

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

**LA RÉGULATION DU GÈNE CYP19A1 DANS LES CELLULES  
DE GRANULOSA BOVINE IN VITRO**

Par

Fatiha sahmi

Département de biomédecine vétérinaire  
Faculté de médecine vétérinaire

Thèse présentée à la Faculté de médecine vétérinaire en vue de  
l'obtention du grade *philosophiae doctor* (Ph.D.)

en science vétérinaires option reproduction

Août, 2013

© Fatiha Sahmi, 2013

## RÉSUMÉ

L'oestradiol joue un rôle important dans la reproduction en général, particulièrement dans la croissance folliculaire chez la vache. La production de l'oestradiol nécessite l'expression du gène CYP19A1 suite à la stimulation des cellules de granulosa par l'hormone folliculostimulante (FSH) ou le facteur de croissance insulinique de type 1 (IGF-1).

Chez la vache, il existe six promoteurs (1.1 ; 1.2 ; 1.3 ; 1.4 ; 1.5 et 2) qui dirigent la transcription du gène CYP19A1 dans les cellules de la granulosa. Le principal promoteur qui dirige la transcription au niveau de l'ovaire (cellules de granulosa) est le promoteur 2 (P2). Cependant, l'effet de la FSH et de l'IGF-1 sur l'activation de ces promoteurs d'aromatase demeure mal connu. De plus, la demi-vie du transcrit CYP19A1 est très courte avec une région 3'UTR relativement longue. L'analyse de la séquence 3'UTR montre la présence des motifs ARE (séquence riche en AU), des études antérieures montrent que ces séquences impliquent dans la régulation de la stabilité ou la dégradation de l'ARNm, ce qui est fort probable que la courte demi-vie de l'ARNm CYP19A1 est sous le contrôle post-transcriptionnel.

L'objectif de la thèse visait à étudier la régulation de l'expression du gène CYP19A1 chez la vache. Il y a deux thèmes soit étude de la régulation transcriptionnelle ciblant le promoteur et soit étude de la régulation post-transcriptionnelle impliquant la région 3' non traduite (3'UTR).

Le premier objectif vise à étudier la régulation transcriptionnelle du gène CYP19A1. Nous avons étudié l'activité du promoteur ovarien bovin dans deux modèles de cellules de la granulosa, les cellules lutéinisées et nonlutéinisées *in vitro*, suite à une stimulation des cellules par la FSH ou IGF-1. Nous avons également évalué la voie de signalisation impliquée dans la régulation des différents promoteurs en utilisant un RT-PCR et un gène rapporteur (les différents promoteurs d'aromatase ont été insérés dans le vecteur

pGL3promoter en amont du gène exprimant la luciférase). Les résultats de RT-PCR démontrent que la FSH et l'IGF-1 augmentent les concentrations d'ARNm provenant des deux promoteurs 2 et 1.1 dans les cellules de la granulosa non lutéinisées. Des expériences subséquentes ont montré que la FSH stimule le promoteur 2 via la voie PKA tandis que l'IGF-1 stimule le promoteur 2 via la voie PKC. La FSH et l'IGF-1 stimulent l'expression du promoteur 1.1 via la voie PI3K.

L'analyse de l'activité luciférase démontre que dans les cellules de granulosa lutéinisées, la FSH stimule le promoteur 1.1 de façon dose dépendante et ne semble y avoir aucun effet significatif sur le promoteur 2. Nous avons donc comparé l'activité du promoteur PII/P2 humain, du rat, de la chèvre et de la vache dans les cellules de granulosa bovine lutéinisées. Le résultat le plus significatif est que le promoteur 2 bovine (et caprine) dépend de plusieurs facteurs de transcription (NR5A2, FOXL2) comparé au promoteur PII humain et celui du promoteur proximal du rat qui dépendent principalement de l'AMPc. En effet, nos résultats ont démontré une expression raisonnablement robuste du P2 bovine lorsque les cellules sont traitées à la forskoline, NR5A2 et FOXL2. Le facteur FOXL2 semble déterminer l'activité du promoteur 2 chez le ruminant.

Le deuxième objectif vise à étudier la régulation post-transcriptionnelle du gène CYP19A1. Pour ce faire, nous avons déterminé la séquence minimale de l'ARNm CYP19A1 requise pour la régulation de sa demi-vie. Différentes séquences de la région 3'UTR ont été insérés dans le vecteur pGL3promoter en aval du gène exprimant la luciférase ou soit dans le vecteur pGEMTeasy. Le vecteur pGL3promoter a été transfecté dans les cellules de granulosa lutéinisées pour évaluer l'impact de la séquence 3'UTR sur l'expression du gène rapporteur de la luciférase, alors que le vecteur pGEMTeasy a été utilisé pour la transcription in vitro afin de générer de l'ARNm. Ce dernier sera utilisé en réaction croisée

au UV avec des extraits protéiques pour démontrer l'association du complexe ARNm/protéine.

L'analyse de l'activité luciférase a permis d'identifier une séquence de 200 pb située entre 926 et 1134 pb de la région 3'UTR de l'ARNm CYP19A1 qui a réduit significativement l'activité de la luciférase. Selon les analyses de la réaction croisée au UV, une ou plusieurs protéines de 66 et 80 kDA se lient spécifiquement à la séquence de 200 pb qui réduit l'activité de luciférase. Cette protéine s'exprime dans les cellules de granulosa, mais n'a pas été détectée dans d'autres tissus comme le foie et le cœur.

Par ailleurs, l'utilisation du gène rapporteur sensible à la FSH a suscité l'intérêt d'une compagnie pharmaceutique qui vend de l'équine chorionic gonadotropin (eCG) pour lui permettre de distinguer facilement l'eCG ayant une forte activité FSH et donc, avoir un produit commercial plus efficace et de meilleure qualité. Dans cette étude, nous avons développé un système de bioessai à la FSH basé sur la transfection des cellules avec un récepteur à la FSH et un gène rapporteur colorimétrique qui permet d'estimer l'activité de la FSH dans le sérum de la jument et qui pourrait être applicable au niveau de la ferme/industrie.

**Mots-clés** : aromatase, promoteur, 3'UTR, eCG, cellules de la granulosa.

## ABSTRACT

Oestradiol plays an important role in reproduction in general, particularly during follicular growth. Production of estradiol requires the expression of CYP19A1 following stimulation of granulosa cells by follicle-stimulating hormone (FSH) and insulin like growth factor-1 (IGF-1).

In cows, there are six promoters (1.1, 1.2, 1.3, 1.4 and 1.5 and 2) that direct transcription of CYP19A1, and promoter 2 (P2) is the major promoter used in granulosa cells. However the effect of FSH and IGF-1 on the activation of these promoters of aromatase remains unclear. Further, the CYP19A1 gene has a very short half-life and a long 3' non-translated region (3'UTR) that suggests post-transcriptional as well as transcriptional regulation. The aim of my PhD project is to study the regulation of the CYP19A1 gene in the cow. This summary is divided into two parts, the transcriptional regulation involving the promoter region and the post-transcriptional regulation involving the 3'UTR.

The first part of my project was to study the transcriptional regulation of CYP19A1 gene; we measured the expression of the different promoters in luteinized or nonluteinized bovine granulosa cells following stimulation of cells with FSH or IGF-1. The results of RT-PCR showed that FSH and IGF-1 increases mRNA levels from both promoters 2 and 1.1 in non luteinized granulosa cells. Subsequent experiments showed that FSH stimulates the promoter 2 via the PKA pathway and IGF-1 stimulated promoter 2 via the PKC pathway. FSH and IGF-1 stimulate the expression of 1.1 via the PI3K pathway.

In subsequent studies in luteinized cells with luciferase reporter genes driven by the specific CYP19A1 promoters, FSH stimulated promoter 1.1 in a dose dependent manner but that promoter 2 was weakly activated and not responsive to FSH. We then compared the activity of human, rat, goat and bovine promoters in luteinised bovine granulosa cells. The most significant result is that the bovine (and caprine) P2 depends on several transcription factors

(NR5A2, FOXL2) whereas the human and rat promoters largely depend on cAMP. In fact, these data demonstrate a reasonably robust expression of the bovine P2 when treated with forskolin, NR5A2 and FOXL2. FOXL2 appears to be a determinant of promoter activity in ruminants.

The second part of my project was to study the post-transcriptional regulation of the CYP19A1 gene. The objective was to identify the elements required for the regulation of the half-life of CYP19A1 mRNA. To do so, we generated and inserted different fragments of the 3'UTR region of CYP19A1 mRNA in the pGL3promoter vector downstream of the luciferase gene, which was then transfected into luteinized granulosa cells to assess the impact of the 3'UTR sequence on the expression of luciferase reporter gene. We identified a sequence of 200 bp between 926 and 1134 bp of the 3'UTR region of CYP19A1 mRNA that significantly reduced luciferase activity. The same fragments were inserted into the pGEMTeasy vector for in vitro transcription and the generation of mRNA for UV crosslinking with protein extracts to demonstrate the presence of mRNA/protein complexes. We detected protein complexes of 66 and 80KDA that specifically bound to the 200 pb probe. This protein is expressed in granulosa cells but not in other tissues such as the liver and heart.

The use of reporter gene attracted the interest of a company producing equine chorionic gonadotropin (eCG), and an interest was expressed in developing this system to measure the FSH-like bioactivity in eCG, and therefore have a more effective commercial product. In this study, we developed a FSH bioassay system based on the transfection of cells with an the FSH receptor and a colorimetric reporter gene to estimate the activity of FSH in the serum of the mare ; these results may be applicable at the farm / industry.

**Keywords:** aromatase, promoter, 3'UTR, eCG, granulosa cell.

## TABLE DES MATIERES

RÉSUMÉ.....	I
ABSTRACT.....	IV
TABLE DES MATIÈRES .....	VI
LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX.....	X
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	XIII
DÉDICACES .....	XIX
REMERCIEMENTS .....	XX
INTRODUCTION.....	1
RÉVISION DE LA LITTÉRATURE .....	4
1- L'OVAIRE .....	4
2- LE FOLLICULE .....	6
3- ASPECTS MORPHOLOGIQUES DU DEVELOPPEMENT FOLLICULAIRE.....	9
3-1 Phase de multiplication .....	9
3-2 Phase de croissance.....	10
3-2-1 <i>Follicule preantraux</i> .....	10
3-2-2 <i>Follicule antraux</i> .....	11
3-3 Phases de maturation .....	12
4- DYNAMIQUE DE LA CROISSANCE FOLLICULAIRE (LA FOLLICULOGENESE).....	15
4-1 Notion de vagues de croissance folliculaire .....	15
4-2 Notion de recrutement, la sélection et la dominance .....	18

4-3 Atrésie folliculaire .....	19
4-4 Ovulation .....	19
4-5 Lutéinisation .....	20
4-6 Surovulation.....	21
5- LES FACTEURS QUI REGULENT LE DEVELOPPEMENT FOLLICULAIRE...	21
5-1 Les facteurs endocrines (gonadotrophines) .....	22
5-1-1 <i>FSH et LH</i> .....	22
5-1-2 <i>eCG</i> .....	23
5-2 Les facteurs autocrines et paracrines .....	26
5-2-1 <i>Le système des IGFs</i> .....	27
5-2-2 <i>Oestradiol</i> .....	28
5-2-3 <i>La famille TGF-<math>\beta</math></i> .....	31
5-2-4 <i>Les facteurs de croissance des fibroblastes</i> .....	32
5-2-5 <i>Autre facteurs</i> .....	35
6- LE CONTROL DE DEVELOPPEMENT FOLLICULAIRE .....	36
6-1 La transition de follicule primordial au follicule primaire .....	36
6-2 La transition de follicule primaire à l'antral .....	37



6-3 La transition d'un follicule antral au follicule ovulatoire.....	38
7 LA STEROIDOGENESE.....	41
7-1 Les enzymes steriodogeniques .....	44
7-1-2 <i>CYP11A1</i> .....	44
7-1-2 <i>3<math>\beta</math>HSD</i> .....	44
7-1-3 <i>CYP17A1</i> .....	45
7-1-4 <i>17<math>\beta</math>-HSD</i> .....	45
7-1-5 <i>CYP19A1</i> .....	46
8- CHANGEMENTS FONCTIONNELS DES CELLULES FOLLICULAIRES .....	47
9- AROMATASE DANS LE DÉVELOPPEMENT FOLLICULAIRE.....	51
9-1 Structure du gène de l'aromatase.....	51
9-2 Le rôle du gène de l'aromatase .....	52
9-3 L'expression tissulaire du gène de l'aromatase .....	53
9-4 La régulation du gène <i>CYP19A1</i> et la sécrétion de l'œstrogène.....	56
9-5 La régulation transcriptionnelle du gène <i>CYP19A1</i> .....	58
9-5-1 <i>Éléments de régulation du promoteur 2 du CYP19A1</i> .....	58
9-5-2 <i>Éléments de régulation du promoteur 1.1 du gène CYP19A1</i> .....	60

9-6 La régulation post-transcriptionnelles du gène CYP19A1 .....	60
9-6-1 Modalités spécifiques .....	61
9-6-2 ARN interférant (miARN) .....	64
9-6-3 Modifications post-traductionnelles .....	65
HYPOTHESE ET OBJECTIVE .....	67
ARTICLE 1: Factors regulating the bovine, caprine, rat and human ovarian aromatase promoters in a bovine granulosa cell model.....	68
ARTICLE 2: Bioassay for follicle stimulating activity of equine gonadotropic hormone in mare serum using frozen/thawed transiently transfected reporter cells .....	108
ARTICLE 3: Posttranscriptional regulation of bovine CYP19A1 messenger RNA is associated with specific protein binding to the 3'-untranslated region .....	140
DISCUSSION GENERAL.....	179
Perspectives .....	185
CONCLUSION GENERAL .....	187
BIBLIOGRAPHIE .....	188

## LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

### RECENSION DE LA LITTÉRATURE

<b>Figure 1:</b> La structure de l’ovaire .....	5
<b>Figure 2:</b> La structure d’un follicule ovarien.....	8
<b>Figure 3:</b> Les différents stades du développement folliculaire.....	14
<b>Figure 4:</b> Le développement folliculaire chez la vache.....	17
<b>Figure 5 :</b> Schéma représentant la sécrétion d’oestradiol, FSH et LH au cour de la croissance folliculaire.....	30
<b>Figure 6:</b> Schéma représente le rôle de l’activine et l’inhibine dans le contrôle du taux de la FSH.....	34
<b>Figure 7:</b> La stéroidogénèse des hormones sexuelles.....	43
<b>Figure 8:</b> La structure du gène CYP19A1 et l’expression tissulaire des différents promoteurs d’aromatase .....	55
<b>Figure 9 :</b> L’abondance relative des ARNm codant pour le cytochrome P450scc (CYP11A1) et P450arom (CYP19A1) après un traitement par l’inhibiteur de la transcription DRB.....	63

### ARTICLE 1

<b>Figure 1:</b> Schematic representation of regulatory elements contained within the promoter constructs used .....	94
<b>Figure 2:</b> FSH and IGF1 regulation of oestradiol secretion and CYP19A1 promoter usage .....	96

**Figure 3:** Intracellular pathways used by FSH and IGF1 to stimulate oestradiol secretion and bovine CYP19A1 expression from promoters 1.1 and 2 in nonluteinizing bovine granulosa cells ..... 98

**Figure 4:** Activation of ERK and Akt pathways in nonluteinizing bovine granulosa cells by FSH and IGF1 ..... 100

**Figure 5:** Regulation of bovine CYP19A1 promoter 1.1 by FSH in transfected luteinized bovine granulosa cells ..... 102

**Figure 6:** Effect of forskolin and FOXL2 overexpression on activity of rat, human, bovine (-1153 and -590) and goat ovarian CYP19A1 promoters and the bovine P1.1 promoter in luteinized bovine granulosa cells ..... 104

**Figure 7:** Effect of forskolin and overexpression of NR5A2 and FOXL2 on activity of rat, human, bovine (-1153 and -590) and goat ovarian CYP19A1 promoters and the bovine P1.1 promoter in luteinized bovine granulosa cells..... 106

**Table 1:** Effect of FSH on activity of human, rat and bovine CYP19A1 promoter constructs in luteinized bovine granulosa cells cotransfected with FSHR..... 107

**Table 2:** Relative activity of the ovarian promoters of four species to sequential addition of transcriptional activators ..... 107

**ARTICLE 2**

**Figure 1:** Ability of cell-lines to response to cAMP-inducing ligands..... 130

**Figure 2:** Responsiveness of HEK293 cells to FSH, eCG and LH ..... 132

**Figure 3:** Responsiveness of frozen/thawed, transiently transfected HEK293 cells to eCG 134

**Figure 4:** Parallelism of eCG standard curve and individual horse sera in frozen/thawed, transiently transfected HEK293 cells..... 136

<b>Table 1:</b> Bioactivity (U/ml) of horse serum samples as determined by cell-line bioassay and in-vivo augmentation assay .....	137
<b>Supplemental Figure 1:</b> Photograph of a section of a microtitre plate to illustrate color development with the b-galactosidase reporter gene .....	139
<b>ARTICLE 3</b>	
<b>Figure 1:</b> Location of potential RNA destabilizing activity in the CYP19A1 mRNA 3'UTR and design of bovine CYP19A1 3'UTR fragments used for constructing luciferase reporter plasmids and for in vitro transcription .....	168
<b>Figure 2:</b> Location of protein binding region within the 3'UTR of bovine CYP19A1 mRNA .....	170
<b>Figure 3:</b> Radiolabeled full-length CYP19A1 3'UTR RNA binding to protein extracts from bovine tissues .....	172
<b>Figure 4:</b> Specificity of protein binding to RNA in bovine granulosa cells.....	174
<b>Figure 5:</b> Competition analysis of fragments of RNA within the bovine CYP19A1 3'UTR binding to granulosa cell protein.....	176
<b>Figure 6:</b> Protein isolation .....	178

**LISTE DES ABREVIATIONS**

ADN:	Acide désoxyribonucléique
AMH:	Anti-Muellerian hormone
AMPc:	Adénosine mono-phosphate cyclique
ARE:	Éléments riches en adénylates et uridylates
ArKO:	Les souris portant une mutation nulle pour aromatase
ARNm:	Acide ribonucléique messenger
AP:	binding site for activating protéine
AUF 1:	AU Factor 1
BMP:	Bone Morphogenic Proteins
CLS:	Séquence comme CRE
CHO:	Chinese hamster ovary cell
COC:	Complexe ovocyte-cumulus
CRE:	Élément de réponse à l'AMPc
CREB:	Protéine de liaison à l'élément de réponse à l'AMPc
CYP17:	Gène codant pour 17 $\alpha$ hydroxylase
CYP19A1:	Gène codant pour P450aromatase

DHEA :	Déhydroépiandrostérone
E:	E box
eCG:	Hormone gonadotrophine chorionique équine
EGF:	Facteur de croissance épidermique
eLH:	LH équine
EP:	Le récepteur de PGE2
FGF:	Facteur de croissance fibroblastique
FGFR:	Récepteur aux FGF
FSH:	Hormone folliculostimulante
FSHR:	Récepteur à la FSH
FOX:	Site de liaison de FOXL2
FOXL2:	Boîte Forkhead L2
FOXO3:	Boîte Forkhead O3
GATA:	Boîte GATA
GDF:	Facteur de croissance et de différentiation
GnRH:	Gonadolibérine
H:	Core half site hexameric sequence

HA:	Acide hyaluronique
hCG:	Hormone gonadotrophine chorionique humaine
HEK293 :	Human embryonic kidney cell line
HGF:	Facteur de croissance des hépatocytes
IGF:	Insulin-like growth factor
IGFBP:	Insulin-like growth factor binding protein
INR:	Transcriptional initiator region
IRE:	Iron-responsive element
Kb:	kilobase
KGF:	Facteur de croissance des kératinocytes
KL:	kit ligand
LH:	Hormone lutéinisante
LHr:	Récepteur à la LH
LRH1:	Liver receptor homolog-1
MAPK:	Mitogen-activated protein kinases
miARN:	microARN
mm:	millimètre



NADPH:	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
ng:	Nanogramme
NR5A:	Nuclear receptor 5A
NREA:	Nuclear receptor element A
NREB:	Nuclear receptor element B
P450arom:	Cytochrome P450 aromatase
P450scc:	Cytochrome P450 side-chain-cleavage
P45017 $\alpha$ :	Cytochrome P450 17 $\alpha$ -hydroxylase
PABP:	Protéine spécifiques à la queue polyA
pARNi:	Petit ARN interférent
pb :	paire de base
PEG:	Polyéthylène glycol
PGE2:	Prostaglandine E2
PGF2 $\alpha$ :	Prostaglandine F2 $\alpha$
PI3K:	Phospho-ionisitol 3 kinase
PKA:	Protein kinase A
PKC:	Protein kinase C

PMA:	Pre-Market Approval
RIA:	Essai Radioimmunologie
RISC:	RNA-induced silencing complex
RRA:	Radioligand Receptor Assay
SBE:	Element de liaison au facteur SMAD
SF1:	Récepteur nucléaire steroidogenic factor 1
STAR:	Steroidogenic acute regulatory
TAF:	TBP associated factors
TATA:	Boite TATA
TBP:	Protéine de liaison à la boîte TATA
TFR:	Récepteur transferrin
TGF $\alpha$ :	Facteur de croissance transformant $\alpha$
TGF $\beta$ :	Facteur de croissance transformant $\beta$
TNF $\alpha$ :	Tumor necrosis factor $\alpha$
TSH:	Hormone thyroïdostimuline
USF:	Upstream stimulating factors
3 $\beta$ HSD:	3 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase

17 $\beta$ HSD: 17 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénases

3'UTR: Région 3' non traduit

5'UTR: Région 5' non traduit

$\mu$ M : micromolaire

**DÉDICACES**

*À mes parents et ma grand-mère*

*À mes frères et mes sœurs surtout Nacera*

*À mes neveux et mes nièces*

*À mes beaux-frères et mes belles-sœurs*

*À mes amies et toutes les personnes qui m'aiment*

## REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier mon directeur Dr Christopher A. Price de m'avoir permis de travailler dans son équipe. Je le remercie aussi pour sa grande disponibilité, son implication et la motivation qu'il m'a donnée tout au long du projet.

Je remercie particulièrement Dr Francis Beaudry et Dr Bruce Murphy pour leurs nombreux et judicieux conseils, leur disponibilité et surtout leur sympathie.

J'aimerais bien remercier tous ceux qui ont contribué de loin ou de près au bon déroulement de ce projet notamment Dr Malha Sahmi, Dr Gustavo Zamberlam et Dr Edmir Nicola que je remercie pour leurs précieux conseils et leur disponibilité.

Un remerciement spécial pour notre secrétaire Geneviève Provost pour son travail toujours bien accompli et sa disponibilité.

Je remercie tous les membres du CRRA pour leur support, leur amitié et leurs nombreux conseils notamment Hilda Guerrero, Atefeh Abedini, Mira Dobias, Jacinthe Therrien, France Filion et Kam Sayasith.

## INTRODUCTION

L'industrie agroalimentaire liée aux animaux domestiques tels que les bovins, occupe une place importante au Canada, mais malheureusement, depuis les deux dernières décennies, la fertilité chez la vache laitière au Canada se détériore de façon significative, ce qui affecte les entreprises de production laitière. Afin de rester compétitifs sur le marché international, nous devons continuellement améliorer les techniques d'élevage tant dans l'alimentation, dans la sélection d'animaux de qualité et au niveau de la reproduction. Le principal axe de recherche au Centre de Recherche en Reproduction Animale (CRRA) est d'une part, l'amélioration des conditions de fécondation in-vitro et, d'autre part, la survie de l'embryon et la fonction ovarienne. Le laboratoire du Dr Price s'intéresse plus particulièrement aux facteurs produits par les cellules ovariennes au cours de la folliculogénèse (la croissance folliculaire).

La croissance folliculaire durant le cycle œstral chez la vache, de même que chez la plupart des mammifères, se manifeste par une alternance de croissance et de régression d'un certain nombre de follicules communément appelés vague folliculaire. Chaque vague de croissance s'amorce par le recrutement d'une cohorte de 5 à 6 follicules de 2 à 4 mm de diamètre qui vont poursuivre davantage leur croissance. Parmi ces follicules recrutés, un seul est sélectionné pour devenir le follicule dominant et potentiellement le follicule ovulatoire, tandis que le reste des follicules, appelés follicules subordonnés, entrent dans un processus de dégénérescence folliculaire ou atresie. La suroovulation est une technique ayant été mise au point il y a plus de 40 ans. Le but de la suroovulation est d'augmenter le nombre de follicules ovulatoires dans un même œstrus chez une vache donneuse afin d'augmenter la quantité d'embryons transférés par la suite dans des vaches receveuses. Parmi les traitements de suroovulation utilisés, figurent la

FSH (Hormone folliculostimulante) et l'eCG (Hormone gonadotrophine chorionique équine). L'eCG est une glycoprotéine sécrétée dans le sérum de la jument et possède la bioactivité FSH et LH (hormone lutéinisante) chez les espèces non-équines. Le traitement à la FSH coûte cher et nécessite plusieurs injections par cycle, alors que l'eCG nécessite une seule injection/cycle, mais cause des réponses variables au niveau du nombre d'embryons viables obtenus suite à une suroovulation. Ces problèmes sont liés directement à l'absence d'un système efficace qui permet de mesurer la bioactivité FSH de l'eCG produite par chaque jument au niveau de la ferme. C'est pourquoi l'un des objectifs de cette étude est d'établir un système simple, efficace et moins dispendieux qui permet de mesurer la bioactivité FSH de l'eCG dans le sérum des juments au niveau de la ferme (un biorapporteur).

La FSH joue un rôle important durant la croissance et le développement des follicules, elle agit sur les cellules folliculaires, particulièrement sur les cellules de la granulosa et elle stimule ces cellules pour produire un stéroïde appelé oestradiol. La production d'oestradiol nécessite l'expression d'un certain nombre d'enzymes dont le cytochrome P450 aromatasase ou CYP19A1. Durant la croissance folliculaire, il y a une augmentation des niveaux d'oestradiol et de l'expression de CYP19A1. Le follicule dominant sécrète plus d'oestradiol et exprime plus CYP19A1 que le follicule subordonné. Le taux élevé d'oestradiol induit l'expression du récepteur à la LH sur les cellules de la granulosa, ces cellules sont capables de produire la progestérone et de répondre à la LH qui est un élément essentiel pour la maturation du follicule dominant. Quelques heures après le pic de la LH, il se produit une chute rapide des niveaux d'oestradiol et de l'expression de l'aromatase chez la vache. Le même effet a été rapporté au niveau des cellules de la granulosa in vitro après une réduction de l'insuline et l'IGF-1 (Insulin-like growth factor). L'oestradiol est important pour la croissance folliculaire et l'ovulation

dans la mesure où les souris portant une mutation nulle pour le gène de CYP19A1 ne sont pas capables d'ovuler [1].

Chez la vache, de multiples promoteurs peuvent être impliqués dans l'expression spécifique tissulaire du gène CYP19A1, ceci résulte en plusieurs transcrits ayant différentes régions 5' non traduites (5'UTR), qui codent pour une seule protéine. Il existe six promoteurs qui sont 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5 et 2. Le principal promoteur qui dirige la transcription au niveau de l'ovaire (cellules de la granulosa) est le promoteur 2, bien que le promoteur 1.1 a un rôle sur les cellules de la granulosa, mais avec un niveau d'expression beaucoup moindre que le promoteur 2 [2]. La FSH et l'IGF-1 stimulent la synthèse de l'oestradiol et donc, l'expression de l'aromatase. Cependant, l'effet de ces hormones sur l'activation des promoteurs d'aromatase demeure mal connu.

Chez le ruminant, le transcrit de l'ARNm CYP19A1 est très long (3Kb) et possède une demi-vie très courte (3h) [3] comparé à celui de l'humain (1Kb) avec une demi-vie de 12h et celui du rat avec une demi-vie d'environ 7h [4]. L'utilisation d'un inhibiteur de la synthèse protéique (la cycloheximide) rend capable d'augmenter la stabilité de l'ARNm de CYP19A1 bovine jusqu'à 12h [3].

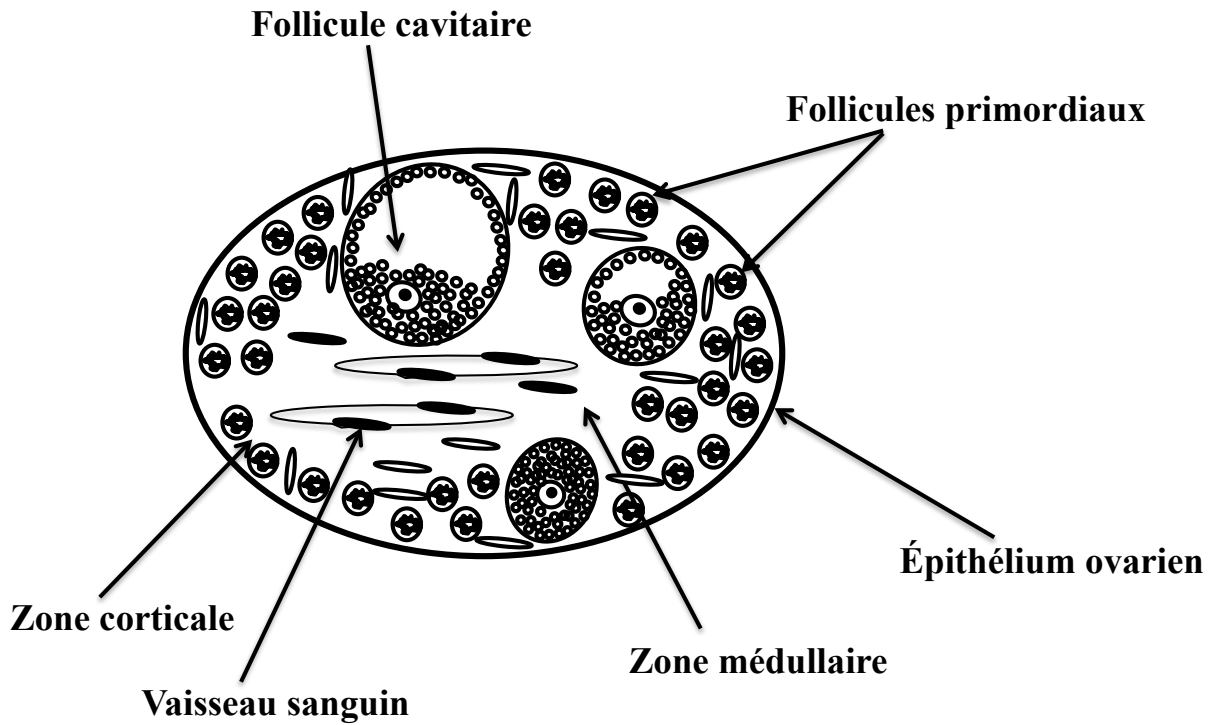
L'analyse de la séquence 3'UTR montre la présence des motifs riches en AU. Plusieurs études ont montré la présence des protéines de liaison qui se lient sur la séquence ARE (élément riche en AU) connue pour être impliquée dans la régulation post-transcriptionnelle de certains gènes. C'est pourquoi l'objectif principale de cette étude est de mieux comprendre le mécanisme de la régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle du gène CYP19A1 dans les cellules de la granulosa.



## RÉVISION DE LA LITTÉRATURE

### 1. L'OVAIRE

Les ovaires font partie de l'appareil reproducteur des femelles vertébrées et sont deux glandes génitales situées de chaque côté de l'utérus. L'ovaire est recouvert par un épithélium, au-dessous de l'épithélium se trouve l'albuginée, qui est une couche dense de tissu conjonctif, ensuite vient la zone corticale qui est formée principalement par les follicules entourés de fibroblastes, de fibres de collagène et de fibres élastiques. La zone médullaire contient principalement des vaisseaux sanguins, des vaisseaux lymphatiques et des terminaisons nerveuses (Figure 1). L'ovaire chez la vache a une forme ovale et une taille approximative de 2 à 4 cm de longueur, de 1.5 à 2.5 cm de largeur et un poids de 1.2 à 2.25 g, mais cela peut varier beaucoup en fonction des structures présentes [5].



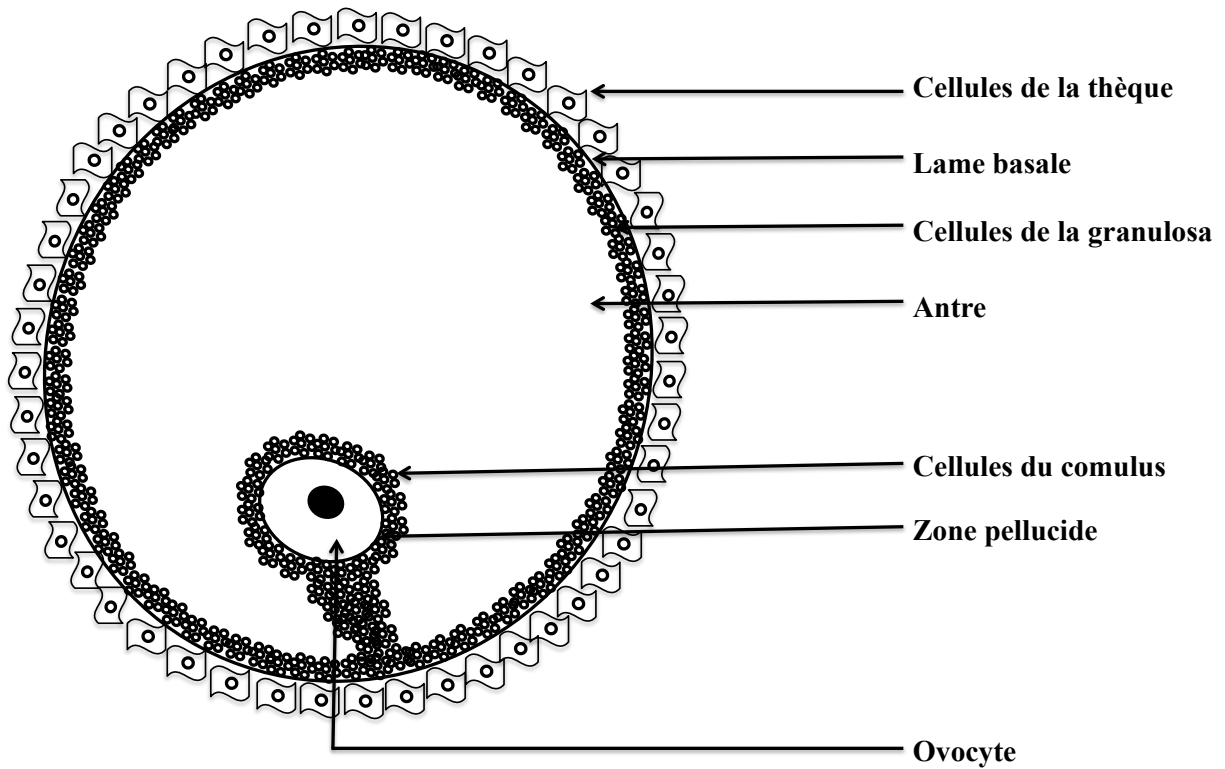
**Figure 1 : La structure de l'ovaire.** Schéma représentant la zone corticale qui est formée principalement par les follicules et zone médullaire de l'ovaire.

## 2. LE FOLLICULE

Le follicule ovarien est l'unité fonctionnelle de l'ovaire. Ce dernier représente la gonade femelle, c'est-à-dire la réserve de cellules germinales permettant la reproduction chez les vertébrés. Le follicule ovarien soutient les fonctions physiologiques principales de l'ovaire, telles que la synthèse des hormones stéroïdiennes, le soutien de la croissance de l'ovocyte, l'ovulation au moment requis d'un ovule mature et le maintien de la gestation par la formation du corps jaune. Ces fonctions sont modulées par l'interaction d'un certain nombre de signaux endocriniens provenant du système nerveux central ou du tissu adipeux, de signaux paracrines (cellules du follicule ovarien entre elles) et autocrines (cellules du follicule ovarien sur elles-mêmes) [6].

Le follicule ovarien est formé de différents types cellulaires (Figure 2), l'ovocyte, le cumulus, la granulosa et la thèque [7]. L'ovocyte est une cellule germinale qui a un volume plus important que les autres cellules. La maturation de l'ovocyte mènera à la production d'un ovule fécond et si l'ovule est fécondé, il aboutit à la formation d'un embryon [7]. Les cellules du cumulus proviennent de la différenciation d'une sous-population de cellules de la granulosa en contact étroit avec l'ovocyte lors de la formation de l'antra, cette dernière est constituée d'une cavité remplie d'un exsudat de sérum sanguin et de sécrétions des cellules folliculaires. Séparées des cellules de la thèque par la lame basale, les cellules de la granulosa soutiennent l'aromatisation des androgènes et coordonnent la croissance et la maturation de l'ovocyte. Les cellules du cumulus, séparées de l'ovocyte par la zone pellucide, adoptent un phénotype différent des cellules de la granulosa. Le troisième type cellulaire du follicule ainsi que le plus éloigné de l'ovocyte est la cellule de la thèque. Elle provient de la différenciation d'une

population de cellules stromales et produit, entre autres, les androgènes nécessaires à la production d'estrogènes par les cellules de la granulosa [8].



**Figure 2 : La structure d'un follicule ovarien.** Schéma représentant les différents compartiments d'un follicule (ovocyte, cellules de la granulosa et la thèque)

### **3. ASPECTS MORPHOLOGIQUES DU DÉVELOPPEMENT FOLLICULAIRE**

Les étapes du développement des follicules sont au nombre de trois : la phase de multiplication, la phase de croissance et la phase de maturation.

#### **3.1 Phase de multiplication**

La différenciation sexuelle embryonnaire chez la vache est établie vers la 6<sup>e</sup> semaine de la gestation. Les cellules germinales primordiales, encore appelées cellules souches d'origine extra-embryonnaire, localisées au niveau de la paroi de la vésicule vitelline, colonisent, après migration au travers de l'embryon le long du mésentère dorsal de l'intestin postérieur, la crête génitale et donnent naissance aux ovogonies [9-11]. Les ovogonies se multiplient et forment un stock d'ovogonies, dont le nombre est variable selon les espèces. Une fois la phase mitotique terminée, les ovogonies entament une division méiotique qui se trouve bloquée en prophase 1 (stade pachytène chez la vache), elle se transforme en ovocyte primaire [12, 13]. À cette même période, quelques cellules épithéliales et une membrane conjonctive dite basale, viennent entourer l'ovocyte primaire formant ainsi les follicules primordiaux qui représentent la réserve des cellules germinales d'où s'échapperont les follicules destinés à se développer et dont quelques-uns seulement arriveront à maturité [14]. Cette phase de multiplication est, chez la plupart des mammifères, terminée avant ou peu après la naissance [15-17]. L'importance de la réserve folliculaire constituée dépend de l'espèce, de la race, de l'individu et de l'âge [12, 18, 19]. Cette réserve folliculaire décline progressivement au cours de la vie de l'animal. Chez la vache, le nombre de follicules primordiaux a été estimé à 133 000 vers l'âge de 2 à 3 ans et à 2 500 entre 12 et 14 ans [20].

### **3.2 Phase de croissance**

Cette phase de croissance ne concerne que 10 % de la réserve folliculaire. Comprise entre le moment où le follicule quitte la réserve folliculaire et celui de l'ovulation, elle est particulièrement longue et variable selon les espèces. La croissance et l'activation des follicules antraux prend environ 42 jours chez la vache, soit l'équivalent de 2 cycles œstraux [21]. Chez la ratte, elle a été estimée à 21 jours soit 17 jours pour atteindre le stade cavitaire et 4 à 5 jours pour atteindre le stade ovulatoire [22]. Le développement folliculaire est continu et se fait en différents stades. Le stade de follicule primordial, le stade primaire et secondaire, constituant les follicules préantraux, puis le stade tertiaire et le stade pré-ovulatoire représentant les follicules antraux [21, 23, 24] (Figure 3).

#### ***3.2.1 Follicules préantraux***

Le follicule primordial comprend un ovocyte bloqué à la prophase 1 de la première division méiotique (ovocytes primaires) par un polypeptide appelé OMI (Oocyte Maturation Inhibitor) produit par les cellules entourant l'ovocyte (cellules de la granulosa) [14, 25-28]. Les cellules de la granulosa non différenciées (prégranulosa) forment un épithélium simple pavimenteux qui est séparé des cellules stromales par la lame basale. Chez la vache, le diamètre d'un follicule primordial est inférieur à 40  $\mu\text{m}$ , habituellement localisé en périphérie de l'ovaire. L'ovocyte est d'un diamètre compris entre 25 et 30  $\mu\text{m}$  [29].

Les follicules primordiaux commencent à s'activer en follicules primaires vers le 140<sup>ième</sup> jour de gestation chez la vache par un mécanisme inconnu [12, 30]. Ce stade folliculaire est caractérisé par une modification des cellules de la granulosa, passant de la forme aplatie à la forme cuboïdale [12, 31], formant un follicule primaire. L'ovocyte amorçe sa croissance quand

il y a environ 40 cellules de la granulosa [29, 32]. C'est durant cette période que l'ovocyte synthétise et sécrète les glycoprotéines qui donneront naissance à une enveloppe hyaline poreuse entre l'ovocyte et les cellules de la granulosa, la zone pellucide (ZP) [29, 32, 33]. Le diamètre du follicule primaire est compris entre 40 et 80  $\mu\text{m}$  alors que celui de l'ovocyte qu'il renferme entre 30 et 35  $\mu\text{m}$  chez la vache [29].

Des follicules secondaires apparaissent au 210<sup>ième</sup> jour de gestation chez la vache, lorsque le nombre de cellules de la granulosa augmente par mitose et passe d'une couche à au moins deux couches. L'ovocyte atteint son volume maximal [12, 29] et s'est entouré d'une zone pellucide bien différenciée. L'ensemble est limité extérieurement par la lame basale. Le diamètre du follicule secondaire est compris entre 80 et 300  $\mu\text{m}$ . . Celui de l'ovocyte est entre 40 et 70  $\mu\text{m}$  [29]. De plus, on peut identifier les cellules de la thèque en dehors de la lame basale ainsi qu'un réseau capillaire de vaisseaux sanguins. La multiplication des cellules de la granulosa amène la formation de petites vacuoles qui sont dispersées entre les cellules de la couche granulosa et qui deviennent subséquentement l'antra folliculaire, une cavité remplie de liquide folliculaire [14, 29].

