulosa de follicules dominants à J5 du cycle oestral lorsque comparé au profil d'expression dans les petits follicules ( $\leq 4$  mm) et les follicules induits à l'hCG par l'application de la DDRT-PCR. Nous avons identifié puis caractérisé pour la première fois le gène SERPINE2 bovin dans son ensemble. SERPINE2 est un membre de la superfamille des inhibiteurs de protéinase aux résidus sérine. Nous avons démontré une expression différentielle du transcrit de 2.4 kb de SERPINE2

dans divers tissus bovins. Le fragment S<sup>12</sup> à R<sup>196</sup> correspondant à la protéine SERPINE2 a été produit puis a servi à développer des anticorps spécifiques à SERPINE2. De façon générale, nous avons observé une expression cellulaire spécifique. La SERPINE2 est sécrétée dans le liquide folliculaire et l'intensité du marquage augmente en fonction du développement folliculaire. De plus, elle a été détectée dans les veinules drainant les gros follicules antraux. Elle se retrouve également dans les sécrétions des vésicules séminales et celle de la queue de l'épididyme. Nous avons observé que sa localisation varie en fonction du type cellulaire ; le signal est faible dans les cellules de la granulosa, de l'épithélium des vésicules séminales et de la queue de l'épididyme tandis qu'un fort signal a été observé dans certaines cellules lutéales, les cellules de Leydig et les cellules nerveuses du cervelet.

À l'aide d'échantillons de cellules de la granulosa indépendants de ceux générés lors de la DDRT-PCR, nous avons démontré que la concentration en ARNm codant pour SERPINE2 était d'au moins six fois plus élevée dans les follicules dominants comparativement aux petits follicules ( $\leq 4$  mm) ou les follicules pré-ovulatoires induits à l'hCG. Toutefois, cette différence en ARNm n'a pas été observée lors de l'analyse Western des concentrations de la protéine dans les liquides folliculaires, ce qui suggère une modulation additionnelle associée soit à sa traduction, à sa sécrétion ou à sa libération en fonction de la perfusion sanguine du follicule. Les Serpins sont des inhibiteurs de protéinases à sérine et sont impliqués dans la modulation de la protéolyse de la matrice extracellulaire médiée par la cascade catalytique des activateurs de plasminogène et de la plasmine. Nous concluons que SERPINE2 est un gène différentiellement exprimé lors de la dominance folliculaire chez la vache et que sa fonction biologique connue à ce jour comme inhibiteur de protéinase est cohérent au remodelage tissulaire contrôlé que nécessite le développement folliculaire, l'ovulation et la formation du corps jaune au sein de l'ovaire.

## 7. BIBLIOGRAPHIE

- Abel MH, Wootton AN, Wilkins V, Huhtaniemi I, Knight PG, Charlton HM. **2000**. The effect of a null mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene on mouse reproduction. *Endocrinology* 141:1795-803.
- Ackland, JF, Schwartz NB, Mayo KE, Dodson RE. **1992**. Nonsteroidal signals originating in the gonads. *Physiol Rev* 72:731-87.
- Adashi E. **1992**. Intraovarian peptides. Stimulators and inhibitors of follicular growth and differentiation. *Endocrinol Metabol Clinics of North America* 21:1-17.
- Adams GP, Matteri RL, Kastelic JP, Ko JC, Ginther OJ. **1992**. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J Reprod Fertil* 94:177-88.
- Alila HW, Hansel W. **1984**. Origin of different cell types in the bovine corpus luteum as characterized by specific monoclonal antibodies. *Biol Reprod* 31:1015-1025.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. **1994**. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons Inc, New York.
- Bacharach E, Itin A, Keshet E. **1992**. In vivo patterns of expression of urokinase and its inhibitor PAI-1 suggest a concerted role in regulating physiological angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 89(22) :10686-90.
- Badinga L, Driancourt MA, Savio JD, Wolfenson D, Drost M, De la Sota RL, Thatcher WW. **1992**. Endocrine and ovarian responses associated with the first wave dominant follicle in cattle. *Biol Reprod* 47:871-883.
- Baired, A, Emoto N, Shimasaki S, Gonzales AM, Fauser B, Hsued JW. **1989**. Fibroblast growth factors as local mediators of gonadal function, p. 151-160. In : A. N. Hirshfield (ed.), *Growth factors and The Ovary*. Plenum Press, New York.
- Baker J, Hardy M, Zhou J, Bondy C, Lupu F, Bellvé A, Efstratiadis A. **1996**. Effects of an Igf1 gene null mutation on mouse reproduction. *Mol Endocrinol* 10:903-918.
- Baker JB, Low DA, Simmer RL, Cunningham DD. **1980**. Protease-nexin: a cellular component that links thrombin and plasminogen activator and mediates their binding to cells. *Cell* 21(1):37-45.
- Bao B, Garveric HA. **1998**. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves. *Biol Reprod* 76 : 1903-1921.
- Bao B, Garveric HA, Smith GW, Smith MF, Salfen BE, Yougquist RS. **1997a**. Changes in messenger RNA encoding LH receptor, cytochrome P450 side chain cleavage and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. *Biol Reprod* 56 :1158-1168.
- Bao B, Garveric HA, Smith GW, Smith MF, Salfen BE, Yougquist RS. **1997b**. Expression of messenger RNA encoding 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4 isomerase during recruitment and selection of bovine ovarian follicles : identification of dominant follicles by expression of 3beta-HSD mRNA within the granulosa cell layer. *Biol Reprod* 56 :1466-1473.

- Bélanger A, Couture J, Caron S, Roy R. **1990**. Determination of non-conjugated and conjugated steroid levels in plasma and prostate after separation on C-18 columns. *Annals of New York Academy of Sciences* 595:251-259.
- Bendell JJ, Dorrington JH. **1990**. Epidermal growth factor influences growth and differentiation of rat granulosa cells. *Endocrinology* 127:533-540.
- Braw-Tal R, Yossefi S. **1997**. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *J Reprod Fertil* 109:165-71.
- Brûlé S, Rabahi F, Faure R, Beckers J-F, Silversides DW, Lussier JG. **2000**. Vacuolar system-associated protein-60 : A protein characterized from bovine granulosa and luteal cells that is associated with intracellular vesicles and related to human 80K-H and murine  $\beta$ -glucosidase II. *Biol Reprod* 62 :642-654
- Byskov, A. G. **1978**. Follicular atresia, p. 533-47. In: R. E. Jones (ed.), *The vertebrate ovary : Comparative biology and evolution*. Plenum, New York.
- Cahill LP, Mauléon P. **1980**. Influences of season, cycle and breed on follicular growth rates in sheep. *J Reprod Fertil* 58:321-328.
- Carson, RS, Findlay JK, Burger HG, Trounson AO. **1979**. Gonadotropin receptors of the ovine ovarian follicle during follicular growth and atresia. *Biol Reprod* 21:75-87.
- Carter RE, Cerosaletti KM, Burkin DJ, Fournier RE, Jones C, Greenberg BD, Citron BA, Festoff BW. **1995**. The gene for the serpin thrombin inhibitor (PI7), protease nexin I, is located on human chromosome 2q33-q35 and on syntenic regions in the mouse and sheep genomes. *Genomics* 27(1):196-9.
- Chang WS, Chang NT, Lin SC, Wu CW, Wu FY. **2000**. Tissue-specific cancer-related serpin gene cluster at human chromosome band 3q26. *Gen Chr Canc* 29(3):240-255.
- Charlesworth MC, Young CY, Miller VM, Tindall DJ. **1999**. Kininogenase activity of prostate-derived human glandular kallikrein (hK2) purified from seminal fluid. *J Androl* 20(2):220-9.
- Chen C-YA, Shyu A-B. **1995**. AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *TIBS* 20:465-470.
- Chen LY, Lin YH, Lai ML, Chen YH. **1998**. Developmental profile of a caltrin-like protease inhibitor, P12, in mouse seminal vesicle and characterization of its binding sites on sperm surface. *Biol Reprod* 59(6):1498-505.
- Chomczynski P, Sacchi N. **1987**. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162(1):156-9.
- Clements JA, Matheson BA, Wines DR, Brady JM, MacDonald RJ, Funder JW. **1988**. Androgen dependence of specific kallikrein gene family members expressed in rat prostate. *J Biol Chem* 263(31):16132-7.
- Coughlin P, Sun J, Cerruti L, Salem HH, Bird P. **1993**. Cloning and molecular characterization of a human intracellular serine proteinase inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(20):9417-21.
- Crisp RJ, Knauer DJ, Knauer MF. **2000**. Roles of the heparin and low density receptor-related protein-binding sites of protease nexin-1 (PN1) in urokinase-PN1 complex catabolism. *J Biol Chem* 275:19628-19637.

- Dailey RA. **1999**. Female reproductive systems, Nonhuman Mammals. *Encyclopedia of Reproduction*, vol 2: 229-239.
- Dierich, A, Sairam MR, Monaco L, Fimia GM, Gansmuller A, LeMeur M, Sassone-Corsi P. **1998**. Impairing follicle-stimulating hormone (FSH) signaling in vivo: targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:13612-7.
- Dong J, Albertini D, Nishimori K, Kumar T, Lu N, Matzuk M. **1996**. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 383:531-535.
- Donovan FM, Cunningham DD. **1998**. Signaling pathways involved in thrombin-induced cell protection. *J Biol Chem* 273(21):12746-52.
- Donovan FM, Vaughan PJ, Cunningham DD. **1994**. Regulation of protease nexin-1 target protease specificity by collagen type IV. *J Biol Chem* 269(25):17199-205.
- Driancourt MA. **2001**. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology* 55:1211-1239.
- Driancourt MA, Gougeon A, Royere D, Thibault C. **1993**. Ovarian function. In: C. Thibault, MC Levasseur, RHF Hunter (Eds), *Reproduction in Mammals and Man*. Paris Ellipses, 281-305.
- Driancourt, M, Gougeon A, Royère D, Thibault C. **1991**. La fonction ovarienne. In : *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. Ellipses INRA. 273-298.
- Drion PV, Beckers JF, Derkenne F, Hanzen Ch. **2000**. Le développement folliculaire chez la vache. 2. Mécanismes hormonaux au cours du cycle et du post-partum. *Ann Méd Vét* 144:385-404.
- Duffy, P., M. A. Crowe, M. P. Boland, and J. F. Roche. **2000**. Effect of exogenous LH pulses on the fate of the first dominant follicle in postpartum beef cows nursing calves. *J Reprod Fertil* 118:9-17.
- Elvin JA, Matzuk MM. **1998**. Mouse Model of ovarian failure. *Rev Reprod* 3:183-195.
- Eppig JJ, O'Brien MJ. 1996. Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. *Biol Reprod* 54:197-207.
- Erickson GF, Hsueh AJW. **1978**. Stimulation of aromatase activity by follicle stimulating hormone in rat granulosa cells in vivo and in vitro. *Endocrinology* 72:68-78.
- Erickson BH. **1966a**. Development and radio-response of the prenatal bovine ovary. *J Reprod Fert* 10:97-103.
- Erickson, BH. **1966b**. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *J Anim Sci* 25:800-5.
- Estrieher A Muhlhauser J, Carpentier J-L, Orci L, Vassali J-D. **1990**. The receptor for urokinase type plasminogen activator polarizes expression of the protease to the leading edge of migrating monocytes and promotes degradation of enzyme inhibitor complexes. *J Cell Biol* 111(2) :783-92.
- Evain-Brion, D. **1991**. Les facteurs de croissance et leurs récepteurs, In: C. Thibault and M. Levasseur (ed). *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. Paris, p. 159-169.

- Evans DL, McGrogan M, Scott RW, Carrell RW. **1991**. Protease specificity and heparin binding and activation of recombinant protease nexin I. *J Biol Chem* 266(33):22307-12.
- Fetni N. **2001**. Identification des gènes exprimés lors de la dominance folliculaire et de l'ovulation chez la vache par étalement différentiel des ARN messagers. Mémoire de maîtrise. Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, 166 p.
- Fetni N, Sirois J, Silversides DW, Lussier JG. **2002**. Molecular analysis of gene expression in granulosa cells of dominant or preovulatory follicles in cattle by mRNA differential display. *Theriogenology* 57(1):638.
- Findlay JK, Clarke IJ, Luck MR, Rodgers RJ, Shukovski L, Robertson DM, Klein R, Murray JF, Scaramuzzi RJ, Bindon BM, et al. **1991**. Peripheral and intragonadal actions of inhibin-related peptides. *J Reprod Fertil Suppl* 43:139-50.
- Findlay JK, Sai X, Shukovski L. **1990**. Role of inhibin related peptides as intragonadal regulators. *Reprod Fert Develop* 2: 205-218.
- Flack B. **1959**. Site of reproduction of oestrogen in rat ovary as studied in micro-transplant. *Acta physiology* 47:1.
- Fortune JE, Kito S, Byrd DD. **1999**. Activation of primordial follicles in vitro. *J. Reprod Fertil Suppl* 54:439-448.
- Fortune, JE. **1994**. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod* 50:225-32.
- Fortune JE, Sirois J, Turzillo AM, Lavoisier M. **1991**. Follicle selection in domestic ruminants. *J Reprod Fertil Suppl* 43:187-98.
- Fortune JE, Sirois J, Quirk SM. **1988**. The growth and differentiation of ovarian follicles during the bovine estrous cycle. *Theriogenology* 29:95-109.
- Fortune JE, Quirk SM. **1988**. Regulation of steroidogenesis in bovine preovulatory follicles. *J Anim Sci* 66(Suppl2) :1-8.
- Fortune, JE, Hansel W. **1985**. Concentrations of steroids and gonadotropins in follicular fluid from normal heifers and heifers primed for superovulation. *Biol Reprod* 32:1069-79.
- Fortune JE, Vincent SE. **1983**. Progesterone inhibits the induction of aromatase activity in rat granulosa cells in vitro. *Biol Reprod* 28: 1078-1089.
- Gentry PA, Plante L, Schroeder MO, LaMarre J, Young JE, Dodds WG. **2000**. Human ovarian follicular fluid has functional systems for the generation and modulation of thrombin. *Fertil Steril* 73(4):848-54.
- Ginther OJ. **2000**. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Anim Reprod Sci* 60:61-79.
- Ginther OJ, Bergfelt DR, Kulick LJ, Kot K. **1999**. Selection of the dominant follicle in cattle: establishment of follicle deviation in less than 8 hours through depression of FSH concentrations. *Theriogenology* 52: 1079-1093.
- Ginther OJ, Kot K, Kulick LJ, Wiltbank MC. **1997**. Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. *Theriogenology* 48:75-87.
- Ginther, OJ, Wiltbank MC, Fricke PM, Gibbons JR, Kot K. **1996**. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol Reprod* 55:1187-94.