### ***3.2.2 Follicules antraux***

Les follicules tertiaires font leur apparition vers le 230<sup>ième</sup> jour de gestation chez la vache [12]. À ce stade, les follicules sont caractérisés par la formation de l'antra. L'antra est détectable lorsque le follicule atteint de 0,12 à 0,28 mm de diamètre [21]. La croissance des follicules entre 1 et 2 mm de diamètre est attribuée à une augmentation du nombre de cellules de la granulosa, tandis que les follicules ayant un diamètre de plus de 2,5mm augmentent de taille par la formation de l'antra [21]. Le développement progressif de l'antra entraîne la



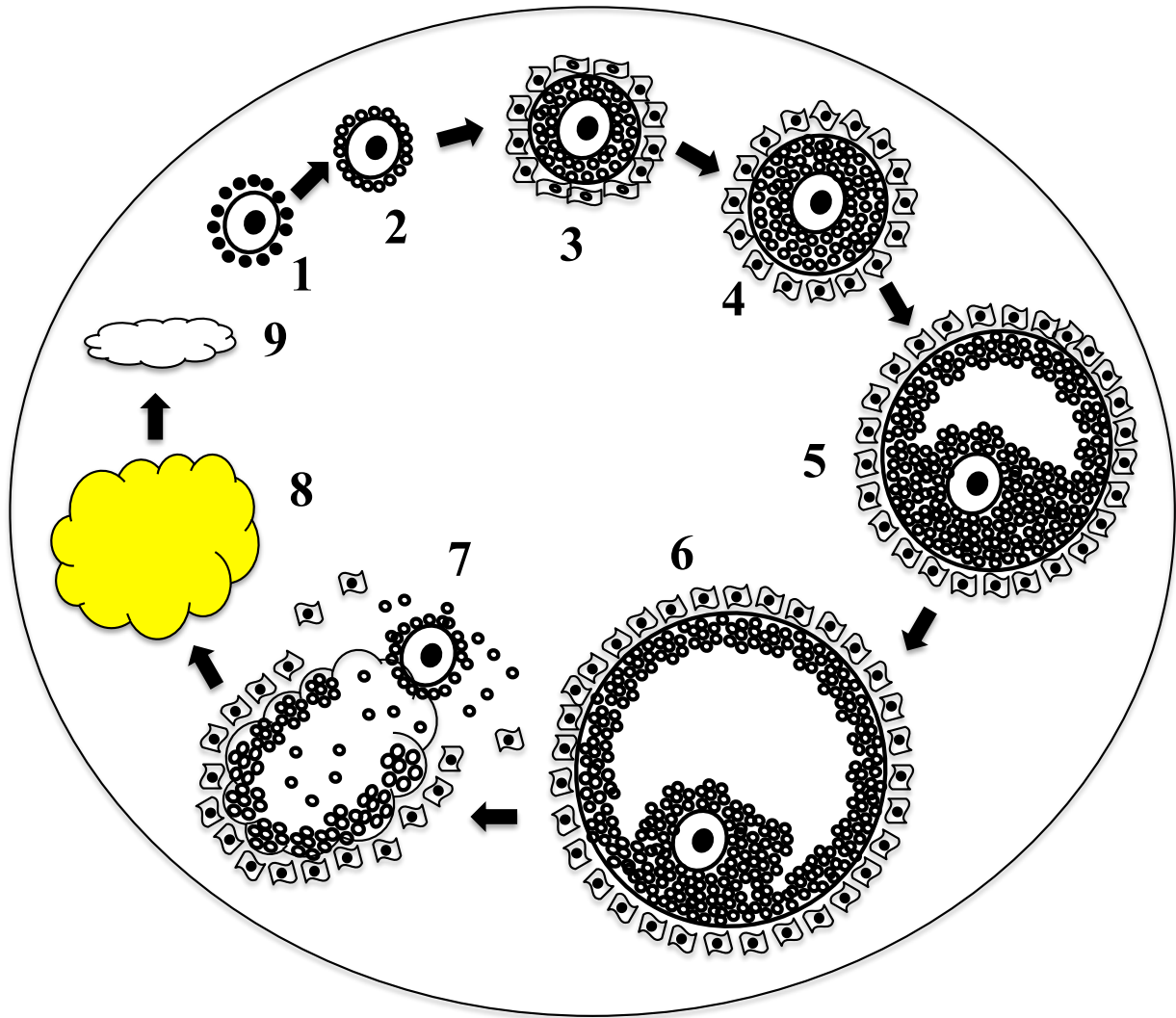
séparation des cellules de la granulosa proche de l'ovocyte en cellules du cumulus. Les cellules de la granulosa sont dites antrales (à proximité de la cavité antrale) ou murales (proche de la lame basale du follicule) [14]. Une autre caractéristique de ce stade est la présence de jonctions perméables entre les cellules de la granulosa et entre les cellules du cumulus et l'ovocyte à travers la zone pellucide appelés les jonction lacunaires [34] ce qui permettra l'apport en nutriments et signaux régulateurs à l'ovocyte [34].

Le follicule pré-ovulatoire représente la phase terminale du développement folliculaire. Cette phase ne concerne qu'un follicule sur 1000 entré en croissance. Le follicule se caractérise par une taille maximale de 10 mm chez la brebis et la truie et de 20 mm chez la vache [35]. L'augmentation progressive de la taille du follicule résulte davantage de la formation de l'antra et de l'accumulation du liquide antral que d'une multiplication cellulaire. En effet, l'activité mitotique réduit progressivement pour céder la place à une différenciation cellulaire plus importante [21, 36]. Le follicule rempli de liquide, affleure en surface de l'ovaire. L'ovocyte demeure enfermé dans un massif cellulaire formé des cellules du cumulus. Les thèques internes et externes sont bien différenciées et la lame basale est bien visible entre les cellules de la granulosa et la thèque interne. Une fois l'antra formé, l'ovocyte entretient des échanges métaboliques avec le liquide folliculaire via les cellules du cumulus et avec le sang via les cellules de la granulosa et de la lame basale.

### **3.3 Phase de maturation**

Elle concerne surtout l'ovocyte. Cette phase représente l'ensemble des modifications cytologiques et métaboliques permettant l'acquisition par l'ovocyte de l'aptitude à être reconnu et pénétré par le spermatozoïde, le début du développement embryonnaire. Elle est induite par

le pic ovulatoire. Elle implique des modifications nucléaires, cytoplasmiques et membranaires de l'ovocyte. Lorsque l'ovocyte a atteint 80 % de sa taille finale, il a acquis la compétence ou l'aptitude à continuer sa maturation nucléaire proprement dite, c'est-à-dire la capacité à reprendre la méiose [27, 28]. Celle-ci est caractérisée par la disparition de la membrane nucléaire, à la condensation des chromosomes et finalement à l'émission du premier globule polaire, l'ovocyte I se transforme en ovocyte II. La reprise de la division méiotique n'a pas lieu tant que l'ovocyte reste en contact avec les cellules de la granulosa [27] .



**Figure 3 : Les différents stade du développement folliculaire.** 1, stade promordial; 2, stade primaire ; 3, stade secondaire ; 4, stade préantral ; 5, stade antral ; 6, follicule ovulatoire ; 7, ovulation ; 8, corpus luteum ; 9, corpus albicans.

## **4. DYNAMIQUE DE LA CROISSANCE FOLLICULAIRE**

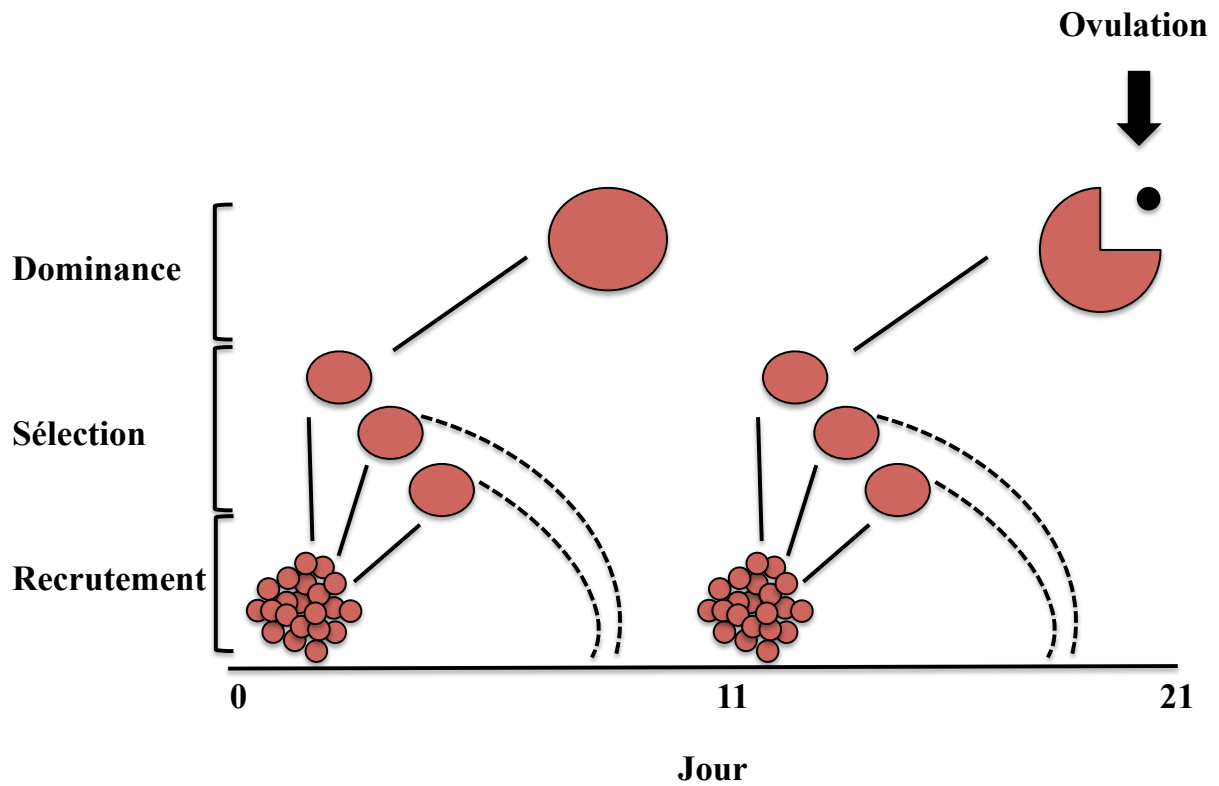
### **(LA FOLLICULOGÉNÈSE)**

La folliculogénèse est le processus de développement du follicule ovulatoire aboutissant à la libération d'un ovocyte mature dans un interval de temps fixe au cours de la vie reproductive d'une femelle. Une fois que la croissance du follicule est amorcée, celui-ci va soit ovuler, ou va, comme 99% des follicules, devenir atrétique [37].

#### **4.1 Notion de vagues de croissance folliculaire**

Certaines études ont décrit la croissance folliculaire comme un phénomène continu indépendant du stade du cycle [38, 39]. D'autres, par contre, ont démontré la présence d'au moins deux périodes de croissance et/ou de régression au cours du cycle, la première apparaissant au début de la phase lutéale et évoluant vers l'atrésie, la seconde apparaissant en fin de phase lutéale, au moment de la lutéolyse et aboutissant à l'ovulation [40-43]. Ces dernières années, de nombreuses études échographiques ont confirmé la théorie des vagues selon laquelle le développement folliculaire apparaît non pas de manière aléatoire, mais sous la forme de croissances et de régressions synchrones de plusieurs follicules appelées vagues. Chez la vache, chaque vague consiste en l'émergence de plusieurs follicules de diamètre égal ou supérieur à 5 mm, parmi lesquels, au bout de quelques jours, apparaîtra un follicule dit dominant [44, 45]. Le cycle oestral chez la vache dure 21 jours et une à quatre vagues par cycle ont été décrites [45, 46]. Généralement, un cycle ne comporte que 2 ou 3 vagues, le follicule préovulatoire étant issu de la dernière vague. Pour un cycle à trois vagues folliculaires, elles débutent généralement aux

jours 2, 9 et 16 du cycle. Celui-ci n'en comporte que deux qui apparaissent aux jours 2 et 11 du cycle oestral [45] (Figure 4). Les vaches laitières de races Holstein ont tendance à avoir 2 vagues folliculaires [47] alors que les génisses ont tendance à avoir 2 ou 3 vagues par cycle [45]. L'étude de Townson en 2002 indique que les vaches à 2 vagues folliculaires ont tendance à avoir des cycles courts et ovulent un follicule plus grand et plus vieux. Aussi, ces vaches sont moins fertiles que les vaches à trois vagues [48], chez les vaches de la sous-espèce *Bos indicus*, il y a souvent 4 vagues folliculaires dans un cycle [46]. Plus de 4 vagues folliculaires par cycle est souvent associé à une absence de lutéolyse, ou absence d'ovulation [49]. Par ailleurs, des cycles courts de vagues folliculaires ont été rapportés aux environs de la puberté [50] et aussi après la première ovulation après la mise bas [35]. Les vagues folliculaires sont également présentes lors de la gestation [51]. La dynamique folliculaire implique plusieurs stades séquentiels, soit le recrutement, la sélection et la dominance.



**Figure 4 : Le développement folliculaire chez la vache.** Schéma illustrant la notion de vagues folliculaires et les différents stades de croissance folliculaire [52].

## 4.2 Notion de recrutement, la sélection et la dominance

Le recrutement est un processus initié juste après la formation des follicules primordiaux qui permet à certains follicules d'initier leur croissance sous l'influence des facteurs intraovariens et/ou d'autres facteurs inconnus. La taille de la cohorte de follicules recrutés varie d'une espèce à l'autre; 50 chez le porc, 5-10 chez la vache et 1-4 chez le cheval [53], tandis que le reste des follicules demeurent quiescents pour des mois ou des années. Les follicules qui résistent au recrutement sont probablement soumis à des influences inhibitrices constantes d'origine systématique et/ou locale [54]. Cependant, le nombre de follicules primordiaux dormants n'altère pas le nombre de follicules impliqués dans l'initiation de la croissance folliculaire [55]. La baisse d'influences inhibitrices et/ou l'augmentation de facteurs stimulateurs permettent l'initiation de la croissance folliculaire.

La sélection étant le processus qui résulte en un seul follicule dominant et en une diminution du nombre de follicules en croissance dans la vague. Le follicule dominant est défini quand sa taille est supérieure aux follicules subordonnés. Le moment où l'on remarque la divergence dans les niveaux de croissance est appelé déviation [51].

À partir d'une cohorte de follicules recrutés, il s'établit une dominance d'un ou plusieurs follicules, selon l'espèce, qui seront destinés à ovuler. Le bovin constitue un bon modèle pour l'étude de la dominance folliculaire, car il n'y a qu'un seul follicule dominant la plupart du temps. Chez la vache, le follicule dominant atteint le diamètre maximal d'environ 10-20 mm [35] et les follicules subordonnés atteignent environ 8 mm [56]. Le sort du follicule dominant est soit l'ovulation ou l'atrésie.

### **4.3 Atrésie folliculaire**

L'atrésie folliculaire est un processus de dégénérescence physiologique qui atteint la majorité (99.9%) des follicules présents dans l'ovaire des mammifères. Elle joue donc indirectement un rôle important dans la régulation du taux d'ovulation. Sa durée, ses causes et son mécanisme sont encore mal connus. Examen cytologique montre qu'elle n'est identifiable que chez les follicules primaires, secondaires ou tertiaires par la mise en évidence de pycnose (grains de chromatine condensée) [57, 58] ou d'apoptose (corps apoptotiques) dans les cellules de la granulosa, par l'identification de processus dégénératifs (opacification) au niveau de l'ovocyte [58, 59]. Biochimiquement, elle s'accompagne d'une augmentation des concentrations en enzymes lysosomales ainsi que d'une diminution des concentrations en œstradiol [59, 60]. La granulosa disparaît progressivement et le cumulus se dissocie. L'ovocyte dégénéré reste la dernière cellule identifiable.

### **4.4 Ovulation**

L'ovulation est le processus commençant par le pic de la LH et se terminant par la rupture de la paroi folliculaire, la libération d'un ovule mature et la formation du corps jaune (Figure 3). L'ovulation a été comparée à une réaction inflammatoire compte tenu de la similarité des facteurs impliqués dans les deux événements « comme PAPIII (Pancreatic associated protein-III) qui exprime dans les cellules de la granulosa » [61]. Pendant le processus d'ovulation, une matrice riche en acide hyaluronique (HA) se forme à l'intérieur du COC (complexe cumulus ovocyte). La surface du follicule se rompt et le fluide folliculaire et le COC sont expulsés. La



lame basale folliculaire est ensuite dégradée et le follicule devient un corps jaune. Les cellules de la granulosa et de la thèque deviennent des cellules lutéales [62, 63] .

#### **4.5 Lutéinisation**

Le corps jaune est une structure se développant après l'ovulation à partir du follicule ovulatoire. Les cellules de la granulosa subissent une importante différenciation après le pic ovulatoire leur permettant de soutenir la gestation. Cependant, l'induction de la lutéolyse (la dégénérescence du corps jaune) peut s'effectuer dans le cas où il y a absence de gestation. La partie fonctionnelle du corps jaune est formée de grosses cellules lutéales provenant de la différenciation des cellules de la granulosa, et de petites cellules lutéales, provenant, quant à elle, de la différenciation des cellules de la thèque [64] .

Le dilemme entre le développement et la régression du corps jaune dépend de l'équilibre des facteurs lutéotrophes (favorisant la persistance du corps jaune) et des facteurs lutéolytiques (favorisant la régression du corps jaune). Parmi les facteurs lutéotrophes reconnus, on compte l'hormone gonadotrophe lutéinisante (LH), la prolactine, la progestérone et l'œstradiol (ce dernier chez le porc, le lapin et le rat) [64-67]. L'agent lutéolytique est la prostaglandine  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) chez la plupart des espèces étudiées jusqu'à maintenant [64]. Chez les ruminants, la  $PGF_{2\alpha}$  est produite par l'utérus et il a été proposé qu'elle transite de la veine utéro-ovarienne vers l'artère ovarien par un système de transport actif, ce qui lui évite la dégradation dans la circulation pulmonaire [68]. D'autres facteurs participent également à la lutéolyse fonctionnelle

(diminution de progestérone) et structurale (régression physique du corps jaune), dont l'oxytocine, le facteur de la nécrose de la tumeur  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) et Fas ligand [65, 69].

#### **4.6 Surovulation**

La surovulation pourrait être décrite comme étant l'application d'un programme hormonal visant à amener un nombre maximal de follicules à ovuler de manière synchrone. Parmi les traitements de surovulations utilisés figure l'eCG et la FSH, mais cette dernière coûte excessivement chère et nécessite plusieurs injections par cycle, alors que l'eCG est relativement facile à produire et à utiliser (une seule injection par cycle) [70]. Si ce produit est administré au bon moment, l'ovulation de plusieurs follicules est possible. Si l'animal ainsi traité est inséminé, il est possible de récupérer les embryons après 7 jours chez les ruminants.

### **5. LES FACTEURS QUI RÉGULENT LE DÉVELOPPEMENT FOLLICULAIRE**

Pendant la folliculogénèse, les cellules de la granulosa sont dans une phase de croissance très importante, contrôlée par les facteurs endocriniens (gonadotrophines), les facteurs paracrines locaux et les facteurs autocrines, tels que les facteurs de croissance épidermiques (EGF)/facteur de croissance transformant  $\alpha$  (TGF $\alpha$ ), les IGF-I et -II, oestradiol, les membres de la famille des TGF $\beta$ , le facteur de croissance des hépatocytes (HGF), le facteur de croissance des kératinocytes (KGF) en plus de plusieurs autres cytokines [53].

## **5.1 Les facteurs endocriniens (gonadotrophines)**

### **5.1.1 FSH et LH**

La FSH et la LH sont des hormones glycoprotéiques sécrétées par l'hypophyse antérieure sous l'influence de l'hormone de relâche des gonadotrophines (GnRH) sécrétée par l'hypothalamus. Ces glycoprotéines sont impliquées dans la croissance folliculaire et la différenciation folliculaire. Les gonadotrophines agissent sur les cellules folliculaires en se liant à des récepteurs de surface. Les récepteurs à la FSH (FSHR) et à la LH (LHR) font partie de la classe des récepteurs transmembranaires. Ces récepteurs sont composés d'un domaine extracellulaire N-terminal, trois boucles intracellulaires, trois boucles intercellulaires et une C-terminale intracellulaire. Dans l'ovaire, les récepteurs FSH sont situés sur les cellules de la granulosa dès le stade de follicule primaire [71]. Leur nombre varie au cours du développement folliculaire, mais la sensibilité des follicules à la FSH augmente au cours de leur développement. LHR sont situés sur les cellules de la thèque interne à partir du stade préantral [58]. Leur nombre augmente avec la taille du follicule. Ils apparaissent sur les cellules de la granulosa du follicule dominant, soit à un diamètre entre 9 à 10 mm chez la vache et chez le porc 5 à 6 mm [72].

En première partie du développement folliculaire, la FSH joue un rôle très important, elle permet d'une part la croissance folliculaire grâce à son effet mitogène important sur les cellules de la granulosa, d'autre part la maturation folliculaire en induisant la différenciation de ces cellules, l'acquisition de l'activité aromatasase (enzyme responsable de la sécrétion d'oestradiol) et l'expression des récepteurs à la LH sur les cellules de la granulosa [53, 71, 73, 74].

En deuxième partie, la LH joue un rôle très important dans la régulation de la fonction ovarienne, elle est responsable de l'ovulation et de la transformation des cellules folliculaires en cellules lutéales [75].

Sous l'effet des gonadotrophines le follicule produit des hormones stéroïdes selon la théorie « deux cellules, deux gonadotrophines » : sous le contrôle de la FSH, les cellules de la granulosa aromatisent en oestrogènes les androgènes produits par la thèque interne sous l'effet de la LH [74]. En effet, la FSH contrôlerait la sécrétion des œstrogènes, tandis que la LH contrôlerait la sécrétion des androgènes [71].

Chez les primates et équidés, il existe également une gonadotrophine chorionique sécrétée par le placenta, soit la gonadotrophine chorionique humaine (hCG) sécrétée chez la femme enceinte [76, 77] et l'eCG sécrétée dans le sérum de la jument gestante [78, 79].

### 5.1.2 eCG

L'eCG est une glycoprotéine, la glycosylation de l'eCG serait la cause de sa persistance dans la circulation sanguine des chevaux, si nous comparons sa demi-vie aux autres hormones glycoprotéiques, elle dure environ 6 jours [78, 80-82]. L'eCG est composée de sous-unités ( $\alpha$  et  $\beta$ ), liées de façon non-covalente. L'association de deux unités  $\alpha$  et  $\beta$  est requise pour qu'il y ait activité biologique de l'hormone [83].

Chez les espèces équines, l'eCG a une activité biologique LH, puisqu'elle se lie aux récepteurs LH dans les testicules équin [84]. Toutefois, malgré le fait que l'eCG et la eLH (équin LH) sont semblables au niveau de leur composition en acides aminés [84, 85], le niveau de glycosylation est différent [81, 82]. L'affinité de l'eCG pour le récepteur LH chez le cheval est seulement le dixième ou moins que celle pour la eLH [84]. L'eCG ne se lie pas aux récepteurs FSH des follicules ovariens équin [86]. Le rôle principal d'eCG chez les équin est de maintenir la gestation jusqu'à ce que le support placentaire soit suffisant pour poursuivre la

gestation [82], l'eCG assure le maintien du corps jaune afin de fournir une concentration adéquate en progestérone [82, 87], indiquant que l'utérus et le placenta contribuent à la sécrétion de la progestérone dans la circulation.

Chez les espèces non équine, il y a une dualité de l'activité biologique de l'eCG telle que démontré par plusieurs études. Chez le rat, on a observé une interaction de l'eCG avec les récepteurs à la FSH de cellules de Sertoli et avec les récepteurs à la LH de cellules de Leydig [88]. Cela a aussi été démontré pour les récepteurs FSH ovariens de rat, pour les récepteurs FSH testiculaires de porc [89] et pour les récepteurs LH ovariens de porc [84]. Les études de Cole et coll en 1930 montrent qu'après l'injection de l'eCG à des rats femelles immatures, la croissance ovarienne était stimulée [78, 79, 90], ces résultats permettent à l'eCG de posséder un domaine étendu d'applications en médecine vétérinaire. L'eCG permet d'augmenter la fertilité et la taille de la portée surtout chez les petits ruminants et la truie. L'eCG est utilisé pour induire la suroovulation chez les ruminants comme la vache, grâce à son activité FSH. Cependant, l'activité biologique de l'eCG peut subir des variations dans le ratio d'activité FSH/LH de l'eCG, qui peut varier selon la source d'eCG [91], le stade de gestation et l'origine de la semence [78, 92]. La raison de cette variabilité des résultats a été identifiée comme étant la conséquence d'un mauvais produit commercial puisque la quantité de FSH, comme le rapport des quantités FSH/LH, était très variable. Un système de mesure de la bioactivité FSH est nécessaire.

De nombreuses techniques ont été optimisées pour essayer de mesurer l'activité biologique de la FSH. Des techniques de mesure de la bioactivité *in vivo* ou de mesures de la bioactivité *in vitro*. Le dosage *in vivo* de la bioactivité de la FSH repose sur le bioessai mis au point par

Steelman et Pohley (1953) basé sur la mesure de l'augmentation de poids d'ovaires des rattes immatures traitées par de l'hCG/eCG. Dans ces conditions, le traitement par la FSH engendre une stimulation de la production d'oestrogène et la sensibilité au FSH exogène. De plus, la relation entre l'administration de la FSH et le poids de l'ovaire est linéaire. Le bioessai Steelman et Pohley est encore utilisé pour préciser la relative bioactivité des différentes préparations de FSH utilisées comme standards, mais ne permet pas de quantifier la FSH bioactive dans des échantillons sériques à cause de sa faible sensibilité [93].

Deux bioessais in vitro sont utilisés pour apprécier la bioactivité sérique de la FSH. Ils utilisent la capacité de la FSH à induire l'activité aromatasase dans les cellules de la granulosa [94] ou des cellules de sertoli de rat, en culture primaire. Ces bioessais reposent sur la mesure de la production d'oestradiol par aromatisation de l'androstènedione ajoutée dans le milieu de culture [94-96]. Ces bioessais ne nécessitent pas d'extraction de sérum, il est cependant sensible à certaines interférences sériques [96]. De plus, ces bioessais reposent sur des cultures primaires de cellules de rats et non des lignées cellulaires. Ils sont techniquement difficiles à réaliser et leur reproductibilité n'est pas toujours excellente d'une culture cellulaire à l'autre. Ils nécessitent la mesure dans un deuxième temps par un dosage radioimmunologique de l'oestradiol produit par aromatisation des androgènes dans le milieu de culture.

Un bioessai alternatif est d'utiliser une lignée cellulaire exprimant le récepteur humain de la FSH [97]. Des cellules CHO (Chinese hamster ovary) ont été cotransfectées d'une part avec le gène codant pour le récepteur humain de la FSH, d'autre part avec un gène rapporteur codant pour la protéine luciférase. Ce gène rapporteur est sous le contrôle du promoteur qui contient des éléments CRE (élément de réponse à l'AMPc). La liaison de la FSH à son récepteur

engendre donc la cascade d'activation suivante, l'interaction du récepteur de la FSH avec les protéines G, l'activation de l'adénylate cyclase et la stimulation de la protéine kinase A qui phosphoryle le facteur de transcription CREB (la protéine de liaison à CRE). Ce facteur de transcription se liera ensuite sur la région CRE du promoteur. La liaison de CREB au CRE va induire la transcription du gène codant pour la protéine luciférase. Le taux d'expression de la protéine luciférase est quantifié par une mesure de l'activité lumineuse grâce à un luminomètre. Ce bioessai repose sur une lignée évitant les cultures primaires. La bioactivité de la FSH peut donc être mesurée directement sur les échantillons sériques, sans extraction préalable du sérum. Ce système, de plus, évite la deuxième étape du dosage par radioimmunoessai des œstrogènes. Le système est sensible et spécifique à l'activité FSH [93].

En résumé, eCG, grâce à son activité FSH, stimule la croissance folliculaire dans l'ovaire chez les espèces non équines.

## **5.2 Les facteurs autocrines et paracrines**

Les facteurs endocriniens sont régulés à l'intérieur de l'ovaire par des facteurs paracrines synthétisés par les cellules de la granulosa (IGF-II, inhibine, activine, follistatine, EGF, TGF- $\beta$  et l'oestradiol) et les cellules de la thèque interne (IGF I, EGF, TGF- $\beta$  et les androgènes) [53, 74].

Le développement d'un système de culture sans sérum capable de maintenir le phénotype folliculaire de lutéinisation a permis d'étudier le rôle des facteurs impliqués dans la régulation

locale de la fonction ovarienne [98]. Certains facteurs de croissance (EGF, FGF et IGF-I) pourraient être impliqués dans le processus de recrutement, en agissant au niveau de la régulation de la réponse folliculaire aux gonadotrophines [98, 99].

### **5.2.1 Le système des IGFs (*insulin-like growth factors*)**

Les IGF-I et -II sont des peptides dont la structure est proche de celle de la proinsuline. Ils se lient à des protéines de liaison et à des récepteurs spécifiques. Les IGFs régulent les effets de la FSH sur les cellules de la granulosa et les effets de la LH sur les cellules de la thèque [100]. Le système IGF comporte six protéines de liaison (IGF-BP 1 à 6) [101]. Les IGFs circulants sont liés à ces protéines, liaison qui entraîne une diminution de l'activité des IGFs [74]. La production de ces protéines de liaison est inhibée *in vitro* et *in vivo* par la FSH. Des protéases spécifiques des IGF-BP (PAPP-A, pregnancy-associated plasma protein A) [102] les dégradent et augmentent la biodisponibilité des IGFs [101].

L'IGF-I est sécrété par les cellules de la thèque interne des petits follicules antraux et par les cellules de la granulosa du follicule dominant chez le bovin [103]. Dans les petits follicules antraux, IGF-I agit de façon autocrine dans les cellules thécales et paracrine dans les cellules de la granulosa. Dans le follicule dominant, IGF-I agit de façon autocrine sur les cellules de la granulosa. Sa production est stimulée par les gonadotrophines [104]. Il joue un rôle important dans la croissance du follicule dominant.

L'IGF-II est produit par les cellules de la thèque interne et du stroma et les cellules de la granulosa bovine [100]. Agissant sur des récepteurs dans les cellules de la granulosa des petits follicules antraux, il exerce un effet mitogène sur les cellules de la granulosa. La FSH agit en



synergie avec IGF-I et IGF-II pour augmenter la production d'oestradiol par les cellules de la granulosa [103, 104].

Des récepteurs à l'insuline sont retrouvés sur les cellules de la granulosa, les cellules de la thèque et le corps jaune [105]. L'insuline potentialise l'effet de la FSH sur les cellules de la granulosa. Les IGFs et insuline augmentent aussi la production d'androgènes par les cellules de la thèque interne et la progestérone par les cellules de la granulosa dans le follicule dominant chez la vache [106].

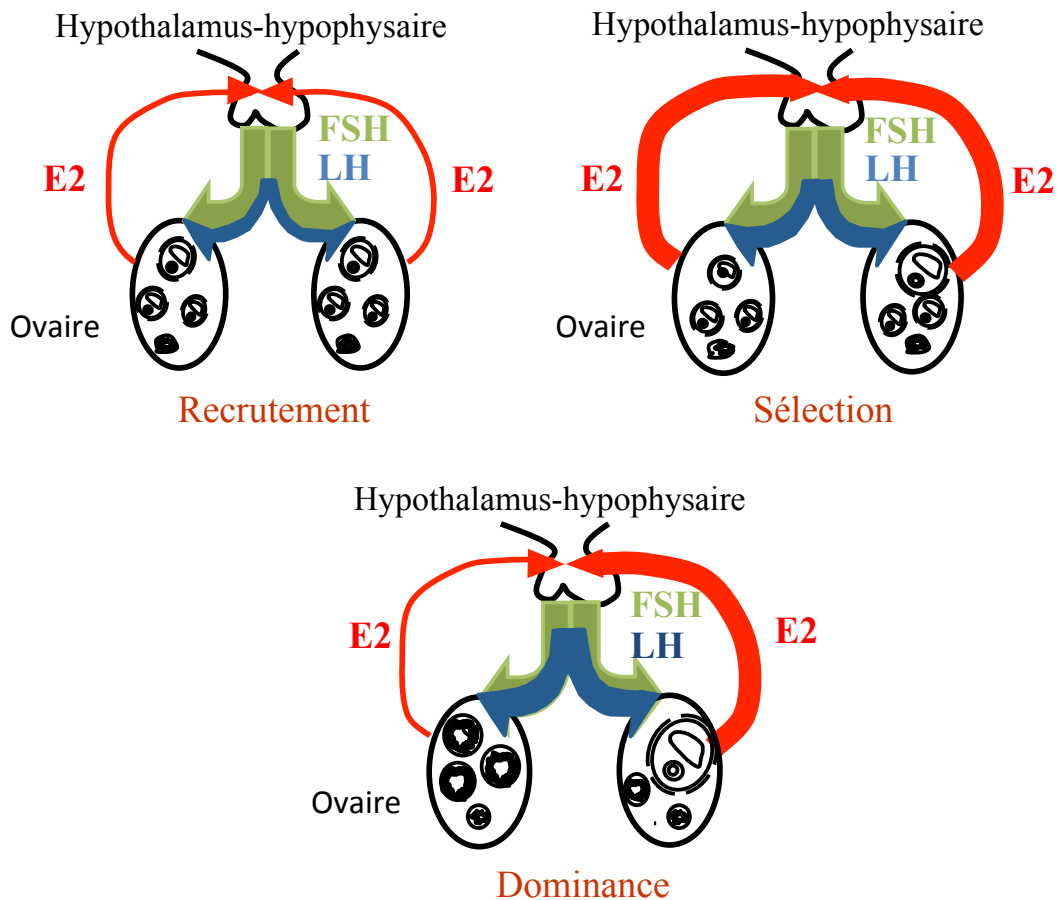
En résumé, La FSH stimule la protéine PAPP-A, cette dernière clive le complexe IGF-BP et libère l'IGF, une fois que l'IGF est libéré, elle amplifie les effets de la FSH sur les cellules de la granulosa en augmentant la sécrétion de l'oestradiol par les cellules de la granulosa et IGF amplifie aussi l'effet de la LH sur les cellules de la thèque en augmentant la production des androgènes par les cellules de la thèque.

### ***5.2.2 Oestradiol***

L'oestradiol joue un rôle très important dans la régulation des hormones hypothalamiques et hypophysaires qui vont contrôler à leur tour la fonction ovarienne. Les androgènes sont généralement produits par les cellules de la thèque et sont utilisés par les cellules de la granulosa qui les convertissent principalement en oestradiol par l'enzyme aromatase.

Au fur et à mesure que le follicule s'accroît, il y a production d'importantes quantités d'oestradiol, ce qui va stimuler la synthèse et la relâche des hormones gonadotrophes FSH et

LH, favorisant ainsi la croissance folliculaire [107], les fortes concentrations d'oestradiol vont par la suite contribuer à réduire les concentrations de la FSH [108]. Ainsi, lorsque le follicule dominant atteint un diamètre d'environ 8.5 mm, il y a déviation folliculaire [51]. Deux caractéristiques fondamentales du follicule dominant sont requises pour la déviation [109]. Il s'agit de la capacité à réduire la FSH plasmatique à des niveaux inférieurs aux besoins des autres follicules en croissance et l'acquisition d'un plus grand nombre de récepteurs à la FSH lui permettant de tirer de faibles quantités de FSH plasmatique [109] et de sécréter de plus en plus d'oestradiol [110] (Figure 5). Ceci contribuera à l'acquisition des récepteurs à la LH par les cellules de la granulosa.



**Figure 5 : Schéma représentant la sécrétion d'oestradiol.** FSH et LH au cours de la croissance folliculaire. Les gonadotropines FSH et LH agissent sur leurs cellules folliculaires *via* leurs récepteurs membranaires spécifiques, respectivement FSHR et LHR. En première partie du développement folliculaire, la FSH joue un rôle très important, elle permet la sécrétion de l'oestradiol par les cellules folliculaires (phase de recrutement). Au fur et à mesure que le follicule s'accroît, il y a une élévation de l'oestradiol qui rétrocontrôle négativement la production de la FSH. Les taux de FSH étant en baisse, c'est parmi ces follicules que le follicule dominant sera sélectionné (phase de sélection). Le follicule dominant secrète de plus en plus d'oestradiol. Au cour de la phase dominance, l'estradiol exerce une action positive sur le système hypothalamo-hypophysaire. Il provoque une décharge massive de LH qui déclenchera l'ovulation de follicule préovulatoire présent dans l'ovaire

### 5.2.3 La famille TGF- $\beta$

La famille TGF- $\beta$  est composée d'une trentaine de membres dont les TGF- $\beta$ s, les inhibines-activines-follistatines et les BMPs, GDF, AMH et autres [111, 112]. Elles jouent un rôle primordial dans la détermination du devenir cellulaire au cours de l'embryogénèse et contrôlent un large spectre de réponses biologiques chez l'adulte [113]. Le TGF- $\beta$  est apparu comme un facteur de croissance impliqué dans des processus physiologiques essentiels comme le développement embryonnaire, la réparation tissulaire, la différenciation et le contrôle de la croissance cellulaire. Après son activation, le TGF- $\beta$  induit une réponse cellulaire en se fixant à des récepteurs spécifiques ayant une activité de type sérine/thréonine kinase [112].

Le GDF-9 est important pour la progression de la folliculogénèse, les souris déficientes du gène étant infertiles et montrant un arrêt du développement des follicules au stade primaire [114]. Les souris déficientes de BMP-15 ou BMP-6 ne subissent que des effets minimaux quant à leur développement des follicules et leur fertilité [115].

L'inhibine, l'activine et la follistatine sont également des peptides intervenant dans la régulation paracrine des fonctions ovariennes [115]. L'inhibine est composée de 2 sous-unités alpha et béta, il existe deux types d'inhibines : A et B. L'activine est formée de 2 sous-unités béta. La follistatine est monomérique, elle est capable de se lier avec l'inhibine et l'activine.

L'inhibine est produite par les cellules de la granulosa des follicules matures et par les cellules lutéales. La sécrétion de l'inhibine B par les cellules de la granulosa est FSH dépendante, elle s'élève en début de phase folliculaire et décroît juste avant le pic de LH [116]. La sécrétion d'inhibine A est LH dépendante. Elle s'élève en fin de phase folliculaire pour atteindre un

maximum le jour du pic de LH, puis elle baisse au cours de la lutéolyse. L'inhibine stimule la production d'oestradiol par les cellules de la granulosa en présence de la FSH et la production d'androgènes par les cellules thécales en présence de LH [116].

L'activine est produite par les cellules de la granulosa des follicules immatures. Son taux est au maximum en milieu de cycle. Elle agit sur les cellules de la granulosa de follicules plus matures en les sensibilisant à la FSH. Elle inhibe la lutéinisation dans les follicules matures [117].

L'activine est contrôlée localement par la follistatine, une protéine de liaison qui empêchera l'activine de se lier à son récepteur [118, 119], l'inhibine agit d'une façon endocrine contraire à celle de la FSH. En retournant à l'hypophyse, l'inhibine empêche la signalisation d'activine, complétant ainsi le cycle de régulation folliculaire [120].

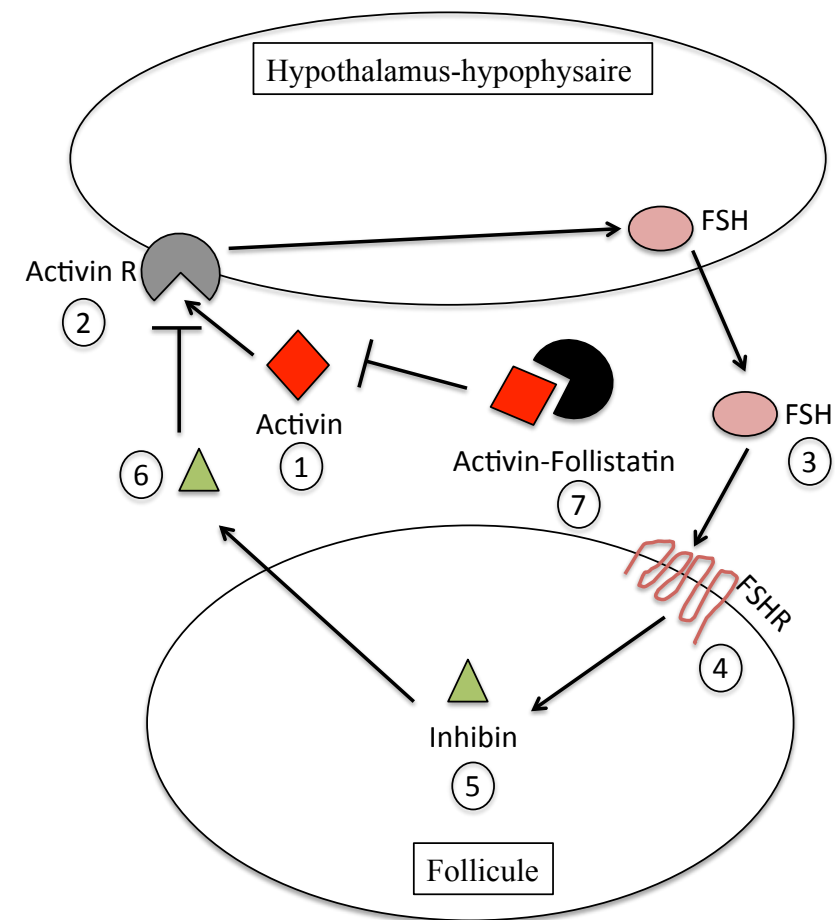
En résumé, le système inhibine-activine régule les taux de FSH (Figure 6).

#### ***5.2.4 Les facteurs de croissance des fibroblastes (FGF)***

Les FGFs forment une famille comportant 23 protéines identifiées à ce jour et quatre récepteurs. Chez l'espèce Buffalo, les FGFs jouent un rôle dans la survie et la croissance de l'ovocyte, ainsi qu'un rôle dans la formation de l'antre [121].

Le FGF-10 est exprimé par les cellules de la thèque et par l'ovocyte, mais pas par les cellules de la granulosa. Le FGF-10 inhibe de façon significative la sécrétion d'oestradiol, mais n'affecte pas la prolifération cellulaire chez la vache [122].

Le mécanisme d'action des FGFs sur leurs cellules cibles passe par leur liaison à des récepteurs spécifiques à la surface des cellules. Ces récepteurs aux FGFs (ou FGFR) constituent un groupe de molécules capables de recevoir des signaux de l'extérieur et de les transmettre à l'intérieur de la cellule et d'induire de nombreux messages cellulaires secondaires. Ces récepteurs ont généralement une activité tyrosine kinase dans leur domaine intracellulaire.



**Figure 6 : Schéma représente le rôle de l'activine et de l'inhibine dans le contrôle du taux de la FSH :** Activine (1) se lie à son récepteur au niveau des cellules hypothalamus hypophysaire, le complexe Activim récepteur (2) stimule l'expression de la FSH (3), la FSH se lie à son récepteur qui se trouve sur les cellules folliculaire (cellules de la granulosa) (4), la FSH stimule l'expression d'inhibine (5) , ce dernier empêche la fixation de l'activin à son récepteur (6), l'activine forme un complexe avec la follistatine (7), ce complexe stimule l'expression de l'inhibine.

### ***5.2.5 Autres facteurs***

Parmi les gènes activés par les gonadotrophines dans les cellules de la granulosa, un groupe est responsable de la transmission du signal ovulatoire aux cellules du cumulus et à l'ovocyte. Dans ceux-ci, on retrouve les gènes de la famille des EGF, épiréguline, beta-celluline et amphiréguline qui agissent via le récepteur EGF [123, 124]. Ceux-ci sont impliqués dans la rupture de la paroi folliculaire, dans l'expansion du cumulus et dans la maturation nucléaire de l'ovocyte chez la souris [123-125]. L'EGF exerce un effet mitogène sur les cellules de la granulosa et réduit la sécrétion de l'oestradiol [126].

D'autres messagers importants produits localement sont la progestérone et la prostaglandine E2 (PGE2). Le premier est produit de façon significative par les cellules folliculaires suivant le pic ovulatoire et agirait sur les récepteurs à la progestérone. L'inactivation génétique d'un récepteur membranaire à la progestérone chez la souris provoque l'infertilité. Celle-ci a été attribuée à l'absence d'ovulation et la perturbation de l'expression de protéases nécessaires à la rupture de la paroi folliculaire [127]. Le deuxième messager, la PGE2, est synthétisé par la cyclooxygénase 2, qui est massivement induite dans les cellules de la granulosa murale et du cumulus par les gonadotrophines [124, 128]. Il semble, dans les cellules de la granulosa et du cumulus, que PGE2 agirait sur le récepteur des PGE (2 (EP2) et 4 (EP4)) pour induire la rupture de la paroi folliculaire, l'expansion du cumulus et la maturation de l'ovocyte [129].

Un autre groupe de gènes regroupe les facteurs responsables du remodelage de la paroi folliculaire et de sa rupture. Ce groupe comprend plusieurs protéases nécessaires à la disparition de la lame basale et de la dégradation de la matrice extracellulaire du collagène retenant les cellules de la granulosa, celles de la thèque et celles des tissus conjonctifs. Des



études ont démontré que l'expression de ces protéases était modulée pendant la période péri-ovulatoire, dont ADAMTS-1, cathepsine-L [7].

## **6. LE CONTRÔLE DU DÉVELOPPEMENT FOLLICULAIRE**

La folliculogénèse peut être divisée en 2 étapes principales : la première étape est peu ou pas dépendante des gonadotrophines. Elle correspond à l'activation des follicules primordiaux au début de la croissance folliculaire. À ce stade, des taux très faibles de gonadotrophines suffisent à maintenir la croissance folliculaire. La deuxième étape est dépendante des gonadotrophines, elle correspond à la sélection du futur follicule ovulatoire parmi une population de follicules sélectionnables ( $\geq 2\text{mm}$ ) et à la maturation du follicule préovulatoire [72].

### **6.1 La transition du follicule primordial au follicule primaire**

Chez les mammifères, l'activation des follicules primordiaux n'est pas dépendante des gonadotrophines. La liaison du ligand à son récepteur à domaine tyrosine kinase et des facteurs locaux FGF-2 qui sont exprimés par les ovocytes des follicules primordiaux stimulent la production de KL (kit ligand) par les cellules pré-granulosa qui entourent l'ovocyte. Le récepteur pour KL, c-kit, est exprimé par l'ovocyte et les précurseurs des cellules thécales, ce qui leur permet de répondre à ce facteur de croissance [30, 130]. Ces dernières cellules produisent du FGF-7 qui pourrait, à son tour, agir sur les cellules pré-granulosa et/ou les cellules de la granulosa afin de réguler à la hausse l'expression de KL et amplifier son effet positif sur la prolifération des cellules pré-thécales/thécales provenant de tissus stromaux avoisinants et la croissance de l'ovocyte [131]. En se liant à c-kit, il active la voie

phosphoinositol 3 kinase (PI3K) et conduit à l'entrée en croissance des follicules primordiaux et stimule la croissance de l'ovocyte. Chez la vache, l'insuline, qui peut induire la voie PI3K [132], joue un rôle important dans l'entrée en croissance des follicules primordiaux [74]. La voie PI3K est régulée par des molécules inhibitrices dont la délétion conduit à l'épuisement prématuré de la réserve ovarienne lors de la stimulation [30]. Certains facteurs locaux appartenant à la famille du TGF- $\beta$  stimulent l'activation des follicules primordiaux. BMP-4 et -7, exprimés dans les cellules pré-thécales, stimulent, *in vivo*, l'activation des follicules primordiaux [133, 134]. Le GDF-9 est exprimé par les ovocytes de follicules aux stades primordiaux (vache et brebis) et primaires (souris) qui jouent un rôle dans la transition de primordial à primaire [74, 135]. Un autre membre de la famille TGF- $\beta$ , l'AMH, issu des follicules en croissance par les cellules de la granulosa, la bloque, indirectement, en inhibant des molécules (KL, c-kit, FGF-2, FGF-7) activant la voie PI3K [136]. La production d'AMH peut être stimulée par FOXO3 (Forkhead box O3) et FOXL2 (Forkhead box L2), ce dernier permet la transformation des cellules de la granulosa aplaties en cellules cuboïdales [30].

## **6.2 La transition du follicule primaire à l'antral**

Les follicules d'un diamètre inférieur à 2 mm sont insensibles aux variations cycliques des taux de FSH. Il est proposé que des facteurs locaux, incluant plusieurs membres de la famille TGF- $\beta$ , régulent la transition primaire à secondaire des follicules et la croissance subséquente jusqu'au début du stade antral. En effet, l'ovocyte se développe rapidement sous le contrôle du KL, puis la thèque interne se différencie en réponse à l'action de facteurs locaux comme (KL, GDF-9) [137, 138] ou circulants (IGF-I) [139], ces cellules possèdent des LHR et synthétisent

des androgènes. Les cellules de la granulosa d'un follicule primaire ne possèdent pas LHR, elles sont indifférenciées. La différenciation des cellules de la granulosa est inhibée par des facteurs locaux comme l'EGF et TGF- $\alpha$ , tandis que leur prolifération est stimulée par ces mêmes molécules [139], des facteurs de la famille TGF- $\beta$  (BMP-15) [140] et d'autres facteurs agissant de façon locale comme KL et androgène [138, 141]. En outre, la concentration élevée d'IGF-BP dans les petits follicules diminue la biodisponibilité des IGFs qui stimulent la prolifération et la différenciation des cellules de la granulosa [104]. L'AMH inhibe la prolifération des cellules de la granulosa en réprimant la synthèse de molécules stimulatrices comme GDF-9 et BMP-15, elle est sans doute responsable de leur faible vitesse de croissance [137, 142]. Lorsque la taille du follicule augmente, la production d'AMH diminue et entraîne l'augmentation de cette vitesse, un effet sans doute amplifié par l'augmentation de la production d'androgènes par la thèque interne pendant le développement du follicule chez l'humain [143]. L'augmentation progressive de la taille du follicule résulte davantage de la formation de l'antra et de l'accumulation du liquide antral que d'une multiplication cellulaire. Les follicules ayant un diamètre de plus de 2 mm augmentent de taille par la formation de l'antrum [21, 36].

### **6.3 La transition d'un follicule antral au follicule ovulatoire**

Les follicules d'une taille supérieure à 2 mm sont très sensibles aux variations gonadotropes cycliques. Après l'augmentation de la FSH circulante, une cohorte de follicules antraux s'échappe de l'apoptose dû à l'action de la FSH qui leur permet de survivre. Par ailleurs, l'effet de la FSH a été démontré en utilisant un agoniste de GnRH, qui résulte en l'arrêt de la

croissance folliculaire à environ 4 mm de diamètre. Cependant, après traitement avec de la FSH, nous avons stimulé la croissance folliculaire jusqu'à 8,0 mm chez la vache [144].

Le recrutement des follicules antraux est associé à l'apparition de l'activité aromatasase et l'expression de l'ARNm codant pour CYP19A1 ou P450 arom et P450scc dans les cellules de la granulosa [145, 146] qui seraient stimulées par la FSH au début d'une vague folliculaire. L'activité de l'aromatasase est d'abord détectée dans les follicules ayant un diamètre de 3 à 4 mm [51]. Elle se traduit par une production d'oestradiol. Au cours du développement folliculaire, il y a une élévation de l'oestradiol et de l'inhibine qui rétrocontrôlent négativement la production de la FSH. Les taux de FSH étant en baisse,[147], c'est parmi ces follicules que le follicule dominant sera sélectionné. Par opposition, l'AMH réduit la réponse à la FSH chez les follicules pré-antraux et antraux et peut donc avoir un rôle négatif dans le recrutement des follicules et dans la sélection du follicule dominant [148, 149]. Le follicule sélectionné pourra continuer à croître et ainsi entamer sa maturation préovulatoire et produire une plus grande quantité d'oestrogènes et d'inhibines. Les autres follicules partiront en atresie [150].

Le rôle du système IGF dans le processus de sélection apparaît de plus en plus clairement chez l'humain [104]. L'IGF-BP4, qui neutralise l'activité biologique de l'IGF, produite par les cellules de la granulosa préovulatoires, est dégradée par une protéase, la PAPP-A, stimulée par la FSH. La FSH stimule donc, indirectement, son propre effet sur la prolifération des cellules de la granulosa via l'action de l'IGF. Ainsi, le follicule sélectionnable possédant le seuil de réponses à FSH le plus bas sera le premier à bénéficier de l'action de l'IGF qu'il synthétise, sa vitesse de croissance s'accélénera et sa production d'oestradiol deviendra significative. Étant le premier à posséder des LHR sur ses cellules de la granulosa [151], l'acquisition de récepteurs la LH peut être observée dans les cellules de la granulosa dans les follicules dont le diamètre

dépasse 5 et 9 mm chez le porc et la vache, respectivement [72]. Certaines études suggèrent que l'acquisition des récepteurs à la LH par les cellules de la granulosa augmenterait l'expression de l'aromatase suite à une stimulation non seulement par la FSH, mais aussi par la LH [152, 153]. D'autres, par contre, avancent l'hypothèse que les cellules se transformeront de la FSH dépendante en LH dépendante [154] ce qui contribuera à maintenir une forte production de l'oestradiol. Cependant, chez la vache, il n'existe aucune étude à ce jour démontrant la stimulation de la production de l'oestradiol dans les cellules ovariennes par la LH, malgré la présence du gène CYP19A1 dans le corps jaune bovin [155]. Au contraire, de fortes doses de LH inhibe la sécrétion d'oestradiol, mais pas la progestérone [153]. Ce qui n'est pas le cas pour les cellules de la granulosa des primates et du rat pour lesquelles la LH stimulerait l'aromatase des androgènes dans les follicules préovulatoires. Cependant, dans ces espèces, même le corps jaune synthétise de l'oestradiol [156], alors que chez la vache il y a une chute de l'expression CYP19A1 et de l'oestradiol dans les follicules préovulatoires [37]. Toutefois, le mécanisme par lequel la LH maintient la production d'oestradiol n'est pas aussi clair. Il y a une hypothèse qui stipule que les cellules de la thèque pourraient être la première cible pour la LH durant cette période de développement folliculaire et les androgènes produits par les cellules de la thèque seraient un facteur limitant pour la production de l'oestradiol par le follicule dominant. Il est évident que la production de la progestérone par les cellules de la granulosa augmente la production des androgènes par les cellules de la thèque en augmentant la quantité des précurseurs disponibles [37], alors que la LH augmente la production de progestérone par les cellules de la granulosa des follicules dominants et indirectement la production d'oestradiol. Les taux croissants d'oestradiol déclenchent le pic de LH si la croissance du follicule dominant coïncide avec la régression du corps jaune [157], l'un des événements requis pour l'ovulation.

Même si la LH stimule directement les cellules de la granulosa et thécales, son effet sur les cellules du cumulus et de l'ovocyte est probablement indirect étant donné qu'il n'y a peu ou pas de récepteurs de la LH exprimés sur ces cellules [158]. Au cours des dernières années, les EGF sont devenus des candidats pour l'entremise de l'action de la LH dans le follicule. Spécifiquement, amphiréguline, épiréguline et betacelluline sont rapidement induits par la LH [123, 159, 160] et nous pensons qu'ils fonctionnent de façon autocrine et paracrine afin de propager le signal induit par la LH à travers le follicule préovulatoire. *In vitro*, ces facteurs de croissance (EGF) promeuvent plusieurs événements qui sont stimulés par la LH, incluant l'expansion du cumulus et la reprise méiotique de l'ovocyte [123, 159]. Pour la petite proportion de follicules qui atteignent le statut ovulatoire, la folliculogénèse atteint son point culminant avec la relâche du COC et la formation subséquente du corps jaune par un processus appelé lutéinisation. Le corps jaune nouvellement formé synthétise et sécrète de grandes quantités de progestérone par la LH (et d'œstrogène chez les primates) qui sont essentiels pour le support de l'éventuelle grossesse. Si la fécondation et l'implantation subséquente ne se produisent pas, la progestérone inhibe par rétrocontrôle la synthèse de la LH et stimule la production de FSH provoquant le démarrage d'un nouveau cycle et le corps jaune régresse [161].

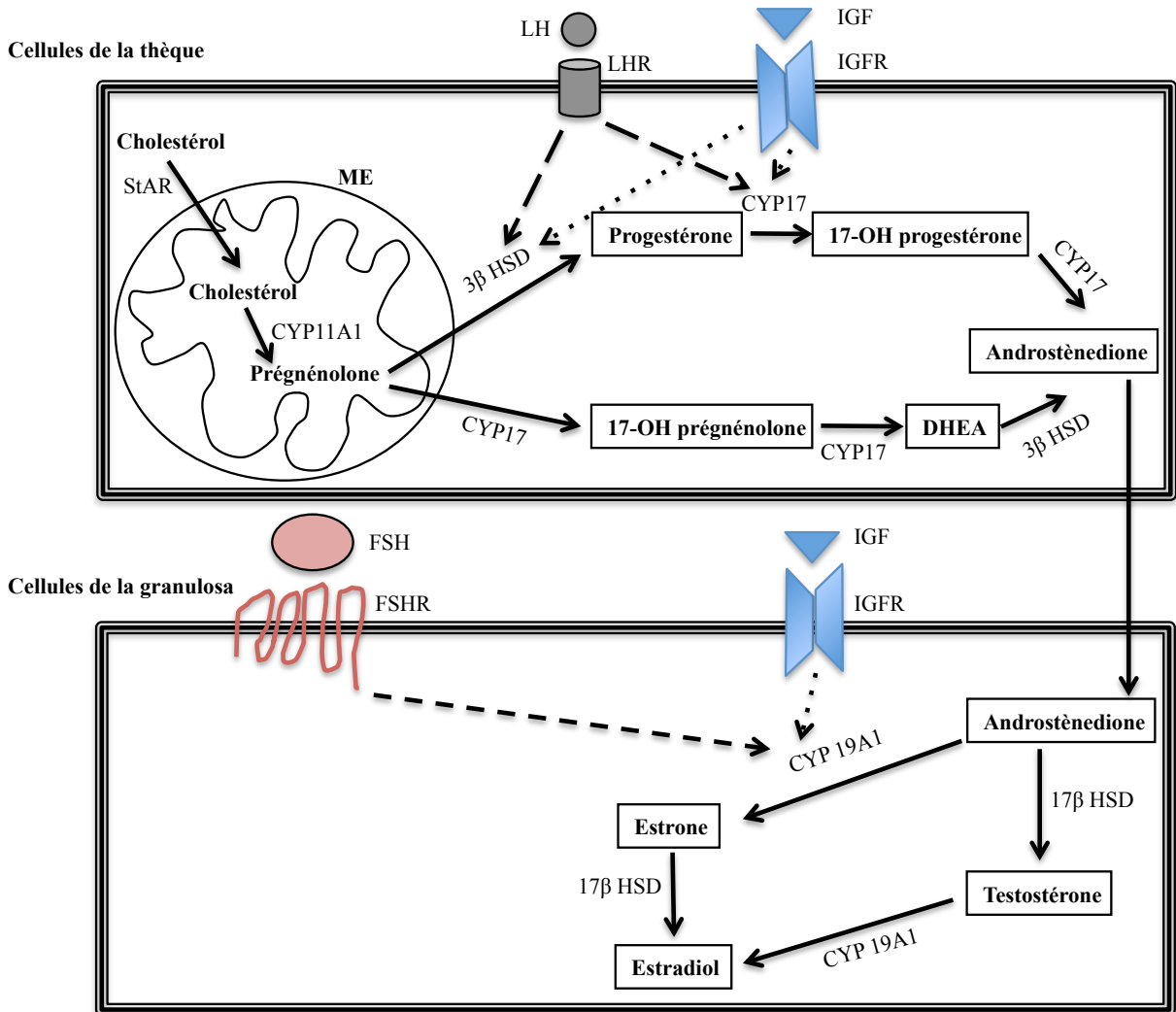
## **7. LA STÉROÏDOGÉNÈSE**

La stéroïdogénèse est l'ensemble des réactions qui sont nécessaires à la synthèse des hormones stéroïdiennes à partir de la molécule de cholestérol : œstrogène, progestérone, testostérone et glucocorticoïde. La stéroïdogénèse folliculaire aboutit à la synthèse d'œstrogènes. C'est la

théorie « 2 cellules- 2 gonadotrophines »: sous le contrôle de la FSH les cellules de la granulosa aromatisent en oestrogènes les androgènes produits par les cellules de la thèque interne sous l'effet de la LH. La thèque interne synthétise de l'androstènedione de la testostérone. Au niveau de la granulosa, la stéroïdogénèse aboutit à la production d'oestradiol avant la décharge ovulante, puis à une production de progestérone.

La progestérone est produite par la conversion enzymatique du cholestérol par des enzymes spécialisés. La synthèse débute après la translocation du cholestérol du cytoplasme aux mitochondries par le transporteur STAR. La chaîne latérale du cholestérol est d'abord clivée par l'enzyme de clivage de la chaîne latérale du cholestérol (cytochrome P450<sub>scc</sub> ou CYP11A1) pour produire la prégnénolone qui sort des mitochondries et passe à l'intérieur du réticulum endoplasmique lisse. L'enzyme cytochrome P450 17 $\alpha$ -hydroxylase/lyase ou CYP17A1, produira ensuite, par deux réactions oxydatives consécutives sur le carbone 17, la 17-OH prégnénolone, puis le déhydroépiandrostérone (DHEA), un précurseur inactif. Alternativement, la prégnénolone peut d'abord être oxydée en position 3 par la 3 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase (3 $\beta$ HSD) pour produire la progestérone. La progestérone peut aussi être oxydée par la CYP17A1 pour produire d'abord la 17-OH progestérone, puis l'androstènedione, un androgène relativement peu actif. L'androstènedione peut aussi être produite par l'oxydation du DHEA (déhydro-épiandrostérone) par la 3 $\beta$ HSD. Par la suite, l'androstènedione peut être convertie en estrone, un estrogène peu actif, par le CYP19A1. Les enzymes 17 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénases (17 $\beta$ HSD) catalysent les interconversions entre les formes inactives (androstènedione, estrone) et les formes actives (testostérone, oestradiol) pour moduler le potentiel hormonal. Alternativement, l'oestradiol peut être produit par l'aromatation de la testostérone par le CYP19A1. Les différentes étapes de la biosynthèse des

androgènes et des estrogènes sont décrites à la figure 7.



**Figure 7 : La stéroidogénèse des hormones sexuelles [58, 162, 163].** La molécule de cholestérol se transforme en androstènedione principalement par les enzymes 3βHSD et CYP17A1 qui sont stimulées par l'IGF-1 et la LH dans les cellules de la thèque. L'androstènedione se transforme en oestradiol par les enzyme CYP19A1 et 17βHSD qui sont stimulées par la FSH dans les cellules de la granulosa.



## 7.1 Les enzymes stéroidogéniques

### 7.1.1 P450scc (*clivant la chaîne latérale*) ou CYP11A1

L'enzyme P450scc est exprimée au niveau des gonades et des surrénales. Elle est également présente au niveau du placenta, du cerveau, de la peau et du système nerveux [164]. Dans l'ovaire, la P450scc est exprimée au niveau de la thèque interne et des cellules de la granulosa. La P450scc est localisée dans la mitochondrie. La réaction enzymatique implique une série de transformations, notamment deux hydroxylations et une coupure de la chaîne latérale du cholestérol au niveau des carbones 20-22 [165] aboutissant à la formation de la prégnénolone [166]. La réaction utilise 3 molécules de NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) et 3 molécules d'oxygène pour chaque molécule de cholestérol. Chez la vache, l'ARNm P450scc augmente dans les cellules de la granulosa avec le développement [145] et diminue de façon transitoire dans les follicules après le pic de la LH et par la suite augmente considérablement lors du développement du corps jaune avant de chuter de nouveau avec la régression du corps jaune. Chez la vache, P450scc est stimulée principalement par la FSH dans les cellules de la granulosa [144, 167] et par la LH et l'IGF dans les cellules de la thèque [58].

### 7.1.2 3 $\beta$ -HSD (*3 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénases*)

Cette enzyme comporte deux activités catalytiques majeures, l'enzyme est importante dans la conversion de prégnénolone en progestérone, 17 $\alpha$ -hydroxyprégnénolone en 17 $\alpha$ -hydroxyprogestérone et de déhydro-épiandrostérone (DHEA) en androstènedione. Cette enzyme est localisée dans la mitochondrie [168]. Chez la vache, 3 $\beta$ -HSD est exprimée au

niveau des cellules de la granulosa de follicules ayant atteints 7 à 8 mm de diamètre [169]. Au niveau des cellules de la thèque, 3 $\beta$ -HSD, stimulée par la LH [37].

### ***7.1.3 P450-17 $\alpha$ (P450 17 $\alpha$ -hydroxylase/lyase) ou CYP17A1***

L'enzyme P450-17 $\alpha$  est une enzyme capable de catalyser deux réactions, une 17 $\alpha$ -hydroxylation et une activité de clivage en C17 et C21, le ratio de ces deux activités peut varier selon les tissus. Au niveau des gonades, il y a plus d'activités de clivage en C17 et C21, ce qui résulte en une plus grande production de DHEA ou de l'androstènedione. L'activité du complexe enzymatique du P450-17 $\alpha$  est nécessaire pour convertir soit la prègnénolone ou la progestérone en leurs produits respectifs, DHEA et androstènedione [162, 163]. Cette enzyme est localisée dans le réticulum endoplasmique. L'enzyme est présente dans les cellules de la thèque interne du follicule ovarien.

### ***7.1.4 17 $\beta$ -HSD (17 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase)***

L'enzyme est responsable de l'étape finale de production des oestrogènes. L'enzyme catalyse la conversion de l'androstènedione en testostérone et oestrone en oestradiol [162, 163]. Il existe différents isoformes dont l'expression et le substrat préférentiel utilisé diffèrent en fonction des tissus. Chez l'humain, nous distinguons 5 isoformes de 17 $\beta$ -HSD [170]. Le type 1 est cytosolique et catalyse préférentiellement la réduction de l'oestrone en oestradiol dans les cellules intactes avec le NADPH comme cofacteur. L'enzyme est très abondante au niveau du

syncytiotrophoblaste du placenta et des cellules de la granulosa du follicule ovarien. Le type 2 est microsomal et est exprimé principalement dans l'endomètre et est faible dans le placenta et le foie. Le type 3 est aussi microsomal et se présente principalement dans les testicules où il catalyse la réduction de l'androstènedione en testostérone avec la NADPH comme cofacteur. Le type 4 se retrouve dans le peroxyssome de la plupart des tissus et catalyse la conversion oxydative de l'oestradiol en œstrone en présence de  $\text{NAD}^+$ . Le type 5 est présent dans le cytosol, principalement dans le foie et les muscles squelettiques, il catalyse la réduction des stéroïdes en C19 et C21 en présence de NADPH. Chez le rat, l'expression de  $17\beta$ -HSD augmente pendant le développement folliculaire et diminue avec la lutéinisation [171]. Chez la vache,  $17\beta$ -HSD type 1 est détectable dans les moyens et gros follicules et elle est stimulée par la FSH dans les cellules de la granulosa [172].

### ***7.1.5 P450aromatase ou CYP19A1***

L'enzyme P450aromatase (P450arom) est un produit du gène CYP19A1 et elle est localisée dans les microsomes. Elle est l'enzyme responsable de la conversion des stéroïdes, soit androstènedione en œstrone et la testostérone en œstradiol (Figure 7). L'ovaire chez le ruminant produit principalement de l'œstradiol, alors que le placenta produit l'oestriol et le tissu adipeux souvent l'œstrone. Dans l'ovaire, CYP19A1 est exprimée dans les cellules de la granulosa qui représentent le site majeur pour la production des œstrogènes chez la femelle [173]. Le complexe enzymatique de l'aromatase est nommé ainsi à cause de la structure aromatique du produit formé. L'aromatase est composée de deux polypeptides NADPH-cytochrome P450aromatase qui est une flavo protéine ubiquiste et le cytochrome

P450aromatase [174]. L'aromatase catalyse par oxydation une cascade de réactions aboutissant à l'enlèvement du groupement méthyle au niveau du C-10, donnant ainsi naissance à l'acide formique, suivi d'un réarrangement de l'anneau A en structure aromatique [165]. La réaction implique deux hydroxylations consécutives au niveau du groupement méthyle du C19 (activité 19-hydroxylase) du substrat, formant ainsi 19-hydroxy-A4 et éventuellement 19-oxo-A4 et une troisième réaction d'oxydation aboutit au clivage du groupement méthyle en C-19 (activité 19-déméthylase). L'androstènedione et la testostérone sont les substrats préférentiellement utilisés [175].

## **8. CHANGEMENTS FONCTIONNELS DES CELLULES FOLLICULAIRES**

La croissance folliculaire est indépendamment des gonadotrophines au stade de développement précoce. Les cellules de granulosa entrent en prolifération, synthétisent de nombreux facteurs de croissance (EGF, FGF, AMH). En particulier la production d'AMH, faible à indetectable dans les follicule primaires, augmente dans les follicule préantraux [149], l'AMH jouerait un rôle déterminant de gardien de la réserve ovarienne. Les cellules thécales contribuent aussi à la régulation du développement folliculaire par la sécrétion d'androgènes et de nombreux facteurs de croissance (BMP4, BMP7, FGF7, EGF, TGF $\beta$ ) capables de stimuler la prolifération des cellules de granulosa. L'activité des cellules de thèque est elle-même régulée par des facteurs sécrétés par les cellules de granulosa en particulier le Kit ligand [176].

Les gonadotrophines FSH et LH agissent sur leurs cellules-cibles via leurs récepteurs membranaires spécifiques, respectivement FSHR et LHR. Les récepteurs de FSH apparaissent

dans la granulosa des follicules primaires, leur nombre augmente légèrement et progressivement dans les follicules préantraux.—Les cellules de la thèque interne expriment dès leur formation des récepteurs de LH. Les cellules de la granulosa d'un follicule primaire ne possèdent pas LHR, elles sont indifférenciées. La différenciation des cellules de la granulosa est inhibée par des facteurs locaux comme l'EGF et TGF- $\alpha$ , tandis que leur prolifération est stimulée par ces mêmes molécules [139]. L'activation de ces récepteurs par leurs ligands stimule la production d'AMPc par l'enzyme adénylate cyclase, puis l'activation de la kinase PKA et de nombreuses autres kinases (MAPK, PI3K). La phosphorylation de différents facteurs de transcription (CREB, NR5A1) par ces kinases va activer l'expression d'un ensemble de gènes cibles codent pour des enzymes de la stéroïdogénèse tels que CYP19A1 [177]., Inhibine, FSHR et 17 $\beta$ HSD [171] dans la granulosa, CYP17A1 dans la thèque, et CYP11A1, STAR et 3 $\beta$ HSD dans ces 2 types cellulaires [178]. Les cellules de la granulosa perdent progressivement leur activité de prolifération et de synthèse d'AMH, et se différencient en cellules stéroïdogènes. Chez les rongeurs, l'IGF1 stimule l'expression du gène du FSHR, permettant ainsi aux cellules de la granulosa d'augmenter leur sensibilité à la FSH et de se différencier en cellules stéroïdogènes [179]. L'IGF1 amplifie l'action de la FSH sur l'induction de l'aromatase et joue un rôle de médiateur dans l'effet anti-apoptotique de FSH sur les cellules de la granulosa. La présence d'une quantité importante d'IGF BP diminue la biodisponibilité de l'IGF1 et freine son effet potentialisateur sur la FSH. La FSH stimule la protéine PAPP-A, cette dernière clive le complexe IGF-BP et libère l'IGF, une fois l'IGF est libéré, amplifie les effets de la FSH sur les cellules de la granulosa en augmentant la sécrétion de l'oestradiol par les cellules de la granulosa. Les deux facteurs (FSH et IGF) activent des mécanismes de signalisation communs, touchant principalement la voie PI3k/Akt impliquée dans la survie et la

prolifération des cellules de la granulosa et induisent, par cette voie, la phosphorylation du facteur de transcription Foxo-1 (forkhead box-containing protein, O subfamily), permettant sa redistribution du noyau vers le cytoplasme [180] Pour permettre la différenciation du follicule pré-ovulatoire, la FSH lève l'inhibition transcriptionnelle exercée par Foxo-1 sur les gènes P450 aromatase, épiréguline ou inhibine A, vraisemblablement en activant de façon autonome Sgk (serum/glucocorticoid-regulated kinase) et PKB [181].

L'IGF amplifie aussi l'effet de la LH sur les cellules de la thèque en augmentant la production des androgènes par les cellules de la thèque. L'activité de l'aromatase est détectée dans les follicules ayant un diamètre de 3 à 4 mm [51]. Elle se traduit par une production d'estradiol à partir des androgènes d'origine thécale. Du début à la fin de la phase folliculaire la concentration d'estradiol dans le liquide folliculaire s'accroît fortement. L'aromatase s'élève régulièrement avec l'augmentation de taille des follicules. L'activine produite par les cellules de la granulosa stimule par voie autocrine cette production. La stéroïdogénèse thécale est faiblement stimulée par la LH en début de phase folliculaire. L'activine inhibe par voie paracrine cette réponse thécale à la LH. L'activine est contrôlée localement par la follistatine, une protéine de liaison qui va empêcher l'activine de se lier à son récepteur [118, 119]. La forte production de follistatine inhibe l'activine. L'inhibine devient la principale protéine régulatrice. Les fortes concentrations d'estradiol et d'inhibine vont par la suite contribuer à réduire les concentrations de la FSH [108]. Simultanément, Les cellules de granulosa deviennent sensibles à LH. Les récepteurs LH apparaissent sur les cellules de la granulosa du follicule préovulatoire en milieu de phase folliculaire [178]. Les récepteurs FSH diminuent au stade préovulatoire. Ainsi que, l'aromatase n'augmente plus avec la taille folliculaire et c'est la disponibilité en androgènes thécaux qui limite la production d'estradiol. Cependant, en fin de croissance

folliculaire l'estradiol exerce une action positive sur le système hypothalamo-hypophysaire. Il provoque à la fois une augmentation de la fréquence des pulses de GnRH, puis une libération massive de ce dernier, et une augmentation importante de la sensibilité hypophysaire. L'association de ces deux effets conduit à une décharge massive de LH qui déclenchera l'ovulation de follicule préovulatoire présents dans l'ovaire. Lors du pic préovulatoire de LH, la fixation de la LH sur son récepteur augmente les taux intracellulaires d'AMPc et d'inositol phosphate[182], Ainsi activée, la PKA induit une cascade de phosphorylation et d'activation de facteurs de transcription (CREB) qui va inhiber (CYP19A1 [183], CYP17A1) ou activer (STAR, CYP11A1, HSD3beta) l'expression des gènes-cibles. Ces changements expressionnels se traduisent par une importante modification du profil de sécrétion des stéroïdes. Ainsi, dans les quelques heures suivant l'augmentation circulante de LH, la concentration d'estradiol et d'androgènes diminuent , alors que le taux de progestérone augmente considérablement, le follicule pré- ovulatoire passe d'un statut estrogénique à un statut progestatif . Simultanément, les cellules de la granulosa perdent leurs récepteurs de FSH. En fin de cycle ovarien, le pic préovulatoire de LH induit d'importants changements fonctionnels dans les cellules de granulosa et de thèque du follicule préovulatoire, conduisant à leur lutéinisation et à la formation du corps jaune.

Dans le corps jaune les cellules ne synthétisent plus d'estrogènes, il y a une chute de l'expression de l'aromatase (CYP19A1) [155] et 17 $\beta$ HSD [171] chez les ruminants, mais pas chez les primates [184] et les rongeurs [185]. La LH provoque la synthèse de progestérone par les cellules du corps jaune. Si la fécondation et l'implantation subséquente ne se produisent pas, la progestérone inhibe par rétrocontrôle la synthèse de LH et stimule la production de FSH provoquant le démarrage d'un nouveau cycle [161] .

## **9. AROMATASE DANS LE DEVELOPPEMENT FOLLICULAIRE**

La capacité à synthétiser d'importantes concentrations d'oestradiol par un follicule est souvent synonyme de santé. Cette forte capacité à synthétiser l'oestradiol est souvent liée à une augmentation de l'expression du gène cytochrome P450aromatase (P450arom). Cette enzyme est codée par le gène CYP19A1.

### **9.1 Structure du gène de l'aromatase**

Chez la vache, le gène CYP19A1 a été localisé sur le chromosome 10 en position q2.6 [186]. Le gène CYP19A1 a été cloné et caractérisé chez l'humain [187], le rat [188], le porc [189] et le poisson [190]. Chez la vache, le gène CYP19A1 est composé de 14 exons comprenant plus de 56Kb d'ADN génomique. La région codante du gène est confinée entre les exons 2-10. L'exon 1 encode la région 5'non traduite (5'UTR), qui est séparée de l'exon 2 par un intron [191]. La grandeur du transcrit diffère entre les espèces. Trois transcrits de 6.5, 3.4 et 1.8 Kb ont été observés chez la vache [192], la longueur du transcrit est principalement due à la longue région 3'non traduite (3'UTR) [193]. Deux transcrits de 3.4 et 2.9 Kb sont observés dans tous les tissus chez l'humain et trois transcrits de 3.3, 2.6 et 1.9 Kb chez le rat [194, 195].

Chez la plupart des mammifères, l'enzyme CYP19A1 est codée pour un seul gène [191] sauf chez le porc [196]. Chez la vache, le gène aromatase exprimé dans les différents tissus représente seulement une protéine, qui elle est constituée d'une seule séquence de 503 acides aminés et elle partage 84% d'identité avec le CYP19A1 chez l'humain et 77%, 81%, 71% et



52% avec le CYP19A1 du rat, de la souris, du poulet et de la truite [197] .

## 9.2 Le rôle du gène de l'aromatase

Les études portant sur les souris nulles ou *knockout* (ArKO) pour le gène aromatase ont démontré le rôle important de ce gène chez les deux sexes. Les souris femelles à 9 semaines d'âge montraient un bas développement génital externe et de l'utérus [1, 198]. Il y a également une dégénérescence kystique de l'ovaire, caractérisée par l'absence du développement folliculaire et ovulatoire [199]. Les mâles du même âge étaient fertiles [1], mais nous notons une dégénérescence testiculaire [200]. Les niveaux de l'œstradiol plasmatique étaient à la limite de la détection chez la souris ArKO et les niveaux de testostérone étaient élevés [1].

D'autres études montrent qu'une expression aberrante du gène aromatase est souvent associée à des processus pathologiques tels que le cancer du sein, des ovaires et des testicules [201], ainsi que l'endométriose [202]. Dans ce contexte, un intérêt particulier est accordé au mécanisme de régulation du gène et l'expression spécifique tissulaire.

Dans le cerveau, la conversion des androgènes en œstrogènes par l'aromatase est un mécanisme clé par lequel la testostérone régule plusieurs processus physiologiques et du comportement, incluant l'activation du comportement sexuel du mâle, la différenciation sexuel du cerveau et les effets du rétrocontrôle négatif des hormones stéroïdiennes dans la sécrétion des gonadotrophines [203].

### 9.3 L'expression tissulaire du gène de l'aromatase

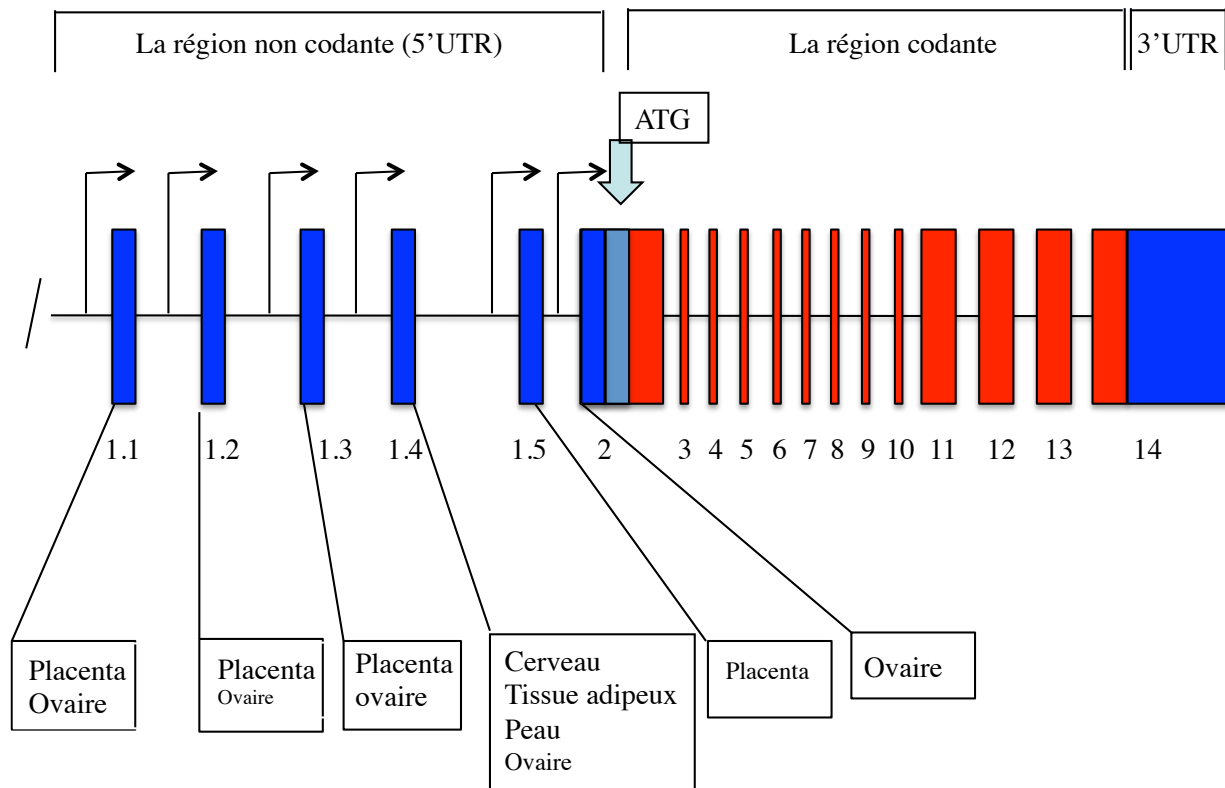
Les gonades et le cerveau sont les lieux majeurs dans lesquels l'expression de l'aromatase se déroule pour la majorité des espèces vertébrés [174]. Chez l'humain, l'expression de l'aromatase se déroule dans le placenta (syncytiotrophoblaste) aussi bien que dans les cellules stromales du tissu adipeux [174, 204]. L'expression de l'aromatase dans le placenta n'est pas seulement pour les humains, mais s'est aussi exprimée dans les espèces ongulées telles que la vache [191], le porc [189] et le cheval [205]. L'activité de l'aromatase a été observée dans le blastocyste du porc [206] aussi bien que dans les cellules de Leydig [207, 208]. Au niveau de l'ovaire, l'expression de l'aromatase est plus importante dans les cellules de la granulosa des follicules préovulatoires que des petits follicules [145, 185]. Certaines espèces, comme l'humain [184], les rongeurs [185] et les bovins [155] peuvent exprimer l'aromatase au niveau du corps jaune. Chez le porc, nous avons rapporté l'expression de l'aromatase dans les cellules de la thèque interne des follicules préovulatoires [189].

Plusieurs études montrent que l'expression du gène CYP19A1 est régulée de façon différente dans les tissus [189, 191]. De multiples promoteurs peuvent être impliqués dans l'expression spécifique de certains tissus. Chez la vache, 6 promoteurs ont été décrits. Le promoteur 1.1 et 1.3 sont activés principalement au niveau du placenta, le promoteur 1.4 au niveau de cerveau [191] et le promoteur 2 au niveau de l'ovaire, bien que les promoteurs 1.1 et 1.5 ont un rôle sur les cellules de la granulosa, mais avec un niveau d'expression beaucoup moindre que le promoteur 2 (Figure 8) [2]. Après l'ovulation, il y a seulement le promoteur 1.1 qui s'exprime au niveau du corps jaune bovin [155]. Chez la brebis, il y a 4 promoteurs qui dirigent la transcription du gène CYP19A1, les promoteurs 1.5 et 1.1 au niveau du placenta, le promoteur

I.4 au niveau de cerveau et le promoteur 2 au niveau de l'ovaire [209, 210].

Chez l'humain, 9 promoteurs ont été décrits (I.f, I.1, I.2, I.3, I.4, I.5, I.6 et II), les promoteurs I.6, I.4 et I.3 sont activés principalement au niveau des tissus adipeux, les os ou la peau, le promoteur I.f au niveau du cerveau, le promoteur I.1 au niveau du placenta et le promoteur II au niveau de l'ovaire [210, 211]. Chez le rat, il n'y a que deux promoteurs ; le distal et le proximal, ce dernier dirige la transcription au niveau de l'ovaire et l'autre au niveau du cerveau [210, 212].

Des études récentes montrent que des facteurs épigénétiques sont impliqués dans l'expression tissulaire des promoteurs, pour chaque gène, la méthylation de l'ADN est corrélée avec la répression de la transcription [213, 214], alors que l'hypométhylation est associée au promoteur actif [210].



**Figure 8 : La structure du gène CYP19A1 et l'expression tissulaire des différents promoteurs d'aromatase [210].**

#### **9.4 La régulation du gène CYP19A1 et la sécrétion de l'oestrogène**

Les multiples promoteurs d'aromatase sont régulés différemment et selon les tissus par une variété d'hormones, de cytokines et de facteurs de transcription [215]. Par exemple, au niveau du cerveau, les androgènes peuvent induire l'expression d'aromatase chez le rat [216]. Alors que dans les tissus adipeux et la peau humaine, la faible expression de l'aromatase et la production d'oestrogènes est sous le contrôle du promoteur I.4 qui est régulé par les glucocorticoïdes et diverses cytokines de classe I [211]. Chez la vache et les rongeurs, il n'y a pas de preuves de la biosynthèse de l'oestrogène dans les tissus adipeux et le placenta [174, 217].

Au niveau des ovaires, l'ARNm et la protéine qui codent pour le gène sont absents dans les follicules antraux avant le recrutement et la concentration intra-folliculaire d'oestradiol est très faible [142], du moins chez le rat [185], l'humain [184] et la vache [145]. L'ARNm de la CYP19A1 apparaît dans les cellules de la granulosa des follicules recrutés et augmente dans les follicules dominants. L'expression de la CYP19A1 et de l'oestradiol sont induits principalement par la FSH durant la phase folliculaire du cycle œstral, juste avant l'émergence de la vague folliculaire [177]. La FSH a un effet biphasique au niveau des cellules de la granulosa in vitro, dans la mesure où de faibles doses (1ng/ml) stimulent et de fortes doses (100ng/ml) ont un effet inhibiteur [218-220]. Au contraire, les sécrétions de progestérone étaient élevées avec les doses élevées de la FSH [219].

L'un des mécanismes moléculaires par lequel la CYP19A1 est régulée par les gonadotrophines est décrit comme suit : la FSH se lie à son récepteur sur les cellules de la granulosa et résulte en une augmentation de l'AMPc intracellulaire qui à son tour va phosphoryler certains facteurs de

transcription qui se lieront au niveau du promoteur d'aromatase et stimuleront son expression aussi bien chez l'humain [221] que chez le rat [188], ce qui permet de transformer l'androstènedione secrétée par les cellules de la thèque en œstradiol.

D'autres études, chez les rongeurs par exemple, démontrent que la FSH peut stimuler aussi la voie cAMP second messenger, la voie PI3K (phosphoinositol 3 kinase) comme AKT second messenger pour induire l'expression de l'aromatase [222].

L'insuline et l'IGF-1 sont nécessaires à l'induction de l'aromatase par la FSH [218, 223]. Des études récentes chez les bovins, montrent que l'IGF-1 augmente l'effet de la FSH sur la stimulation de l'expression des gènes stéroïdogéniques et sur la production des hormones dans les cellules de la granulosa sans sérum en culture, l'IGF-1 stimule la voie PI3K par la phosphorylation AKT [224].

Au moment du pic de la LH a un effet inhibiteur sur les niveaux d'ARNm CYP19A1 [183], les niveaux de l'œstradiol diminuent de façon transitoire et augment par la suite durant la phase lutéale chez la femme [184] ou la gestation chez le rat [185]. Cette augmentation dans la production d'œstradiol par le corps jaune est due à une augmentation de l'expression CYP19A1 [184, 185]. Chez la vache, le patron de l'expression de l'aromatase et de la synthèse de l'œstradiol est très différent de celui de l'homme et du rat. Des cellules de la granulosa synthétisent de l'œstradiol [225]. Cependant, après l'ovulation, l'expression de CYP19A1 et la sécrétion d'œstradiol du corps jaune est très faible [155].

## 9.5 La régulation transcriptionnelle du gène CYP19A1

Le remodelage de la chromatine, le recrutement de facteurs de transcription et l'assemblage de la machinerie transcriptionnelle sont les événements cruciaux qui doivent être accomplis avec succès pour permettre l'initiation de la transcription. Il existe deux types de promoteurs : le promoteur minimal, situé immédiatement en amont du site d'initiation de la transcription, où vont se lier les facteurs de transcription généraux et l'ARN polymérase II, et le promoteur distal, situé généralement sur quelques centaines de paires de bases en amont du promoteur minimal, où vont se lier les facteurs de transcription spécifiques. Par exemple, dans le cas du gène aromatase, le promoteur 2 est considéré comme un promoteur minimal et le promoteur 1.1 comme un promoteur distal. Les régulateurs transcriptionnels se lient à des motifs d'ADN qui sont spécifiques (éléments de réponse).

### 9.5.1 *Éléments de régulation du promoteur 2 du gène CYP19A1 :*

L'initiation de la transcription nécessite la présence dans la région promotrice d'un complexe multiprotéique formé notamment de facteurs transcriptionnels. On distingue principalement la protéine TBP et les TAF (facteurs associés au TBP) qui se fixent sur les deux boîtes TATA [191, 226] et stabilisent le complexe d'initiation formé par l'ARN polymérase et les facteurs de transcription. La boîte TATA est conservée entre l'homme, la vache, le rat et la poule [197]. Par ailleurs, il existe d'autres séquences régulatrices. Les éléments cis-régulateurs sont généralement constitués de quelques nucléotides, ces séquences qui viennent se fixer sur les facteurs trans-régulateurs. Parmi les séquences régulatrices, il y a la boîte *CLS* (CRE like

sequence), élément de réponse à l'AMPC dont la séquence est représentée par l'octamère palindromique TGACGTCA retrouvé dans la région promotrice des gènes inductibles par l'AMPC. Cette séquence serait reconnue par une protéine CREB, qui est un régulateur important du promoteur 2 de CYP19A1 chez l'humain et le rat [227, 228]. Des études comparatives entre l'humain et la vache réalisées par Hinshelwood (1997) sur le promoteur 2, ont montré que malgré 88% d'homologie de séquence avec l'humain, il semblerait qu'il ait une délétion d'une paire de base au niveau de la séquence CLS, ce qui cause probablement l'absence d'activité du promoteur 2 bovin dans les cellules de la granulosa bovine lutéinisées *in vitro* [226]. En amont du CLS, nous trouvons deux éléments de régulation pour les récepteurs nucléaires de la famille NR5A, le NRE-A et NRE-B, où se lient le facteur NR5a1 et le facteur NR5a2 qui sont respectivement des éléments essentiels à l'expression d'un grand nombre d'enzymes stéroïdogéniques, incluant CYP19A1 [229-232]. Les récepteurs nucléaires NR5A sont donc d'importants régulateurs de l'activation AMPc/PKA- dépendante du promoteur gonadique de CYP19A1 chez l'humain [233] et sont très bien conservés chez les mammifères [226, 232]. En amont du NRE, nous trouvons l'élément FOXL2 (Forkhead box L2) qui se lie au site de liaison FOXL2 (FOX motif). Sa fonction diffère d'une espèce à l'autre. Chez l'humain et le rat, FOXL2 joue un rôle de répresseur du gène CYP19A1 [234, 235], alors que chez la chèvre, il stimule le gène CYP19A1 [236]. Des éléments de régulation GATA, qui sont très bien conservés entre les espèces, sont présentés sur le promoteur 2 [237, 238]. Des expériences de transfections transitoires sur des cellules de la granulosa ont aussi démontré que lorsque l'élément GATA distal est muté, l'activité du promoteur 2 basal est significativement réduite, ceci démontre que les facteurs GATA sont aussi des régulateurs de l'expression de l'aromatase dans les gonades et que leurs effets peuvent aussi être modulés par la voie



AMPC/PKA chez le rat [239]. Chez le buffle, délétion au niveau de CLS, le facteur GATA joue un rôle important dans la régulation de l'expression du gène CYP19A1 durant la folliculogénèse *in vitro* [240].