- Gloor S, Odink K, Guenther J, Nick H, Monard D. **1986**. A glia-derived neurite promoting factor with protease inhibitory activity belongs to the protease nexins. *Cell* 47(5):687-93.
- Goldfarb M. **1996**. Functions of fibroblast growth factors in vertebrate development. *Cytokine Growth Factor Rev* 7:311-25.
- Gong JG, Campbell BK, Bramley TA, Gutierrez CG, Peters AR, Webb R. **1997**. Suppression in the secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and ovarian follicle development in heifers continuously infused with a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Biol Reprod* 55:68-74.
- Gong, J. G., T. A. Bramley, and R. Webb. **1993**. The effect of recombinant bovine somatotrophin on ovarian follicular growth and development in heifers. *J Reprod Fertil* 97:247-54.
- Gosden RG, Hunter RH, Telfer E, Torrance C, Brown N. **1988**. Physiological factors underlying the formation of ovarian follicular fluid. *J Reprod Fertil* 82:813-25.
- Grimmond S, Van Hateren N, Siggers P, Arkell R, Larder R, Soares MB, de Fatima Bonaldo M, Smith L, Tymowka-Lalanne Z, Wells C, Greenfield A. **2000**. Sexually dimorphic expression of protease nexin-1 and vanin-1 in the developing mouse gonad prior to overt differentiation suggests a role in mammalian sexual development. *Hum Mol Genet* 12: 9(10):1553-1560.
- GST Gene Fusion System, Pharmacia Biotech, Inc., Molecular Biology Reagents Division, Second Edition, **1996**, United-States.
- Guenther J, Nick H, Monard D. **1985**. A glia-derived neurite-promoting factor with protease inhibitory activity. *EMBO J* 4(8):1963-6.
- Hagglund AC, Ny A, Liu K, Ny T. **1996**. Coordinated and cell-specific induction of both physiological plasminogen activators creates functionally redundant mechanisms for plasmin formation during ovulation. *Endocrinology* 137(12):5671-7.
- Hafez, ESE, Jainudeen MR, Rosnina Y. **2000**. Hormones, Growth Factors, and Reproduction, p. 33-54. In : B. H. Hafez, E. S. E. Reproduction in farm animals, 7th ed. Lippincott Williams & Wilkin, Philadelphia.
- Hammond JM, Mondschein JS, Samara SE, Smith SA, Hagen DR. **1991**. The ovarian insulin-like growth factor system. *J Reprod Fertil* 43:199-208.
- Hanzen CH, Lourtie O, Drion PV. **2000**. Le développement folliculaire chez la vache I. Aspects morphologiques et cinétiques. *Ann Méd Vét* 144 : 223-235.
- Harlow E, Lane D. **1988**. Antibodies. A laboratory manual. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Harper KM, Brackett BG. **1993**. Bovine blastocyst development after in vitro maturation in a defined medium with epidermal growth factor and low concentrations of gonadotropins. *Biol Reprod* 1993 Feb;48(2):409-16.
- Hasan S, Hosseini G, Princivale M, Dong JC, Birsan D, Cagide C, de Agostini Al. **2002**. Coordinate expression of anticoagulant heparan sulfate proteoglycans and serine protease inhibitors in the rat ovary: a potent system of proteolysis control. *Biol Reprod* 66(1):144-58.
- Hasegawa Y, Miyamoto K, Abe Y, Nakamura T, Sugino H, Eto Y, Shibai H, Igarashi M. **1988**. Induction of follicle stimulating hormone receptor by

- erythroid differentiation factor on rat granulosa cell. *Biochem Biophys Res Commun* 156(2):668-74.
- He CS, Wilhelm SM, Pentland AP, Marmer BL, Grant GA, Eisen AZ, Goldberg GI. **1989**. Tissue cooperation in a proteolytic cascade activating human interstitial collagenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:2632-2636.
- Hebert CA, Baker JB. **1988**. Linkage of extracellular plasminogen activator to the fibroblast cytoskeleton: colocalization of cell surface urokinase with vinculin. *J Cell Biol* 106(4):1241-7.
- Herrin DL, Schmidt GW. **1988**. Rapid, reversible staining of Northern blots prior to hybridization. *Biotechniques* 6:196-200.
- Hirshfield AN. **1991**. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol* 124:43-101.
- Hirshfield AN. **1989**. Rescue of atretic follicles in vitro and in vivo. *Biol Reprod* 19:597-605.
- Hofstetter P, Kikinis Z, Altus MS, Pearson D, Nagamine Y. **1987**. A new genetic approach for studying hormonal regulation of urokinase-type plasminogen activator gene expression in LLC-PK1 cells. *Mol Cell Biol* 7(12):4535-41.
- Hosseini G, Liu J, de Agostini AI. **1996**. Characterization and hormonal modulation of anticoagulant heparan sulfate proteoglycans synthesized by rat ovarian granulosa cells. *J Biol Chem* 271(36):22090-9.
- Houde A, Lambert A, Saumande J, Silversides DW, Lussier JG. **1994**. Structure of the bovine follicle-stimulating hormone receptor complementary DNA and expression in bovine tissues. *Mol Reprod Dev* 39:127-135.
- Hsu SY, Hsueh AJW. **1997**. Hormonal regulation of apoptosis: an ovarian perspective. *Trends Endocrinol Metab* 8:207-213.
- Hsueh AJ, Billig H, Tsafiriri A. **1994**. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocrinol Rev* 15:707-24.
- Huarte J, Belin D, Bosco D, Sappino AP, Vassalli JD. **1987**. Plasminogen activator and mouse spermatozoa: urokinase synthesis in the male genital tract and binding of the enzyme to the sperm cell surface. *J Cell Biol* 104(5):1281-9.
- Hughes FM Jr., Evans-Storms RB, Cidlowski JA. **1998**. Evidence that non-caspase proteases are required for chromatin degradation during apoptosis. *Cell Death Differ* 5(12):1017-1027.
- Hughes FM, Jr., Gorospe WC. **1991**. Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. *Endocrinology* 129:2415-22.
- Hulshof SJC, Figueiredo JR, Beckers JF, Bevers MM, Ven Den Hurk R. **1994**. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. *Vet Quarterly* 16:78-80.
- Huntington JA, Read RJ, Carrell RW. **2000**. Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature* 407(6806):923-6.
- Hutchinson LA, Findlay JK, de Vos FL, Robertson DM. **1987**. Effects of bovine inhibin, transforming growth factor-beta and bovine Activin-A on granulosa cell differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 146(3):1405-12.
- Hynes RO. **1992**. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69(1):11-25.