### **9.5..2 Éléments de régulation du promoteur 1.1 du gène CYP19A1**

Des études avec les gènes rapporteurs réalisées par Vanselow et coll en 2001 ont démontré que les séquences de 404pb en amont du promoteur 1.1 bovin situées aux environs de 35kb en amont du site d'initiation de la traduction est une région active. L'analyse de la séquence du promoteur 1.1 chez vache et la brebis a montré l'existence de sites de liaisons pour les facteurs de transcription tels que H1, H2 et H3 (core half site hexameric sequence) ; E1 et E2 (E box) ; AP1, AP2 (binding site for activiting proteine) ; INR (transcriptional initiator region) et CAAT box [210]. D'autres études montrent que chez le bovin, USF-1 et USF-2 sont des facteurs de transcription qui se lient sur la boîte E au niveau du promoteur 1.1 du gène CYP19A1 dans le placenta [241]. Chez l'humain, le site de liaison des SMAD (éléments SBE) est présenté sur le promoteur 1.1 [242]

## **9.6 La régulation post-transcriptionnelle du gène CYP19A1**

La régulation post-transcriptionnelle peut opérer au cours de nombreuses étapes telles que la maturation des ARNm (coiffage, épissage et polyadénylation), le transport nucléoplasmique, l'efficacité de traduction et la stabilité du transcrit. Malgré leur rôle majeur dans l'expression des gènes, la régulation post-transcriptionnelle a été beaucoup moins étudiée que la régulation transcriptionnelle. Cependant, la découverte du mécanisme de *RNA silencing* a permis de

souligner l'ampleur de la régulation post-transcriptionnelle pour l'expression d'un grand nombre des gènes.

Plusieurs modalités s'appliquent généralement de façon simultanée pour réguler de façon complexe l'expression d'un gène et permettre son adaptation fine.

### ***9.6.1 Modalités spécifiques***

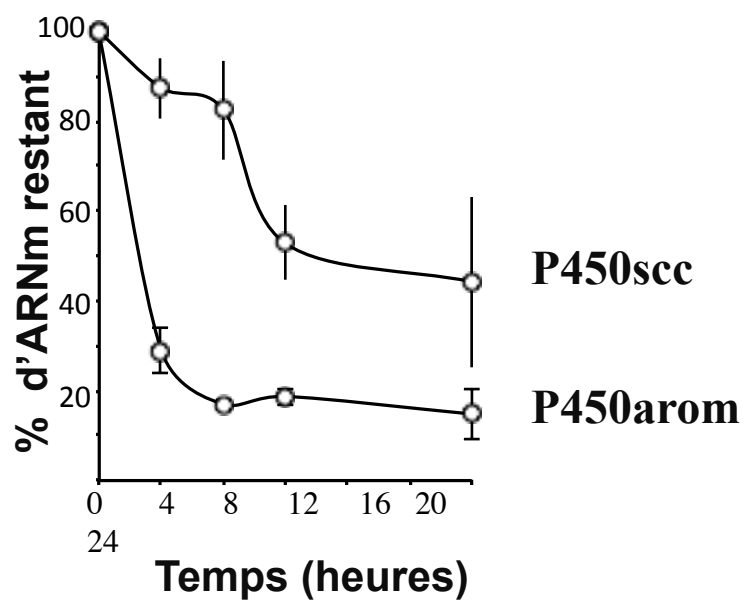
Il est admis qu'après la transcription de l'ADN en ARNm, plusieurs protéines se fixent sur des séquences/structures particulières de l'ARNm [243]. Ces complexes dictent le destin de chaque ARNm quant à sa stabilité, son transport et sa traduction. La plupart des séquences caractérisées sont principalement localisées dans la région 3'UTR [188]. L'ARNm CYP19A1 chez la vache est environ 6.5Kb, soit deux fois plus que l'ARNm chez le rat et l'humain [192], alors que la demi-vie de l'ARNm chez la vache est courte (3h) comparée au gène CYP11A1 (Figure 9) [3]. La différence de la demi-vie est liée principalement à la présence d'une longue région 3'UTR qui est environ 3kb chez la vache [193]. La région 3'UTR est caractérisée par la présence de multiples régions riches en adénylates et en uridylates nommées ARE (AU-rich element) [193]. Plusieurs copies des motifs AUUUUA et AUUUA peuvent exister à l'intérieur de la région 3'UTR. Certaines études ont démontré que les motifs AUUUA, lorsque présents dans une région ARE, ont des fonctions de déstabilisation. Plusieurs études ont montré la présence de protéines de liaison qui se lient spécifiquement à la séquence ARE. Parmi les facteurs trans-régulateurs qui sont en contact direct avec ARE [244, 245], nous distinguons AUF (AU factor 1) [246, 247]. AUF1 peut agir comme stabilisateur ou déstabilisateur pour le

gène cfos chez la souris, dépendamment du type cellulaire, de la région ARE et de l'environnement cellulaire [244].

Il existe aussi d'autres éléments comme IRE (élément de réponse au fer ou Iron-responsive element) qui sont des structures qui se forment de tige en boucle (stem-loop) avec 23-27 pb. La région 3'UTR de l'ARNm du récepteur transferrine (TFR) contient 5 IRE, qui sont requis pour réguler sa demi-vie. En addition, la région 5'UTR de l'ARNm ferritine contient un IRE qui affecte l'initiation de la traduction chez la plupart des mammifères [188].

D'autres familles de protéines comme les arginine/sérine splicing factor, jouent deux rôles, un rôle dans l'épissage de l'ARNm à l'intérieur du noyau et un rôle sur la stabilité des ARNm où se fixe sur la séquence ATGGAGGGTAATGAAAAG de 3'UTR PKCI-r (a chicken gene homologous to PKC interacting protein 1 (PKCI-1) à l'intérieur du cytoplasme de la lignée cellulaire DT40-ASF chez les poulets [248, 249].

Le mécanisme d'action de ces protéines n'est pas très clair, certaines études suggèrent l'idée d'interaction directe de la protéine de liaison avec une déadénylase pour moduler son activité, ou alors empêcher la liaison des protéines spécifiques à la queue polyA (PABP) qui va exposer la queue polyA à divers ribonucléases [250, 251].



**Figure 9 :** L'abondance relative des ARNm codant pour le cytochrome P450 scc (CYP11A1) et P450arom (CYP19A1) après un traitement par l'inhibiteur de la transcription DRB. Les niveaux d'ARNm du gène cible ont été mesurés par *Northern blot* [3].

### **9.6.2 ARN interférant (miARN)**

Un ARN interférant est un acide ribonucléique simple ou double brin dont l'interférence avec un ARN messager spécifique conduit à sa dégradation et à la diminution de sa traduction en protéine. Le principe général de ces microRNA est décrit comme suit, les ARN double brin présents dans une cellule sont tout d'abord pris en charge par une ribonucléase de type III appelée Dicer, celle-ci clive l'ARN double brin à toutes les 21 à 25 paires de base. Dicer transfère alors les petits ARN interférents (miARN) à un gros complexe multiprotéique, le complexe RISC. Un des brins du miARN, dit passager, est éliminé tandis que l'autre (appelé « guide ») dirige le complexe RISC vers les ARNm possédant une séquence complémentaire au brin guide. Si la complémentarité entre le miARN et l'ARNm cible est parfaite, le complexe RISC clive l'ARNm cible qui est alors dégradé et n'est donc plus traduit en protéine. Quelques bases non complémentaires suffisent pour empêcher le clivage [252].

Ces miARN peuvent affecter la stabilité de certains gènes, de plus selon la base de données des miARN (<http://www.mirbase.org/>) de multiples miARN sont prédites pour lier la région 3'UTR de CYP19A1 [253, 254]. Certaines études réalisées au niveau des cellules de l'endomètre humain ont démontré qu'une faible expression de miR-23a, miR-23b est corrélée avec une forte expression du gène CYP19A1 [255]. Chez le porc, mir378 se lie à la région 3'UTR du gène CYP19A1, il inhibe l'expression de l'aromatase et la production de l'œstradiol dans les cellules de la granulosa [254].

### ***9.6.3 Modifications post-traductionnelles***

Une modification post-traductionnelle est une modification chimique d'une protéine, réalisée le plus souvent par une enzyme, après sa synthèse ou au cours de sa vie dans la cellule. Elle entraîne généralement un changement de la fonction de la protéine, de son activité, de sa demi-vie ou de sa localisation cellulaire. Il existe plusieurs types de modifications post-traductionnelles qui consistent en l'ajout d'un groupement fonctionnel (acétylation, alkylation, glycosylation, phosphorylation) ou en l'addition d'un groupement peptidique (ubiquitination, sumoylation).

L'acétylation des protéines consiste en l'ajout d'un groupement acétyle ( $\text{CH}_3\text{CO-R}$ ) sur les résidus lysines. L'acétylation ne requiert pas un motif protéique spécifique, mais survient dans les régions riches en lysines.

La phosphorylation des protéines est l'un des mécanismes de régulation les plus importants et les plus fréquents chez les eucaryotes. C'est un processus réversible catalysé par des kinases (phosphorylation) et des phosphatases (déphosphorylation). Les kinases sont généralement activées par des signaux extracellulaires et transmettent ces signaux à l'intérieur des cellules. L'ajout des groupements phosphates se fait sur les résidus sérines, thréonines et tyrosines. La phosphorylation d'une protéine peut affecter sa structure et/ou sa fonction, positivement ou négativement.

La sumoylation consiste à l'attachement par des ligases spécifiques d'une protéine SUMO (small ubiquitin-like modifiée, qui sont de petites protéines apparentées à l'ubiquitine), à un résidu lysine d'une séquence. Contrairement à l'ubiquitination dont la fonction première est

d'étiqueter les protéines pour les diriger vers le protéasome où elles seront dégradées, la sumoylation prévient leur dégradation [256]. La sumoylation modifie aussi les fonctions des protéines; elle régule notamment les interactions protéine-protéine, le transport nucléocytoplasmique et les interactions protéine-ADN.

## HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

La FSH et l'IGF-1 sont les principaux régulateurs du gène CYP19A1 dans les cellules de la granulosa. Des études réalisées dans notre laboratoire montrent qu'au moins deux promoteurs (P1.1 et P2) dirigent la transcription du gène CYP19A1 dans les cellules de la granulosa. Le mécanisme de régulation de ces deux promoteurs est mal connu. De plus, la mesure de la demi-vie de l'ARNm CYP19A1 est de 3h, ce qui est très court comparé au CYP19A1 humain et aux autres gènes stéroïdogénique. L'utilisation d'un inhibiteur de la synthèse protéique (la cycloheximide) rend capable d'augmenter la stabilité de l'ARNm de CYP19A1 bovine jusqu'à 12h [3]. L'analyse de la région 3'UTR qui est de 3kb du gène CYP19A1 bovin montre la présence de plusieurs motifs ARE. Des études antérieures démontrent que ces motifs sont impliqués dans la régulation de la stabilité du gène. Notre hypothèse est que la FSH et l'IGF-1 agissent en stimulant différents promoteurs d'aromatase dans les cellules de la granulosa et que la courte demi-vie de l'ARNm CYP19A est fort probablement sous le contrôle post-transcriptionnel.

### **Les objectifs de cette étude sont :**

1. Mieux comprendre la régulation des différents promoteurs du gène CYP19A1 par la FSH et l'IGF-1 dans les cellules de granulosa bovine.
2. Établir un système bioessai on utilisant les promoteurs du gène CYP19A1 qui répondent à la FSH.
3. Déterminer le mécanisme moléculaire de contrôle de la stabilité de l'ARNm codant pour le gène CYP19A1.



**Factors regulating the bovine, caprine, rat and human ovarian aromatase promoters in a bovine granulosa cell model.**

**General and Comparative Endocrinology. 2014 Feb 18; 200: 10-17**

Fatiha Sahmi<sup>a</sup>, Edmir S. Nicola<sup>a</sup>, Gustavo O. Zamberlam<sup>a</sup>, Paulo D.B. Gonçalves<sup>a,1</sup>, Jens Vanselow<sup>b</sup> and Christopher A. Price<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Centre de recherche en reproduction animale, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, St-Hyacinthe, Québec, Canada.

<sup>b</sup>Reproductive Biology, Leibniz Institute for Farm Animal Biology, Dummerstorf, Germany.

<sup>1</sup>Present address: Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil.

Keywords: Aromatase, FOXL2, Granulosa, NR5A2, Ruminant

## RÉSUMÉ

Les promoteurs ovariens du gène codant pour le cytochrome P450 aromatasase ( CYP19A1 ) chez les primates et les rongeurs répondent à la forskoline dans les cellules de granulosa bovines lutéinisées, alors que le promoteur ovarien chez le ruminant est peu actif. Dans cette étude, nous avons étudié *in vitro* l'activité du promoteur ovarien bovin dans deux modèles de cellules de la granulosa, les cellules lutéinisées et non lutéinisées. Dans les cellules non-lutéinisées, FSH et IGF-1 augmentent l'abondance des transcrits issus du promoteur ovarien. La comparaison de l'activité du promoteur ovarien de différentes espèces, en réponse aux facteurs de transcription (Forskoline , NR5A2 , FOXL2 ) dans les cellules lutéinisées montre que le gène rapporteur luciférase du promoteur du rat est régulé essentiellement par la forskoline (18 fois par rapport à l'expression de base) et l'ajout de NR5A2 ou FOXL2 n'a aucun effet. L'activité du promoteur humain augmente significativement par NR5A2 et la forskoline (153 fois) comparé à la forskoline seule (71 fois par rapport à l'expression de base) ; L'ajout de FOXL2 n'a pas augmenté de manière significative l'activité du promoteur. La forskoline seule a provoqué l'activation mineure du promoteur du caprin et bovin (3 fois par rapport à l'expression de base), et l'ajout de NR5A2 augmente l'activité (de 7 à 11 fois). Lorsque la forskoline, NR5A2 et FOXL2 ont été combinées, l'activité des promoteurs caprins et bovins augmente respectivement de 20 et 34 fois. Ces données suggèrent que la principale raison pour laquelle CYP19A1 n'est pas exprimé dans les cellules lutéinisées (et le corps jaune) de ruminants peut être l'exigence de FOXL2, ce qui ne semble pas être le cas chez l'humain et le rat.

Mots clés : aromatasase, granulosa, NR5A2, FOXL2, ruminant

## ABSTRACT

The ovarian promoter of the primate and rodent genes encoding cytochrome P450 aromatase (*CYP19A1*) are robustly responsive to forskolin in luteinized cell models, whereas the ruminant ovarian promoter is minimally active. We explored this discrepancy by investigating the activity of the bovine ovarian promoter in two bovine granulosa cell models, luteinizing and non-luteinizing cells in vitro. In non-luteinizing cells, both FSH and IGF1 increased abundance of transcripts derived from the ovarian promoter. Comparison of the activity of promoters of several species in response to transcription factors (forskolin, NR5A2, FOXL2) in luteinizing cells demonstrated that a rat ovarian promoter-luciferase reporter was regulated mainly by forskolin (18-fold increase over basal expression) and addition of NR5A2 or FOXL2 had no further effect. Activity of a human promoter was significantly increased by NR5A2 plus forskolin (153-fold) compared with forskolin alone (71-fold over basal); addition of FOXL2 did not significantly increase promoter activity. Forskolin alone provoked minor activation of caprine and bovine promoter reporters (3-fold over basal), and addition of NR5A2 increased activity (7 to 11-fold). When forskolin, NR5A2 and FOXL2 treatments were combined, the activity of the caprine and bovine promoters increased to 20- and 34-fold, respectively. These data suggest that a major reason why *CYP19A1* is not expressed in luteinized cells (and the corpus luteum) of ruminants may be the stimulatory effect of FOXL2, which does not appear to be the case in the human and rat.

Keywords : Aromatase, Granulosa, NR5A2, FOXL2, Ruminant.

## 1. Introduction

Oestrogens are crucial for fertility in females, as they are necessary for granulosa cell proliferation, growth of the oocyte and acquisition of luteinizing hormone (LH) receptors (Knecht et al., 1985, Britt et al., 2004, Quirk et al., 2006). Loss of the enzyme responsible for the production of oestrogens, cytochrome P450 aromatase (CYP19A1), renders mice infertile (Fisher et al., 1998). Expression of ovarian *CYP19A1* is stimulated by follicle-stimulating hormone (FSH) in human, rat and bovine granulosa cells (Steinkampf et al., 1987, Fitzpatrick and Richards, 1991, Silva and Price, 2000), and by insulin-like growth factor-1 (IGF1) in humans and cattle (Steinkampf et al., 1988, Spicer and Aad, 2007) although in rodents IGF1 may augment FSH-stimulated *CYP19A1* expression rather than act alone (Zhou et al., 1997).

FSH and IGF1 act through multiple pathways. FSH increases intracellular cAMP levels and activates protein kinase A (PKA), which in turn activates cAMP response element binding protein, a major transcription factor for FSH target genes (reviewed in (Hunzicker-Dunn and Maizels, 2006). In rodent granulosa cells, PKA has also been shown to activate ERK1/2 and phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt pathways (Zelevnik et al., 2003, Hunzicker-Dunn et al., 2012), although these may not be as important in bovine granulosa cells (Silva et al., 2006). IGF1 acts through the PI3K/Akt and ERK1/2 pathways independently of PKA in rodent and bovine granulosa cells (Gonzalez-Robayna et al., 2000, Mani et al., 2010).

Transcription of *CYP19A1* is driven by tissue-specific promoters, and there are numerous species differences in the number and structure of the *CYP19A1* promoters. In rats, two promoters are described, in humans there are nine promoters, and in sheep and cattle there are five and seven promoters, respectively. In all species, the proximal promoter, also named PII in humans and P2 in ruminants, is the ovarian promoter (Vanselow et al., 2001, Bulun et al., 2003,

Pannetier et al., 2006); in cattle, P2 derived transcripts normally represent over 80% of all *CYP19A1* transcripts detected in granulosa cells and a distal promoter, P1.1, is a minor contributor to granulosa cell *CYP19A1* transcripts (Lenz et al., 2004, Hamel et al., 2005). In the corpus luteum, the major promoter used is PII in humans and rodents (Means et al., 1991, Stocco, 2004) whereas in ruminants P1.1 is the main luteal promoter (Lenz et al., 2004).

The proximal end of the ovarian promoters contains a number of fairly well conserved regulatory elements. These include two completely conserved binding sites for the orphan nuclear transcription factors NR5A1/NR5A2 (Stocco, 2008), and the forkhead box family member FOXL2. In humans and rodents, the proximal promoter contains a cAMP response element (CRE)-like sequence (CLS) that confers responsiveness to cAMP pathways (Fitzpatrick and Richards, 1993, Michael et al., 1997). In the cow, however, there is a single base pair deletion in the CLS of P2 that renders this promoter unresponsive to cAMP in reporter assays with luteinized bovine granulosa cells (Hinshelwood et al., 1997). The goat and buffalo P2 sequences also have a CLS with this deletion, but in reporter assays both promoters appear active (Pannetier et al., 2006, Monga et al., 2012). Another intriguing species difference involves the activity of FOXL2, which is a repressor of PII in humans and mice (Kuo et al., 2011, Kuo et al., 2012), but which stimulated activity of the goat P2 (Pannetier et al., 2006).

Considering the apparent difference in promoter activities between bovine, caprine and human promoters, the objectives of the present study were to determine if FSH/cAMP regulates both P1.1 and P2 in non-luteinized bovine granulosa cells, and to compare the regulation of human, rat, goat and cow PII/P2 activities in luteinized bovine granulosa cells with the specific objective of determining the effects of NR5A2 and FOXL2, alone and in combination.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Oestrogenic bovine granulosa cell culture

All materials were obtained from Invitrogen Life Technologies (Burlington ON, Canada) unless otherwise stated. Bovine ovaries were obtained from adult cows, irrespective of stage of the oestrous cycle, at an abattoir and transported to the laboratory at 30°C in phosphate-buffered saline (PBS). Follicles between 2 and 5 mm diameter were isolated from the ovaries and granulosa cells were collected by rinsing the follicle wall with MEM containing penicillin (100 IU/ml) and streptomycin (100  $\mu$ g/ml). The cells were washed twice by centrifugation at 980 g for 20 min each and suspended in MEM containing Hepes (15 mM), sodium bicarbonate (10 mM), sodium selenite (4 ng/ml), BSA (0.1 %; Sigma-Aldrich, Oakville ON, Canada), penicillin (100 IU/ml), streptomycin (100  $\mu$ g/ml), transferrin (2.5  $\mu$ g/ml), non-essential amino acid mix (1.1 mM), insulin (10 ng/ml) and androstenedione (A4;  $10^{-6}$  M ). The number of cells was counted with a hemocytometer and the viable cells were assessed by the dye exclusion method using 0.1% Trypan Blue. Cells were placed in 24-well tissue culture plates (Sarstedt Inc; Montréal QC, Canada) at a density of  $1 \times 10^6$  viable cells per well in 1 ml medium. Cultures were maintained at 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub> in air for 6 days with medium changes every 2 days.

The effect of gonadotrophins was tested by culturing cells with graded doses of FSH (AFP-5346D, National Hormone & Peptide Program, Torrance CA, USA) or IGF1 (R3 analog; Sigma-Aldrich) for 6 days of culture. To investigate intracellular pathways used to control *CYP19A1* promoter use, on day 4 of culture the cells were pretreated for 1 h with pathway inhibitors in medium devoid of FSH or IGF1, and then FSH (1ng/ml) or IGF1 (10ng/ml) was

added for 2 d before recovery of RNA for PCR. The inhibitors were GF-109203X (3  $\mu$  M), a protein kinase C (PKC) pathway inhibitor; LY-294002 (20  $\mu$  M), a phosphoinositide 3-kinase (PI3K) inhibitor; PD-98059 (50  $\mu$  M), a mitogen-activated protein kinase (MAPK) inhibitor or H89 (10  $\mu$  M), a protein kinase A (PKA) pathway inhibitor.

The direct effect of FSH and IGF1 on MAPK and Akt activation was measured by Western blotting. Cells were cultured as above with FSH (1ng/ml) or IGF1 (10ng/ml), and on day 5 of culture cells were challenged with addition of FSH or IGF1, in 5  $\mu$ l medium devoid of supplements, for 15 min. Controls received medium alone. Proteins were extracted in RIPA buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% sodium deoxycholate, 1% NP-40 1 mM sodium orthovanadate and protease inhibitor cocktail)

## **2.2. Western blot**

Samples (15  $\mu$ g) were separated on 10% SDS-polyacrylamide gels and electrophoretically transferred to nitrocellulose membranes. Westerns for total ERK1/2, phospho-ERK1/2, total Akt and phospho-Akt (Cell Signaling Technology, Danvers MA, USA) were performed as described (Jiang et al., 2011). Bands were revealed by chemiluminescence and autoradiography. Semiquantitative analysis was performed with ImageJ software (NIH).

## **2.3. Total RNA extraction and real-time RT-PCR**

After treatments, the culture medium was removed and total RNA was extracted using

Trizol according to the manufacturer's instructions. Total RNA was quantified by absorbance at 260 nm. Reverse transcription was performed on 1  $\mu$ g DNase-treated total RNA in the presence of 1 mmol/l oligo(dT) primer and a primer specific for exon 3 of the *CYP19A1* gene (primer 3A in (Fürbass et al., 1997), 4 U Omniscript RTase (Qiagen, Mississauga ON, Canada), 0.25 mmol/l dideoxynucleotide triphosphate (dNTP) mix, 19.33 U RNase Inhibitor (GE Healthcare, Baie D'Urfé QC, Canada) in a volume of 20  $\mu$ l at 37°C for 1 h. The reaction was terminated by incubation at 93°C for 5 min.

Real-time PCR was performed on a 7300 Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Streetsville ON, Canada) with Power SYBR Green PCR Master Mix. Forward primers were located within the 5'UTR derived from *CYP19A1* promoters 1.1 and 2 and the common reverse primer was located in exon 3 as previously described (Fürbass et al., 1997). Thermal cycling conditions were 3 min at 95°C, 40 cycles of 15 sec at 95°C, 30 sec at 59°C, and 30 sec at 72°C. Samples were run in duplicate and were expressed relative to the histone *H2AFZ* as housekeeping gene (Jiang et al., 2011). Data were normalized to a calibrator sample using the  $\Delta\Delta C_t$  method with correction for amplification efficiency (Pfaffl, 2001). Amplification efficiencies were 96% and 95% for P2 and P1.1, respectively.

#### **2.4. Transient transfection of granulosa cells**

Primary bovine granulosa cells were collected as described above and were seeded into 24-well tissue culture plates (Sarstedt Inc, Newton NC, USA) at a density of  $0.5 \times 10^6$  viable cells in 500  $\mu$ l medium (as above but with 2% FBS and without insulin). Cultures were maintained at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>, 95% air with a medium change on day 2. On day 4 of culture, at approximately



70 % confluency, cells were transfected with 0.8 µg vector and 2 µl of Lipofectamine for 4 h at 37°C. The *CYP19A1* promoter vectors used were the rat 245 bp rat proximal promoter (Cai et al., 2007), 1000 bp human promoter PII (kindly provided by Dr Stocco, University of Illinois at Chicago), and 507 bp of the goat P2 (Pannetier et al., 2006) sequence placed upstream of the luciferase gene in pGL3-basic (Promega). The bovine *CYP19A1* P2 reporter vector contained 1248 bp bovine DNA encompassing 1153 bp of promoter 2 and 95 bp of exon 2. The construct was generated by PCR amplification from bovine genomic DNA using primers (forward, 5'-GGGGTACCTCCGGTATTCTGACCTGGAGAATT-3'; reverse 5'-GGGGTACCGGAAAAATTAGAAAATCCCCAAAA-3') with an artificial KpnI restriction site (underlined) for cloning into the pGL3-Basic luciferase reporter vector (Promega, Mannheim, Germany). The authenticity of the promoter was verified by sequencing. As it has been demonstrated that the 507 bp goat P2 is more active in sheep granulosa cells than a longer 1104 bp construct, we created a proximal 590 bovine P2 by digestion of the 1153 bp construct with EcoR1. The bovine promoter 1.1 construct included 1071 bp promoter sequence and 113 bp of the exon 1.1 in pGL3-Basic as described (Kalbe et al., 2000). This promoter is driven by an E-box element at -340 (Fürbass et al., 2010), however, in silico analysis of the promoter by MatInspector ([www.genomatix.de](http://www.genomatix.de)) revealed two potential CREs that differed from the consensus sequence by one nucleotide. Regulatory elements in each of these constructs are illustrated in Fig 1. Expression vectors for rat FSHR (Sprenkel et al., 1990), goat FOXL2 (Pannetier et al., 2006) and mouse NR5A2 (Addgene plasmid 16342)(Gu et al., 2005) were previously described.

After transfection, the cells were cultured for 20 h with graded doses of FSH, IGF1, or forskolin with or without 1 h pretreatment with pathway inhibitors. At the end of the culture

period, firefly and Renilla luciferase activities were determined with the Dual-Luciferase Reporter assay system (Promega) and data expressed relative to Renilla luciferase activity.

## **2.5. Oestradiol assay**

Oestradiol was measured in medium in duplicate by radioimmunoassay. The antibody was raised in rams as described previously (Sanford, 1987), and the tracer was oestradiol[2,4,6,7,16,17-3H] (Perkin Elmer, Montreal QC, Canada). Free and bound tracer were separated by incubation with dextran-charcoal. Steroid concentrations in culture medium were corrected for cell number by expressing per unit mass of cell protein. Cells were lysed with 100  $\mu$ l 1N NaOH for 2 h and neutralised with 100  $\mu$ l 1N HCl, and total cell protein was measured by the Bradford protein assay (Bio-Rad, Mississauga ON, Canada). The intra-assay coefficient of variation was 7 % and the sensitivity was 0.4 ng/ $\mu$ g cell protein.

## **2.6. Statistics**

All experiments were replicated on 3 separate occasions. All statistical analyses were performed with JMP software (SAS institute, Cary NC, USA). Data were transformed to logarithms if they were not normally distributed (Shapiro-Wilk test). Multiple comparisons were analyzed by Tukey–Kramer HSD test, and effects of specific treatments compared to controls were tested with Dunnett's test. Data are presented as means  $\pm$  SEM.

### 3. Results

#### 3.1. Regulation of bovine *CYP19A1* promoters 2 and 1.1 in non-luteinizing granulosa cells

We first determined the regulation of promoter usage in primary oestrogenic granulosa cells cultured in the absence of serum. The relative abundance of transcripts was measured by PCR using a sense primer in the 5'UTR specific to exon 1.1 or exon 2 and an antisense primer in the coding region of exon 3. FSH stimulated oestradiol secretion and stimulated the abundance of *CYP19A1* mRNA transcripts derived from both promoter 2 and 1.1 (Fig 2). Similarly, IGF1 caused a dose-dependent increase in oestradiol secretion and mRNA transcripts derived from both promoters (Fig 2).

We then sought to determine which intracellular pathways were involved in the regulation of each promoter by FSH and IGF1. For cells treated with FSH, inhibition of PKA activity reduced oestradiol secretion and the abundance of transcripts derived from promoter 2 but not promoter 1.1 (Fig 3), whereas inhibition of PKC decreased oestradiol secretion but did not alter levels of *CYP19A1* mRNA. For cells treated with IGF1, the PKC inhibitor decreased oestradiol secretion and both PKA and PKC inhibitors decreased levels of *CYP19A1* mRNA derived from promoter 2 but not promoter 1.1. Inhibition of the PI3K pathway decreased oestradiol secretion and the abundance of transcripts derived from promoters 1.1 and 2 in FSH- and in IGF1-stimulated cells, and inhibition of MAPK had no effect on oestradiol secretion and *CYP19A1* mRNA levels in either FSH- or IGF1-stimulated cells. The potential for FSH to act through PI3K but not MAPK was verified by Western blot; addition of FSH for 15 min significantly increased Akt but not ERK1/2 phosphorylation (Fig 4).

### **3.2. Bovine *CYP19A1* promoter activity in luteinized granulosa cells**

To measure more directly the activities of each bovine promoter, we turned to luteinizing primary granulosa cells and co-transfecting them with a pGL3 vector containing either promoter 1.1 or promoter 2 upstream of the luciferase reporter gene, and with an expression vector containing the rat FSH receptor (luteinized cells do not express the endogenous FSHR). Activity of the P2 promoter was not different from the promoterless vector, and was not analysed statistically. FSH increased luciferase activity of promoter 1.1 in a dose-dependent manner (Fig 5A). Promoter activity was increased by the addition of graded doses of forskolin (Fig 5B) and inhibited by the addition of the PKA inhibitor H89 (Fig 5C). Neither addition of PMA, a PKC agonist (not shown), nor addition of PKC or MAPK inhibitors (Fig 5D) altered FSH-stimulated P1.1 activity, however, addition of the PI3K inhibitor increased P1.1 activity (Fig 5D).

### **3.3. Regulation of human, rat, bovine and caprine *CYP19A1* promoter activities by FSH, NR5A2 and FOXL2 in luteinizing bovine granulosa cells.**

The activities of the bovine P1.1 and P2 were then compared with those of the well-described rat proximal and the human PII promoters in luteinized bovine granulosa cells cotransfected with the rat FSHR expression vector. FSH increased activity of the human PII, rat proximal and bovine P1.1 promoters, but did not increase activity of the bovine P2 promoter (Table 1).

The transcription factor FOXL2 was reported to stimulate caprine P2 promoter activity in luteinized sheep granulosa cells, so we then assessed the role of FOXL2 on activity of the human,

rat and bovine *CYP19A1* promoters by cotransfecting with a FOXL2 expression vector and treating the cells with forskolin to activate the CLS. The human PII and rat proximal promoters were robustly activated in response to forskolin, and overexpression of FOXL2 had no significant effect on forskolin-stimulated promoter activity (Fig 6). Bovine P1.1 activity was increased with forskolin and this was not altered by overexpression of FOXL2. Basal bovine and goat P2 activities were very low, and the caprine P2 was responsive to forskolin but the bovine P2 was not. Both the bovine P2 and caprine constructs were moderately but significantly stimulated by overexpression of FOXL2 in the presence of forskolin (Fig 6). The shorter bovine P2 construct (-590 bp), which is similar in structure to the caprine construct, responded to treatments in a manner similar to the caprine construct and was more responsive to forskolin than the longer bovine P2 construct.

Finally, we assessed the abilities of forskolin and FOXL2 to stimulate activity of the *CYP19A1* promoters in combination with the transcription factor NR5A2. Overexpression of NR5A2 modestly increased basal human PII and bovine P2 promoter activities (2-4 fold) but did not alter activity of the rat proximal, bovine P1.1 or caprine P2 promoters (Fig 7). Overexpression of NR5A2 and treatment with forskolin increased activity of all promoters (except the rat proximal promoter) over treatment with forskolin alone (2-4 fold, Fig 7). Overexpression of NR5A2 and FOXL2 combined resulted in a modest but significant increase in basal promoter activity compared to NR5A2 alone for human, bovine and goat proximal promoters, but not for the rat promoter. Overexpression of NR5A2 and FOXL2 in the presence of forskolin increased activity of the bovine and caprine proximal promoters compared to cotransfection with NR5A2 in the presence of forskolin, but did not increase activity of the human or rat proximal promoters or the bovine P1.1 (Fig 7).

When the data are expressed relative to basal levels of activity of each promoter, it is clear that activity of the rat promoter is not enhanced by the overexpression of NR5A2 or FOXL2 when forskolin is present, whereas the human promoter is additionally stimulated by the addition of NR5A2 (Table 2). In contrast, activity of the the ruminant promoters is significantly increased by the sequential addition of NR5A2 and FOXL2 to forskolin treatment.

#### **4. Discussion**

This is the first report to demonstrate significant regulation of the bovine ovarian *CYP19A1* promoter in vitro. The most significant result is the observation that the bovine (and caprine) P2 is dependent upon several transcription factors acting together, which appears unlike the human and rat promoters that are largely dependent on CREB. In fact, these data demonstrate that treatment with forskolin, NR5A2 and FOXL2 combined results in expression of the bovine P2 to fold-increases that exceed those observed for the well described rat proximal promoter.

The robust activity of the rat and human ovarian *CYP19A1* promoters in luteinized granulosa cells in response to forskolin observed here has previously been described (Fitzpatrick and Richards, 1993, Hinshelwood et al., 1997, Michael et al., 1997, Kwintkiewicz et al., 2007); our estimate of 71-fold increase in activity of the human PII in response to forskolin is consistent with previous reports (Hinshelwood et al., 1997, Hinshelwood et al., 2003). The goat and cow P2 activities were stimulated two to three-fold by forskolin, as reported (Hinshelwood et al., 1997, Pannetier et al., 2006), but this was not significant in all experiments and pales in comparison with the activity of the human promoter. This has led to the notion that the bovine promoter is unresponsive in vitro.

Activity of the human PII in response to forskolin was increased at least 10-fold by cotransfection with NR5A2 (Hinshelwood et al., 2003), whereas data for the rat proximal promoter are contradictory: overexpression of NR5A2 increased CYP19A1 protein abundance (Wang et al., 2012) but did not increase *CYP19A1* promoter activity in rat granulosa cells (Saxena et al., 2004, Saxena et al., 2007). Our results are in general agreement, with a significant increase of activity of human PII and no increase in activity of the rat promoter. In the present study, the weak activity of the bovine and caprine P2 in response to forskolin was stimulated by the overexpression of NR5A2. The ability of NR5A2 to increase forskolin-stimulated activity of human, cow and goat promoters is likely due to the full conservation of the NR5A1/NR5A2 binding sites in these species (Hinshelwood et al., 2003, Pannetier et al., 2006); although the core sequence of one such binding site, NRE-A, is conserved in rats, the flanking sequences are quite different (Stocco, 2008), and this may explain in part why the rat promoter is not responsive to NR5A2 overexpression.

The proximal promoters of all four species studied here also contain conserved FOXL2 binding sites, and overexpression of FOXL2 alone increased activity of the goat P2 as previously observed (Pannetier et al., 2006), but not that of the bovine P2. In contrast to a previous study, FOXL2 did not repress basal or forskolin-stimulated activity of the human PII promoter (Kuo et al., 2011); this may be owing to cell-type or FOXL2 protein differences between species. Most striking, however, was the increase in activity of the bovine P2 promoter when cells were stimulated with NR5A2, FOXL2 and forskolin combined, conditions which have not, to our knowledge, previously been reported for any species. This combination did not stimulate human and rat promoter activities above those observed with NR5A2 and forskolin, strongly suggesting that FOXL2 is important for ruminant P2 activity but not for the primate and rodent proximal

promoters. This is likely to be physiologically relevant, as FOXL2 is expressed in granulosa but not in luteal cells (Pisarska et al., 2004), and a direct interaction between FOXL2 protein and the CYP19A1 promoter was demonstrated in fish (Wang et al., 2007, Yamaguchi et al., 2007) and a human granulosa tumor cell line (Pannetier et al., 2006).

*CYP19A1* is only weakly expressed in luteal cells in ruminants in vivo (Voss and Fortune, 1993), therefore we assessed the regulation of promoter 2 activity in non-luteinizing cells with an indirect approach, measuring the abundance of transcripts containing 5'UTR sequences that are specific to P2 or P1.1. The ability of FSH and IGF1 to increase the number of transcripts derived from P2 were expected as it is the major promoter used in granulosa cells (80% of all *CYP19A1* transcripts detected in granulosa cells (Lenz et al., 2004, Hamel et al., 2005)) and both these hormones increase total *CYP19A1* mRNA levels in nonluteinizing bovine cells (Silva and Price, 2000, Mani et al., 2010). The stimulatory effect of FSH on P1.1 in luteinizing and non-luteinizing cell is novel, and likely due to the presence of two putative CREs that differ from the consensus sequence by 1 nucleotide; the CRE at -828 has the sequence TGACATCA and the CRE at -266 has the sequence TGAGGGTCA (underlined nucleotides are those that differ from consensus sequence). This is consistent with the stimulatory effects of forskolin on P1.1 activity (present study) and with the effect of FSH on *CYP19A1* mRNA abundance in sheep placenta (Weems et al., 2007). The present data also demonstrate that the PI3K is important for FSH stimulation of both bovine P2 and P1.1 promoter use in non-luteinizing granulosa cells, which reflects the obligatory nature of Akt activity for *CYP19A1* expression and granulosa cell differentiation (Zeleznik et al., 2003, Hunzicker-Dunn et al., 2012, Zhou et al., 2013).

In conclusion, the present study demonstrates that the ruminant, human and rodent ovarian *CYP19A1* promoters respond differently to transcription factors. Whereas the human and



rodent promoters were stimulated by NR5A2 and cAMP, the bovine promoter required the presence of FOXL2 as well as NR5A2 and cAMP to increase PII activity thus FOXL2 may be a key determinant of promoter activity in the ruminant. Both cAMP and NR5A2 pathways are active in corpora lutea, and are sufficient for human and rodent - but not ruminant - expression of *CYP19A1* in this tissue. While FOXL2 is expressed in follicular granulosa cells, it is not expressed in the corpus luteum (Pisarska et al., 2004), and this could explain why the ruminant *CYP19A1* ovarian promoter is not expressed in luteinized cells.

### **Declaration of interest**

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

### **Role of Funding Source**

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (CAP) and the Deutsche Forschungsgemeinschaft (JV). E.S.N. was supported by a scholarship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico of Brazil. These funding sources had no role in the design or publication of the study.

## **Acknowledgements**

We thank Dr I. Huhtaniemi (Turku University, Turku, Finland) for pSV-FSHR, Dr M. Pannetier (INRA, France) for goat P2-luciferase vector and FOXL2 expression vector, Dr C. Stocco (University of Illinois at Chicago) for rat and human promoter vectors, Dr A. F. Parlow and the National Hormone & Peptide Program, NIDDK, for bovine FSH and Dr R. Fürbaß (Leibniz Institute for Farm Animal Biology) for advice.

## **References**

- Britt, K.L., Saunders, P.K., McPherson, S.J., Misso, M.L., Simpson, E.R., Findlay, J.K., 2004. Estrogen actions on follicle formation and early follicle development. *Biol. Reprod.* 71, 1712-1723.
- Bulun, S.E., Sebastian, S., Takayama, K., Suzuki, T., Sasano, H., Shozu, M., 2003. The human CYP19 (aromatase P450) gene: update on physiologic roles and genomic organization of promoters. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 86, 219-224.
- Cai, Z., Kwintkiewicz, J., Young, M.E., Stocco, C., 2007. Prostaglandin E2 increases cyp19 expression in rat granulosa cells: Implication of GATA-4. *Mol. Cell. Endocrinol.* 263, 181-189.
- Fisher, C.R., Graves, K.H., Parlow, A.F., Simpson, E.R., 1998. Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the cyp19 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 6965-6970.

Fitzpatrick, S.L., Richards, J.S., 1991. Regulation of cytochrome P450 aromatase messenger ribonucleic acid and activity by steroids and gonadotropins in rat granulosa cells. *Endocrinology*. 129, 1452-1462.

Fitzpatrick, S.L., Richards, J.S., 1993. Regulation of the rat aromatase gene in ovarian granulosa cells and R2C Leydig cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 44, 429-433.

Fürbass, R., Kalbe, C., Vanselow, J., 1997. Tissue-specific expression of the bovine aromatase-encoding gene uses multiple transcriptional start sites and alternative first exons. *Endocrinology*. 138, 2813-2819.

Fürbass, R., Tomek, W., Vanselow, J., 2010. Upstream Stimulating Factors 1 and 2 Enhance Transcription from the Placenta-Specific Promoter 1.1 of the Bovine Cyp19 Gene. *BMC Molecular Biology*. 11, 5.

Gonzalez-Robayna, I.J., Falender, A.E., Ochsner, S., Firestone, G.L., Richards, J.S., 2000. Follicle-Stimulating hormone (FSH) stimulates phosphorylation and activation of protein kinase B (PKB/Akt) and serum and glucocorticoid-induced kinase (Sgk): evidence for A kinase-independent signaling by FSH in granulosa cells. *Mol. Endocrinol.* 14, 1283-1300.

Gu, P., Goodwin, B., Chung, A.C., Xu, X., Wheeler, D.A., Price, R.R., Galardi, C., Peng, L., Latour, A.M., Koller, B.H., Gossen, J., Kliewer, S.A., Cooney, A.J., 2005. Orphan nuclear receptor LRH-1 is required to maintain Oct4 expression at the epiblast stage of embryonic development. *Mol. Cell. Biol.* 25, 3492-3505.

Hamel, M., Vanselow, J., Nicola, E.S., Price, C.A., 2005. Androstenedione increases cytochrome P450 aromatase messenger ribonucleic acid transcripts in nonluteinizing bovine granulosa cells. *Mol. Reprod. Dev.* 70, 175-183.

Hinshelwood, M.M., Michael, M.D., Simpson, E.R., 1997. The 5'-flanking region of the ovarian promoter of the bovine CYP19 gene contains a deletion in a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-like responsive sequence. *Endocrinology*. 138, 3704-3710.

Hinshelwood, M.M., Repa, J.J., Shelton, J.M., Richardson, J.A., Mangelsdorf, D.J., Mendelson, C.R., 2003. Expression of LRH-1 and SF-1 in the mouse ovary: localization in different cell types correlates with differing function. *Mol. Cell. Endocrinol.* 207, 39-45.

Hunzicker-Dunn, M., Maizels, E.T., 2006. FSH signaling pathways in immature granulosa cells that regulate target gene expression: Branching out from protein kinase A. *Cell. Signal.* 18, 1351-1359.

Hunzicker-Dunn, M.E., Lopez-Biladeau, B., Law, N.C., Fiedler, S.E., Carr, D.W., Maizels, E.T., 2012. PKA and GAB2 play central roles in the FSH signaling pathway to PI3K and AKT in ovarian granulosa cells. *Proc. Natl. Sci. U.S.A.* 109, E2979-E2988.

Jiang, Z.L., Ripamonte, P., Buratini, J., Portela, V.M., Price, C.A., 2011. Fibroblast growth factor-2 regulation of Sprouty and NR4A genes in bovine ovarian granulosa cells. *J. Cell. Physiol.* 226, 1820-1827.

Kalbe, C., Fürbass, R., Schwerin, M., Vanselow, J., 2000. Cis-acting elements regulating the placenta-specific promoter of the bovine Cyp19 gene. *J. Mol. Endocrinol.* 25, 265-273.

Knecht, M., Brodie, A.M., Catt, K.J., 1985. Aromatase inhibitors prevent granulosa cell differentiation: an obligatory role for estrogens in luteinizing hormone receptor expression. *Endocrinology*. 117, 1156-1161.

Kuo, F.T., Bentsi-Barnes, I.K., Barlow, G.M., Pisarska, M.D., 2011. Mutant Forkhead L2 (FOXL2) proteins associated with premature ovarian failure (POF) dimerize with wild-type

FOXL2, leading to altered regulation of genes associated with granulosa cell differentiation. *Endocrinology*. 152, 3917-3929.

Kuo, F.T., Fan, K., Bentsi-Barnes, I., Barlow, G.M., Pisarska, M.D., 2012. Mouse forkhead L2 maintains repression of FSH-dependent genes in the granulosa cell. *Reproduction*. 144, 485-494.

Kwintkiewicz, J., Cai, Z., Stocco, C., 2007. Follicle-Stimulating Hormone-Induced Activation of Gata4 Contributes in the Up-Regulation of Cyp19 Expression in Rat Granulosa Cells. *Mol. Endocrinol.* 21, 933-947.

Lenz, S., Pöhland, R., Becker, F., Vanselow, J., 2004. Expression of the bovine aromatase cytochrome P450 gene (Cyp19) is primarily regulated by promoter 2 in bovine follicles and by promoter 1.1 in corpora lutea. *Mol. Reprod. Dev.* 67, 406-413.

Mani, A.M., Fenwick, M.A., Cheng, Z., Sharma, M.K., Singh, D., Wathes, D.C., 2010. IGF1 induces up-regulation of steroidogenic and apoptotic regulatory genes via activation of phosphatidylinositol-dependent kinase/AKT in bovine granulosa cells. *Reproduction*. 139, 139-151.

Means, G.D., Kilgore, M.W., Mahendroo, M.S., Mendelson, C.R., Simpson, E.R., 1991. Tissue-specific promoters regulate aromatase cytochrome P450 gene expression in human ovary and fetal tissues. *Mol. Endocrinol.* 5, 2005-2013.

Michael, M.D., Michael, L.F., Simpson, E.R., 1997. A CRE-like sequence that binds CREB and contributes to cAMP-dependent regulation of the proximal promoter of the human aromatase P450 (CYP19) gene. *Mol. Cell. Endocrinol.* 134, 147-156.

Monga, R., Ghai, S., Datta, T.K., Singh, D., 2012. Involvement of transcription factor GATA-4 in regulation of CYP19 gene during folliculogenesis and luteinization in buffalo ovary. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 130, 45-56.

Pannetier, M., Fabre, S., Batista, F., Kocer, A., Renault, L., Jolivet, G., Mandon-Pépin, B., Cotinot, C., Veitia, R., Pailhoux, E., 2006. FOXL2 activates P450 aromatase gene transcription: towards a better characterization of the early steps of mammalian ovarian development. *J. Mol. Endocrinol.* 36, 399-413.

Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.

Pisarska, M.D., Bae, J., Klein, C., Hsueh, A.J.W., 2004. Forkhead L2 Is expressed in the ovary and represses the promoter activity of the steroidogenic acute regulatory gene. *Endocrinology.* 145, 3424-3433.

Quirk, S.M., Cowan, R.G., Harman, R.M., 2006. The susceptibility of granulosa cells to apoptosis is influenced by oestradiol and the cell cycle. *J. Endocrinol.* 189, 441-453.

Sanford, L.M., 1987. Luteinizing hormone release in intact and castrate rams is altered with immunoneutralization of endogenous estradiol. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 65, 1442-1447.

Saxena, D., Escamilla-Hernandez, R., Little-Ihrig, L., Zeleznik, A.J., 2007. Liver receptor homolog-1 and steroidogenic factor-1 have similar actions on rat granulosa cell steroidogenesis. *Endocrinology.* 148, 726-734.

Saxena, D., Safi, R., Little-Ihrig, L., Zeleznik, A.J., 2004. Liver receptor homolog-1 stimulates the progesterone biosynthetic pathway during follicle-stimulating hormone-induced granulosa cell differentiation. *Endocrinology.* 145, 3821-3829.

Silva, J.M., Hamel, M., Sahmi, M., Price, C.A., 2006. Control of oestradiol secretion and of cytochrome P450 aromatase messenger ribonucleic acid accumulation by FSH involves different intracellular pathways in oestrogenic bovine granulosa cells in vitro. *Reproduction*. 132, 909-917.

Silva, J.M., Price, C.A., 2000. Effect of follicle-stimulating hormone on steroid secretion and messenger ribonucleic acids encoding cytochromes P450 aromatase and cholesterol side-chain cleavage in bovine granulosa cells in vitro. *Biol. Reprod.* 62, 186-191.

Spicer, L.J., Aad, P.Y., 2007. Insulin-like growth factor (IGF) 2 stimulates steroidogenesis and mitosis of bovine granulosa cells through the IGF1 receptor: role of follicle-stimulating hormone and IGF2 receptor. *Biol. Reprod.* 77, 18-27.

Sprenkel, R., Braun, T., Nikolics, K., Segaloff, D.L., Seeburg, P.H., 1990. The testicular receptor for follicle stimulating hormone: structure and functional expression of cloned cDNA. *Mol. Endocrinol.* 4, 525-530.

Steinkampf, M.P., Mendelson, C.R., Simpson, E.R., 1987. Regulation by follicle-stimulating hormone of the synthesis of aromatase cytochrome P-450 in human granulosa cells. *Mol. Endocrinol.* 1, 465-471.

Steinkampf, M.P., Mendelson, C.R., Simpson, E.R., 1988. Effects of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on the levels of mRNA encoding aromatase cytochrome P-450 of human ovarian granulosa cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 59, 93-99.

Stocco, C., 2004. In vivo and in vitro inhibition of cyp19 gene expression by prostaglandin F2  $\alpha$  in murine luteal cells: implication of GATA-4. *Endocrinology*. 145, 4957-4966.

Stocco, C., 2008. Aromatase expression in the ovary: Hormonal and molecular regulation. *Steroids*. 73, 473-487.

Vanselow, J., Furbass, R., Zsolnai, A., Kalbe, C., Said, H.M., Schwerin, M., 2001. Expression of the aromatase cytochrome P450 encoding gene in cattle and sheep. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 79, 279-288.

Voss, A.K., Fortune, J.E., 1993. Levels of messenger ribonucleic acid for cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase and P450 aromatase in preovulatory bovine follicles decrease after the luteinizing hormone surge. *Endocrinology.* 132, 2239-2245.

Wang, D.S., Kobayashi, T., Zhou, L.Y., Paul-Prasanth, B., Ijiri, S., Sakai, F., Okubo, K., Morohashi, K., Nagahama, Y., 2007. Foxl2 up-regulates aromatase gene transcription in a female-specific manner by binding to the promoter as well as interacting with ad4 binding protein/steroidogenic factor 1. *Mol. Endocrinol.* 21, 712-725.

Wang, Q., Kim, J.Y., Xue, K., Liu, J.-y., Leader, A., Tsang, B.K., 2012. Chemerin, a novel regulator of follicular steroidogenesis and its potential involvement in polycystic ovarian syndrome. *Endocrinology.* 153, 5600-5611.

Weems, Y.S., Kim, L., Tsuda, V., Yin, C., Weems, C.W., 2007. What regulates placental steroidogenesis in 90-day pregnant ewes? *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 84, 54-65.

Yamaguchi, T., Yamaguchi, S., Hirai, T., Kitano, T., 2007. Follicle-stimulating hormone signaling and Foxl2 are involved in transcriptional regulation of aromatase gene during gonadal sex differentiation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 359, 935-940.

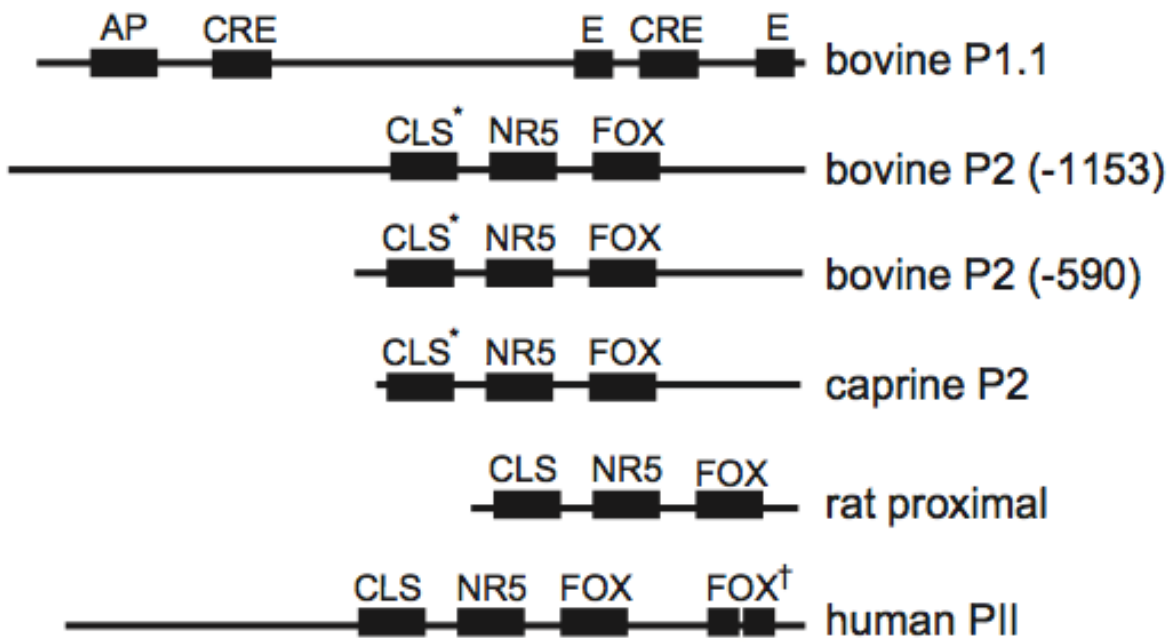
Zelevnik, A.J., Saxena, D., Little-Ihrig, L., 2003. Protein kinase B is obligatory for follicle-stimulating hormone-induced granulosa cell differentiation. *Endocrinology.* 144, 3985-3994.



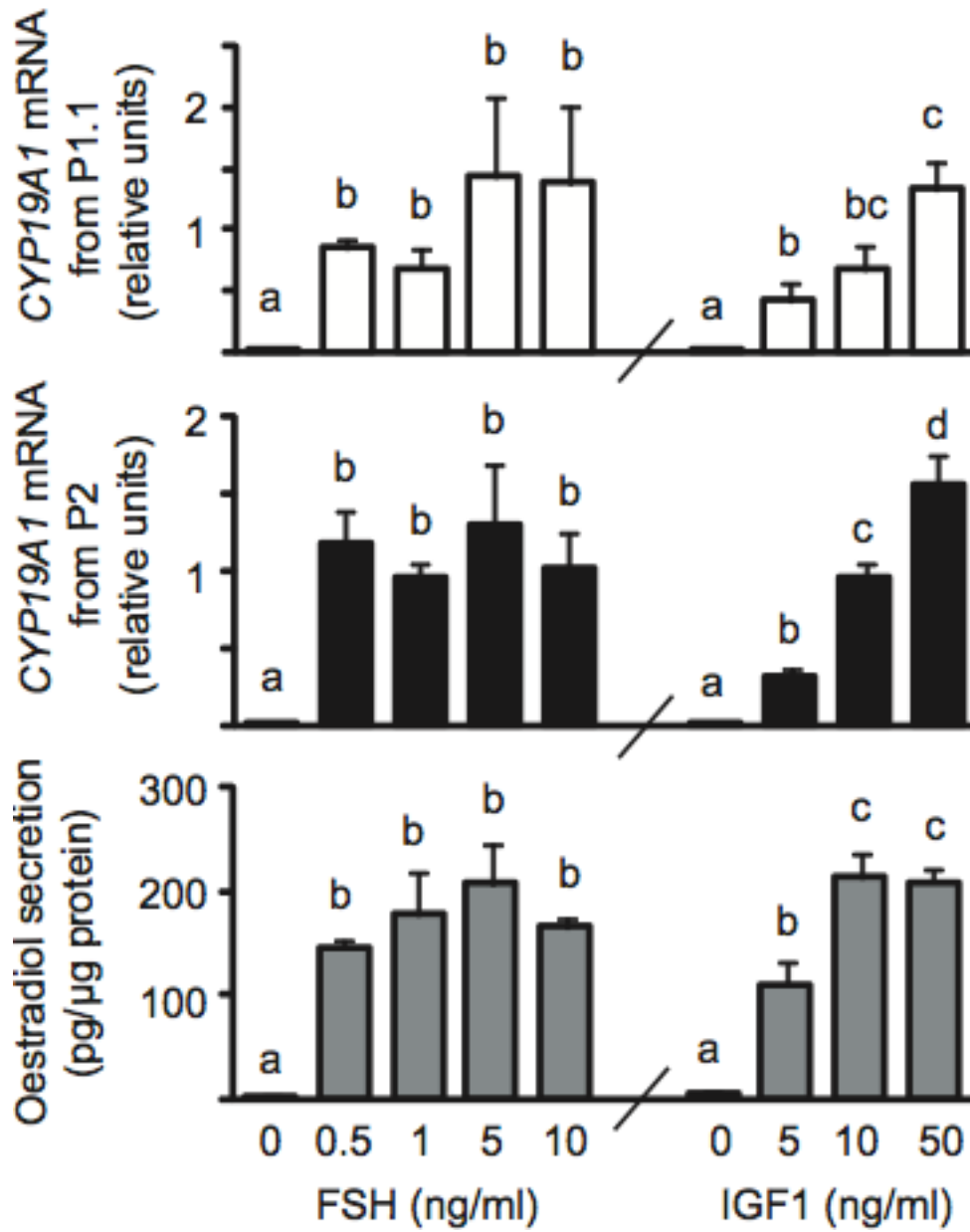
Zhou, J., Kumar, T.R., Matzuk, M.M., Bondy, C., 1997. Insulin-Like Growth Factor I Regulates Gonadotropin Responsiveness in the Murine Ovary. *Mol. Endocrinol.* 11, 1924-1933.

Zhou, P., Baumgarten, S.C., Wu, Y., Bennett, J., Winston, N., Hirshfeld-Cytron, J., Stocco, C., 2013. IGF-I signaling Is essential for FSH stimulation of AKT and steroidogenic genes in granulosa cells. *Mol. Endocrinol.* 27, 511-523.

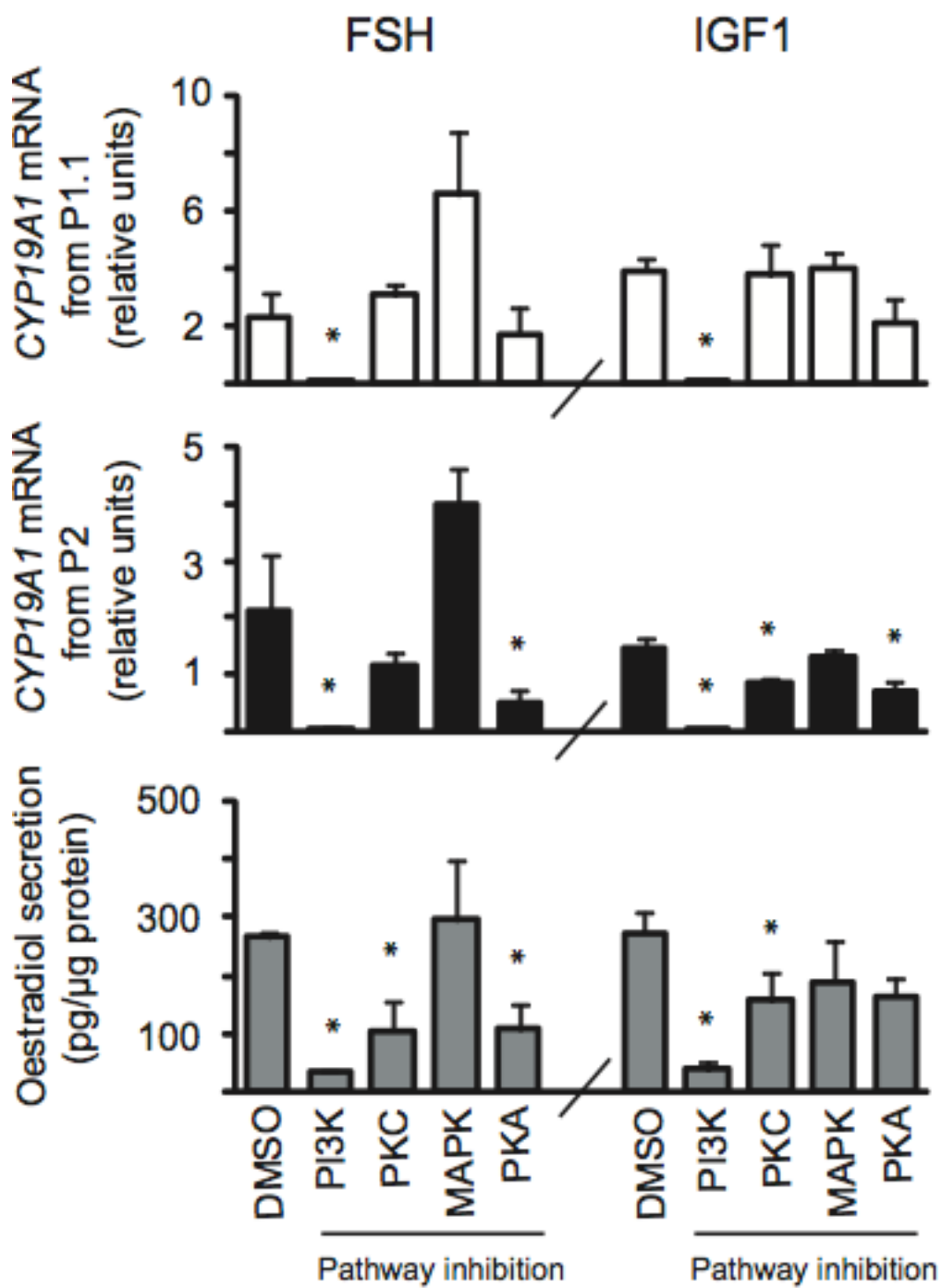
**Fig. 1.** Schematic representation of regulatory elements contained within the promoter constructs used. AP, binding sites for activating proteins 1 and 2; E, E boxes; CRE, cAMP response element; CLS, CRE like sequence; CLS\*, CRE like sequence with single base pair deletion compared to human sequence; NR5, orphan nuclear receptor 5A1/2 binding site; FOX, forkhead box L2 binding site; † denotes non-homologous sequence compared with other species. Elements in the bovine P1.1 are from (Kalbe et al., 2000) and from in silico analysis (MatInspector), those in the human and rat promoters are summarized in (Stocco, 2008), and those in the bovine (Fürbass et al., 1997) and caprine P2 (DQ122857) from published sequences.



**Fig. 2.** FSH and IGF1 regulation of oestradiol secretion and *CYP19A1* promoter usage in nonluteinizing bovine granulosa cells. Granulosa cells were harvested from follicles 2 - 5 mm diameter and cultured in serum-free conditions for 6 days with graded doses of FSH or IGF-1. Real-time PCR was performed with sense primers located in the promoter-specific 5`UTR of the *CYP19A1* mRNA . Data are means  $\pm$  SEM of three independent cultures. Within treatment, bars with different letters are significantly different from each other (Tukey–Kramer;  $p < 0.05$ ).

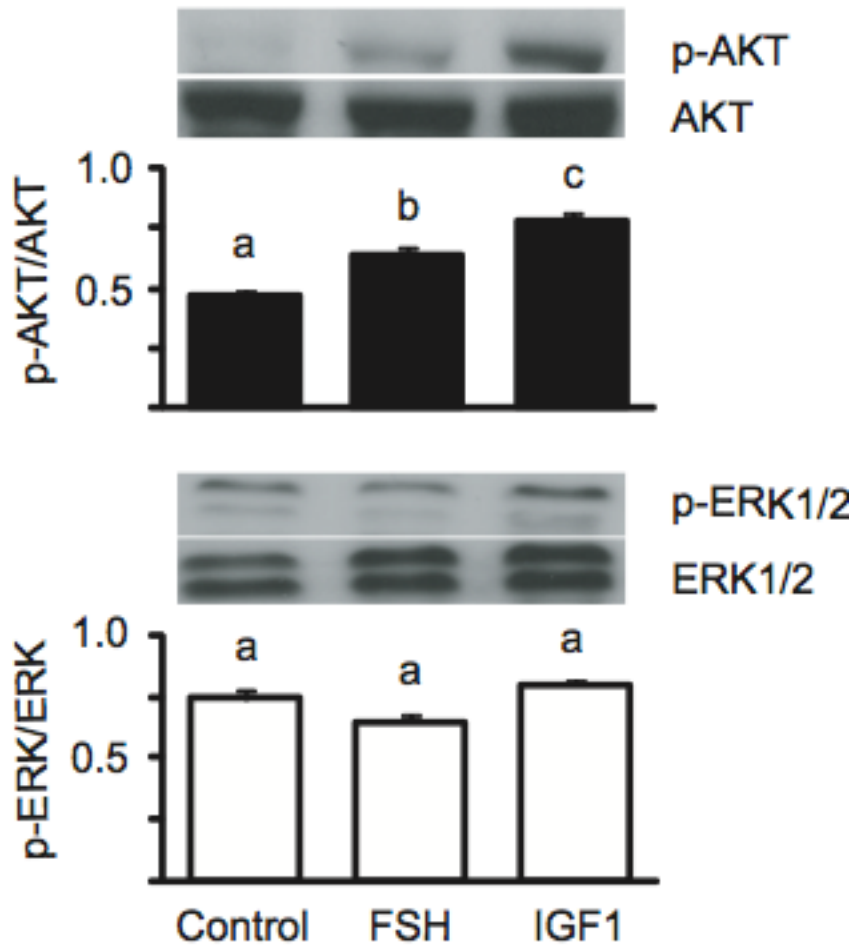


**Fig. 3.** Intracellular pathways used by FSH and IGF1 to stimulate oestradiol secretion and bovine *CYP19A1* expression from promoters 1.1 and 2 in nonluteinizing bovine granulosa cells. Cells were cultured as described in figure 2. On day 4, medium was changed to one devoid of hormones but containing GF-109203X, a protein kinase C (PKC) pathway inhibitor; LY-294002, a phosphoinositide 3-kinase (PI3K) inhibitor; PD-98059, a mitogen-activated protein kinase (MAPK) inhibitor; H89, a protein kinase A (PKA) pathway inhibitor; or DMSO vehicle control. After 1 h, FSH (1 ng/ml) or IGF1 (10 ng/ml) were added. PCR was performed with sense primers located in the promoter-specific 5'UTR of the *CYP19A1* mRNA. Data are means  $\pm$  SEM of three independent cultures. Bars with asterisks are significantly different from control (Dunnett;  $p < 0.05$ ).

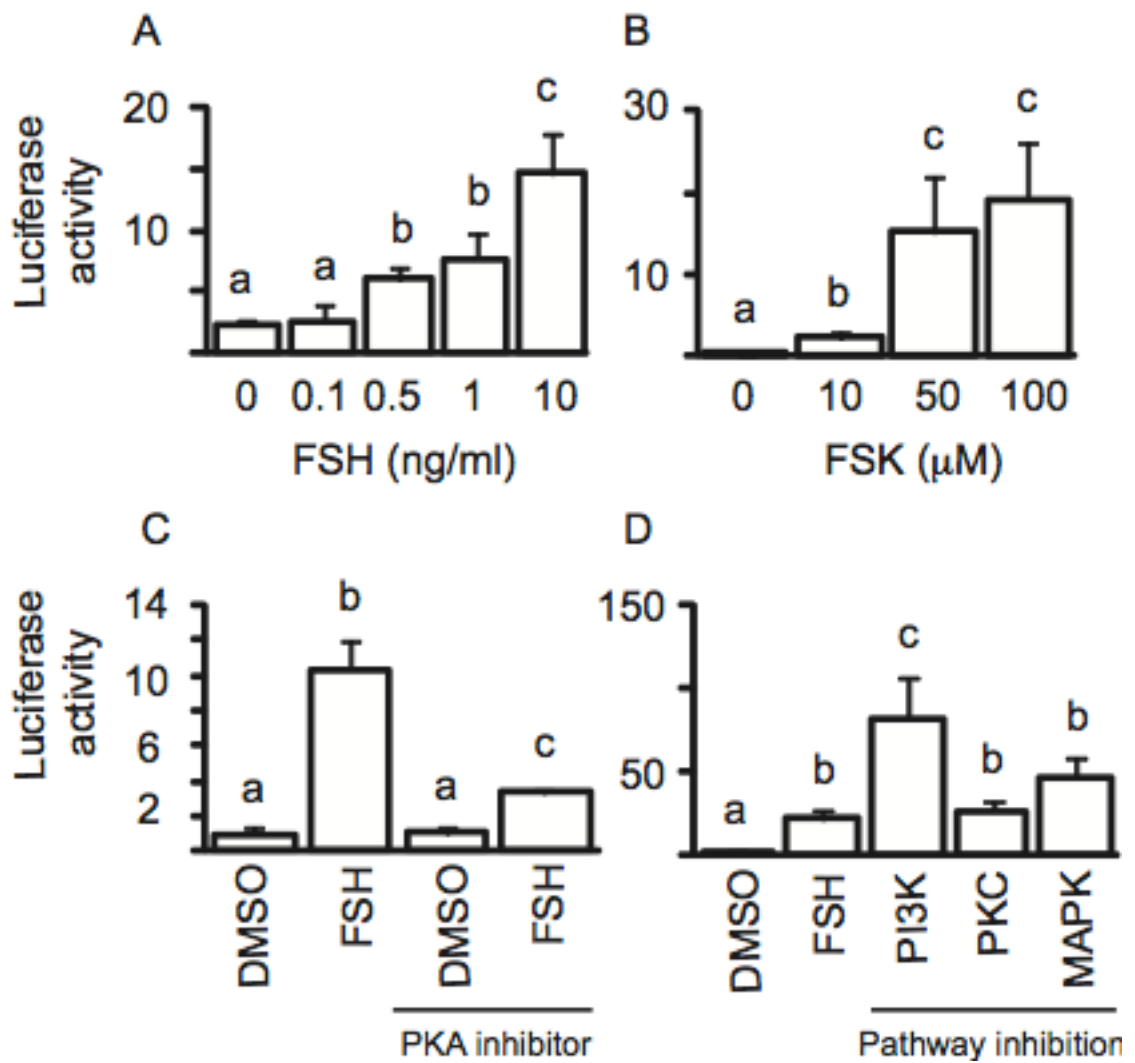


**Fig. 4.** Activation of ERK and Akt pathways in nonluteinizing bovine granulosa cells by FSH and IGF1. Cells were cultured as described in Fig. 2 and on day 5, FSH (1 ng/ml) or IGF1 (10 ng/ml) was added for 15 min. Total and phosphorylated ERK1/2 and Akt were measured by Western blot (one representative blot shown). Data are means  $\pm$  SEM of three independent cultures. Bars with different letters are significantly different from each other (Tukey–Kramer;  $p < 0.05$ ).

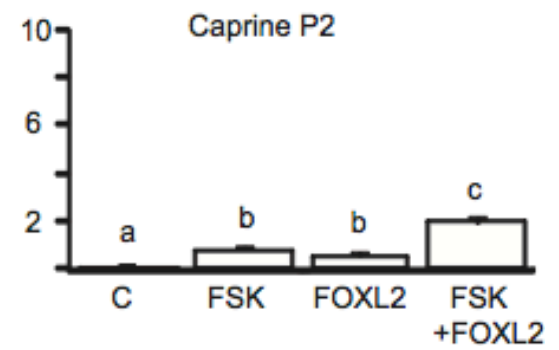
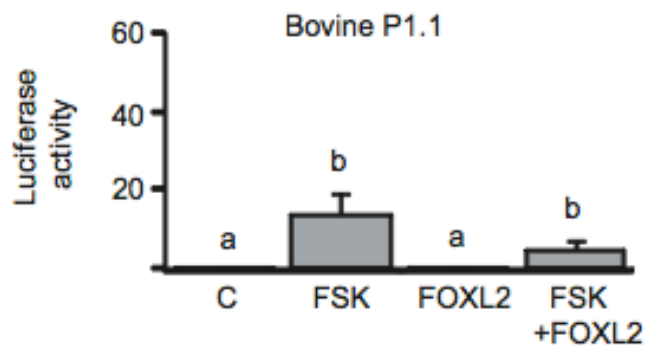
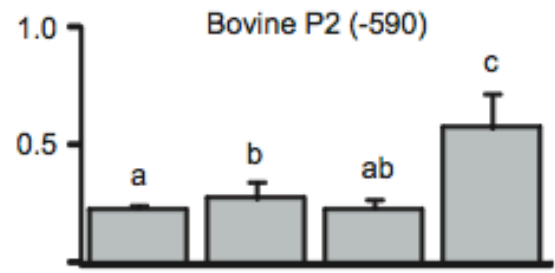
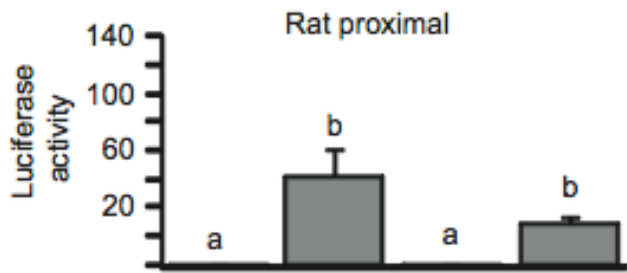
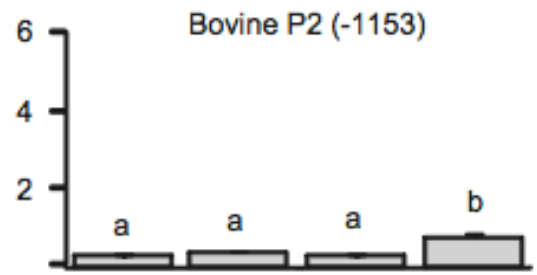




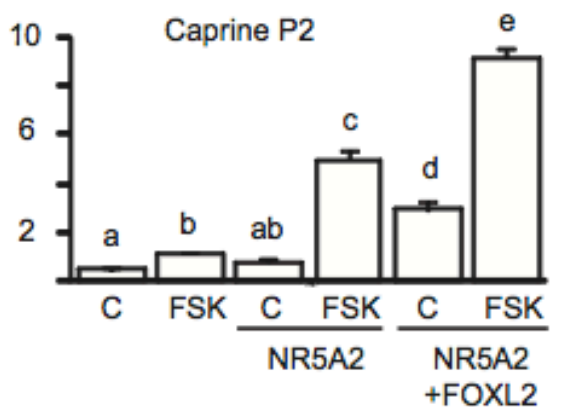
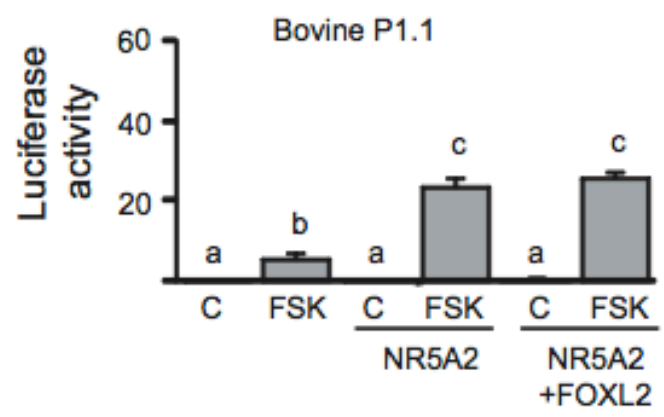
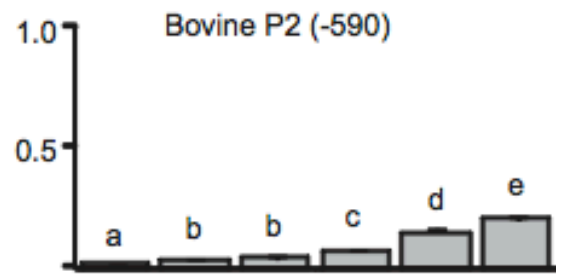
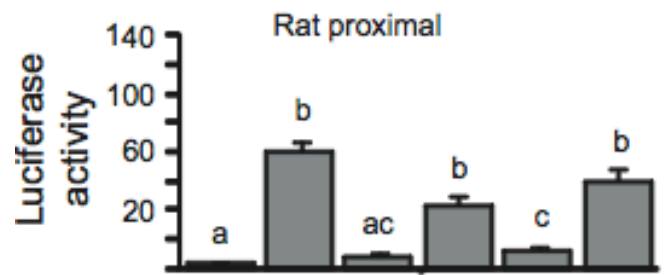
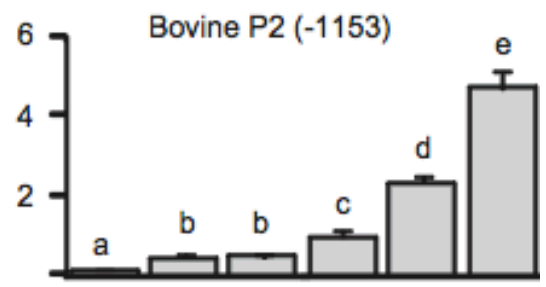
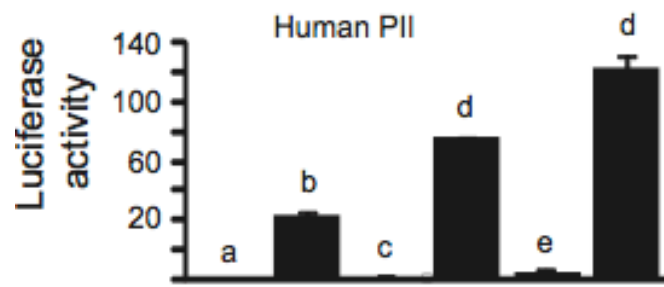
**Fig. 5.** Regulation of bovine *CYP19A1* promoter 1.1 by FSH in transfected luteinized bovine granulosa cells. Cells were transfected with pGL3 vector containing promoter 1.1 inserted upstream of the firefly luciferase reporter gene, and were co-transfected with an expression vector containing the rat FSH receptor. Cells were treated with the doses of FSH or forskolin (FSK) shown (A, B), or pre-treated with inhibitors of PKA (H89), PI3K (LY-294002), PKC (GF-109203X) or MAPK (PD-98059) pathways before addition of FSH (1 ng/ml) (C, D). Data are expressed relative to *Renilla* luciferase and are means  $\pm$  SEM of three independent cultures. Bars with different letters are significantly different from each other (Tukey-Kramer;  $p < 0.05$ ).



**Fig 6.** Effect of forskolin and FOXL2 overexpression on activity of rat, human, bovine (-1153 and -590) and goat ovarian *CYP19A1* promoters and the bovine P1.1 promoter in luteinized bovine granulosa cells. Cells were cotransfected with the promoter constructs and a goat FOXL2 expression vector or empty vector (control; C), and treated with or without forskolin (FSK; 25 $\mu$ m) for 20 h. Data are expressed relative to Renilla luciferase, and shown as means  $\pm$  SEM of three independent cultures. Bars with no common letters are significantly different (P<0.05).



**Fig 7.** Effect of forskolin and overexpression of NR5A2 and FOXL2 on activity of rat, human, bovine (-1153 and -590) and goat ovarian *CYP19A1* promoters and the bovine placental (P1.1) promoter in luteinized bovine granulosa cells. Cells were cotransfected with the promoter constructs and/or FOXL2 and/or NR5A2 expression vectors, and treated with (FSK) or without (C) forskolin (25 $\mu$ m) for 20 h. Data are expressed relative to Renilla luciferase and presented as means  $\pm$  SEM of three independent cultures. Bars with no common letters are significantly different (P<0.05).



**Table 1.** Effect of FSH (10ng/ml) on activity (relative luciferase activity) of human, rat and bovine CYP19A1 promoter constructs in luteinized bovine granulosa cells cotransfected with FSHR.

Treatments	Human	Rat	Bovine P1.1	Bovine P2
Basal	2.0±1.0	2.6±0.2	0.2±0.1	0.2±0.1
FSH	148.9±26.1*	88.5±24.6*	6.2±1.7*	0.6±0.3

\*Significant effect of FSH (P<0.05).

**Table 2.** Relative activity of the ovarian promoters to sequential addition of transcriptional activators\*

Treatments	Human	Rat	Goat	Cow
FSK	71±16 <sup>a</sup>	18±3 <sup>a</sup>	2.6±0.3 <sup>a</sup>	3.0±0.3 <sup>a</sup>
FSK+NR5A2	153±34 <sup>b</sup>	9.8±2.0 <sup>a</sup>	11.1±1.3 <sup>b</sup>	7.0±0.9 <sup>b</sup>
FSK+NR5A2+FOXL2	223±43 <sup>b</sup>	13.3±2.8 <sup>a</sup>	20.4±2.2 <sup>c</sup>	33.9±3.4 <sup>c</sup>

Bars with no common letters are significantly different (P<0.05).

\*Activity expressed as fold-change (± SEM) relative to basal control; data derived from those in Fig 7.



**Bioassay for follicle stimulating activity of equine gonadotropic hormone in mare serum using frozen/thawed transiently transfected reporter cells.**

Theriogenology. 2012 Sep 1; 78(4): 724-730

Fatiha Sahmi, Edmir Nicola and Christopher Price\*

\*Centre de recherche en reproduction animale, Faculté de médecine vétérinaire,  
Université de Montréal, 3200 Sicotte, St-Hyacinthe QC, J2S 7C6, Canada

Keywords: Bioassay, eCG, Superovulation, Cell-line

## **RÉSUMÉ**

L'objectif de cette étude était d'établir un bio-essai qui permet de sélectionner le sérum de juments qui ont une forte activité à la FSH. Une lignée cellulaire (HEK293) a été transitoirement cotransfectée avec un plasmide exprimant le récepteur FSH et un plasmide contenant des éléments de réponse à l'AMPc en amont du gène rapporteur  $\beta$ -galactosidase. Les cellules ont été congelées et décongelées à des fins d'analyse. Ce test est spécifique pour la FSH, sans réaction croisée avec LH ou insulin-like growth factor-1. Les courbes d'étalonnage (eCG) et des échantillons de sérum de juments gestantes passent les tests de validité bio-essais parallèle en ligne (linéarité et parallélisme). Les estimations de bioactivité avec cet essai étaient fortement corrélées avec les estimations obtenues avec le test Steelman-Pohley. L'utilisation de ce test permet de distinguer rapidement les sérums de juments qui ont une forte activité FSH au lieu d'utiliser des animaux ou des installations de culture de cellules complexes.

## **ABSTRACT**

The objective of this study was to establish a cell-line based bioassay for FSH in horse serum that would be of use for screening samples with high eCG bioactivity. A cell-line (HEK293) was transiently cotransfected with a FSH reporter expression plasmid and a cAMP-responsive  $\beta$ -galactosidase reporter

plasmid. Cells were bulk frozen, and thawed for assay purposes. This assay was specific for FSH, with no cross-reaction with LH or insulin-like growth factor-1. Standard curves (eCG) and serum samples from pregnant mares passed parallel-line bioassay validity tests (linearity and parallelism). Estimates of bioactivity with this bioassay were highly correlated with estimates obtained with the Steelman-Pohley hCG augmentation assay. The colorimetric end-point permits the use of this assay as a rapid screen for FSH bioactivity without the need for animal use or complex cell culture facilities.

## **1. INTRODUCTION**

Commercial gonadotropins are widely used for the manipulation of estrous cycles and the induction of superovulation, among other practices. For superovulation of cattle, the major current source of FSH is porcine pituitary glands, and the source of eCG is pregnant mare serum. Both these sources present natural biological variation in the quantity and bioactivity of hormone obtained. Bioassays for FSH based on ovarian weight gain in immature rats [1] are employed to control for this variation and to standardize biopotency of commercial preparations, but are costly and labor-intensive to run and involve sacrificing large numbers of animals. In vitro assays using primary Sertoli or

granulosa cell cultures have been used [2, 3], but again are labor-intensive and suffer from inter-assay variation. An attractive alternative is the use of stable cell-lines expressing the FSH receptor (FSHR), and bioassays have been reported with the measurement of cAMP or progesterone as end-points [4-7]. More elegant assays were developed by transiently transfecting FSHR-expressing cell-lines with luciferase reporter genes [8, 9], and establishing cell lines stably expressing both FSHR and luciferase reporter genes [10].

An additional problem for the commercial production of eCG is variation in the amount and specific bioactivity of eCG between mares and during pregnancy [11, 12]; a method for rapidly screening raw serum for FSH bioactivity in a farm setting before bulk pooling and purification would be a considerable advantage. Cell-lines with cAMP or luciferase reporter gene activity as end-points are not practical, as they require specialized equipment and expertise for measuring the end-points and maintaining cell lines.

More recently, several studies have shown that transiently transfected cells maintain the ability to express a transgene after freezing [13, 14]. This has been investigated in high-throughput screening applications for drug discovery [15], but may be equally applicable to on-farm use. The objective of the present study was to determine if this approach could be used to develop a bioassay for eCG in horse serum for use on-farm.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1 Cell-lines and vectors**

All materials were from Invitrogen Life Technologies (Burlington ON, Canada) unless otherwise stated. The mouse Sertoli cell line TM4 (ATCC; Manassas VA, USA) were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12) containing 10% horse serum and gentamycin (0.05 mg/mL). The human granulosa tumor cell line KGN (Riken BioResource Center, Tsukuba-shi, Ibaraki, Japan) was maintained in DMEM/F12 containing 10% fetal calf serum (FCS) and gentamycin (0.05 mg/mL) until confluence, and then allowed to grow for a further 2-3 d in DMEM/F12 supplemented with  $10^{-6}$  M testosterone and 1% FCS to form a second layer of rounded cells as described [16]. Cells were then trypsinized and replated in DMEM/F12 supplemented with  $10^{-6}$  M testosterone, 1% FCS and graded doses of bovine FSH (lot AFP-5332B; NHPP, NIDDK; Torrance CA, USA) to assess responsiveness to this hormone. The human embryonic kidney line HEK293 was maintained in DMEM/F12 containing 10% FCS and gentamycin (50 mg/mL). Cells were plated at a density

of  $0.3 \times 10^6$  cells/well in 6-well plates or  $0.1 \times 10^6$  cells/well in 24-well plates and were incubated at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> in air until reaching 90-95% confluence.

The reporter vector (pCRE-bGal) consists of four cAMP response elements inserted upstream of the human vasoactive intestinal peptide promoter driving the b-galactosidase gene [17]. The FSHR expression plasmid (pSV-FSHR) contains the coding sequence of the rat FSHR driven by the SV40 enhancer/promoter [18].

## **2.2 Primary cell culture**

Primary bovine granulosa cells were cultured as described by Gutiérrez [19] with slight modifications. Briefly, bovine ovaries were collected from adult cows at abattoir, and were transported to the laboratory in PBS containing penicillin (100 IU/mL) and streptomycin (100 µg/mL). Follicles between 2 and 5 mm diameter were dissected and granulosa cells were collected by rinsing the follicle wall with DMEM/F12. The granulosa cells were washed twice by centrifugation at 200 x g for 20 min each, and suspended in DMEM/F12 containing Hepes (15 mM), sodium bicarbonate (10 mM), sodium selenite (4 ng/mL), BSA (0.1%; Sigma-Aldrich, Oakville ON, Canada), penicillin (100 IU/mL), streptomycin (100 µg/mL), transferrin (2.5 µg/mL), non-essential amino acid mix (1.1 mM), androstenedione ( $10^{-7}$  M at start of culture, and  $10^{-6}$  M at each medium change)

and insulin (10 ng/mL). The number of cells was counted with a hemocytometer and the viable cells were assessed by the dye exclusion method using 0.4% Trypan Blue. Cells were seeded into 24-well tissue culture plates (Sarstedt Inc; Montréal QC, Canada) at a density of  $1 \times 10^6$  viable cells per well in 1 mL medium. Cultures were maintained at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> in air for 6 days, with 700 µL medium being replaced every 2 days.