- Ireland JJ, Roche JF. **1982a**. Effect of progesterone on basal LH and episodic LH and FSH secretion in heifers. *J Reprod Fertil* 64:295-302.
- Ireland JJ, Roche JF. **1982b**. Development of antral follicles in cattle after prostaglandin-induced luteolysis: changes in serum hormones, steroids in follicular fluid, and gonadotropin receptors. *Endocrinology* 111:2077-86.
- Ireland JJ, Roche JF. **1983**. Development of nonovulatory antral follicles in heifers: changes in steroids in follicular fluid and receptors for gonadotropins. *Endocrinology* 112:150-6.
- Ireland JJ, Murphree RL., Coulson P.B. **1980**. Accuracy of predicting stages of the bovine estrous cycle by gross appearance of the corpus luteum. *J Dairy Sci* 63: 155-160
- Irving JA, Pike RN, Lesk AM, Whisstock JC. **2000**. Phylogeny of the serpin superfamily: implications of patterns of amino acid conservation for structure and function. *Genome Res* 10(12):1845-1864.
- Ivell R. **1997**. Biology of the relaxin-like factor (RLF). *Rev Reprod* 2(3):133-8.
- Jaffe RB. **2000**. Importance of angiogenesis in reproductive physiology. *Semin Perinatol* 24(1):79-81.
- Jones PB, Welsh TH Jr., Hsueh AJ. **1982**. Regulation of ovarian progesterone production by epidermal growth factor in cultured rat granulosa cells. *J Biol Chem* 257:11268-73.
- JMP. **1989**. Software for statistical visualization on the Apple McIntosh. Version 2. SAS Institute Inc. Cary, NC.
- Kalra SP, Hovath T, Naftolin F, Xu B, Pu S, Kalra PS. **1997**. *J Neuro Endocrinol* 9(8):569-576.
- Kerr JFR, Gobe GC, Winterford CM, Harmon BV. **1995**. Anatomical methods of cell death. *Methods Cell Biol* 46:1-27.
- Kinn IC, Schomberg DW. **1989**. The production of transforming growth factor  $\beta$  activity by rat granulosa cell cultures. *Endocrinology* 124:1345-1351.
- Kirkpatrick BW, Byla BM, Gregory KE. **2000**. Mapping quantitative trait loci for bovine ovulation rate. *Mamm Genome* 11:136-139.
- Knauer DJ, Majumdar D, Fong PC, Knauer MF. **2000**. SERPIN regulation of factor XIa. The novel observation that protease nexin 1 in the presence of heparin is a more potent inhibitor of factor XIa than C1 inhibitor. *J Biol Chem* 275(48):37340-6.
- Knauer MF, Hawley SB, Knauer DJ. **1997a**. Identification of a binding site in protease nexin I (PN1) required for the receptor mediated internalization of PN1-thrombin complexes. *J Biol Chem* 272(19):12261-4.
- Knauer MF, Kridel SJ., Hawley SB., Knauer DJ. **1997b**. The efficient catabolism of thrombin-protease nexin-1 complexes is a synergistic mechanism that requires both the LDL receptor-related protein and cell surface heparins. *J Biol Chem* 272(46) : 29039-45.
- Knight PG and Glister C. **2001**. Potential local regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary. *Reproduction* 121: 503-512.
- Ko JCH, Kastelic JP, Del Campo MR, Ginther OJ. **1991**. Effects of a dominant follicle on ovarian follicular dynamics during the oestrous cycle in heifers. *J Reprod Fert* 91: 511-519.

- Komiyama T, Ray CA, Pickup DJ, Howard AD, Thornberry NA, Peterson EP, Salvesen G. **1994**. J Biol Chem 169:19331-19337.
- Kraut J. **1977**. Serine proteases: structure and mechanism of catalysis. Annu Rev Biochem 46:331-58.
- Kruip TA, Dieleman SJ. **1982**. Macroscopic classification of bovine follicles and its validation by micromorphological and steroid biochemical procedures. Reprod Nutr Dev 22:465-73.
- Kruys V, Marinx O, Shaw G, deschanps J, Huez G. **1989**. Translational blockade imposed by cytokine-derived UA-rich sequences. Sciences 245:852-855.
- Kudlow JE, Kobrin MS, Purchio AF, Twardzik DR, Hernandez ER, Asa SL, Adashi EY. **1987**. Ovarian transforming growth factor a gene expression: immunohistochemical localization to the theca interstitial cells. Endocrinology 121: 1577-1570.
- Kulick LJ, Kot K, Wiltbank MC, Ginther OJ. **1999**. Follicular and hormonal dynamics during the first follicular wave in heifers. Theriogenology 52: 913-921.
- Lagriffoul A, Charoentier N, Carrette J, Tougard C, Bockaert J, Homburger V. **1996**. Secretion of protease nexin-1 by C6 glioma cells is under the control of a heterotrimeric G protein, Go1. J Biol Chem 27 :1508-1516.
- Lambert A. **1993**. Caractérisation partielle du récepteur à l'hormone folliculo-stimulante bovine. Thèse de maîtrise ès Sciences, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Canada.
- Lavoir M, Fortune JE. **1990**. Follicular dynamics in heifers after injection of PGF2a during the first wave of follicular development. Theriogenology 33: 270 (abstract).
- Lederer K, Luciano A, Pappalardo A, Peluso J. **1995**. Proliferative and steroidogenic capabilities of different-sized rat granulosa cells. J Reprod Fertil 103: 47-54.
- Lei ZM, Mishra S, Zou W, Xu B, Foltz M, Li X, Rao CV. **2001**. Targeted disruption of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor gene. Mol Endocrinol 15:184-200.
- Leonardson G, Peng XR, Liu K, Nordström L, Carmeliet P, Mulligan R, Collen D, Ny T. **1995**. Ovulation efficiency is reduced in mice that lack plasminogen activator gene function: Functional redundancy among physiological plasminogen activators. Proc Natl Acad Sci USA 92(12): 12446-12450.
- Li M, Karakji EG, Xing R, Fryer JN, Carnegie JA, Rabbani SA, Tsang BK. **1997**. Expression of urokinase-type plasminogen activator and its receptor during ovarian follicular development. Endocrinology 138(7):2790-9.
- Liang P, Pardee AB. **1992**. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. Science 257(5072):967-71.
- Liang P, Pardee AB. **1998**. Differential display : A general protocol. In :Differential display methods and protocols. Methods in Molecular Biology, Eds P Liang and AB Pardee, Humana Press, New Jersey, pages 3-12.
- Lien S, Karlsen A, Klemetsdal G, Vage DI, Olsaker I, Klungland H, Aasland M, Herringstad B, Ruane J, Gomez-Raya L. **2000**. A primary screen of the bovine genome for quantitative trait loci affecting twinning rate. Mamm Genome 11:877-882.