### **2.3 Transient transfections**

Transfections of all cell-lines were performed in 24-well plates at approximately 80-90% confluence with Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. Briefly, medium was replaced with 300 µL of OPTI-MEM (Opti-MEM Reduced-Serum Medium) containing 0.8 mg pCRE-bGal plasmid or 0.4 mg pCRE-bGal + 0.4 mg pSV-FSHR, depending on experiment, and 2 mL Lipofectamine 2000 for 4 h. The transfection medium was replaced with 500 µL fresh medium containing test substances. The reporter gene was tested for responsiveness to forskolin (Biomol International; Farmingdale NY, USA), bovine FSH, bovine LH (lot AFP11743B: NHPP), eCG (Pregnecol; Bioniche Animal Health, Belleville ON, Canada) or insulin-like growth factor-1 (LongR3, recombinant human analog; Sigma-Aldrich) for 20 h. In some

experiments (see Results), TM4 and KGN cells were cotransfected with pCRE-bGal and pSV-FSHR plasmids using LipofectaminePlus (Invitrogen), Effectene (Qiagen; Mississauga ON, Canada) or DreamFect Gold (OZ Biosciences, Marseille, France) according to the manufacturer's instructions.

Reporter gene activity was measured with the colorimetric CPRG assay kit (OZ Biosciences) according to manufacturer's instructions. Briefly, cells were washed in PBS, lysed with 250  $\mu$ L kit lysis buffer, and 50  $\mu$ L of lysate was transferred to a 96-well plate. CPRG substrate solution (100  $\mu$ L) was added and color development was quantified with a plate reader at 590 nm. Data are expressed as optical density units.

#### **2.4 Cryopreservation of transiently transfected cells**

HEK293 cells were transfected as above but in 6-well plates with 4  $\mu$ g plasmid (pCRE-bGal + pSV-FSHR) and 10  $\mu$ L Lipofectamine 2000 in 1 mL OPTI-MEM, and after removal of the transfection medium, cells were incubated for the times given in Results (referred to herein as 'recovery time') at 37 °C in 2 mL fresh medium without test substances. Cells were then detached by trypsinization (0.25% trypsin for 3 min at 37 °C), recovered by centrifugation



(200 x g for 15 min at room temperature), resuspended in 10% DMSO in FCS and immediately frozen at -80 °C for 24 h, then stored in liquid nitrogen.

Bioassays were performed on thawed cells. Aliquots of frozen cells were placed in a 37 °C water bath with 0.3 vol warm medium until thawed, centrifuged immediately (7200 x g) for 10 min at room temperature) to remove the DMSO, and resuspended in medium. Cells were seeded in 24-well plates at a density of  $0.2 \times 10^6$  cells/well in 500 mL medium for 2 h before adding test substances for the times given in Results ('treatment time'). Reporter gene activity was measured with the colorimetric CPRG assay kit (OZ Biosciences). Color development was quantified with a plate reader at 590 nm and samples expressed relative to an eCG (Pregnenol; Bioniche Animal Health) standard curve.

A parallel-line bioassay design was used for seven samples of pregnant mares, two nonpregnant mare and a sample of FCS. Sera were diluted in PBS to give sample volumes of 0.005 – 0.25 mL and assayed with a standard curve. In a single-point assay design, sera were assayed at a volume of 0.05 mL. Standards and sera were assayed in duplicate, and the minimum detectable was 10 U/mL.

## **2.5 Horse sera**

Serum samples from mares kept at a commercial eCG production facility (Bioniche Animal Health) were collected during pregnancy as part of routine blood collection for monitoring eCG concentrations. Samples were assayed in-house with the immature ovarian augmentation assay [1] and expressed relative to the WHO 2<sup>nd</sup> International Standard for equine serum gonadotropin (62/001). The in-house assay was designed to identify samples with high activity, and samples that exceeded the upper range of the bioassay were recorded as > 100 U/mL and not reassayed.

## **2.6 Estradiol assay**

Estradiol was measured in spent medium in duplicate by RIA as described previously [20], without solvent extraction. Intra- and inter-assay coefficients of variation were 6% and 9%, respectively. Steroid concentrations in culture medium were corrected for cell number by expressing per unit mass of cell protein. Cells were lysed with 100  $\mu$ L 1 N NaOH for 2 h and neutralised with 100  $\mu$ L 1 N HCl, and total cell protein was measured by the Bradford protein assay

(Bio-Rad, Mississauga ON, Canada). The sensitivity of this assay was 10 pg/tube, equivalent to 0.3 ng/ $\mu$ g cell protein.

## **2.7 Statistics**

All experiments were performed at least three times on separate occasions. Data were transformed to logarithms when not normally distributed (Shapiro–Wilk test). General culture data were analyzed by ANOVA with doses of hormones and incubation times as main effects and culture replicate as a random effect in the F-test, and were performed with JMP software (SAS Institute, Cary NC, USA). Parallel-line bioassay analyses for tests of linearity, regression and parallelism of standard and samples were performed with PLA2.0 software (Stagmann Systems, Rodgau, Germany). Concordance between bioassay methods was tested with the Pearson correlation coefficient. Data are presented as means  $\pm$  SEM.

## **3. RESULTS**

KGN cells were first tested as a bioassay as they express the FSH receptor and respond to FSH, and the dose-responsiveness of KGN cells was compared

with primary bovine granulosa cells. Primary and KGN granulosa cells responded to FSH with an increase in estradiol secretion ( $P < 0.05$ ), although the KGN cells were several orders of magnitude less sensitive than the primary granulosa cells (Fig. 1A). KGN and TM4 cells were transiently transfected with the pCRE-bGal reporter gene, or cotransfected with pCRE-bGal and FSHR plasmids, but they did not respond to FSH with significant b-galactosidase activity with any of the transfection protocols tested (not shown). The effects of the cAMP analog Forskolin on transfected KGN and HEK293 cells was then tested; HEK293 cells responded with a robust increase in b-galactosidase activity ( $P < 0.01$ ) whereas KGN cells did not (Fig. 1B).

As KGN cells did not express the pCRE-bGal reporter gene, the usefulness of HEK293 cells as a bioassay was then explored after transient cotransfection with the FSHR expression plasmid and the reporter gene. Transfected cells responded to FSH and eCG with dose-dependent increases in b-galactosidase activity ( $P < 0.001$ ) but they did not respond ( $P > 0.05$ ) to LH (Fig. 2) or IGF1 (up to 100 ng/mL; not shown).

Initial experiments with freezing transiently cotransfected HEK293 cells demonstrated detectable b-galactosidase activity after stimulation with FSH, therefore a more detailed optimization of freeze/thaw conditions was undertaken. Both the recovery time between transfection and freezing, and the time of

treatment with test substances significantly altered the response to eCG ( $P < 0.001$ ; Fig. 3) and there was no interaction between these variables. A recovery time of 4 h resulted in improved responsiveness to stimulation compared with cells that were frozen immediately after transfection, although longer recovery times did not significantly improve the response. For logistical reasons, a standard recovery time of 20 h (overnight) and a treatment time of 8 h were adopted for subsequent studies. Frozen/thawed transfected cells did not respond to LH (200 ng/mL) or IGF1 (50 ng/mL) with increased b-galactosidase activity ( $P > 0.05$ ).

A traditional bioassay design using serial dilutions of sera showed a dose-dependent increase in b-galactosidase activity with samples from pregnant mares but not with nonpregnant mares or FCS (Fig. 4). Parallel-line analyses confirmed that the eCG standard curve and sera from pregnant mares passed tests of linearity, regression and parallelism ( $P < 0.05$  for all tests); both nonpregnant mares tested and one mare showing low FSH bioactivity with the Steelman-Pohley assay (No 207-2 in Table 1) failed the parallelism test ( $P > 0.05$ ).

A single-point assay approach was then adopted to permit the screening of larger numbers of samples. Biopotency of the samples in this assay, expressed relative to the eCG curve, are presented in Table 1 along with biopotency estimates from the Steelman-Pohley assay. Bioassay estimates from the two methods were significantly correlated ( $r = 0.82$ ,  $P < 0.001$ ). The intra-assay coefficient of

variation was 10%, and the mean inter-assay coefficients of variation were 10, 12 and 19% for high, medium and low (non-pregnant) samples, respectively. The colorimetric detection of reporter gene activity allowed a rapid visual assessment of relative bioactivity (Supplementary Fig. 1).

#### **4. DISCUSSION**

Commercial production of superovulatory drugs requires standardization of biopotency between batches, the industry standard for which is the Steelman-Pohley ovarian augmentation assay. Alternatives using cell lines would eliminate the use of animals for testing, reduce cost and potentially provide a method of on-farm use for screening of bioactivity. In this report, we describe a FSH bioassay based on a frozen/thawed cell-line transfected with FSHR and colorimetric reporter genes that provides estimates of FSH activity in horse serum and that may be applicable to an on-farm/industrial setting.

We assessed the usefulness of several cell-lines, starting with those that are known to express endogenous FSHR. Although the human granulosa KGN line responded to FSH with increased estradiol secretion, neither this nor the mouse Sertoli TM4 line expressed the pCRE-bGal reporter gene in response to FSH, even after cotransfection with a FSHR expression plasmid. The reason for this is

unclear, as we attempted other transfection reagents (Effectene, DreamFect Gold and LipofectaminePlus) without success (data not shown). The HEK293 cell-line was then exploited as it did express the reporter gene. These cells responded to forskolin but not to FSH, indicating that they do not express endogenous FSHR. Cotransfection with a rat FSHR construct permitted a dose-responsive increase in reporter gene activity after addition of FSH or eCG, but not LH or IGF1. These hormones were tested as eCG has inherent LH activity and IGF1 is a major component of serum that also possesses gonadotropic activity.

We assessed whether the transiently transfected cells would respond to FSH after freezing as this approach has been taken for detecting activation of calcium flux induced by agonists in HEK293 cells transiently transfected with the membrane cation channel TRPA1 [13], and for measuring degradation of the tyrosine kinase Wee1 following transfection of HeLa cells with a Wee1-luciferase fusion protein [15]. This is, to our knowledge, the first report of this strategy for hormone bioassay. These previous freeze-thaw bioassays used a luciferase reporter gene, whereas we demonstrate here that this approach works well also with a colorimetric b-galactosidase reporter gene. Serum samples from individual pregnant mares diluted in parallel with an eCG standard curve, and passed parallel-line bioassay validity tests (linearity and parallelism). Nonpregnant mares

did not increase expression of the reporter gene, as would be expected, and failed the parallel-line bioassay validity tests.

A single-point assay approach was used to screen a larger number of samples, and biopotencies were calculated based on the eCG standard curve. The concordance between the Steelman-Pohley estimates of biopotency and those obtained in the cell line bioassay were very good; those sera identified as high yielding by Steelman-Pohley were also provided strong reactions in the cell-line assay, and values were highly significantly correlated. The potency values obtained were, however, numerically different, potentially caused by variable factors present in serum, to the limited range of the Steelman-Pohley assay format used here, and to the limitations of single-point bioassay. Nevertheless, this assay strategy offers a valid alternative to bioassays using animals, especially for screening a large number of samples, and would be expected to work well for simpler sample types including bulk purified pituitary extracts and culture media containing recombinant hormones.

On a practical level, measuring exact biopotency in individual horse sera at the farm is not a useful goal. Of greater importance is the ability to determine, with the minimum of equipment and expertise, whether a given mare is providing a high yield of bioactive eCG. This assay may allow this, as cells can be thawed just prior to use, incubated with sample sera, followed by reagents for colorimetric



detection of reporter gene activity. A red coloration is clear indication of FSH activity, whereas yellow or pale pink colors are low levels of activity. This assay is simpler and cheaper than the Steelman-Pohley assay, and requires laboratory facilities only for the transfection and freezing of the cell-lines. Although this assay has not been tested in a farm setting, it may be especially suited for screening large numbers of mares before large-scale harvest of serum.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank Dr R Cone (Oregon Health Sciences University, Portland OR) for the gift of pCRE-bGal, Dr I. Huhtaniemi (Turku University, Turku, Finland) for pSV-FSHR, Drs Y. Nishi and T. Yanase (Kyusyu University, Fukuoka, Japan) for KGN cells, and staff at Bioniche Animal Health for providing horse sera. This work was supported by a NSERC-AAFC collaborative research grant and by Bioniche Animal Health.

## **REFERENCES**

1. Steelman, S.L. and F.M. Pohley, Assay of the follicle stimulating hormone based on the augmentation with human chorionic gonadotropin. *Endocrinology*, 1953. **53**(6): p. 604-16.

2. Padmanabhan, V., S.C. Chappel, and I.Z. Beitins, An improved in vitro bioassay for follicle-stimulating hormone (FSH): suitable for measurement of FSH in unextracted human serum. *Endocrinology*, 1987. **121**(3): p. 1089-98.
3. Jia, X.C. and A.J. Hsueh, Granulosa cell aromatase bioassay for follicle-stimulating hormone: validation and application of the method. *Endocrinology*, 1986. **119**(4): p. 1570-7.
4. Gudermann, T., et al., In vitro bioassay for human serum follicle-stimulating hormone (FSH) based on L cells transfected with recombinant rat FSH receptor: validation of a model system. *Endocrinology*, 1994. **135**(5): p. 2204-13.
5. Kelton, C.A., et al., The cloning of the human follicle stimulating hormone receptor and its expression in COS-7, CHO, and Y-1 cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 1992. **89**(1-2): p. 141-51.
6. Sanders, R.D., et al., Biomarkers of ovarian function in girls and women with classic galactosemia. *Fertility and Sterility*, 2009. **92**(1): p. 344-51.
7. Braileanu, G.T., et al., FSH bioactivity in commercial preparations of gonadotropins. *Theriogenology*, 1998. **49**(5): p. 1031-1037.

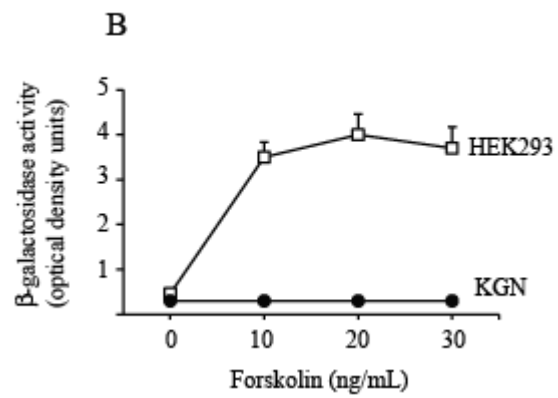
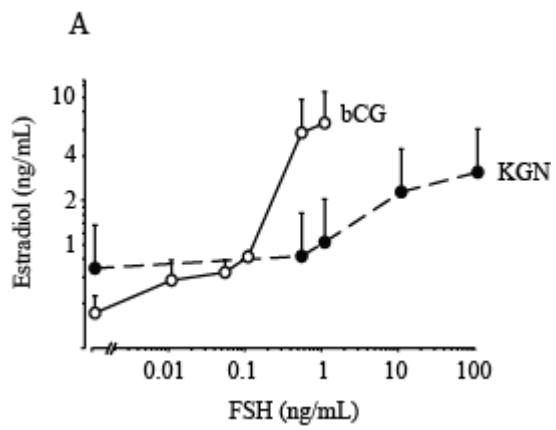
8. Rocha, A., et al., Molecular characterization of two sea bass gonadotropin receptors: cDNA cloning, expression analysis, and functional activity. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2007. **272**(1-2): p. 63-76.
9. Kajitani, T., et al., Analysis of serum FSH bioactivity in a patient with an FSH-secreting pituitary microadenoma and multicystic ovaries: A case report. *Human Reproduction*, 2008. **23**(2): p. 435-9.
10. Albanese, C., et al., Development of a bioassay for FSH using a recombinant human FSH receptor and a cAMP responsive luciferase reporter gene. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 1994. **101**(1-2): p. 211-219.
11. Manning, A.W., et al., Genetic and temporal variation in serum concentrations and biological activity of horse chorionic gonadotrophin. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 1987. **35**: p. 389-97.
12. Menzer, C. and D. Schams, Radioimmunoassay for PMSG and its application to in-vivo studies. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1979. **55**(2): p. 339-45.
13. Chen, J., et al., Utility of large-scale transiently transfected cells for cell-based high-throughput screens to identify transient receptor potential channel A1 (TRPA1) antagonists. *J Biomol Screen*, 2007. **12**(1): p. 61-9.

14. Kleman, M.I., K. Oellers, and E. Lullau, Optimal conditions for freezing CHO-S and HEK293-EBNA cell lines: influence of Me<sub>2</sub>SO, freeze density, and PEI-mediated transfection on revitalization and growth of cells, and expression of recombinant protein. *Biotechnology and Bioengineering*, 2008. **100**(5): p. 911-22.
15. Madoux, F., et al., An ultra-high throughput cell-based screen for weel degradation inhibitors. *J Biomol Screen*, 2010. **15**(8): p. 907-17.
16. Nishi, Y., et al., Establishment and Characterization of a Steroidogenic Human Granulosa-Like Tumor Cell Line, KGN, That Expresses Functional Follicle-Stimulating Hormone Receptor. *Endocrinology*, 2001. **142**(1): p. 437-445.
17. Chen, W., et al., A colorimetric assay for measuring activation of Gs- and Gq-coupled signaling pathways. *Analytical Biochemistry*, 1995. **226**(2): p. 349-354.
18. Sprengel, R., et al., The testicular receptor for follicle stimulating hormone: structure and functional expression of cloned cDNA. *Molecular Endocrinology*, 1990. **4**(4): p. 525-30.
19. Gutierrez, C.G., B.K. Campbell, and R. Webb, Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle-stimulating hormone, and

morphological characteristics. *Biology of Reproduction*, 1997. **56**(3): p. 608-16.

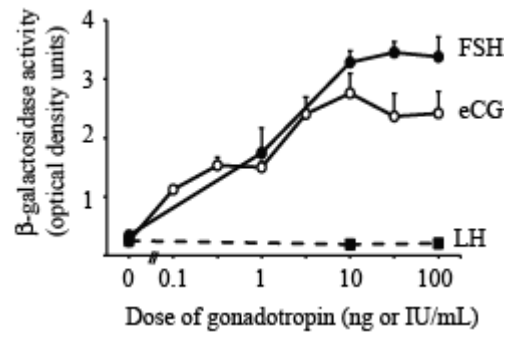
20. Bélanger, A., et al., Determination of nonconjugated and conjugated steroid levels in plasma and prostate after separation on C-18 columns. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1990. **595**: p. 251-9.

**Fig 1.** Ability of cell-lines to respond to cAMP-inducing ligands. (A) Effect of FSH on estradiol secretion from the human granulosa cell-line KGN and primary bovine granulosa cells (bCG). (B) Effect of forskolin on a cAMP-responsive b-galactosidase reporter gene in transiently transfected KGN and HEK293 cells. Data are means  $\pm$  SEM of three independent experiments.

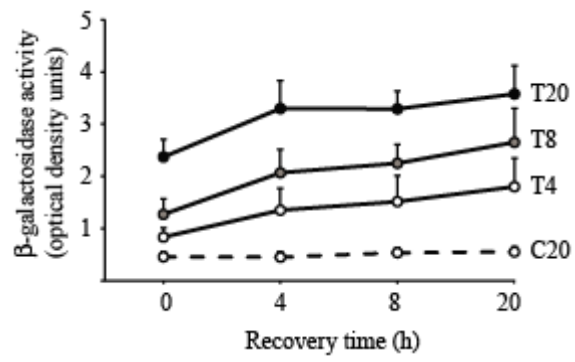


**Fig 2.** Responsiveness of HEK293 cells to FSH, eCG and LH. Cells were cotransfected with a FSHR expression plasmid and a cAMP-responsive b-galactosidase reporter gene plasmid, and treated with FSH (ng/mL), eCG (IU/mL) or LH (ng/mL) for 8 h. Data are means  $\pm$  SEM of three independent experiments.

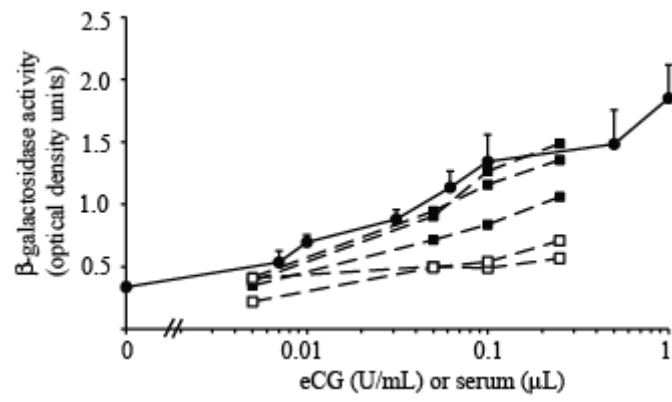




**Fig 3.** Responsiveness of frozen/thawed, transiently transfected HEK293 cells to eCG. Cells were cotransfected with a FSHR expression plasmid and a cAMP-responsive b-galactosidase reporter gene plasmid and frozen at various times after transfection (Recovery time). After thawing, cells were incubated with 10 IU eCG for 4 (T4), 8 (T8) or 20 (T20) h. Controls were incubated without eCG for 20 h (C20). Data are means  $\pm$  SEM of three independent experiments.



**Fig 4.** Parallelism of eCG standard curve and individual horse sera in frozen/thawed, transiently transfected HEK293 cells. Cells were cotransfected with a FSHR expression plasmid and a cAMP-responsive b-galactosidase reporter gene plasmid and frozen. After thawing, cells were incubated for 20 h with dilutions of standard (solid circles), sera from pregnant mares (dashed lines and solid symbols) or sera from non-pregnant mares (dashed lines, hollow symbols), and optical density measured. Data are means ( $\pm$  SEM for standards) of three independent experiments (for clarity, SEM for sera are not shown).



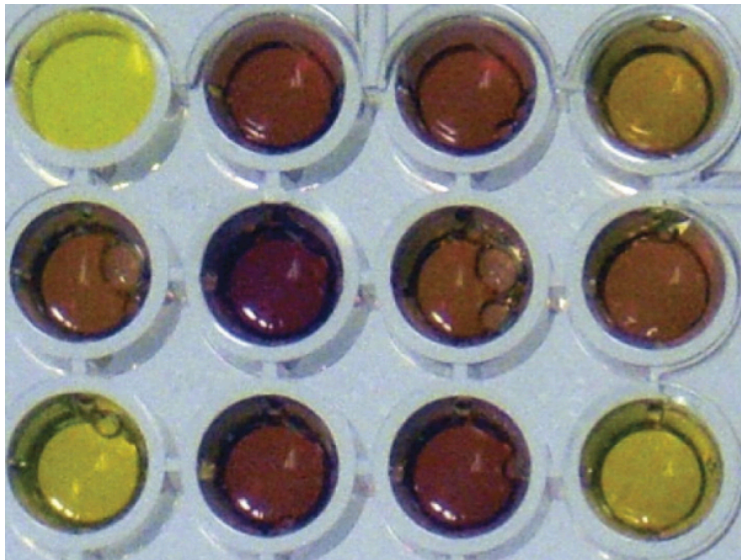
**Table 1.** Bioactivity (U/ml) of horse serum samples as determined by cell-line bioassay and in-vivo augmentation assay.

Horse	Steelman-Pohley assay	Cell-line bioassay (mean $\pm$ SEM)
112	NP	20.0 $\pm$ 5.7 <sup>†</sup>
84	NP	10.0 $\pm$ 10.0 <sup>†</sup>
207-2	29.6	16.7 $\pm$ 6.7 <sup>†</sup>
228	55.7	127.5 $\pm$ 27.5
460	50.9	76.7 $\pm$ 26.7
943-2	46.3	228.3 $\pm$ 3.4
512	53.6	63.3 $\pm$ 8.8
207	84.0	181.7 $\pm$ 22.1
514	>100	143.3 $\pm$ 24.0
514-2	>100	232.5 $\pm$ 37.5
943	>100	193.3 $\pm$ 20.9
167	>100	240.0 $\pm$ 5.0
973	>100	197.5 $\pm$ 2.5

NP, non-pregnant mares that were not assayed in the Steelman-Pohley assay. <sup>†</sup>

These samples failed the bioassay parallelism test.

**Supplemental Fig 1.** Photograph of a section of a microtitre plate to illustrate color development with the b-galactosidase reporter gene. The upper left corner well represents a negative control (medium), the other three corner wells are sera from non-pregnant animals. The remaining wells are from pregnant mares. This photograph was taken 10 min after addition of colorimetric substrate solution.





**Posttranscriptional regulation of bovine CYP19A1 messenger RNA is associated with specific protein binding to the 3'-untranslated region.**

F. Sahmi, M. Sahmi, N. Gévry<sup>1</sup>, E.S. Nicola and C.A. Price

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

<sup>1</sup> Present address: Faculté des sciences, Département de biologie Université de Sherbrooke 2500, boul. de l'Université, Sherbrooke (Québec) CANADA J1K 2R1

Key words: Aromatase, mRNA Stability, RNA-binding protein, Granulosa cells, 3'UTR.

## RÉSUMÉ

L'activité aromatasase dans les cellules de la granulosa bovine exige la synthèse de la protéine aromatasase. L'ARNm codant pour le gène de l'aromatasase bovine a une longue région 3' non traduite (3'UTR) de 3,5 kb et une demi-vie courte (3h), ce qui suggère que la régulation post-transcriptionnelle peut être importante pour le contrôle de l'activité enzymatique. Nous avons testé cette hypothèse en insérant la 3'UTR de l'aromatasase et des fragments de ceux-ci dans un vecteur rapporteur entre la fin de la région codante pour la luciférase et le signal de polyadénylation. Le 3'UTR de l'aromatasase pleine longueur inhibe de manière significative l'activité luciférase et les petits fragments ont montré que cette activité inhibitrice se situe entre 926 et 1134 de la 3'UTR. La réaction croisée au UV a révélé que ce fragment 3'UTR lie deux protéines d'environ 66 et 80 kDa qui étaient présentes dans les cellules de la granulosa, mais pas chez d'autres tissus comme le foie ou le coeur. La liaison du complexe ARN/protéine est spécifique à la 3'UTR, comme le montre les expériences de compétition. Les petites séquences d'ARN ont été utilisées pour localiser la séquence de liaison dans une région de 200 pb qui contient qu'un seul motif AUUUA. Ces données montrent que la régulation post-transcriptionnelle est un élément important de la régulation de l'expression de l'aromatasase et l'activité enzymatique, elle impliquerait une protéine de liaison à une séquence spécifique de la région 3'UTR de l'aromatasase.

## **ABSTRACT**

Aromatase activity in bovine granulosa cells requires ongoing protein synthesis. The mRNA encoding the bovine aromatase gene has a long (3.5 kb) 3'-untranslated region (3'UTR) and a short half-life, suggesting that post-transcriptional regulation may be important for control of enzyme activity. We tested this hypothesis by inserting the aromatase 3'UTR and fragments thereof into a reporter vector between the end of the luciferase coding region and the polyadenylation signal. The full-length aromatase 3'UTR significantly inhibited luciferase activity, and smaller fragments showed that this inhibitory activity lies between +926 and +1134 of the 3'UTR. UV cross-linking experiments revealed that these 3'UTR fragments bound to two proteins of approximately 66 and 80 kDa that were present in granulosa cells, but not in liver or heart. RNA-binding activity was specific to the 3'UTR, as shown by competition experiments. Smaller RNA sequences were used to localize the binding sequence to a 200 base region that contains just one AUUUA motif. These data show that post-transcriptional regulation is an important component of the control of aromatase expression that involves protein binding to a specific sequence in the aromatase 3'UTR.

## 1. INTRODUCTION

Growth and regression of bovine ovarian follicles occurs in waves, during which a single potentially ovulatory follicle predominates in the ovary [1, 2]. One of the major characteristics of growing and potentially ovulatory follicles is the higher estradiol content within the follicle compared to regressing and atretic follicles. In cattle, estradiol is synthesized in granulosa cells from thecal androgens by the enzyme cytochrome P450 aromatase or CYP19A1. Estradiol is important for follicle development and ovulation, as CYP19A1 knock-out mice do not ovulate [3]. The local actions of estradiol include induction of LH receptors on granulosa cells (reviewed in [4]). It has been shown that estradiol may be necessary for follicle growth in cattle in vivo [5].

Levels of mRNA encoding CYP19A1 are upregulated in rodent, human and bovine granulosa cells by FSH [6] [7] [8] [9] and insulin/insulin-like growth factor-1 (IGF1) [10, 11]. In contrast, LH has been shown to downregulate CYP19A1 mRNA levels in rats and cattle [12] [13] [14]. How much of the control of CYP19A1 mRNA abundance is exerted at the transcriptional compared with the translational level is not clear. The half-life of CYP19A1 mRNA in bovine, rabbit and rat granulosa cells is between 3 and 7 hours [12] [15, 16], whereas it is 12 h in a human granulosa cell line [17]. The translation inhibitor cycloheximide

stabilized CYP19A1 mRNA in rat [12] and bovine [16] granulosa cells, suggesting potential post-transcriptional regulation of this mRNA. In support of this, we have shown that insulin-stimulated CYP19A1 mRNA is more stable than that stimulated by FSH [16].

Although the regulation of mRNA stability is complex, the 3'-untranslated region (3'UTR) of many mRNAs plays an important role in mRNA degradation (reviewed in [18] [19]). AU-rich sequences within the 3'UTR are main determinants of mRNA stability, particularly the AUUUA pentamer and UUAUUU(U/A)(U/A)U nonamer [18] [19]. AU-rich elements (ARE) interact with specific RNA binding proteins in *trans* to stabilize or destabilize mRNA. Other determinants of mRNA stability include *cis*-acting stem-loop structures in the RNA, elements in the coding region and 5'UTR [18], and microRNAs [20, 21]

The mRNA encoding bovine CYP19A1 is approximately 3 kb larger than that encoding rat or human CYP19A1 [22] [23, 24], and the difference is mostly due to a very long 3'UTR in the bovine message. In light of the potential post-transcriptional regulation of CYP19A1 mRNA, the objectives of the present study were to determine if the bovine CYP19A1 3'UTR plays a role in posttranscriptional regulation of CYP19A1, and whether this is mediated through *trans*-acting protein(s).

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Plasmids and in vitro RNA synthesis

A region of the 3'UTR of the bovine CYP19A1 mRNA extending from +35 to +3363 nt beyond the coding region of exon 10 was amplified by PCR from granulosa cell total RNA. The sense (S1: 5'-TCCCCGCGGTCAACAGAACTCCACATGGGAA-3') and antisense primers (AS1: 5'-TCCCCGCGGCTCCCTTTTGAACCTCCCTC-3'; *SacII* restriction sites underlined) were designed from the published bovine sequence (**Z32741**). Reverse transcription was performed with SUPERSCRIPT II (Invitrogen) following the procedure recommended by the manufacturer for transcripts with high GC content, and PCR was performed with ELONGASE (Invitrogen) for 35 cycles of 94 °C for 30 sec, 56 °C for 30 sec and 68 °C for 4 min. The resulting 3328 bp cDNA was designated the full length 3'UTR (FL), and contains all the AUUUA and AUUUUA motifs found within the 3'UTR. The cDNA was ligated into pGEM-T Easy vector (Promega Corp., Nepean, Ontario, Canada) and sequenced to verify identity. Smaller fragments of the FL 3'UTR were generated by overnight digestion at 37 °C of the FL vector with *XbaI*, *BstX1* (Amersham Biosciences, Montreal QC) and *HindIII* giving fragments 35-1740, 35-623 (Fig 1)

and 35-992, respectively. The digested plasmids were purified on QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) and used for RNA synthesis.

A 1122 bp downstream fragment of the 3'UTR (592-1714) was amplified with primers S2 (5'-CCGCGGTGGGGACTACAACATC-3') and AS2 (5'-ACTAGTATTCCTGCTTCTCCTTTAC-3'). Two other primers were used to amplify smaller fragments within 592-1714 of 478 bp (592-1070) using sense primer S2 and antisense primer AS3 (5'-ACTAGTCCTTAGAGTTTGAACCCACTG-3'), and of 615 bp (1099-1714) with sense primer S3 (5'-CCGCGGTCACCATTTCTTCCCTCTTCT-3') and antisense primer AS2. PCR was performed with Taq RNA polymerase (Amersham Biosciences) at 57 °C for 35 cycles. Each of the resulting PCR products was ligated into pGEM-T Easy vector (Promega Corp., Nepean, Ontario, Canada) and sequenced to verify identity. Smaller fragments of the 3'UTR were generated by overnight digestion at 37 °C of the (592-1714) with *BLPI* (New England Biolabs Ltd., Mississauga, ON Canada), giving fragments (592-926) and (926-1714) (Fig 1). The fragment (926-1134) was generated by overnight digestion at 37 °C of the (926-1714) vector with *BPU10I* (New England Biolabs Ltd., Mississauga, ON Canada).

For riboprobe generation, the pGEM-T Easy plasmid containing the FL 3'UTR cDNA was linearized with *Sall* and transcribed to RNA with T7 RNA

polymerase (Riboprobe In Vitro Transcription System; Promega) in the presence of  $\alpha\text{P}^{32}$ -UTP (800ci/mmol; Perkin-Elmer). The reaction mixture was incubated at 37°C for 2 hours, incubated with 2 U DNase (RQ1 DNase; Promega) for 20 min at 37 °C, then purified with RNAeasy mini kit (Qiagen).

Unlabeled competitor RNA was produced by in vitro transcription from the above plasmids in the presence of unlabeled UTP. Competitor RNA from the coding regions of CYP19A1 and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was also produced from cDNA amplified from granulosa cell total RNA. The sense and antisense primers for GAPDH were 5'-TGTTCCAGTATGATTCCACC-3' and 5'-TCCACCACCCTGTTGCTG-3', respectively [25]. PCR was performed with Taq RNA polymerase for 30 cycles of 95°C for 30 sec, 56 °C for 30 sec and 72 °C for 1 min, and resulting cDNA was cloned into pGEM-T Easy and transcribed in vitro as described above. A 640 bp region of CYP19A1 was transcribed from an insert in Bluescript KS plasmid [26]. The riboprobe and all competitor RNAs were analysed in 1% RNase-free agarose gels to verify integrity and size. Concentrations were measured by absorbance at 260 nm.



## 2.2 Construction of reporter gene vectors

In order to determine the effect of 3'-sequences on luciferase gene expression, we inserted the 3'UTR sequences between the luciferase coding region and the poly(A) site of the pGL3 Promoter Vector (Promega). At this location there is a *Xba*I insertion site, which we mutated as *Xba*I cleaves the FL 3'UTR at three sites. The mutation involved replacing the *Xba*I insertion site with *Sac*II and *Spe*I insertion sites (for directed cloning). The sense and antisense primers for the *Sac*II site were 5'-AGATCGCCGTGTAATCCGCGGGTCGGGGCGGCCGGCCGCTTC-3' and 5'-GAAGCGGCCGGCCGCCCCGACCCGCGGATTACACGGCGATCT-3', respectively, with *Sac*II restriction sites underlined. PCR was performed with 20 ng pGL3 Promoter Vector, 125 ng of each of the primers, 10mM dNTPs and 2.5 U Pfu DNA polymerase (Stratagene, La Jolla, CA) in a volume of 50 µl for 18 cycles of 95°C for 30sec, 52°C for 1 min and 68°C for 10 min. The reaction mixture was then digested for 2 hours with *Dpn*I (New England Biolabs, Mississauga, ON) to eliminate methylated template DNA, and the amplified DNA was transformed into *E. coli* (XL1-Blue; Stratagene). Verification of the plasmids was performed by digestion with *Sac*II. The *Spe*I insertion site was then added under the same conditions with sense and antisense primers 5'-

GTCGGGGCGGCCGGCACTAGTGAGCAGACATGATAAG-3' and 5'-  
CTTATCATGTCTGCTCACTAGTGCCGGCCGCCCCGAC-3', respectively,  
with *SpeI* restriction sites underlined.

The pGEM-T Easy vectors containing fragments FL, (592-1714), (592-1070) and (1099-1714) were linearized with *PvuI*, and the inserts excised by digestion with *SpeI* and *SacII*. The cDNA fragments were gel-purified and ligated into the mutated pGL3 Promoter Vector for transfection studies. Reporter genes containing fragments (35-1740), (35-992) and (35-623) were obtained by digesting the pGL3-Promoter plasmid containing FL with *XbaI*, *HindIII* and *BstXI*, respectively. Fragments (592-926) and (926-1714) were generated by overnight digestion at 37 °C of the pGL3-promoter containing (592-1714) with *BLPI* (New England Biolabs Ltd., Mississauga, ON Canada), and fragment (926-1134) was obtained by overnight digestion at 37 °C of the (926-1714) vector with *BPU10I*. The digested plasmids were blunt-ended with Klenow DNA polymerase and religated with T4 ligase. All the plasmids for transfection were prepared using the Plasmid Midi Kit (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada).

### 2.3 Cell culture and transient transfection of granulosa cells

All culture materials were obtained from Invitrogen Life Technologies (Burlington, ON, Canada) unless otherwise stated. Bovine ovaries were collected at a local abattoir and transported to the laboratory at 35°C in PBS containing penicillin (100 IU/ml), streptomycin (100 mg/ml) and fungizone (1 mg/ml). Granulosa cells were aspirated from follicles 2-5 mm diameter into  $\alpha$ -MEM medium containing penicillin (100 IU/ml), streptomycin (100 mg/ml) and fungizone (1 mg/ml). Cells were washed 2 times in  $\alpha$ -MEM containing antibiotics, then resuspended in culture medium. Cell viability was estimated at 40% by Trypan blue exclusion.

Cells were seeded into 24-well tissue culture plates (Falcon; Becton Dickinson and Company, New Jersey) at a density of  $3 \times 10^5$  viable cells in 300  $\mu$ l of  $\alpha$ -MEM with L-glutamine containing transferrin (5 mg/ml), insulin (1  $\mu$ g/ml), non-essential amino acid mix, 2% FBS, penicillin (100 IU/ml) and streptomycin (100 mg/ml). Cultures were maintained at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>, 95% air for 5 days, with medium being replaced every 2 days. Transfections were performed on day 4 of culture, at approximately 70 % confluence. The pGL3 Promoter vector (90 fmol) and *Renilla* luciferase vector pRL-SV40 (10 fmol) were incubated with 2  $\mu$ l

of Lipofectamine (Invitrogen Life Technologies) in a volume of 40 $\mu$ l for 30 min at room temperature. The vector-Lipofectamine mix was added to each well and incubated for 3 hours at 37°C, after which the complex was removed by washing twice with fresh medium and the cells cultured for a further 20 hours. At the end of the culture period, cell lysates were prepared by adding 100 $\mu$ l/well Passive Lysis Buffer (Promega), and firefly and *Renilla* luciferase activities were determined with the Dual-Luciferase Reporter Assay system (Promega). Experiments were performed on 3 independent cell cultures.

#### **2.4 Protein extraction and UV crosslinking**

Total cell protein was extracted from bovine granulosa cells liver, and heart and by homogenizing tissues with a Polytron in lysis buffer (10 mM HEPES, pH 7.6 containing 40 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT, 5% glycerol, 0.5% Nonidet P40, 0.5 mM phenyl-methylsulfonylfluoride (PMSF) and 8  $\mu$ g/ml leupeptin). Protein extracts were clarified by centrifugation at 3000 g at 4°C for 10 min, and the supernatants were stored at -84°C.

Protein concentrations were measured with the Bradford protein assay (BioRad, Mississauga, ON, Canada). Protein (20  $\mu$ g) was incubated with the P<sup>32</sup>-

labeled FL 3'UTR riboprobe ( $2 - 4 \times 10^6$  cpm) in the presence of 0.5 mg/ml heparan sulfate, 14 U of RNase inhibitor (RNAguard, Amersham Bioscience) and 2  $\mu$ g of tRNA (Sigma) in a total volume of 20  $\mu$ l at room temperature for 40 min. In competition experiments, non-radioactive RNA was added to the protein sample 5 min before the addition of the radiolabeled probe. The RNA-protein complexes were cross-linked on ice by exposure to UV light at 999 mJ for 15 min in a GSGenelinker (BioRad), followed by incubation with 10 U RNase One Ribonuclease (Promega). The UV cross-linked products were separated on a 10% SDS-polyacrylamide gel and detected by autoradiography using Kodak phosphor screen and digitalized with a phosphorimager (Molecular Dynamics Storm 840; Amersham Biosciences), or exposed to Kodak X-Omat film at  $-70$  °C in the presence of an intensifying screen and quantified using NIH Image software. Competitor experiments were performed on 3 independent samples of granulosa cell protein extract.

## **2.5 Protein isolation (capture of crosslinked complexes)**

Total cell protein from bovine granulosa cells was lysed in hypotonic buffer (20 mM Tris/HCl pH 7.5, 20 mM NaCl, 5 mM EGTA, 1 mM EDTA, 1mM DTT,

1mM PMSF and protease inhibitor), ultracentrifuged at 100000 g and the supernant containing cytosolic proteins was recovered. Protein concentrations were measured with the Bradford protein assay (BioRad, Mississauga, ON, Canada). 10mg proteins were incubated with 14 units of RNase inhibitor, 10µg tRNA, 50µg heparin sulfate and 5000µg of biotinylated RNA probe (denatured first for 5min at 95 °C) in final volume of 100µl at room temperature for 40min. The mixture was cross-linked on ice by exposure to UV light at 999mJ for 15min in a GSGenelinker (BioRad). Streptavidin beads were blocked in 100mM PBS, 0,3 M KCL, 0,1%NP40, 50µg/µl Glycogen, 0,5mg/ml BCA and 50µg/ml tRNA for 15min at 4°C and washed 2 times with wash buffer (100mm PBS, 50mM KCL and 0.1% Nonidet P-40). The bead were resuspended in 0.1% NP-40S, 0.07% SDS, and 133 µL IPP500 [10 mM Tris-HCl (pH 8); 500 mM NaCl, 0.1% NP-40S] containing UV cross-linked products for 1.5 h at 4°C with constant rotation. After the biotinylated cross-linked proteins had been coupled to the beads, they were washed four times with a 1:1 mixture of 1% SDS and IPP750 (see above, except that 750 mM NaCl was used), and then four times with IPP750, each for 1 min. Elution of the bound complex was achieved with urea and SDS [27] with 3× 50 µL aliquots of loading-elution buffer [400 mM urea, 2% SDS, and 30 mM Tris-HCl (pH 6.8), 0.1 mM EDTA (pH 8), and 0.25% bromophenol blue] in three steps as follows: 5 min at 96°C, followed by 30 min at 50°C, and an

additional denaturing step at 96°C for 5 min. The eluate (150 µL) was then loaded onto a 10% SDS–polyacrylamide gel, and stained with silver nitrate [28, 29].

## **2.6 Protein identification**

Protein bands were cut from the gel and transferred to Francis Beaudry laboratory at University of Montreal. Samples were analyzed by Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) analysis OR HPLC

## **2.7 Statistics**

In UV cross-linking experiments, intensity of specific bands in the presence of unlabeled competitor were expressed relative to specific band intensity of probe without competitor (included in every gel), or expressed as arbitrary densitometry units. Transfection data were expressed relative to control vector without 3'UTR. Analysis of variance (ANOVA) was used to test effects of constructs and competitors on luciferase activity and riboprobe binding, respectively. Culture replicate was included as a random variable in the F-test for the effect of experiment. Differences between groups were

identified with the Tukey-Kramer HSD test. Analyses were performed with JMP<sup>®</sup> software (SAS Institute, Cary, NC). The data are presented as means  $\pm$  SEM.

### **3. RESULTS**

Examination of the published sequence of the bovine CYP19A1 3'UTR showed the presence of four AUUUUA motifs, nine AUUUA motifs and 15 AUUA motifs. The distribution of the AUUUUA and AUUUA elements are shown in Fig 1. A cluster of three AUUUA and one AUUUUA elements occurs between +1196 and +1255 (relative to the start of the 3'UTR sequence), otherwise the AREs are widely distributed. On the basis of this distribution, we used restriction digestion of a plasmid containing the full-length 3'UTR to produce constructs containing progressively fewer AUUUUA elements (fragments (35-1740), (35-992) & (935-623)). The lengths and number of AUUUA and AUUUUA motifs are given in Fig 1.

The effect of these constructs on luciferase activity was assessed by transiently transfecting primary cultures of bovine granulosa cells. The full length 3'UTR (FL) and construct (35-1740), (592-1714), (926-1714) and (926-1134) inhibited luciferase activity by approximately 90%, whereas transfection with



construct (35-623) and (592-926) did not cause a significant reduction in luciferase activity. Construct (592-1070) and (1099-1714) inhibited luciferase activity by 40% and 60% respectively ( $P < 0.05$ ), but this was significantly less inhibition than observed with the region (926-1134) (Fig 1).

UV-crosslinking experiments were then performed to determine if the inhibition of luciferase activity observed with constructs FL, (35-1740), (592-1714), (926-1714) and (926-1134) is associated with a *trans*-acting protein. The full-length, (592-1714) and (926-1134) riboprobe formed a RNA:protein complex with cell extracts from bovine granulosa cells that migrated on SDS-PAGE gels at approximately 66 and 80 kDa. This RNA:protein complex was not observed with the construct (592-926) that did not cause a significant reduction in luciferase activity (Fig 2). This RNA:protein complex was not observed with extracts from liver and heart (Fig 3). A 10-fold molar excess of unlabeled RNA from the coding region of CYP19A1 or GADPH did not compete with the riboprobe for binding to cell protein, whereas as little as 2-fold excess of unlabeled FL 3'UTR RNA significantly decreased riboprobe binding to protein (Fig 4).

Competition experiments with unlabeled RNA corresponding to constructs (35-1740), (35-992), (35-623), (592-1714), (592-1070), (1099-1714), (926-1714), (592-926) and (926-1134) showed that sequence (35-1740), (592-1714), (926-1714) and (926-1134) significantly reduced riboprobe binding at 2-fold excess,

whereas sequences (35-992), (35-623), (592-1070), (1099-1714) and (592-926) competed at 10-fold but not 2-fold molar excess (Fig 5).

#### **4. DISCUSSION**

Aromatase enzyme activity in granulosa cells is dependent on continued protein synthesis [16], and the mRNA of the bovine CYP19A1 gene is characterized by a short half-life and a long 3'UTR. Stimulation of granulosa cells with different hormones alters the stability of the mRNA [16], suggesting that posttranscriptional regulation of this gene product may play an important physiological role in the ovary and perhaps in other estrogen-secreting tissues. Employing transfection and UV-crosslinking studies, we demonstrate here that the CYP19A1 3'UTR has a major impact on luciferase activity, and that this effect is associated with the formation of a cell- and sequence-specific RNA:protein complex.

We inserted the bovine 3'UTR of CYP19A1 into the SV40-driven pGL3-Promoter reporter vector between the coding region of the luciferase gene and the poly(A) signal. This in effect gives the luciferase gene an exogenous 3'UTR, and changes in luciferase activity can be interpreted as changes in posttranscriptional processing of luciferase [30] [31]. Insertion of the full-length CYP19A1 3'UTR

reduced luciferase activity by 90%, suggesting that this 3'UTR does affect posttranscriptional processing of the preceding coding region. This is to our knowledge the first demonstration of the role of the RNA 3'UTR for an ovarian steroidogenic enzyme gene.

We determined approximately which region of the 3'UTR is involved in mRNA regulation by transfecting granulosa cells with various fragments of the CYP19A1 3'UTR. The regulatory region lies between 926 and +1134 of the 3'UTR, as insertion of the proximal 200pb inhibited luciferase activity to the same extent as the full-length 3'UTR, whereas the construct 35-623 and 592-926 did not affect luciferase activity.

RNA sequences may act through *cis*- or *trans*-acting factors to influence gene expression, and for this reason we sought to determine if the CYP19A1 3'UTR contains protein binding sites. UV crosslinking analyses were used to identify protein binding and gain insight to the approximate size of the putative binding protein(s). The full-length riboprobe bound to protein(s) giving complexes of approximately 66 and 80 kDa. The most exciting finding however is that this binding activity was not observed in liver or heart. This sets this protein apart from the traditional RNA binding proteins involved in RNA stability, such as AUF1, which are expressed in many cell types [32]. In addition, AUF1 and most known ARE binding proteins are smaller (45 kDa and less, depending on

isoform; see [33]) than the protein observed here. It is unlikely that we are detecting several proteins binding to multiple binding sites, as UV crosslinking involves RNase digestion of crosslinked RNA:protein complexes and denaturing electrophoresis. Only protein subunits directly bound to the labeled RNA are detected [34]. A 60kDa ARE-binding protein, TINO, has been described [35], although the apparent binding sequence does not occur in the bovine CYP19A1 3'UTR.

Competition experiments demonstrated that the RNA:protein binding observed in granulosa cells is specific for the CYP19A1 3'UTR, and only for those fragments of the 3'UTR that inhibited luciferase activity in transfection experiments. This indicates that the protein that binds to the 3'UTR destabilizes the upstream mRNA. This is supported by the action of CHX, which stabilizes CYP19A1 mRNA half-life in rat and bovine granulosa cells [12];[16]. The smaller of these fragments (926-1134) contributes significantly to the regulatory activity of the aromatase 3'UTR; this region is devoid of the classical AU-rich motifs associated with mRNA stability, but contains a 49 base sequence rich in CT. A sequence of this type has been implicated in the regulation of cyclin D3 mRNA stability in mice [36].

It should be noted that there is a gap of 20 nt between the 5'-end of fragment (592-1070) and the 3'-end of fragment (1099-1714), so this sequence may also be involved in regulating the activity of the 3'UTR.

In summary, the present data provide compelling evidence for posttranslational regulation of bovine CYP19A1 by a protein-binding sequence in the long 3'UTR of this mRNA. The putative regulatory element lies between +926 and +1134 of the 3'UTR, and does not encompass a traditional AU-rich element. Given the short half-life of the mRNA and the requirement for ongoing protein synthesis for aromatase activity, we propose that post-transcriptional regulation is an important component of the control of aromatase expression and enzyme activity.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank the late Mélanie Hamel for technical assistance, and Dr A.F. Parlow and the NIDDK National Hormone and Peptide Program for providing bovine FSH. E.S.N. was supported in part by a fellowship from CNPq (Brazil). This work was supported by NSERC Canada.

## REFERENCES

1. Fortune, J.E., et al., *Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle*. Biol Reprod, 2001. **65**(3): p. 648-54.
2. Ginther, O.J., et al., *Follicle selection in monovular species*. Biol Reprod, 2001. **65**(3): p. 638-47.
3. Fisher, C.R., et al., *Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the cyp19 gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(12): p. 6965-70.
4. Rosenfeld, C.S., et al., *Intraovarian actions of oestrogen*. Reproduction, 2001. **122**(2): p. 215-26.
5. Beg, M.A., et al., *Role of oestradiol in growth of follicles and follicle deviation in heifers*. Reproduction, 2003. **125**(6): p. 847-54.
6. Fitzpatrick, S.L. and J.S. Richards, *Regulation of cytochrome P450 aromatase messenger ribonucleic acid and activity by steroids and gonadotropins in rat granulosa cells*. Endocrinology, 1991. **129**(3): p. 1452-62.
7. Steinkampf, M.P., C.R. Mendelson, and E.R. Simpson, *Regulation by follicle-stimulating hormone of the synthesis of aromatase cytochrome P-450 in human granulosa cells*. Mol Endocrinol, 1987. **1**(7): p. 465-71.

8. Silva, J.M. and C.A. Price, *Effect of follicle-stimulating hormone on steroid secretion and messenger ribonucleic acids encoding cytochromes P450 aromatase and cholesterol side-chain cleavage in bovine granulosa cells in vitro*. Biol Reprod, 2000. **62**(1): p. 186-91.
9. Garverick, H.A., et al., *Regulation of expression of ovarian mRNA encoding steroidogenic enzymes and gonadotrophin receptors by FSH and GH in hypogonadotrophic cattle*. Reproduction, 2002. **123**(5): p. 651-61.
10. Steinkampf, M.P., C.R. Mendelson, and E.R. Simpson, *Effects of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on the levels of mRNA encoding aromatase cytochrome P-450 of human ovarian granulosa cells*. Mol Cell Endocrinol, 1988. **59**(1-2): p. 93-9.
11. Silva, J.M. and C.A. Price, *Insulin and IGF-I are necessary for FSH-induced cytochrome P450 aromatase but not cytochrome P450 side-chain cleavage gene expression in oestrogenic bovine granulosa cells in vitro*. J Endocrinol, 2002. **174**(3): p. 499-507.
12. Fitzpatrick, S.L., et al., *Expression of aromatase in the ovary: down-regulation of mRNA by the ovulatory luteinizing hormone surge*. Steroids, 1997. **62**(1): p. 197-206.
13. Voss, A.K. and J.E. Fortune, *Levels of messenger ribonucleic acid for cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase and P450 aromatase in*

- preovulatory bovine follicles decrease after the luteinizing hormone surge.* Endocrinology, 1993. **132**(5): p. 2239-45.
14. Komar, C.M., et al., *Decline in circulating estradiol during the periovulatory period is correlated with decreases in estradiol and androgen, and in messenger RNA for p450 aromatase and p450 17alpha-hydroxylase, in bovine preovulatory follicles.* Biol Reprod, 2001. **64**(6): p. 1797-805.
  15. Hanoux, V., et al., *Differential regulation of two 3' end variants of P450 aromatase transcripts and of a new truncated aromatase protein in rabbit preovulatory granulosa cells.* Endocrinology, 2003. **144**(11): p. 4790-8.
  16. Sahmi, M., E.S. Nicola, and C.A. Price, *Hormonal regulation of cytochrome P450 aromatase mRNA stability in non-luteinizing bovine granulosa cells in vitro.* J Endocrinol, 2006. **190**(1): p. 107-15.
  17. Mu, Y.M., et al., *Combined treatment with specific ligands for PPARgamma:RXR nuclear receptor system markedly inhibits the expression of cytochrome P450arom in human granulosa cancer cells.* Mol Cell Endocrinol, 2001. **181**(1-2): p. 239-48.
  18. Guhaniyogi, J. and G. Brewer, *Regulation of mRNA stability in mammalian cells.* Gene, 2001. **265**(1-2): p. 11-23.

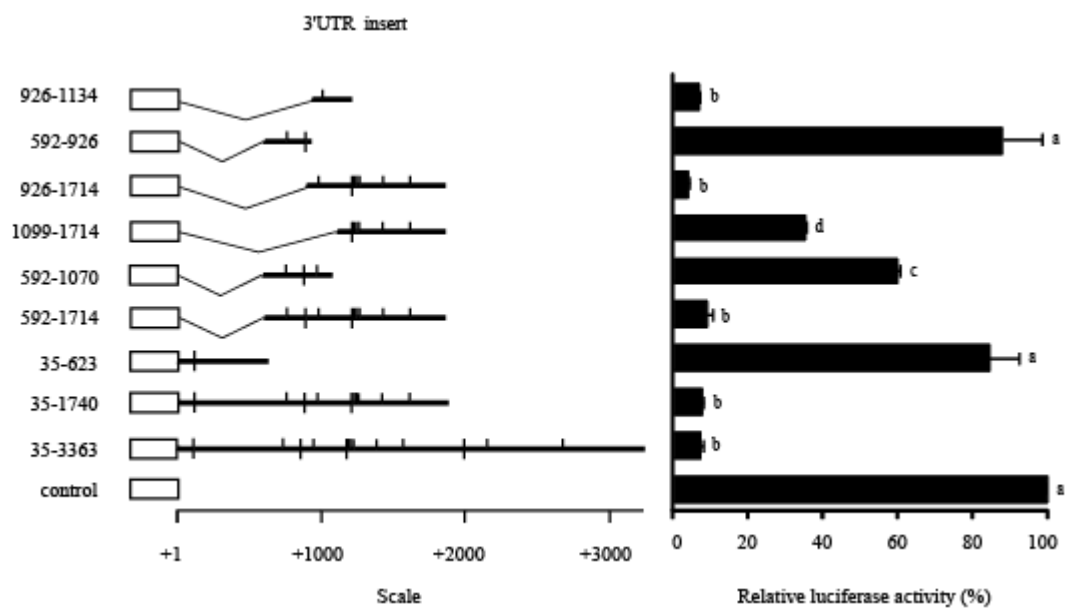


19. Bakheet, T., et al., *ARED: human AU-rich element-containing mRNA database reveals an unexpectedly diverse functional repertoire of encoded proteins*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(1): p. 246-54.
20. Fiedler, S.D., et al., *Hormonal regulation of MicroRNA expression in periovulatory mouse mural granulosa cells*. Biology of Reproduction, 2008. **79**(6): p. 1030-7.
21. Xu, S., et al., *Micro-RNA378 (miR-378) regulates ovarian estradiol production by targeting aromatase*. Endocrinology, 2011. **152**(10): p. 3941-51.
22. Hinshelwood, M.M., et al., *Isolation and characterization of a complementary deoxyribonucleic acid insert encoding bovine aromatase cytochrome P450*. Endocrinology, 1993. **133**(5): p. 1971-7.
23. Doody, K.J., et al., *Expression of mRNA species encoding steroidogenic enzymes in the rat ovary*. J Mol Endocrinol, 1991. **6**(2): p. 153-62.
24. Means, G.D., et al., *Structural analysis of the gene encoding human aromatase cytochrome P-450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis*. J Biol Chem, 1989. **264**(32): p. 19385-91.
25. Tsai, S.J., M.C. Wiltbank, and K.J. Bodensteiner, *Distinct mechanisms regulate induction of messenger ribonucleic acid for prostaglandin (PG)*

- G/H synthase-2, PGE (EP3) receptor, and PGF2 alpha receptor in bovine preovulatory follicles. Endocrinology, 1996. 137(8): p. 3348-55.*
26. Soumano, K., et al., *Follicular 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and cytochromes P450 17 alpha-hydroxylase and aromatase messenger ribonucleic acids in cattle undergoing superovulation. Biol Reprod, 1996. 55(6): p. 1419-26.*
  27. Swack, J.A., G.L. Zander, and M.F. Utter, *Use of avidin-sepharose to isolate and identify biotin polypeptides from crude extracts. Analytical Biochemistry, 1978. 87(1): p. 114-26.*
  28. Blum, H., H. Beier, and H.J. Gross, *Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Electrophoresis, 1987. 8(2): p. 93-99.*
  29. Rhode, B.M., et al., *Analysis of site-specific protein-RNA cross-links in isolated RNP complexes, combining affinity selection and mass spectrometry. RNA, 2003. 9(12): p. 1542-51.*
  30. Powell, M.J., et al., *Posttranscriptional regulation of IL-10 gene expression through sequences in the 3'-untranslated region. J Immunol, 2000. 165(1): p. 292-6.*

31. Nair, A.K. and K.M. Menon, *Regulatory role of the 3' untranslated region of luteinizing hormone receptor: effect on mRNA stability*. FEBS Lett, 2000. **471**(1): p. 39-44.
32. Bevilacqua, A., et al., *Post-transcriptional regulation of gene expression by degradation of messenger RNAs*. J Cell Physiol, 2003. **195**(3): p. 356-72.
33. Cok, S.J., et al., *Identification of RNA-binding proteins in RAW 264.7 cells that recognize a lipopolysaccharide-responsive element in the 3'-untranslated region of the murine cyclooxygenase-2 mRNA*. J Biol Chem, 2004. **279**(9): p. 8196-205.
34. Wilson, G.M. and G. Brewer, *Identification and characterization of proteins binding A + U-rich elements*. Methods, 1999. **17**(1): p. 74-83.
35. Donnini, M., et al., *Identification of TINO: a new evolutionarily conserved BCL-2 AU-rich element RNA-binding protein*. J Biol Chem, 2004. **279**(19): p. 20154-66.
36. Garcia-Gras, E.A., P. Chi, and E.A. Thompson, *Glucocorticoid-mediated destabilization of cyclin D3 mRNA involves RNA-protein interactions in the 3'-untranslated region of the mRNA*. J Biol Chem, 2000. **275**(29): p. 22001-8.

**FIG 1.** Location of potential RNA destabilizing activity in the CYP19A1 mRNA 3'UTR and design of bovine CYP19A1 3'UTR fragments used for constructing luciferase reporter plasmids and for in vitro transcription. Open-ended boxes represent vector sequence. Vertical dashes represent AUUUA and AUUUUA motifs. Location of the sequences is relative to the start of the 3'UTR of the bovine sequence (**Z32741**). Granulosa cells were transfected with pGL3-Promoter vector as control (Cont), or with pGL3-promoter containing cDNA corresponding to full-length (FL) or shorter sequences of the 3'UTR of CYP19A1 mRNA. Data are mean  $\pm$  SEM relative light units (RLU), expressed relative to *Renilla* luciferase to correct for transfection efficiency. Experiments were performed with three independent cell cultures. Asterisks denote means significantly different from Control ( $P < 0.001$ ).

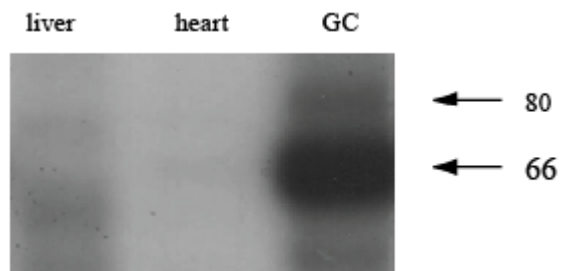


**FIG 2.** Location of protein binding region within the 3'UTR of bovine CYP19A1 mRNA. Total protein extracts (20 µg) from granulosa cells of small follicles (2-6 mm) were UV cross-linked to radiolabeled CYP19A1 3'UTR riboprobe from different fragments (FL, (592-1714), (592-926) and (926-1134)).



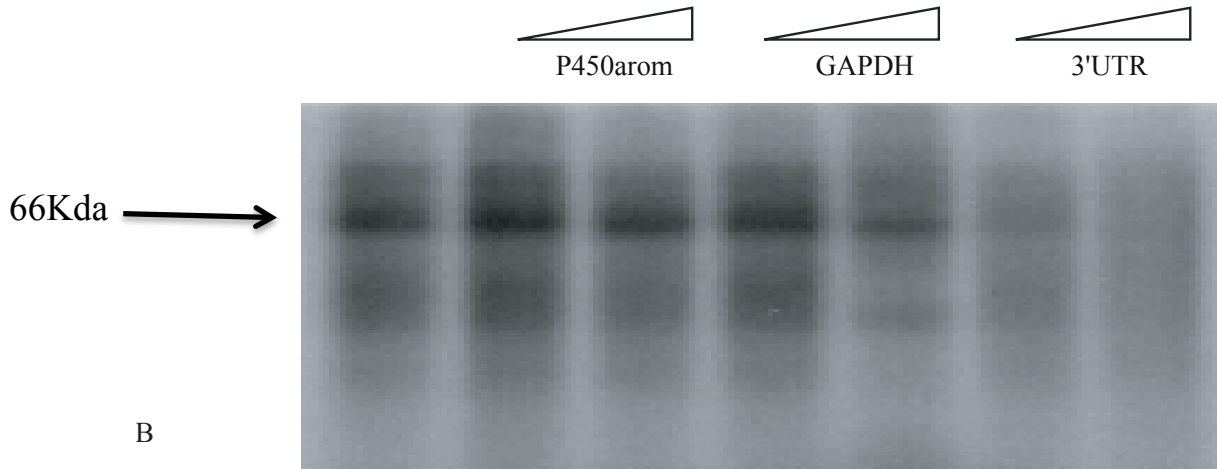
**FIG 3.** Radiolabeled full-length CYP19A1 3'UTR RNA binding to protein extracts (20  $\mu$ g) from bovine tissues. The riboprobe bound to a protein of approximately 66 and 80 kDa (arrow) in fresh granulosa cells (GC). No specific binding was observed in liver or heart tissues examined.



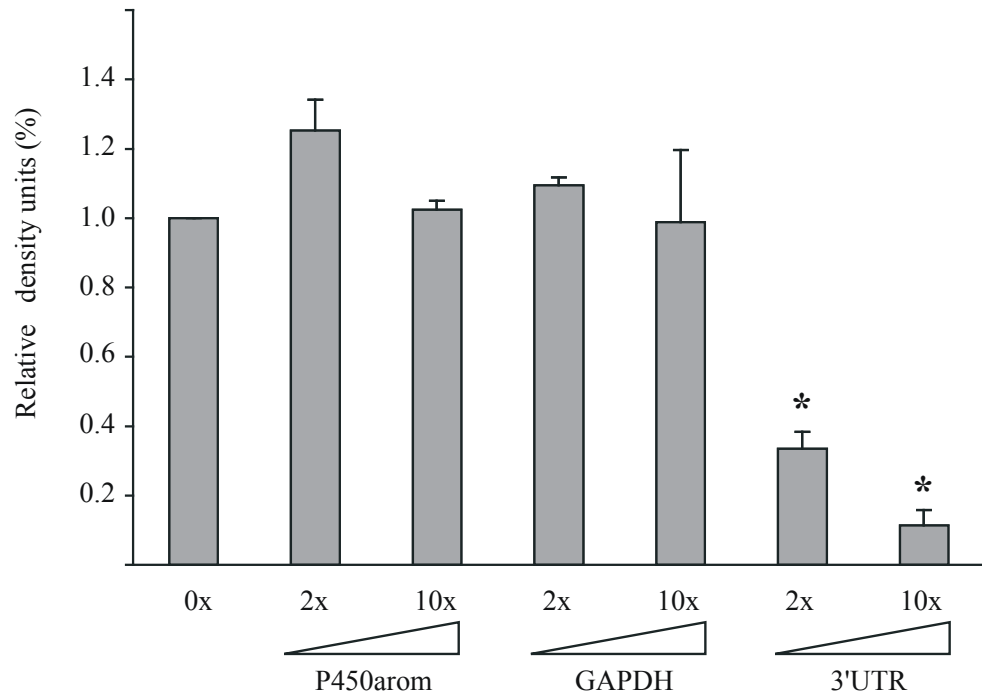


**FIG 4.** Specificity of protein binding to RNA in bovine granulosa cells. Total protein extracts (20  $\mu$ g) from granulosa cells of small follicles (2-6 mm) were UV cross-linked to radiolabeled CYP19A1 3'UTR riboprobe in the presence of molar excess (0-10x) of unlabeled RNA from CYP19A1 or GADPH coding regions, or CYP19A1 3'UTR. A) A representative gel showing the position of the specific band (arrow). B) Mean  $\pm$  SEM band intensity of RNA:protein complexes expressed relative to riboprobe binding in the absence of competitor (control). Experiments were performed on three independent protein extracts. Asterisks indicate bars significantly different from control ( $P < 0.05$ ).

A

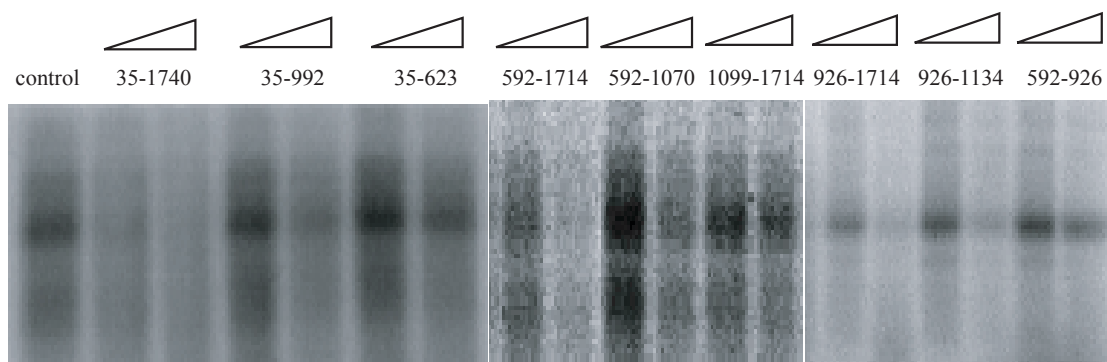


B

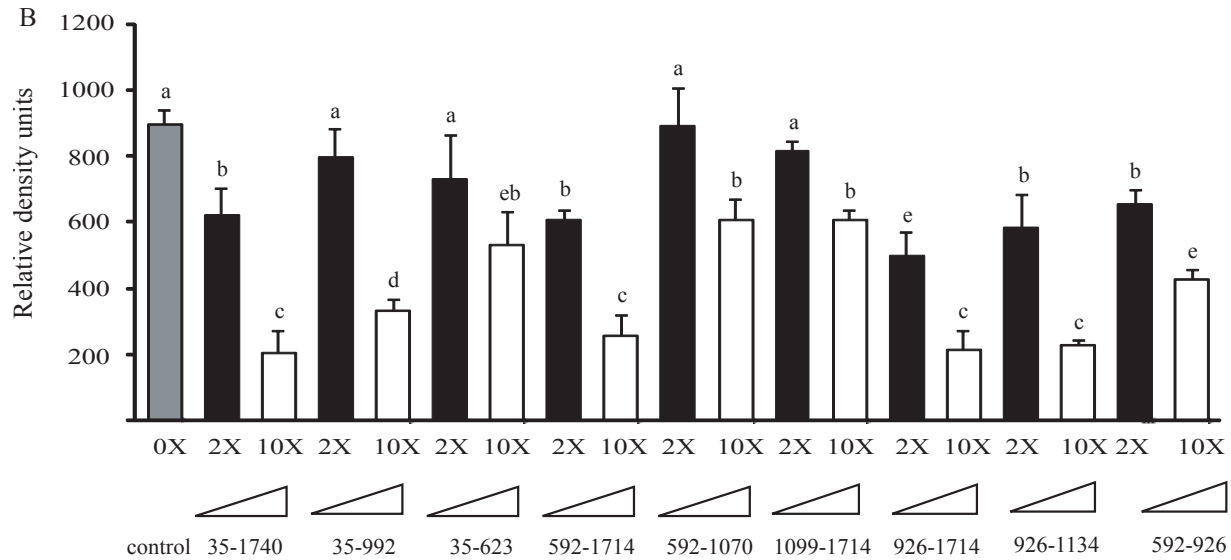


**FIG 5.** Competition analysis of fragments of RNA within the bovine CYP19A1 3'UTR binding to granulosa cell protein. Total protein extracts (20  $\mu$ g) from granulosa cells of small follicles (2-6 mm) were UV cross-linked to radiolabeled CYP19A1 3'UTR riboprobe in the presence of molar excess (0-10x) of unlabeled CYP19A1 3'UTR RNA fragments of progressively smaller size. A) A representative gel showing the position of the specific band (arrow). B) Mean  $\pm$  SEM band intensity of RNA:protein complexes. Experiments were performed on three independent protein extracts. Bars with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ).

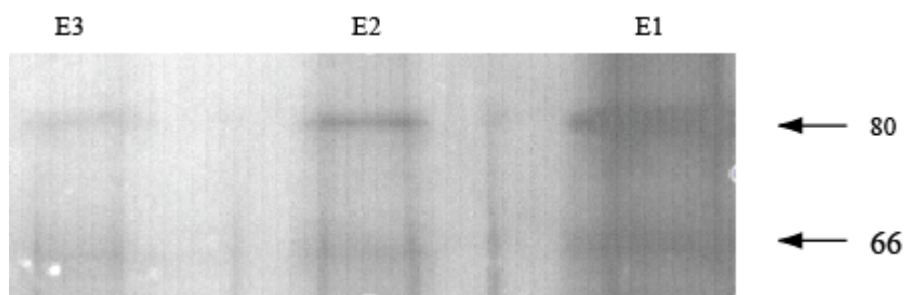
A



B



**FIG 6.** Protein isolation. 10mg proteins were incubated with 5000 $\mu$ g of biotinylated RNA probe at room temperature for 40min. The mixture was cross-linked on ice by exposure to UV light. Washed streptavidin beads were added to UV cross-linked products for 1,5 h at 4°C with constant rotation. After the biotinylated cross-linked proteins had been coupled to the beads, these were washed and elution (E) from the beads was performed with urea and SDS with aliquots of loading-elution buffer. The eluate was then loaded onto a 10% SDS–polyacrylamide gel, and stained with silver nitrate .



## DISCUSSION GÉNÉRALE

L'oestradiol joue un rôle important dans la reproduction en général, particulièrement dans la croissance folliculaire chez la vache. L'oestradiol induit l'expression des récepteurs à la LH sur les cellules de la granulosa. L'expression de CYP19A1 chez les cellules de la granulosa est régulée différemment au cause de la croissance folliculaire et de la lutéinisation. L'expression de l'ARNm codant pour CYP19A1 est indétectable dans les cellules de la granulosa de petits follicules et la sécrétion d'oestradiol est très faible [75, 146]. Au fur et à mesure que le follicule se développe, les cellules de la granulosa se différencient et cette différenciation est caractérisée par une augmentation de l'expression de CYP19A1. Le CYP19A1 est principalement stimulé par la FSH, l'IGF-1 et/ou l'insuline [223]. Juste avant et après le pic de la LH, il y a une chute de l'expression de CYP19A1 et de l'oestradiol [75, 183]. Le même patron d'expression a été observé in vitro avec les cellules de la granulosa mises en culture en absence de sérum dans des conditions qui favorisent la sécrétion d'oestradiol [223]. Dans les cellules de la granulosa bovine, l'expression de CYP19A1 dépend de l'expression de six régions de promoteurs différents (2, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4 et 1.5), au moins deux promoteurs P2 suivi du P1.1 sont actifs [2, 257]. De plus, la régulation de la stabilité de l'ARNm est très complexe. La demi-vie de l'ARNm CYP19A1 au niveau des cellules de la granulosa bovine stimulées à la FSH est relativement courte comparée à celle rapportée chez l'humain, 3h vs 13h [3, 258]. L'ARNm CYP19A1 est caractérisée par une longue région 3'UTR et la présence de nombreux motifs AUUUA qui sont des éléments déterminants de la stabilité de l'ARNm [3]. La région 3'UTR a été impliquée dans la dégradation de nombreux ARNm dont le récepteur de



l'oestradiol humain, le récepteur de la LH humain, la cyclooxygénase 2 humain et l'interleukin 10 de la souris [259-262] .

Dans cette étude, nous avons démontré que chez les ruminants il y a deux types de régulation, une régulation au niveau transcriptionnel et une au niveau post-transcriptionnel. Les promoteurs ovariens CYP19A1 ont besoin de trois facteurs de transcription, NR5A2, FOXL2 ainsi que l'AMPc pour exprimer des niveaux d'activité comparables avec le promoteur de rongeurs dans les cellules de la granulosa lutéinisées et que le FOXL2 semble être un facteur déterminant de l'activité du promoteur chez le ruminant. Aussi, nous avons investiguer différentes voies de signalisation impliquées dans la régulation de ces promoteurs par l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques spécifiques. De plus, la régulation a lieu au moins au niveau post-transcriptionnel impliquant une séquence située entre 926 et 1134 de la région 3'UTR de l'ARNm CYP19A1 et deux protéines spécifiques de 66 et 80 kda. Par ailleurs, les études sur les promoteurs nous ont permis de développer une application commerciale à partir du système de transfection afin de mesurer l'activité de la FSH de l'eCG dans le sérum des juments (un biorapporteur).

Dans première partie de mon étude, nous avons essayé de mieux comprendre l'effet de ces hormones (FSH et IGF-1) sur l'activation des promoteurs d'aromatase dans les cellules de la granulosa. Nous avons utilisé deux systèmes d'analyse in vitro qui permettent de mesurer l'expression des deux promoteurs suite à une stimulation à la FSH ou à l'IGF-1 soit RT-PCR ou un gène rapporteur.

L'analyse des résultats de RT-PCR montre que dans les cellules de la granulosa non-lutéinisées, la FSH et l'IGF1 augmentent l'abondance des transcrits contenant 5'UTR spécifique pour P1.1 et P2. Les effets sur le P2 étaient attendus, car il est le promoteur principal utilisé

dans les cellules de la granulosa. Les effets de la FSH sur P1.1 sont nouveaux, bien que ce résultat est compatible avec l'effet de la FSH sur les niveaux d'ARNm CYP19A1 dans le placenta chez la brebis [263]. Il s'agit de la première description de la régulation gonadotrophine du promoteur CYP19A1 dans l'ovaire. Nous nous sommes intéressés à savoir si les voies utilisées pour activer le P1.1 ou P2 bovin sont différentes. Nos résultats montrent que la FSH utilise la voie PKA et l'IGF-1 la voie PKC pour le P2, mais pas pour le promoteur P1.1 dans les cellules de la granulosa non-lutéinisées. Une inhibition de la voie PI3K affecte sensiblement l'expression à la fois de P2 et P1.1, probablement en raison de la présence d'insuline dans le milieu de culture, sachant que l'insuline et l'IGF-1 agissent sur le même récepteur et que les deux stimulent en plus l'expression de CYP19A1 par l'activation de la voie AKT dans les cellules de la granulosa différenciées chez l'humain, la souris et le rat [264, 265]. Curieusement, le même inhibiteur de la voie PI3K qui inhibe l'ARNm CYP19A1, dérivé du promoteur P1.1 dans les cellules non-lutéinisées, augmente l'activité du P1.1 dans les cellules lutéinisées par un mécanisme qui reste à déterminer. Cependant, le promoteur 2 ovarien n'est pas exprimé dans les cellules lutéinisées bovines. Nous avons donc comparé l'activité du promoteur ovarien PII/P2 d'humain, de rat, de la chèvre et de la vache dans les cellules de la granulosa bovine lutéinisées. Comme attendu, les promoteurs PII/proximal humain et rat sont exprimés dans les cellules de la granulosa lutéinisées traitées à la forskoline [226, 227, 266, 267]. Notre hypothèse est que le promoteur P2 bovin dépendrait davantage de plusieurs facteurs de transcription, ce qui n'est pas le cas pour le promoteur humain ni celui du rat qui dépendent essentiellement de l'AMPc. En effet, la surexpression de NR5A2 augmente l'activité des promoteurs humains et légèrement ceux de la vache et de la chèvre stimulés par la

forskoline, ce qui est probablement dû à la conservation des sites de liaison de NR5A1/NR5A2 dans ces espèces [232, 236].

Les promoteurs proximaux des quatre espèces étudiées ici contiennent aussi des sites conservés de liaison à FOXL2. Chez la vache, le facteur de transcription FOXL2 exprime dans les cellules de la granulosa, mais pas dans le corps jaune [268], ce qui concorde avec l'expression du promoteur P2 bovin du gène CYP19A1, suggérant fortement que le facteur de transcription FOXL2 est nécessaire pour conduire l'activité de P2 chez les ruminants comparé au promoteur des primates et des rongeurs. Notre étude montre que le traitement avec la forskoline et la cotransfection des facteurs de transcription NR5A2 et FOXL2 augmente l'expression du promoteur 2 bovin. Cette combinaison n'a pas stimulé les activités du promoteur de l'humain et du rat au-dessus de ceux observés avec NR5A2 et la forskoline. Alors que la surexpression de FOXL2 de la chèvre seule augmente l'activité de P2 de la chèvre, comme observé précédemment [236], mais pas celle de P2 bovine. Contrairement à l'étude de Kuo et al en 2011, FOXL2 ne réprime pas l'activité basale ou stimulée par la forskoline du promoteur PII humain [234], ce qui peut être dû aux types de cellules ou à la protéine FOXL2 qui diffère entre les espèces. Cependant, la différence des réponses au FOXL2 entre le promoteur humain et les ruminants est liée à la structure de deux sites de liaison au FOXL2 situés dans la région 57 pb du promoteur humain [234] qui ne sont pas conservés dans la séquence de la chèvre et de la vache.

Dans la deuxième partie de mon étude, nous avons élaborer un système bioessai on utilisant les promoteurs du gène CYP19A1 qui répondent à la FSH. L'utilisation du gène rapporteur en amont du promoteur d'aromatase, capable de répondre à une stimulation par la

FSH, a suscité l'intérêt des compagnies productrices de l'eCG qui ont manifesté de l'intérêt à développer ce système pour lui permettre de distinguer facilement l'eCG ayant une forte activité de FSH et donc avoir un produit commercial plus efficace et de meilleure qualité. Etant donné que le promoteur P2 bovine nécessite plusieurs facteur de transcription pour son expression et même après la surexpression de 2 facteur FOXL2 et NR5A2, le niveau d'activation de ce promoteur dans les cellules de granulosa lutéinisées est faible, alors que le promoteur 1.1 est sensible à la FSH dans ces même cellules, Nous avons donc utilisé le promoteur 1.1 pour répondre un notre objectif. Nous avons donc transfecté les cellules de la granulosa avec le promoteur 1.1 et FSHR. Les résultats premières analyses les cellules ne répondent pas au sérum des juments. Une alternative est d'utiliser un promoteur qui contient des éléments de réponses à l'AMPc CRE en amont du gène rapporteur  $\beta$ -galactosidase, ceci donnera un signal visuel permettant rapidement d'identifier les eCG qui ont une forte activité FSH. Nous avons donc transfecté le vecteur pCRE  $\beta$ gal dans les cellules de granulosa lutéinisées. Les cellules répondent très faiblement au sérum de la jument. Une alternative est d'utilisé une lignée cellulaire HEK293. Dans cette étude, nous avons développé un système de bioessai à la FSH basé sur la transfection des cellules HEK293 avec un récepteur FSH (FSHR) et un gène rapporteur colorimétrique  $\beta$ -galactosidase qui permet d'estimer l'activité de la FSH dans le sérum de la jument et qui pourrait être applicable au niveau de la ferme/industrie. La co-transfection des cellules avec le FSHR de rat a permis une augmentation de l'activité du gène rapporteur de façon dose-dépendante, après l'addition de la FSH ou d'eCG, mais pas la LH ou l'IGF-1. Ces hormones ont été testées, comme l'eCG, à une activité LH et l'IGF-1 est une composante majeure du sérum. Pour appliquer ce système dans une ferme, une lignée cellulaire stable exprimant le gène rapporteur et le FSHR est nécessaire, malheureusement toutes les

tentatives sont infructueuses. Une alternative est de congeler les cellules transfectées de manière transitoire et d'évaluer ensuite la réponse de ces cellules transfectées et congelées à une stimulation par la FSH, il s'agit du premier rapport de cette stratégie pour les essais biologiques de l'hormone. Les essais biologiques précédents (congelés/decongelés) ont utilisé un gène rapporteur de la luciférase, alors que nous démontrons ici que cette approche fonctionne bien également avec un gène rapporteur  $\beta$ -galactosidase colorimétrique. Des échantillons dilués du sérum des juments gestantes sont en parallèle avec la courbe standard de l'eCG et passent le test de validité bioessai parallel-line (linéarité et parallélisme). Les juments non gestantes n'ont pas augmenté l'expression du gène rapporteur, comme nous pouvions s'y attendre, le test de validité de bioessai parallel-line a échoué. Les concordances entre les estimations Steelman-Pohley et les résultats obtenus dans notre bioessai de lignée cellulaire ont été très bonnes. Les sérums identifiés comme rendement élevé par Steelman-Pohley a également fourni un rendement élevé dans notre test de lignée cellulaire et les valeurs étaient très significativement corrélées.

Dans la troisième partie de mon étude, nous avons utilisé l'approche de transfection cellulaire pour vérifier l'impact de la région 3'UTR sur l'activité de la luciférase. Les résultats démontrent clairement que la région 3'UTR CYP19A1 a un effet drastique sur la stabilité en réduisant l'activité de la luciférase jusqu'à 90%. Nous avons déterminé approximativement quelle région du 3'UTR est impliquée dans la régulation de l'ARNm par la transfection des cellules de la granulosa avec différents fragments de l'UTR. Les régions 35-623 et 592-926 n'affectent pas l'activité luciférase, tandis que la région entre 926-1134 affecte considérablement l'activité de la luciférase dans la même mesure que la région 3'UTR pleine

longueur. Cette région est dépourvue de motifs riches en AU classiques associés à la stabilité de l'ARNm, mais contient une séquence de base 49 riche en CT. Une séquence de ce type a été impliquée dans la régulation de la stabilité de l'ARNm cycline D3 chez la souris [269].

Les séquences régulatrices de l'UTR peuvent agir en cis ou alors recruter d'autres facteurs trans-régulateurs. C'est pourquoi nous avons examiné la possibilité de l'existence d'un site de liaison potentiel sur la région 3'UTR CYP19A1. Les analyses par fixation croisée aux UV nous ont permis d'identifier deux protéines de 66 et 80 kDa qui sont spécifiques aux cellules de la granulosa dans la mesure où nous n'avons pas détecté de liaison avec les autres types cellulaires comme le cœur et le foie.

Des expériences de compétition ont démontré que les deux complexes ARN-protéines sont spécifiques à la région 3'UTR plus spécifiquement aux fragments qui ont affecté l'activité de la luciférase ce qui suggère que la liaison de ces deux protéines à la région 3'UTR déstabilise l'ARNm CYP19A1.

## **Perspectives**

Nous avons démontré par la présente étude que l'ARNm CYP19A1 peut être régulé au moins en partie au niveau post-transcriptionnel. La régulation implique deux protéines trans-régulatrices qui se lient à une séquence de 200pb de la région 3'UTR; la prochaine étape sera donc d'identifier et de caractériser la protéine, évaluer l'importance de la protéine dans la régulation de la stabilité et de la transcription de l'ARNm CYP19A1 (déterminer l'impact de la suppression par ARNi et de la surexpression de cette protéine dans la cellule sur la transcription de l'ARNm CYP19A1) et déterminer les facteurs cellulaires impliqués dans la régulation de ces

protéines, notamment son expression si elle est constitutive ou inductible soit par (FSH, Insuline, IGF et LH).

## CONCLUSION GÉNÉRALE

Nous avons démontré par la présente étude que chez les ruminants, il y a deux types de régulation, une régulation au niveau transcriptionnel et une au niveau post-transcriptionnel. Les promoteurs ovariens CYP19A1 ont besoin de trois facteurs de transcription, NR5A2, FOXL2 ainsi que l'AMPc, pour exprimer des niveaux d'activité comparables avec le promoteur de rongeurs dans les cellules de la granulosa lutéinisées et FOXL2 semble être un facteur déterminant de l'activité du promoteur chez le ruminant. Les deux voies AMPc et NR5A2 sont actives dans le corps jaune et sont suffisantes pour l'expression de CYP19A1 humain et rongeur dans ce tissu. Alors que FOXL2 est exprimé dans les cellules de la granulosa folliculaire, il n'est pas exprimé dans le corps jaune [268], ce qui pourrait expliquer pourquoi le promoteur ovarien CYP19A1 n'est pas exprimé dans les cellules de la granulosa lutéinisées chez les ruminants.

La demi-vie de l'ARNm CYP19A1 est très courte (3h), ce qui contribue à la chute rapide du messager et de l'activité observée chez la vache. La régulation a lieu au moins au niveau post-transcriptionnel impliquant une séquence située entre 926 et 1134 de la région 3'UTR de l'ARNm CYP19A1 et deux protéines spécifiques de 66 et 80kDa.

Par ailleurs, nous avons établi un système simple, efficace et moins dispendieux qui permet de mesurer l'activité FSH de l'eCG dans le sérum des juments (un biorapporteur) [270].



## BIBLIOGRAPHIE

1. Fisher, C.R., et al., *Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the cyp19 gene*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998. **95**(12): p. 6965-6970.
2. Hamel, M., et al., *Androstenedione increases cytochrome P450 aromatase messenger ribonucleic acid transcripts in nonluteinizing bovine granulosa cells*. Molecular Reproduction and Development, 2005. **70**(2): p. 175-183.
3. Sahmi, M., E.S. Nicola, and C.A. Price, *Hormonal regulation of cytochrome P450 aromatase mRNA stability in non-luteinizing bovine granulosa cells in vitro*. J Endocrinol, 2006. **190**(1): p. 107-15.
4. Fitzpatrick, S.L., et al., *Expression of aromatase in the ovary: down-regulation of mRNA by the ovulatory luteinizing hormone surge*. Steroids, 1997. **62**(1): p. 197-206.
5. Cushman, R.A., et al., *Reproductive aging influences ovarian function in beef cows*. Nebraska Beef Report, 2010.
6. Thibault, C. and M.C. Levasseur, *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. 2001, Paris: INRA Chapitre 3.
7. Russell, D.L. and R.L. Robker, *Molecular mechanisms of ovulation: co-ordination through the cumulus complex*. Human Reproduction Update, 2007. **13**(3): p. 289-312.
8. Moor, R.M., *Sites of steroid production in ovine graafian follicles in culture*. The journal of endocrinology, 1977. **73**(1): p. 143-50.
9. Snow, M. and M. Monk, *Emergence and migration of mouse primordial germ cells*. Current Problems in Germ Cell Differentiation, 1983: p. 115-135.

10. Wu, M.Y. and S.N. Chow, *Derivation of germ cells from mouse embryonic stem cells*. Journal of the Formosan Medical Association, 2005. **104**(10): p. 697-706.
11. Buehr, M., et al., *Proliferation and migration of primordial germ cells in We/We mouse embryos*. Developmental Dynamics, 1993. **198**(3): p. 182-189.
12. Russe, I., *Oogenesis in cattle and sheep*. Bibliotheca Anatomica, 1983. **24**: p. 77-92.
13. Wandji, S.A., M.A. Fortier, and M.A. Sirard, *Differential response to gonadotropins and prostaglandin E2 in ovarian tissue during prenatal and postnatal development in cattle*. Biology of Reproduction, 1992. **46**(6): p. 1034-1041.
14. Baker, S. and N. Spears, *The role of intra-ovarian interactions in the regulation of follicle dominance*. Human Reproduction Update, 1999. **5**(2): p. 153-165.
15. Byskov, A.G., *Regulation of meiosis in mammals*. Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique, 1979. **19**: p. 1251-1261.
16. Westergaard, L., et al., *Is resumption of meiosis in the human preovulatory oocyte triggered by a meiosis-inducing substance (MIS) in the follicular fluid?* Fertility and Sterility, 1984. **41**(3): p. 377-84.
17. Moor, R.M. and G.M. Warnes, *Regulation of meiosis in mammalian oocytes*. British Medical Bulletin, 1979. **35**(2): p. 99-103.
18. Betteridge, K.J., et al., *Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes in vitro*. Journal of Reproduction and Fertility. Supplement, 1989. **38**: p. 87-98.
19. Driancourt, M.A., et al., *Variations in patterns of follicle development in prolific breeds of sheep*. Journal of Reproduction and Fertility, 1986. **78**(2): p. 565-75.
20. Erickson, B.H., *Development and senescence of the postnatal bovine ovary*. Journal of Animal Science, 1966. **25**(3): p. 800-5.