- Lipner H. **1988**. Mechanisms of mammalian ovulation. In: Knobil E, Neill (eds). The physiology of reproduction. Raven Press, New York. 447-488.
- Liu YX. **1999**. Regulation of the plasminogen activator system in the ovary. *Biol. Signals Recept* 8: 160-177.
- Liu YX, Feng Q, Stefan C. **1991a**. A comparative study on involvement of tPA activity in ovulation induced by hCG and GnRH agonist in hypophysectomized rats. *Sci China B* 34(10):1215-24.
- Liu YX, Feng Q, Zou RJ. **1991b**. [Changes of ovarian plasminogen activator and inhibitor during gonadotropin-induced ovulation in rhesus monkeys] *Sheng Li Xue Bao* 43(5):472-9.
- Lobb DK, Kobrin MS, Kudlow JE, Dorrington JH. **1989**. Transforming growth factor-alpha in the adult bovine ovary: identification in growing ovarian follicles. *Biol Reprod* 40:1087-93.
- Luck MR, Ye J, Almisliamani H, Hibberd S. **2000**. Follicular fluid rheology and the duration of the ovulatory process. *J Reprod Fertil* 120:411-421.
- Lucy MC, Savio JD, Badinga L, De La Sota RL, Thatcher WW. **1992**. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *J Anim Sci* 70(11):3615-26.
- Lussier JG, Sirois J, Price C, Carrière P, Silversides DW. **2001**. Research in genomics applied at the undergraduated level: when research meets teaching objectives. *Biol Reprod* 64 Suppl 1; abstract 71.
- Lussier JG, Matton P, Dufour JJ. **1987**. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *J Reprod Fertil* 81:301-7.
- Lussier JG, Matton P, Guilbault LA, Grasso F, Mapletoft RJ, Carruthers TD. **1994**. Ovarian follicular development and endocrine responses in follicular- fluid-treated and hemi-ovariectomized heifers. *J Reprod Fertil* 102:95-105.
- Nishibori M, Chikai T, Kawabata M, Ohta J, Ubuka T, Saeki K. **1995**. Purification of a novel serpin-like protein from bovine brain. *Neurosci Res* 24(1):47-52.
- Nishimori K, Matzuk MM. **1996**. Transgenic mice in the analysis of reproductive development and function. *Rev Reprod* 1(3):203-12.
- Magoffin DA, Gancedo B, Erickson GF. **1989**. Transforming growth factor-beta promotes differentiation of ovarian thecal-interstitial cells but inhibits androgen production. *Endocrinology* 125:1951-8.
- Mansuy IM, van der Putten H, Schmid P, Meins M, Botteri FM, Monard D. **1993**. Variable and multiple expression of protease nexin-1 during mouse organogenesis and nervous system development. *Development* 119:1119-1134.
- Martin T, Fogwell RL, Ireland JJ. **1991**. Concentrations of inhibins and steroids in follicular fluid during development of dominant follicles in heifers. *Biol Reprod* 44:693-700.
- Mariana JC, Monniaux D, Driancourt MA, Maelon P. **1991**. Folliculogenesis. In: Cupps PT (Eds): *Reproduction in domestic animals*. Academic Press, San diego. 119-171.
- Matrisian LM. **1990**. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet* 6(4):121-5.

- Matrisian LM, Hogan BL. **1990**. Growth factor-regulated proteases and extracellular matrix remodeling during mammalian development. *Curr Top Dev Biol* 24:219-59.
- Matzuk M, Ginogold M, Su J, Hsueh A, Bradley A. **1992**.  $\alpha$ -inhibin is a tumour-suppressor gene with gonadal specificity in mice. *Nature* 360:313-319.
- Matzuk M, Kumar T, Bradley A. **1995**. Different phenotypes for mice deficient in either activins or activin receptor type II. *Nature* 374:356-360.
- Mbedi C, Hantai D, Jandrot-Perrus M, Doyennette MA, Verdiere-Sahuque m. **1999**. Protease nexin 1 expression is up-regulated in human skeletal muscle by injury-related factors. *J Cell Physiol* 179(3):305-314.
- McGee EA, Hsueh AJW. **2000**. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev* 21(2):200-214.
- McGrath S, Esquela A, Lee S-J. **1995**. Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9. *Mol Endocrinol* 9 :131-136.
- McNatty KP, Heath DA, Henderson KM, Lun S, Hurst PR, Ellis LM, Montgomery GW, Morrison L, Thurley DC. **1984**. Some aspects of thecal and granulosa cell function during follicular development in the bovine ovary. *J Reprod Fertil* 72:39-53.
- Medema JP, de Jong J, Peltenburg LTC, Verdegaal EME, Gorter A, Bress SA, Franken KLMC, Hahne M, Albar JP, Melief CJM, Offringa R. **2001**. Blockade of the granzyme B/perforin pathway through overexpression of the serine protease inhibitor PI-9/SPI-6 constitutes a mechanism for immune escape by tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(20) :11515-20.
- Mentz S, de Lacalle S, Baerga-Ortiz A, Knauer MF, Knauer DJ, Komives EA. **1999**. Mechanism of thrombin clearance by human astrocytoma cells. *J Neurochem* 72 (3):980-987.
- Miro F, Smyth CD, Hillier SG. **1991**. Development-related effects of recombinant activin on steroid synthesis in rat granulosa cells. *Endocrinology* 129(6):3388-94.
- Monard D, Albrecht H, Altrogge D Bei, Bouton MC, Chevron MP, Fries-Schmid E, Meins MR, Mihailescu D, Murer V, Piosik PA, Schaeren-Wiemers N, Sinnreich M, Taieb S. **2000**. Modulation of embryonic development and of neural functions by serine proteases and their inhibitors. <http://www.fmi.ch-report-Monard.htm>.
- Monget P. **1993**. Importances des facteurs paracrines dans l'ovaire. IXe réunion, AETE LYON, 10-11 septembre. 75-85.
- Monniaux D, Mandon-Pepin B, Monget P. **1999**. L'atrésie folliculaire, un gaspillage programmé. *Med Sci* 15:157-66.
- Monniaux D, Monget P. **1997**. Gonadotropines et régulations paracrines ovariennes. Intégration des mécanismes de régulation d'un processus physiologique complexe, la folliculogénèse ovarienne. In: Combarous Y, Volland-Nail P (eds), *Les gonadotropines*. INRA 267-284.
- Monniaux D, Huet C, Besnard N, Clement F, Bosc M, Pisselet C, Monget P, Mariana JC. **1997**. Follicular growth and ovarian dynamics in mammals. *J Reprod Fertil Suppl* 51:3-23.

- Monniaux D, Chupin D, Saumande J. **1983**. Superovulatory responses of cattle. *Theriogenology* 19: 55-64.
- Morbeck DE, Flowers WL, Britt JH. **1993**. Response of porcine granulosa cells isolated from primary and secondary follicles to FSH, 8-bromo-cAMP and epidermal growth factor in vitro. *J Reprod Fertil* 99:577-84.
- Morgenstern KA, Sprecher C, Holth L, Foster D, Grant FJ, Ching A, Kisiel W. **1994**. Complementary DNA cloning and kinetic characterization of a novel intracellular serine proteinase inhibitor: mechanism of action with trypsin and factor Xa as model proteinases. *Biochemistry* 33(11):3432-41.
- Mou L, Miller H, Li J, Wang E, Chalifour L. **1994**. Improvements to the differential display method for gene analysis. *Biochem Biophys Res Commun* 199 :564-569.
- Mulheron GW, Schomberg DW. **1993**. The intraovarian transforming growth factors system, p. 337-361. In E. Y. Adashi and P. C. K. Leung (ed.), *The ovary*. Raven Press, New York.
- Murer V, Spetz JF, Hengst U, Ludger MA, de Agostini A, Monard D. **2001**. Male fertility defects in mice lacking the serine protease inhibitor protease nexin-1. *Proc Natl Acad Sci* 98 (6): 3029-3033.
- Murphy G, Ward R, Gavrilovic J, Atkinson S. **1992**. Physiological mechanisms for metalloproteinase activation. *Matrix suppl* 1:224-230.
- Ny A, Nordström L, Carmeliet P, Ny T. **1997**. Studies of mice lacking plasminogen activator gene function suggest that plasmin production prior to ovulation exceeds the amount needed for optimal ovulation efficiency. *Eur J Biochem* 244:487-493.
- Ny T, Peng XR, Ohlsson M. **1993**. Hormonal regulation of the fibrinolytic components in the ovary. *Thromb Res* 71:1-45.
- Nykjaer A, Conese M, Christensen EI, Olson D, Cremona O, Gliemann J, Blasi F. **1997**. Recycling of the urokinase receptor upon internalization of the uPA:serpin complexes. *EMBO J* 16(10):2610-20.
- Park IC, Park MJ, Choe TB, Jang JJ, Hong SI. **2000**. TNF-alpha induces apoptosis mediated by AEBSF-sensitive serine protease (s) that may involve upstream caspase-3/CPP32 protease activation in a human gastric cancer cell line. *Int J Oncol* 16(6):1243-1248.
- Pepper MS, Vassali JD, Montesano R, Orci L. **1987**. Urokinase-type plasminogen activator is induced in migrating capillary endothelial cells. *J Cell Biol* 105(6 Pt 1) :2535-41.
- Peluso JJ, Pappalardo A. **1998**. Progesterone mediates its anti-mitogenic and anti-apoptotic actions in rat granulosa cells through a progesterone binding protein with GABA<sub>A</sub> receptor-like features. *Biol Reprod* 58:1131-1137 (abstract).
- Peluso JJ, Pappalardo A. **1999**. Progesterone maintains large rat granulosa cell viability indirectly by stimulating small granulosa cells to synthesize basic fibroblast growth factor. *Biol Reprod* 60: 290-296.
- Peng XR, Hsueh AJW, Ny T. **1993**. Transient and cell specific expression of tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1 results in a controlled and directed proteolysis during gonadotropin-induced ovulation. *Eur J Biochem* 214 : 147-56.

- Picton HM, Tsonis CG, Neilly AS. **1990**. FSF causes a time dependent stimulation of preovulatory follicle growth in the absence of pulsatile LH secretion in ewes chronically treated with GnRH agonist. *J Endocrinol* 126: 297-307.
- Plend J. **2000**. Angiogenesis and vascular regression in the ovary. *Anat Histol Embryol* 29(5):257-266.
- Pollanen J, Hedman K, Nielson LS, Dano K, Vaheri A. **1988**. Ultrastructural localization of plasma membrane-associated urokinase-type plasminogen activator at focal contacts. *J Cell Biol* 106(1) :87-95.
- Potempa J, Korzus E, Travis J. **1994**. The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function, and regulation. *J Biol Chem* 269:15957-15960.
- Porter DA, Harman RM, Cowan RG, Quirk SM. **2001**. Relationship of Fas ligand expression and atresia during bovine follicle development. *Reproduction* 121(4): 561-566.
- Price CA, Carrière PD, Bhatia B, Groome NP. **1995**. A comparison of hormonal and histological changes during follicular growth, as measured by ultrasonography, in cattle. *J Reprod Fertil* 103:63-68.
- Princivalle M, Hasan S, Hosseini G, de Agostini AI. **2001**. Anticoagulant heparan sulfate proteoglycans expression in the rat ovary peaks in preovulatory granulosa cells. *Glycobiology* 11(3):183-94.
- Rabahi F, Brûlé S, Sirois J, Beckers J-F, Silversides DW, Lussier JG. **1999**. High expression of bovine  $\alpha$  glutathione S-transferase (GSTA1, GSTA2) subunits is mainly associated with steroidogenically active cells and regulated by gonadotropins in bovine ovarian follicles. *Endocrinology* 140 :3507-3517.
- Rahe CH, Owens RE, Fleegeer JL, Newton HJ, Harms PG. **1980**. Pattern of plasma luteinizing hormone in the cyclic cow: dependence upon the period of the cycle. *Endocrinology* 107:498-503.
- Rajamahendran R, Lague PC, Baker RD. **1979**. Estrus and LH release in ovariectomized heifers following vaginal devices containing ovarian steroids. *J Anim Sci* 1979 49(2):554-9.
- Rao IM, Mills TM, Anderson E, Mahesh VB. **1991**. Heterogeneity in granulosa cells of developing rat follicles. *Anat Rec* 229: 177-185.
- Reed JC. **2000**. Mechanisms of apoptosis. *Amer J Pathol* 157 (5):1415-1430.
- Richards J. **1994**. Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocr Rev* 15:725-751.
- Roberts AJ, Skinner MK. **1991**. Transforming growth factor-alpha and -beta differentially regulate growth and steroidogenesis of bovine thecal cells during antral follicle development. *Endocrinology* 129(4):2041-8.
- Robertson DM, Foulds LM, Leversha L, Morgan FJ, Hearn MT, Burger HG, Wettenhall RE, de Kretser DM. **1985**. Isolation of inhibin from bovine follicular fluid. *Biochem Biophys Res Commun* 126(1):220-6.
- Roche JF. **1996**. Control and regulation of folliculogenesis-a symposium in perspective. *Rev Reprod* 1:19-27.
- Roche JF, Mihm M, Diskin MG. **1997**. Physiology and practice of inducing and control of oestrus cycle in cattle. *Bovine Practitioner*. 31: 4-10.
- Rodgers RJ, Irving-Rodgers HF, van Wezel IL. **2000**. Extracellular matrix in ovarian follicles. *Mol Cell Endocrinol* 163(1-2):73-9.

- Rossi P, Grimaldi P, Blasi F, Geremia R, Geremia P. **1990**. Glucocorticoids stimulate plasminogen activator production by rat granulosa cells. *Endocrinology* 124(4) :1595-601.
- Roy SK. **1993**. Epidermal growth factor and transforming growth factor-beta modulation of follicle-stimulating hormone-induced deoxyribonucleic acid synthesis in hamster preantral and early antral follicles. *Biol Reprod* 48:552-7.
- Saitou N, Nei N. **1987**. The neighbor-joining method : a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4(4):406-425.
- Saksela O, Rifkin DB. **1988**. Cell-associated plasminogen activation: regulation and physiological functions. *Annu Rev Cell Biol.* 4:93-126.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. **1989**. Molecular cloning. A laboratory manual. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanbuissho A, Lee GY, Anderson E. **1993**. Functionnal and ultrastructural characteristics of two types of rat granulosa cell cultured in the presence of FSH or transforming growth factor alpha (TGF-alpha). *J Reprod Fertil* 98 : 367-376.
- Sanchez R, Sali A. **1998**. Large-scale protein structure modeling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(23):13597-602.
- Sappino AP, Huarte J, Belin D, Vassali JD. **1989**. Plasminogen activators in tissue remodeling and invasion: mRNA localization in mouse ovaries and implanting embryos. *J Cell Biol* 109(5):2471-9.
- Saumande, J. **1991**. La folliculogénèse chez les ruminants. *Rec Med Vét* 167:205-218.
- Savio JD, Thatcher WW, Badinga L, de la Sota RL, Wolfenson D. **1993**. Regulation of dominant follicle turnover during the oestrous cycle in cows. *J Reprod Fertil* 97:197-203.
- Savion N, Lui GM, Laherty R, Gospodarowicz D. **1981**. Factors controlling proliferation and progesterone production by bovine granulosa cells in serum-free medium. *Endocrinology* 109:409-20.
- Scott RW, Baker JB. **1983**. Purification of protease nexin. *J Biol Chem* 258:10439-10444.
- Scott RW, Bergman BL, Bajpai A, Hersh RT, Rodriguez H, Jones BN, Barreda C, Watts S, Baker JB. **1985**. Protease nexin, Properties and a modified purification procedure. *J Biol Chem* 260:7029-7034.
- Setchell BP. **1993**. Male Reproduction. In G. King (ed.), *Reproduction in Domestic Animals*. Elsevier Science Publishing BV, New York.
- Shukovski L, Findlay JK, Robertson DM. **1991**. The effect of follicle-stimulating hormone-suppressing protein or follistatin on luteinizing bovine granulosa cells in vitro and its antagonistic effect on the action of activin. *Endocrinology* 129(6):3395-402.
- Silverman GA, Batarski AJ, Cataltepe S, Gornstein ER, Kamachi Y, Schick C, Uemura Y. **1998**. SCCA1 and SCCA2 are proteinase inhibitors that map to the serpin cluster at 18q21.3. *Tumour Biol* 19(6) :480-7.

- Silverman GA, Bird PI, Carrell RW, Church FC, Coughlin PB, Gettings PGW, Irving JA, Lomas DA, Luke CJ, Moyer RW, Pemberton PA, Reynold-O'Donnell E, Salvesen GS, Travis J, Whisstock C. **2001**. The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *J Biol Chem* 276(36):33293-33296.
- Sirois J. **1994**. Induction of prostaglandin endoperoxide synthase-2 by human chorionic gonadotropin in bovine preovulatory follicles in vivo. *Endocrinology* 135 :841-848.
- Sirois J, Fortune JE. **1990**. Lengthening the bovine estrous cycle with low levels of exogenous progesterone: a model for studying ovarian follicular dominance. *Endocrinology* 127:916-25.
- Sirois J, Fortune JE. **1988**. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol Reprod* 39:308-17.
- Skinner MK, Keski-Oja J, Osteen KG, Moses HL. **1987**. Ovarian thecal cells produce transforming growth factor-beta which can regulate granulosa cell growth. *Endocrinology* 121:786-92.
- Skinner MK, Coffey RJ Jr. **1988**. Regulation of ovarian cell growth through the local production of transforming growth factor-alpha by theca cells. *Endocrinology* 123(6):2632-8.
- Skinner MK, Osteen KG. **1988**. Developmental and hormonal regulation of bovine granulosa cell function in the preovulatory follicle. *Endocrinology* 123:1668-75.
- Solary E. **1998**. [Apoptosis: molecular mechanisms] *C R Seances Soc Biol Fil* 1998;192(6):1065-76.
- Spicer LJ, Alpizar E, Echtenkamp SE. **1993**. Effects of insulin, insulin-like growth factor I, and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol production, and (or) insulin-like growth factor I production in vitro. *J Anim Sci* 71:1232-41.
- Spicer LJ, Alpizar E, Vernon RK. **1994**. Insulin-like growth factor-I receptors in ovarian granulosa cells: effect of follicle size and hormones. *Mol Cell Endocrinol* 102:69-76.
- Sprecher CA, Morgenstern KA, Mathewes S, Dahlen JR, Schrader SK, Foster DC, Kisiel W. **1995**. Molecular cloning, expression, and partial characterization of two novel members of the ovalbumin family of serine proteinase inhibitors. *J Biol Chem* 270(50):29854-61.
- Soto E, Silavin SL, Tureck RW, Strauss JF, 3rd. **1984**. Stimulation of progesterone synthesis in luteinized human granulosa cells by human chorionic gonadotropin and 8-bromo-adenosine 3',5'- monophosphate: the effect of low density lipoprotein. *J Clin Endocrinol Metab* 58:831-7.
- Staigmiller RB, England BG, Webb R, Short RE, Bellows RA. **1982**. Estrogen secretion and gonadotropin binding by individual bovine follicles during estrus. *J Anim Sci* 55:1473-82.
- Stanton PG, Burgon PG, Hearn MT, Robertson DM. **1996**. *Mol Cell Endocrinol* 125(1-2):133-141.

- Stock AE, Fortune JE. **1993**. Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. *Endocrinology* 132:1108-14.
- Stone SR, Hermans JM. **1995**. Inhibitory mechanism of serpins. Interaction of thrombin with antithrombin and protease nexin 1. *Biochemistry* 34(15):5164-72.
- Stone SR, Nick H, Hofsteenge J, Monard D. **1987**. Glial-derived neurite-promoting factor is a slow-binding inhibitor of trypsin, thrombin, and urokinase. *Arch Biochem Biophys* 252:237-244.
- Strickland DK, Gonias SL, Argraves WS. **2002**. Diverse roles for the LDL receptor family. *Trends Endocrinol Metab* 13(2):66-74.
- Strickland S, Beers WH. **1976**. Studies on the role of plasminogen activator in ovulation. In vitro response of granulosa cells to gonadotropins, cyclic nucleotides and prostaglandins. *J Biol Chem* 251(18):5694-702.
- Sugino N, Telleria CM, Gibori G. **1997**. Progesterone inhibits 20 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase expression in the rat corpus luteum through the glucocorticoid receptor. *Endocrinology* 138(10):4497-500.
- Sun J, Bird CH, Sutton V, Mc Donald L, Coughlin PB, Dejong TA, Trapani JA, Bird PI. **1996**. A cytosolic granzyme B inhibitor related to the viral apoptotic regulator cytokine response modifier A is present in cytotoxic lymphocytes. *J Biol Chem* 271(44):27802-9.
- Sunderland SJ, Crowe MA, Boland MP, Roche JF, Ireland JJ. **1994**. Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrus cycle of heifers. *J Reprod Fertil* 101: 547-555.
- Taya, K, Kaneko H, Takedomi T, Kishi H, Watanabe G. **1996**. Role of inhibin in the regulation of FSH secretion and folliculogenesis in cow. *Anim Reprod Sci* 42:563-570.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. **1994**. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, portion-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673-4680.
- Tilly JL, Kowalski KI, Johnson AL, Hsueh AJ. **1991**. Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology* 129(5):2799-801.
- Tilly JL. **1996**. Apoptosis and ovarian function. *Rev Reprod* 1:162-72.
- Tsafiriri A. **1995**. Ovulation as a tissue remodelling process-proteolysis and cumulus expansion. *Adv Exp Med Biol* 377:121-140.
- Tsafiriri A. **1988**. Local nonsteroidal regulators of ovarian function. In: Knobil E, Neill JD (eds.), *The physiology of reproduction*. New York, Raven Press. 527-566.
- Tsafiriri A, Braw RH. **1984**. Experimental approaches to atresia in mammals. *Oxf Rev Reprod Biol* 6:226-65.
- Tureck RW, Strauss JF, 3rd. **1982**. Progesterone synthesis by luteinized human granulosa cells in culture: the role of de novo sterol synthesis and lipoprotein-carried sterol. *J Clin Endocrinol Metab* 54:367-73.

- Turgeon VL, Houenou LJ. **1997**. The role of thrombin-like (serine) proteases in the development, plasticity and pathology of the nervous system. *Brain Res Brain Res Rev* 25(1):85-95.
- Turzillo AM, Fortune JE. **1993**. Effects of suppressing plasma FSH on ovarian follicular dominance in cattle. *J Reprod Fert* 98: 113-119.
- Vale W. **1994**. Reproductive and other roles of inhibins and activins. In : E. Knobil and J. D. Neil (ed.), *Reproductive Physiology*, 2nd ed, vol. 1. Raven Press, New York.
- Van Wenzel IL, Dharmarajan AM, Lavranos TC, Rodgers RJ. **1999**. Evidence for alternative pathways of granulosa cell death in healthy and slightly atretic bovine antral follicles. *Endocrinology* 140(6): 2602-2612.
- Van Zonneveld AJ, Curriden SA, Loskutoff DJ. **1988**. Type 1 plasminogen activator inhibitor gene: functional analysis and glucocorticoid regulation of its promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(15) :5525-9.
- Vassali JD, Sappino AP, Belin D. **1991**. The plasminogen activator/plasmin system. *J Clin Invest* 88:1067-1071.
- Vassali JD, Huarte K, Bosco D, Sappino AP, Sappino N, Valardi A, Wohlwend A, Erno H, Monard D, Belin D. **1993**. Protease-nexin I as an androgen-dependent secretory product of the murine seminal vesicle. *EMBO J* 12 (5):1871-1878.
- Walters DL, Schallenberger E. **1984**. Pulsatile secretion of gonadotrophins, ovarian steroids and ovarian oxytocin during the periovulatory phase of the oestrus cycle in the cow. *J Reprod Fert* 71:503-512.
- Wandji SA, Srsen V, Voss AK, Eppig JJ, Fortune JE. **1996**. Initiation in vitro of growth of bovine primordial follicles. *Biol Reprod* 55:942-8.
- Wandji SA, Pelletier G, Sirard MA. **1992**. Ontogeny and cellular localization of 125I-labeled insulin-like growth factor-I, 125I-labeled follicle-stimulating hormone, and 125I-labeled human chorionic gonadotropin binding sites in ovaries from bovine fetuses and neonatal calves. *Biol Reprod* 47:814-22.
- Wang C, Leung A. **1989**. Glucocorticoids stimulate plasminogen activator production by rat granulosa cells. *Endocrinology* 124(4) :1595-601.
- Wang GQ, Wieckowski E, Goldstein LA, Gastman BR, Rabinovitz A, Gambotto A, Li S, Fang B, Yin XM, Rabinowivh H. **2001**. Resistance to Granzyme B-mediated Cytochrome c release in Bak-deficient cells. *J Exp Med* 94(9): 1325-1338.
- Webb R, Reddy KJ, Sherman LA. **1989**. Lambda Zap : Improved strategies for expression library construction and use. *DNA* 8 :69-73.
- Werb Z, Mainardi CL, Vater CA, Harris J, ED. **1977**. Endogenous activation of latent collagenase by rheumatoid synovial cells: evidence for a role of plasminogen activator. *N Engl J Med* 296:1017-1023.
- Willnow TE, Nykjaer A, Herz J. **1999**. Lipoprotein receptors: new roles for ancient proteins. *Nat Cell Biol*1(6):E157-62.
- Wright HT. **1996**. The structural puzzle of how serpin serine proteinase inhibitors work. *Bioessays*.18(6):453-64.
- Xiao S, Robertson DM, Findlay JK. **1992**. Effects of activin and follicle-stimulating hormone (FSH)-suppressing protein/follistatin on FSH receptors and differentiation of cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 131(3):1009-16.

- Xiao S, Findlay JK, Robertson DM. **1992**. The effect of bovine activin and follicle stimulating hormone (FSH) suppressing protein/follistatin on FSH-induced differentiation of rat granulosa cells in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 133: 131-139.
- Xu N, Chen CY, Shyu AB. **1997**. Modulation of the fate of cytoplasmic mRNA by AU-rich elements: key sequence features controlling mRNA deadenylation and decay. *Mol Cell Biol* 17(8):4611-21.
- Xun Chen CYA et Ahyu AB. **1997**. Modulation of the fate of cytoplasmic mRNA by AU-rich elements: key sequence features controlling mRNA deadenylation and decay. *Mol Cell Biol* 17:4611-4621.
- Yamada M, Gentry PA. **1995**. Hemostatic profile of bovine ovarian follicular fluid. *Can J Physiol Pharmacol* 73(5):624-9.
- Yang MY, Rajamahendran R. **2000**. Involvement of apoptosis in the atresia of non ovulatory dominant follicle during the bovine estrous cycle. *Biol Reprod* 63(5):1313-1321.
- Yi-Xun L. **1999**. Regulation of the plasminogen activator system in the ovary. *Biol Signals Recept* 8:160-177.
- Zeleznik AJ. **1993**. Dynamics of primate follicular growth, p. 41-55. In E. Y. Adashi and P. C. K. Leung (ed.), *The ovary*. Raven Press, New York.
- Zeleznick AJ, Schuler HM, Reichert Jr. LE. **1981**. Gonadotropin-binding sites in the rhesus monkey ovary: role of the vasculature in the selective distribution of human chorionic gonadotropin to the preovulatory follicle. *Endocrinology* 109:356-362.
- Zhang, FP, Poutanen M, Wilbertz J, Huhtaniemi I. **2001**. Normal prenatal but arrested postnatal sexual development of luteinizing hormone receptor knockout (LuRKO) mice. *Mol Endocrinol* 15:172-83.
- Zhou J, Kumar T, Matzuk M, Bondy C. **1997**. Insulin-like growth factor I regulates gonadotrophin responsiveness in the murine ovary. *Mol Endocrinol* 11 : 1924-1933.