21. Lussier, J.G., P. Matton, and J.J. Dufour, *Growth rates of follicles in the ovary of the cow*. Journal of Reproduction and Fertility, 1987. **81**(2): p. 301-307.
22. Hirshfield, A.N. and A.R. Midgley, Jr., *Morphometric analysis of follicular development in the rat*. Biology of Reproduction, 1978. **19**(3): p. 597-605.
23. Monniaux, D., D. Chupin, and J. Saumande, *Superovulatory responses of cattle*. Theriogenology, 1983. **19**(1): p. 55-81.
24. Hulshof, S.C., et al., *Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries*. Veterinary Quarterly, 1994. **16**(2): p. 78-80.
25. Hirshfield, A.N., *Development of follicles in the mammalian ovary*. International Review of Cytology, 1991. **124**: p. 43-101.
26. Byskov, A.G., *The anatomy and ultrastructure of the rete system in the fetal mouse ovary*. Biology of Reproduction, 1978. **19**(4): p. 720-735.
27. Sirard, M.A., et al., *Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes*. Biology of Reproduction, 1989. **40**(6): p. 1257-63.
28. Channing, C.P., et al., *Ovarian follicular and luteal physiology*. International Review of Physiology, 1980. **22**: p. 117-201.
29. Braw-Tal, R. and S. Yossefi, *Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary*. Journal of Reproduction and Fertility, 1997. **109**(1): p. 165-171.
30. Adhikari, D. and K. Liu, *Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles*. Endocrine Reviews, 2009. **30**(5): p. 438-64.

31. Van wezel, I.L. and R.J. Rodgers, *Morphological characterization of bovine primordial follicles and their environment in vivo*. *Biology of Reproduction*, 1996. **55**(5): p. 1003-1011.
32. Picton, H.M., *Activation of follicle development: the primordial follicle*. *Theriogenology*, 2001. **55**(6): p. 1193-1210.
33. Cahill, L.P. and P. Mauléon, *A study of the population of primordial and small follicles in the sheep*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1981. **61**(1): p. 201-206.
34. Espey, L.L., *Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction*. *Biology of Reproduction*, 1994. **50**(2): p. 233-238.
35. Savio, J.D., et al., *Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1988. **83**(2): p. 663-71.
36. Turnbull, K.E., A.W. Braden, and P.E. Mattner, *The pattern of follicular growth and atresia in the ovine ovary*. *Australian Journal of Biological Sciences*, 1977. **30**(3): p. 229-41.
37. Fortune, J.E., *Bovine theca and granulosa cells interact to promote androgen production*. *Biology of Reproduction*, 1986. **35**(2): p. 292-9.
38. Donaldson, L.E. and W. Hansel, *Cystic corpora lutea and normal and cystic graafian follicles in the cow*. *Australian Veterinary Association*, 1968. **44**(7): p. 304-8.
39. Dufour, J., O.J. Ginther, and L.E. Casida, *Intraovarian relationship between corpora lutea and ovarian follicles in ewes*. *American Journal of Veterinary Research*, 1972. **33**(7): p. 1145-6.

40. Rajakoski, E., *The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special reference to seasonal, cyclical, and left-right variations*. Acta Endocrinologica. Supplementum, 1960. **34(Suppl 52)**: p. 1-68.
41. Swanson, L.V., H.D. Hafs, and D.A. Morrow, *Ovarian characteristics and serum LH, prolactin, progesterone and glucocorticoid from first estrus to breeding size in Holstein heifers*. Journal of Animal Science, 1972. **34(2)**: p. 284-93.
42. Matton, P., et al., *Growth and replacement of the bovine ovarian follicles during the estrous cycle*. Journal of Animal Science, 1981. **52(4)**: p. 813-20.
43. Bane, A. and E. Rajakoski, *The bovine estrous cycle*. The Cornell Veterinarian, 1961. **51**: p. 77-95.
44. Fortune, J., J. Sirois, and S. Quirk, *The growth and differentiation of ovarian follicles during the bovine estrous cycle*. Theriogenology, 1988. **29**.
45. Sirois, J. and J. Fortune, *Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography*. Biology of Reproduction, 1988. **39(2)**: p. 308-317.
46. Bo, G.A., P.S. Baruselli, and M.F. Martinez, *Pattern and manipulation of follicular development in Bos indicus cattle*. Animal Reproduction Science, 2003. **78(3-4)**: p. 307-26.
47. Taylor, C. and R. Rajamahendran, *Follicular dynamics, corpus luteum growth and regression in lactating dairy cattle*. Canadian Journal of Animal Science, 1991. **71(1)**: p. 61-68.
48. Townson, D.H., et al., *Relationship of fertility to ovarian follicular waves before breeding in dairy cows*. Journal of Animal Science, 2002. **80(4)**: p. 1053-8.

49. Adams, G.P., *Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants*. Journal of Reproduction and Fertility. Supplement, 1999. **54**: p. 17-32.
50. Evans, A.C., G.P. Adams, and N.C. Rawlings, *Follicular and hormonal development in prepubertal heifers from 2 to 36 weeks of age*. Journal of Reproduction and Fertility, 1994. **102**(2): p. 463-70.
51. Ginther, O.J., et al., *Selection of the dominant follicle in cattle*. Biology of Reproduction, 1996. **55**(6): p. 1187-94.
52. Roche, J.F., *Control and regulation of folliculogenesis--a symposium in perspective*. Reviews of Reproduction, 1996. **1**(1): p. 19-27.
53. Hillier, S.G., *Gonadotropic control of ovarian follicular growth and development*. Molecular and Cellular Endocrinology, 2001. **179**(1-2): p. 39-46.
54. Wandji, S.A., et al., *Initiation in vitro of growth of bovine primordial follicles*. Biology of Reproduction, 1996. **55**(5): p. 942-8.
55. Elvin, J. and M. Matzuk, *Mouse models of ovarian failure*. Reviews of Reproduction, 1998. **3**(3): p. 183-195.
56. Ginther, O.J., J.P. Kastelic, and L. Knopf, *Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle*. Animal Reproduction Science, 1989. **20**(3): p. 187-200.
57. Hirshfield, A.N., *Rescue of atretic follicles in vitro and in vivo*. Biology of Reproduction, 1989. **40**(1): p. 181-90.
58. Young, J.M. and A.S. McNeilly, *Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle*. Reproduction, 2010. **140**(4): p. 489-504.

59. Kruip, T.A. and S.J. Dieleman, *Macroscopic classification of bovine follicles and its validation by micromorphological and steroid biochemical procedures*. *Reproduction, Nutrition, Development*, 1982. **22**(3): p. 465-73.
60. Mariana, J.C., et al., *Folliculogenesis*, in *Reproduction in Domestic Animals*, C. P.T., Editor. 1991, Academic Press: San Diego. p. 119-171.
61. Richards, J.S., et al., *Ovulation: new dimensions and new regulators of the inflammatory-like response*. *Annual Review of Physiology*, 2002. **64**: p. 69-92.
62. Irving-Rodgers, H.F. and R.J. Rodgers, *Extracellular matrix in ovarian follicular development and disease*. *Cell and Tissue Research*, 2005. **322**(1): p. 89-98.
63. Mlynarcikova, A., et al., *Effects of selected endocrine disruptors on meiotic maturation, cumulus expansion, synthesis of hyaluronan and progesterone by porcine oocyte-cumulus complexes*. *Toxicol In Vitro*, 2009. **23**(3): p. 371-7.
64. Niswender, G.D., et al., *Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum*. *Physiological Reviews*, 2000. **80**(1): p. 1-29.
65. Stocco, C., C. Telleria, and G. Gibori, *The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression*. *Endocrine Reviews*, 2007. **28**(1): p. 117-49.
66. Bachelot, A. and N. Binart, *Corpus luteum development: lessons from genetic models in mice*. *Current Topics in Developmental Biology*, 2005. **68**: p. 49-84.
67. Hoffmann, B., et al., *Luteotrophic factors in the cow: evidence for LH rather than prolactin* *Journal of Reproduction and Fertility*, 1974. **40**(1): p. 77-85.
68. Banu, S.K., et al., *Molecular cloning and spatio-temporal expression of the prostaglandin transporter: a basis for the action of prostaglandins in the bovine*

- reproductive system*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**(20): p. 11747-52.
69. McCracken, J.A., E.E. Custer, and J.C. Lamsa, *Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event*. Physiological Reviews, 1999. **79**(2): p. 263-323.
70. Saumande, J., *La production d'embryons chez les bovins: quelles voies de recherches pour augmenter l'efficacité des traitements de superovulation*. INRA Production Animal, 1995. **8**(4): p. 275-283.
71. Richards, J.S., *Hormonal control of gene expression in the ovary*. Endocrine Reviews, 1994. **15**(6): p. 725-51.
72. Hunter, M.G., et al., *Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species*. Animal Reproduction Science, 2004. **82-83**: p. 461-77.
73. Richards, J.S., *Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation*. Physiological Reviews, 1980. **60**(1): p. 51-89.
74. Fortune, J.E., *The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles*. Animal Reproduction Science, 2003. **78**(3): p. 135-163.
75. Smith, M.F., E.W. McIntush, and G.W. Smith, *Mechanisms associated with corpus luteum development*. Journal of Animal Science, 1994. **72**(7): p. 1857-72.
76. Lopata, A. and D.L. Hay, *The potential of early human embryos to form blastocysts, hatch from their zona and secrete HCG in culture*. Human Reproduction 1989. **4**(8 Suppl): p. 87-94.



77. Hoshina, M., et al., *Linkage of human chorionic gonadotrophin and placental lactogen biosynthesis to trophoblast differentiation and tumorigenesis*. *Placenta*, 1985. **6**(2): p. 163-72.
78. Antczak, D.F., et al., *The equine endometrial cup reaction: A fetomaternal signal of significance*. *The Annual Review of Animal Biosciences*, 2013. **8**(1): p. 1-8.
79. Allen, W.R. and R.M. Moor, *The origin of the equine endometrial cups. I. Production of PMSG by fetal trophoblast cells*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1972. **29**(2): p. 313-6.
80. Papkoff, H., *Variations in the properties of equine chorionic gonadotropin*. *Theriogenology*, 1981. **15**(1): p. 1-11.
81. Bousfield, G.R., et al., *Structural studies on equine glycoprotein hormones. Amino acid sequence of equine lutropin beta-subunit*. *Journal of Biological Chemistry*, 1987. **262**(18): p. 8610-20.
82. Murphy, B.D. and S.D. Martinuk, *Equine chorionic gonadotropin*. *Endocrine Reviews*, 1991. **12**(1): p. 27-44.
83. Papkoff, H., *Chemical and biological properties of the subunits of pregnant mare serum gonadotropin*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1974. **58**(2): p. 397-404.
84. Licht, P., et al., *Biological and binding activities of equine pituitary gonadotrophins and pregnant mare serum gonadotropin*. *The Journal of Endocrinology*, 1979. **83**(3): p. 311-22.

85. Sugino, H., et al., *Structural studies on equine glycoprotein hormones. Amino acid sequence of equine chorionic gonadotropin beta-subunit*. The Journal of Biological Chemistry, 1987. **262**(18): p. 8603-9.
86. Stewart, F. and W.R. Allen, *The binding of FSH, LH and PMSG to equine gonadal tissues*. Journal of Reproduction and Fertility. Supplement, 1979(27): p. 431-40.
87. Amoroso, E.C., J.L. Hancock, and I.W. Rowlands, *Ovarian activity in the pregnant mare*. Nature, 1948. **161**(4088): p. 355.
88. Stewart, F., W.R. Allen, and R.M. Moor, *Pregnant mare serum gonadotrophin: ratio of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone activities measured by radioreceptor assay*. The Journal of Endocrinology, 1976. **71**(3): p. 471-82.
89. Cahoreau, C. and Y. Combarous, *Comparison of two reference preparations for horse chorionic gonadotrophin in four in-vivo and in-vitro assays*. Journal of Reproduction and Fertility, 1987. **79**(1): p. 281-7.
90. Cole, H. and G. Hart, *The potency of blood serum of mares in progressive stages of pregnancy in effecting the sexual maturity of the immature rat*. American Journal of Physiology--Legacy Content, 1930. **93**(1): p. 57-68.
91. Matteri, R.L., et al., *Comparison of the properties of highly purified equine chorionic gonadotropin isolated from commercial concentrates of pregnant mare serum and endometrial cups*. Domestic Animal Endocrinology, 1986. **3**(1): p. 39-48.
92. Manning, A.W., et al., *Genetic and temporal variation in serum concentrations and biological activity of horse chorionic gonadotrophin*. Journal of Reproduction and Fertility. Supplement, 1987. **35**: p. 389-97.
93. Christin-Maitre, S., et al., *Bioassays of gonadotropins*. Methods, 2000. **21**(1): p. 51-7.

94. Jia, X.C. and A.J. Hsueh, *Granulosa cell aromatase bioassay for follicle-stimulating hormone: validation and application of the method*. *Endocrinology*, 1986. **119**(4): p. 1570-7.
95. Murphy, B.D., et al., *Variability in gonadotrophin preparations as a factor in the superovulatory response*. *Theriogenology*, 1984. **21**(1): p. 117-125.
96. Padmanabhan, V., S.C. Chappel, and I.Z. Beitins, *An improved in vitro bioassay for follicle-stimulating hormone (FSH): suitable for measurement of FSH in unextracted human serum*. *Endocrinology*, 1987. **121**(3): p. 1089-98.
97. Albanese, C., et al., *Development of a bioassay for FSH using a recombinant human FSH receptor and a cAMP responsive luciferase reporter gene*. *Molecular Cellular Endocrinology*, 1994. **101**(1-2): p. 211-9.
98. Campbell, B.K., R.J. Scaramuzzi, and R. Webb, *Control of antral follicle development and selection in sheep and cattle*. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 1995. **49**: p. 335-50.
99. Armstrong, D.G. and R. Webb, *Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins*. *Reviews of Reproduction*, 1997. **2**(3): p. 139-46.
100. Spicer, L.J., J.L. Voge, and D.T. Allen, *Insulin-like growth factor-II stimulates steroidogenesis in cultured bovine thecal cells*. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2004. **227**(1-2): p. 1-7.
101. Lucy, M.C., *Growth hormone regulation of follicular growth*. *Reproduction, Fertility, and Development*, 2011. **24**(1): p. 19-28.

102. Chander, H., et al., *Skp2B overexpression alters a prohibitin-p53 axis and the transcription of PAPP-A, the protease of insulin-like growth factor binding protein 4*. PLoS One, 2011. **6**(8): p. e22456.
103. Schams, D., et al., *Possible role of growth hormone, IGFs, and IGF-binding proteins in the regulation of ovarian function in large farm animals*. Domestic Animal Endocrinology, 1999. **17**(2-3): p. 279-85.
104. Kwintkiewicz, J. and L.C. Giudice, *The interplay of insulin-like growth factors, gonadotropins, and endocrine disruptors in ovarian follicular development and function*. Seminars in Reproductive Medicine, 2009. **27**(1): p. 43-51.
105. Samoto, T., et al., *Insulin receptor expression in follicular and stromal compartments of the human ovary over the course of follicular growth, regression and atresia*. Endocrine Journal, 1993. **40**(6): p. 715-26.
106. Spicer, L.J., et al., *Effect of resistin on granulosa and theca cell function in cattle*. Animal Reproduction Science, 2011. **124**(1-2): p. 19-27.
107. Fortune, J.E., *Ovarian follicular growth and development in mammals*. Biology of Reproduction, 1994. **50**(2): p. 225-32.
108. Gibbons, J.R., M.C. Wiltbank, and O.J. Ginther, *Relationship between follicular development and the decline in the follicle-stimulating hormone surge in heifers*. Biology of Reproduction, 1999. **60**(1): p. 72-7.
109. Ginther, O.J., et al., *Follicle selection in monovular species*. Biology of Reproduction, 2001. **65**(3): p. 638-47.

110. Evans, A. and J. Fortune, *Selection of the dominant follicle in cattle occurs in the absence of differences in the expression of messenger ribonucleic acid for gonadotropin receptors*. *Endocrinology*, 1997. **138**(7): p. 2963-2971.
111. Massague, J., J. Seoane, and D. Wotton, *Smad transcription factors*. *Genes and Development*, 2005. **19**(23): p. 2783-810.
112. Derynck, R. and X.H. Feng, *TGF-beta receptor signaling*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1997. **1333**(2): p. F105-50.
113. Roberts, A.B., *Molecular and cell biology of TGF-beta*. *Mineral and Electrolyte Metabolism*, 1998. **24**(2-3): p. 111-9.
114. Carabatsos, M.J., et al., *Characterization of oocyte and follicle development in growth differentiation factor-9-deficient mice*. *Developmental Biology*, 1998. **204**(2): p. 373-84.
115. Yan, C., et al., *Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function*. *Molecular Endocrinology*, 2001. **15**(6): p. 854-66.
116. Smitz, J. and R. Cortvrindt, *Inhibin A and B secretion in mouse preantral follicle culture*. *Human Reproduction*, 1998. **13**(4): p. 927-35.
117. Zhao, J., et al., *Effect of activin A on in vitro development of rat preantral follicles and localization of activin A and activin receptor II*. *Biology of Reproduction*, 2001. **65**(3): p. 967-77.
118. Harrington, A.E., et al., *Structural basis for the inhibition of activin signalling by follistatin*. *EMBO Journal*, 2006. **25**(5): p. 1035-45.

119. Thompson, T.B., et al., *The structure of the follistatin:activin complex reveals antagonism of both type I and type II receptor binding*. *Developmental Cell*, 2005. **9**(4): p. 535-43.
120. Lerch, T.F., et al., *The structures that underlie normal reproductive function*. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2007. **267**(1-2): p. 1-5.
121. Sharma, G.T., P.K. Dubey, and G.S. Kumar, *Effects of IGF-1, TGF-alpha plus TGF-beta(1) and bFGF on in vitro survival, growth and apoptosis in FSH-stimulated buffalo (Bubalis bubalus) preantral follicles*. *Growth Hormone and IGF Research*, 2010.
122. Jiang, Z. and C.A. Price, *Differential actions of fibroblast growth factors on intracellular pathways and target gene expression in bovine ovarian granulosa cells*. *Reproduction*, 2012. **144**(5): p. 625-32.
123. Park, J.Y., et al., *EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle*. *Science*, 2004. **303**(5658): p. 682-4.
124. Shimada, M., et al., *Paracrine and autocrine regulation of epidermal growth factor-like factors in cumulus oocyte complexes and granulosa cells: key roles for prostaglandin synthase 2 and progesterone receptor*. *Molecular Endocrinology*, 2006. **20**(6): p. 1352-1365.
125. Hsieh, M., et al., *Luteinizing hormone-dependent activation of the epidermal growth factor network is essential for ovulation*. *Molecular and Cellular Biology*, 2007. **27**(5): p. 1914-24.
126. Silva, C.M.G., et al., *The effects of epidermal growth factor (EGF) on the in vitro development of isolated goat secondary follicles and the relative mRNA expression of*

- EGF, EGF-R, FSH-R and P450 aromatase in cultured follicles*. Research in Veterinary Science, 2013. **94**(3): p. 453-461.
127. Robker, R.L., et al., *Progesterone-regulated genes in the ovulation process: ADAMTS-1 and cathepsin L proteases*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. **97**(9): p. 4689-94.
128. Sirois, J., et al., *Cyclooxygenase-2 and its role in ovulation: a 2004 account*. Human Reproduction Update, 2004. **10**(5): p. 373-85.
129. Takahashi, T., et al., *Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin E(2) directs oocyte maturation by differentially influencing multiple signaling pathways*. The Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(48): p. 37117-29.
130. Nilsson, E.E. and M.K. Skinner, *Kit ligand and basic fibroblast growth factor interactions in the induction of ovarian primordial to primary follicle transition*. Molecular and Cellular Endocrinology, 2004. **214**(1-2): p. 19-25.
131. Kezele, P., E.E. Nilsson, and M.K. Skinner, *Keratinocyte growth factor acts as a mesenchymal factor that promotes ovarian primordial to primary follicle transition*. Biology of Reproduction, 2005. **73**(5): p. 967-73.
132. Silva, J.M., et al., *Control of oestradiol secretion and of cytochrome P450 aromatase messenger ribonucleic acid accumulation by FSH involves different intracellular pathways in oestrogenic bovine granulosa cells in vitro*. Reproduction, 2006. **132**(6): p. 909-17.
133. Nilsson, E.E. and M.K. Skinner, *Bone morphogenetic protein-4 acts as an ovarian follicle survival factor and promotes primordial follicle development*. Biology of Reproduction, 2003. **69**(4): p. 1265-72.

134. Lee, W.S., et al., *Effect of bone morphogenetic protein-7 on folliculogenesis and ovulation in the rat*. *Biology of Reproduction*, 2001. **65**(4): p. 994-9.
135. Bodensteiner, K.J., et al., *Molecular cloning of the ovine growth/differentiation factor-9 gene and expression of growth/differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries*. *Biology of Reproduction*, 1999. **60**(2): p. 381-6.
136. Nilsson, E., N. Rogers, and M.K. Skinner, *Actions of anti-Mullerian hormone on the ovarian transcriptome to inhibit primordial to primary follicle transition*. *Reproduction*, 2007. **134**(2): p. 209-21.
137. Jackowska, M., et al., *Differential expression of GDF9, TGFBI, TGFB2 and TGFB3 in porcine oocytes isolated from follicles of different size before and after culture in vitro*. *Acta Veterinaria Hungarica*, 2013. **61**(1): p. 99-115.
138. Driancourt, M.A., et al., *Roles of KIT and KIT LIGAND in ovarian function*. *Reviews of Reproduction*, 2000. **5**(3): p. 143-52.
139. Campbell, B.K., *The modulation of gonadotrophic hormone action on the ovary by paracrine and autocrine factors*. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 1999. **28**(4): p. 247-51.
140. Otsuka, F., et al., *Bone morphogenetic protein-15. Identification of target cells and biological functions*. *Journal of Biological Chemistry*, 2000. **275**(50): p. 39523-8.
141. Shiina, H., et al., *Premature ovarian failure in androgen receptor-deficient mice*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006. **103**(1): p. 224-9.
142. Gougeon, A., *Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses*. *Endocrine Reviews*, 1996. **17**(2): p. 121-55.



143. Weil, S., et al., *Androgen and follicle-stimulating hormone interactions in primate ovarian follicle development*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 1999. **84**(8): p. 2951-6.
144. Garverick, H.A., et al., *Regulation of expression of ovarian mRNA encoding steroidogenic enzymes and gonadotrophin receptors by FSH and GH in hypogonadotrophic cattle*. Reproduction, 2002. **123**(5): p. 651-61.
145. Bao, B., et al., *Changes in messenger ribonucleic acid encoding luteinizing hormone receptor, cytochrome P450-side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles*. Biology of Reproduction, 1997. **56**(5): p. 1158-68.
146. Xu, Z., et al., *Expression of messenger ribonucleic acid encoding cytochrome P450 side-chain cleavage, cytochrome p450 17 alpha-hydroxylase, and cytochrome P450 aromatase in bovine follicles during the first follicular wave*. Endocrinology, 1995. **136**(3): p. 981-9.
147. Dizerega, G.S. and G.D. Hodgen, *Folliculogenesis in the primate ovarian cycle*. Endocrine reviews, 1981. **2**: p. 27-49.
148. Durlinger, A.L., et al., *Anti-Mullerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary*. Endocrinology, 2001. **142**(11): p. 4891-9.
149. Visser, J.A. and A.P. Themmen, *Anti-Mullerian hormone and folliculogenesis*. Molecular and Cellular Endocrinology, 2005. **234**(1-2): p. 81-6.
150. Zeleznik, A. and D.F. Benyo, *Control of follicular development, corpus luteum function, and the recognition of pregnancy in higher primates*. The Physiology of Reproduction. Vol. 2. 1994. 751-782.

151. Gougeon, A., *La croissance folliculaire dans l'ovaire humain*. Médecine Clinique Endocrinologie et Diabète, 2011.
152. Yong, E.L., et al., *Hormonal regulation of the growth and steroidogenic function of human granulosa cells*. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 1992. **74**(4): p. 842-9.
153. Berndtson, A.K., S.E. Vincent, and J.E. Fortune, *Low and high concentrations of gonadotropins differentially regulate hormone production by theca interna and granulosa cells from bovine preovulatory follicles*. Biology of Reproduction, 1995. **52**(6): p. 1334-42.
154. Ginther, O.J., et al., *Selection of the dominant follicle in cattle: role of estradiol*. Biology of Reproduction, 2000. **63**(2): p. 383-9.
155. Vanselow, J., et al., *Cattle and sheep use different promoters to direct the expression of the aromatase cytochrome P450 encoding gene, Cyp19, during pregnancy*. Domestic Animal Endocrinology, 2004. **27**(2): p. 99-114.
156. Willis, D.S., et al., *Premature response to luteinizing hormone of granulosa cells from anovulatory women with polycystic ovary syndrome: relevance to mechanism of anovulation*. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 1998. **83**(11): p. 3984-91.
157. Stock, A.E. and J.E. Fortune, *Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters*. Endocrinology, 1993. **132**(3): p. 1108-14.

158. Peng, X.R., et al., *Localization of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in ovarian cell types during follicle development and ovulation*. *Endocrinology*, 1991. **129**(6): p. 3200-7.
159. Ashkenazi, H., et al., *Epidermal growth factor family members: endogenous mediators of the ovulatory response*. *Endocrinology*, 2005. **146**(1): p. 77-84.
160. Sekiguchi, T., et al., *Expression of epiregulin and amphiregulin in the rat ovary*. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2004. **33**(1): p. 281-91.
161. Knight, P.G. and C. Glister, *TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development*. *Reproduction*, 2006. **132**(2): p. 191-206.
162. Pepe, J.G. and D.E. Albrecht, *Endocrinology of pregnancy (Steroid Endocrinology of pregnancy)*. The Global Library of Women's Medicine, 2008. (ISSN: 1756-2228) **2008**; DOI 10.3843/GLOWM.10311.
163. Bulun, S.E., et al., *Regulation of aromatase expression in estrogen-responsive breast and uterine disease: from bench to treatment*. *Pharmacological Reviews*, 2005. **57**(3): p. 359-383.
164. Van Voorhis, B., *Follicular development*. *Encyclopedia of Reproduction*, 1999. **2**(Knobil E. and Neill JD. California. Academic Press): p. 376-389.
165. Brown, T., *Steroid hormones, overview*. *Encyclopedia of Reproduction*, 1999. **4**(E. Knobil, J. Neill (Eds.). Academic Press, New York): p. 6354–6644.
166. Gore-Langton, R. and D. Armstrong, *Follicular steroidogenesis and its control*. *The physiology of Reproduction*, 1994. **1**: p. 571-627.
167. Webb, R., et al., *Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle*. *Reproduction Supplement*, 2003. **61**: p. 71-90.

168. Abbaszade, I., et al., *Isolation of a new mouse 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase isoform, 3beta-HSD VI, expressed during early pregnancy*. *Endocrinology*, 1997. **138**: p. 1392 - 1399.
169. Bao, B., et al., *Expression of messenger ribonucleic acid (mRNA) encoding 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase delta4,delta5 isomerase (3beta-HSD) during recruitment and selection of bovine ovarian follicles: identification of dominant follicles by expression of 3beta-HSD mRNA within the granulosa cell layer*. *Biology of Reproduction*, 1997. **56**(6): p. 1466-73.
170. Ghersevich, S.A., et al., *Expression of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in human granulosa cells: correlation with follicular size, cytochrome P450 aromatase activity and oestradiol production*. *The Journal of Endocrinology*, 1994. **143**(1): p. 139-50.
171. Ghersevich, S.A., et al., *Expression of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the rat ovary during follicular development and luteinization induced with pregnant mare serum gonadotrophin and human chorionic gonadotrophin*. *The Journal of Endocrinology*, 1994. **140**(3): p. 409-17.
172. Sahmi, M., et al., *Expression of 17beta- and 3beta-hydroxysteroid dehydrogenases and steroidogenic acute regulatory protein in non-luteinizing bovine granulosa cells in vitro*. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2004. **223**(1-2): p. 43-54.
173. Sasano, H., et al., *Immunolocalization of aromatase, 17 alpha-hydroxylase and side-chain-cleavage cytochromes P-450 in the human ovary*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1989. **85**(1): p. 163-9.
174. Simpson, E.r., et al., *Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis*. *Endocrine Reviews*, 1994. **15**(3): p. 342-355.

175. Conley, A. and M. Hinshelwood, *Mammalian aromatases*. *Reproduction*, 2001. **121**(5): p. 685-695.
176. Skinner, M.K., *Regulation of primordial follicle assembly and development*. *Human Reproduction Update*, 2005. **11**(5): p. 461-71.
177. Adams, G.P., et al., *Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1992. **94**(1): p. 177-88.
178. Lecureuil, C., et al., *[Does FSH signaling have a gender?]*. *Medecine Sciences : M/S*, 2007. **23**(1): p. 75-80.
179. Zhou, J., et al., *Insulin-like growth factor I regulates gonadotropin responsiveness in the murine ovary*. *Molecular Endocrinology*, 1997. **11**(13): p. 1924-33.
180. Park, Y., et al., *Induction of cyclin D2 in rat granulosa cells requires FSH-dependent relief from FOXO1 repression coupled with positive signals from Smad*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005. **280**(10): p. 9135-48.
181. Richards, J.S., et al., *Expression of FKHR, FKHL1, and AFX genes in the rodent ovary: evidence for regulation by IGF-I, estrogen, and the gonadotropins*. *Molecular Endocrinology* 2002. **16**(3): p. 580-99.
182. Davis, J.S., et al., *Luteinizing hormone stimulates the formation of inositol trisphosphate and cyclic AMP in rat granulosa cells*. *Biochemical Journal*, 1986. **238**: p. 597-604.
183. Voss, A.K. and J.E. Fortune, *Levels of messenger ribonucleic acid for cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase and P450 aromatase in preovulatory bovine follicles decrease after the luteinizing hormone surge*. *Endocrinology*, 1993. **132**(5): p. 2239-45.

184. Doody, K.J., et al., *Expression of Messenger Ribonucleic Acid Species Encoding Steroidogenic Enzymes in Human Follicles and Corpora Lutea throughout the Menstrual Cycle*. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 1990. **70**(4): p. 1041-1045.
185. Hickey, G.J., et al., *Hormonal Regulation, Tissue Distribution, and Content of Aromatase Cytochrome P450 Messenger Ribonucleic Acid and Enzyme in Rat Ovarian Follicles and Corpora Lutea: Relationship to Estradiol Biosynthesis*. Endocrinology, 1988. **122**(4): p. 1426-1436.
186. Goldammer, T., et al., *Chromosomal mapping of the bovine aromatase gene (CYP19) and an aromatase pseudogene to chromosome 10 and syntenic group U5*. Mammalian Genome, 1994. **5**(12): p. 822-3.
187. Harada, N., et al., *Structural characterization of the human estrogen synthetase (aromatase) gene*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1990. **166**(1): p. 365-72.
188. !!! INVALID CITATION !!!
189. Conley, A., et al., *Porcine aromatases: studies on tissue-specific, functionally distinct isozymes from a single gene?* The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 1997. **61**(3-6): p. 407-13.
190. Shen, P., et al., *Isolation and characterization of a zebra finch aromatase cDNA: in situ hybridization reveals high aromatase expression in brain*. Brain Research. Molecular Brain Research, 1994. **24**(1-4): p. 227-37.

191. Furbass, R., C. Kalbe, and J. Vanselow, *Tissue-specific expression of the bovine aromatase-encoding gene uses multiple transcriptional start sites and alternative first exons*. *Endocrinology*, 1997. **138**(7): p. 2813-9.
192. Soumano, K., et al., *Follicular 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and cytochromes P450 17 alpha-hydroxylase and aromatase messenger ribonucleic acids in cattle undergoing superovulation*. *Biology of Reproduction*, 1996. **55**(6): p. 1419-1426.
193. Vanselow, J. and R. Furbass, *Novel aromatase transcripts from bovine placenta contain repeated sequence motifs*. *Gene*, 1995. **154**(2): p. 281-6.
194. Hickey, G.J., et al., *Aromatase cytochrome P450 in rat ovarian granulosa cells before and after luteinization: Adenosine 3',5'-monophosphate-dependent and independent regulation. Cloning and sequencing of rat aromatase cDNA and 5' genomic DNA*. *Molecular Endocrinology*, 1990. **4**(1): p. 3-12.
195. Mendelson, C.R. and E.R. Simpson, *Regulation of estrogen biosynthesis by human adipose cells in vitro*. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 1987. **52**(3): p. 169-176.
196. Corbin, C.J., M.W. Khalil, and A.J. Conley, *Functional ovarian and placental isoforms of porcine aromatase*. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 1995. **113**(1): p. 29-37.
197. Hinshelwood, M.M., et al., *Isolation and characterization of a complementary deoxyribonucleic acid insert encoding bovine aromatase cytochrome P450*. *Endocrinology*, 1993. **133**(5): p. 1971-7.
198. Honda, S.-i., et al., *Disruption of sexual behavior in male aromatase-deficient mice lacking exons 1 and 2 of the cyp19Gene*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1998. **252**(2): p. 445-449.

199. Britt, K.L., et al., *An age-related ovarian phenotype in mice with targeted disruption of the Cyp 19 (aromatase) gene*. *Endocrinology*, 2000. **141**(7): p. 2614-2623.
200. Robertson, K.M., et al., *Impairment of spermatogenesis in mice lacking a functional aromatase (cyp 19) gene*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999. **96**(14): p. 7986-7991.
201. Sasano, H. and N. Harada, *Intratumoral aromatase in human breast, endometrial, and ovarian malignancies*. *Endocrine Reviews*, 1998. **19**(5): p. 593-607.
202. Zeitoun, K.M. and S.E. Bulun, *Aromatase: a key molecule in the pathophysiology of endometriosis and a therapeutic target*. *Fertility and Sterility*, 1999. **72**(6): p. 961-969.
203. Balthazart, J. and G.F. Ball, *New insights into the regulation and function of brain estrogen synthase (aromatase)*. *Trends in Neurosciences*, 1998. **21**(6): p. 243-9.
204. Harada, N., et al., *Localized Expression of Aromatase in Human Vascular Tissues*. *Circulation Research*, 1999. **84**(11): p. 1285-1291.
205. Marshall, D.E., et al., *Studies into aromatase activity associated with fetal allantochorionic and maternal endometrial tissues of equine placenta. Identification of metabolites by gas chromatography mass spectrometry*. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 1996. **59**(3-4): p. 281-96.
206. Perry, J.S., R.B. Heap, and E.C. Amoroso, *Steroid hormone production by pig blastocysts*. *Nature*, 1973. **245**(5419): p. 45-7.
207. Carreau, S., et al., *Estrogen signaling in testicular cells*. *Life Sciences*, 2011. **89**(15-16): p. 584-587.
208. Carreau, S., et al., *Aromatase expression and role of estrogens in male gonad : a review*. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2003. **1**: p. 35.



209. Vanselow, J., et al., *Placenta-specific transcripts of the aromatase encoding gene include different untranslated first exons in sheep and cattle*. European Journal of Biochemistry, 1999. **265**(1): p. 318-24.
210. Vanselow, J., et al., *Expression of the aromatase cytochrome P450 encoding gene in cattle and sheep*. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2001. **79**(1-5): p. 279-88.
211. Simpson, E.R., et al., *Aromatase—a brief overview* Annual Review of Physiology, 2002. **64**(1): p. 93-127.
212. Honda, S., N. Harada, and Y. Takagi, *The alternative exons 1 of the mouse aromatase cytochrome P-450 gene*. Biochimica et Biophysica Acta, 1996. **1305**(3): p. 145-50.
213. Lee, L., et al., *Changes in histone modification and DNA methylation of the StAR and Cyp19a1 promoter regions in granulosa cells undergoing luteinization during ovulation in rats*. Endocrinology, 2013. **154**(1): p. 458-470.
214. Nan, X., et al., *Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex*. Nature, 1998. **393**(6683): p. 386-9.
215. Simpson, E.R., *Aromatase: biologic relevance of tissue-specific expression*. Seminars in Reproductive Medicine, 2004. **22**(1): p. 11-23.
216. Roselli, C.E. and J.A. Resko, *Aromatase activity in the rat brain: hormonal regulation and sex differences*. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 1993. **44**(4-6): p. 499-508.
217. Stocco, C., *Tissue physiology and pathology of aromatase*. Steroids, 2012. **77**(1–2): p. 27-35.

218. Gutiérrez, C.G., B.K. Campbell, and R. Webb, *Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle-stimulating hormone, and morphological characteristics*. *Biology of Reproduction*, 1997. **56**(3): p. 608-616.
219. Rouillier, P., et al., *Follicle-stimulating hormone-induced estradiol and progesterone production by bovine antral and mural granulosa cells cultured in vitro in a completely defined medium*. *Journal of Animal Science*, 1996. **74**(12): p. 3012-9.
220. Silva, J.M. and C.A. Price, *Effect of follicle-stimulating hormone on steroid secretion and messenger ribonucleic acids encoding cytochromes P450 aromatase and cholesterol side-chain cleavage in bovine granulosa cells in vitro*. *Biology of Reproduction*, 2000. **62**(1): p. 186-91.
221. Steinkampf, M.P., C.R. Mendelson, and E.R. Simpson, *Regulation by Follicle-Stimulating Hormone of the synthesis of aromatase cytochrome P-450 in human granulosa cells*. *Molecular Endocrinology*, 1987. **1**(7): p. 465-471.
222. Stocco, C., *Aromatase expression in the ovary: Hormonal and molecular regulation*. *Steroids*, 2008. **73**(5): p. 473-487.
223. Silva, J.M. and C.A. Price, *Insulin and IGF-I are necessary for FSH-induced cytochrome P450 aromatase but not cytochrome P450 side-chain cleavage gene expression in oestrogenic bovine granulosa cells in vitro*. *The Journal of Endocrinology*, 2002. **174**(3): p. 499-507.
224. Mani, A.M., et al., *IGF1 induces up-regulation of steroidogenic and apoptotic regulatory genes via activation of phosphatidylinositol-dependent kinase/AKT in bovine granulosa cells*. *Reproduction*, 2010. **139**(1): p. 139-51.

225. McNatty, K.P., et al., *Some aspects of thecal and granulosa cell function during follicular development in the bovine ovary*. Journal of Reproduction and Fertility, 1984. **72**(1): p. 39-53.
226. Hinshelwood, M.M., M.D. Michael, and E.R. Simpson, *The 5'-flanking region of the ovarian promoter of the bovine CYP19 gene contains a deletion in a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-like responsive sequence*. Endocrinology, 1997. **138**(9): p. 3704-10.
227. Michael, M.D., L.F. Michael, and E.R. Simpson, *A CRE-like sequence that binds CREB and contributes to cAMP-dependent regulation of the proximal promoter of the human aromatase P450 (CYP19) gene*. Molecular and Cellular Endocrinology, 1997. **134**(2): p. 147-156.
228. Stocco, C., J. Kwintkiewicz, and Z. Cai, *Identification of regulatory elements in the Cyp19 proximal promoter in rat luteal cells*. Journal of Molecular Endocrinology, 2007. **39**(4): p. 211-221.
229. Lala, D.S., D.A. Rice, and K.L. Parker, *Steroidogenic factor I, a key regulator of steroidogenic enzyme expression, is the mouse homolog of fushi tarazu-factor I*. Molecular Endocrinology, 1992. **6**(8): p. 1249-58.
230. Hinshelwood, M.M., et al., *Temporal and spatial expression of liver receptor homologue-1 (LRH-1) during embryogenesis suggests a potential role in gonadal development*. Developmental Dynamics, 2005. **234**(1): p. 159-68.
231. Fitzpatrick, S.L. and J.S. Richards, *cis-acting elements of the rat aromatase promoter required for cyclic adenosine 3',5'-monophosphate induction in ovarian granulosa cells*

- and constitutive expression in R2C Leydig cells.* Molecular Endocrinology, 1993. **7**(3): p. 341-54.
232. Hinshelwood, M.M., et al., *Expression of LRH-1 and SF-1 in the mouse ovary: localization in different cell types correlates with differing function.* Molecular and Cellular Endocrinology, 2003. **207**(1-2): p. 39-45.
233. Michael, M.D., et al., *Ad4BP/SF-1 regulates cyclic AMP-induced transcription from the proximal promoter (P11) of the human aromatase P450 (CYP19) gene in the ovary.* The Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(22): p. 13561-6.
234. Kuo, F.T., et al., *Mutant Forkhead L2 (FOXL2) proteins associated with premature ovarian failure (POF) dimerize with wild-type FOXL2, leading to altered regulation of genes associated with granulosa cell differentiation.* Endocrinology, 2011. **152**(10): p. 3917-29.
235. Kuo, F.-T., et al., *Mouse forkhead L2 maintains repression of FSH-dependent genes in the granulosa cell.* Reproduction, 2012. **144**(4): p. 485-494.
236. Pannetier, M., et al., *FOXL2 activates P450 aromatase gene transcription: towards a better characterization of the early steps of mammalian ovarian development.* Journal of Molecular Endocrinology, 2006. **36**(3): p. 399-413.
237. Robert, N.M., J.J. Tremblay, and R.S. Viger, *Friend of GATA (FOG)-1 and FOG-2 differentially repress the GATA-dependent activity of multiple gonadal promoters.* Endocrinology, 2002. **143**(10): p. 3963-3973.
238. Tremblay, J.J. and R.S. Viger, *GATA factors differentially activate multiple gonadal promoters through conserved GATA regulatory elements.* Endocrinology, 2001. **142**(3): p. 977-986.

239. Cai, Z., et al., *Prostaglandin E2 increases cyp19 expression in rat granulosa cells: Implication of GATA-4*. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2007. **263**(1–2): p. 181-189.
240. Monga, R., et al., *Involvement of transcription factor GATA-4 in regulation of CYP19 gene during folliculogenesis and luteinization in buffalo ovary*. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*., 2012. **130**(1–2): p. 45-56.
241. Furbass, R., W. Tomek, and J. Vanselow, *Upstream stimulating factors 1 and 2 enhance transcription from the placenta-specific promoter 1.1 of the bovine cyp19 gene*. *BMC Molecular Biology*, 2010. **11**: p. 5.
242. Zhou, H., et al., *Transforming growth factor-beta inhibits aromatase gene transcription in human trophoblast cells via the Smad2 signaling pathway*. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2009. **7**: p. 146.
243. Siomi, H. and G. Dreyfuss, *RNA-binding proteins as regulators of gene expression*. *Current Opinion in Genetics & Development*, 1997. **7**(3): p. 345-53.
244. Xu, N., C.-Y.A. Chen, and A.-B. Shyu, *Versatile role for hnRNP D isoforms in the differential regulation of cytoplasmic mRNA turnover*. *Molecular and Cellular Biology*, 2001. **21**(20): p. 6960-6971.
245. Keene, J.D., *RNA regulons: coordination of post-transcriptional events*. *Nature Reviews. Genetics*, 2007. **8**(7): p. 533-43.
246. Chen, C.-Y.A. and A.-B. Shyu, *AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation*. *Trends in Biochemical Sciences*, 1995. **20**(11): p. 465-470.

247. DeMaria, C.T. and G. Brewer, *AUF1 binding affinity to A+U-rich elements correlates with rapid mRNA degradation*. The Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(21): p. 12179-84.
248. Lemaire, R., et al., *Stability of a PKCI-1-related mRNA is controlled by the splicing factor ASF/SF2: a novel function for SR proteins*. Genes & Development, 2002. **16**(5): p. 594-607.
249. Sanford, J.R., J. Ellis, and J.F. Caceres, *Multiple roles of arginine/serine-rich splicing factors in RNA processing*. Biochemical Society transactions, 2005. **33**(Pt 3): p. 443-6.
250. Wilusz, C.J., et al., *Poly(A)-binding proteins regulate both mRNA deadenylation and decapping in yeast cytoplasmic extracts*. RNA, 2001. **7**(10): p. 1416-24.
251. Van Hoof, A. and R. Parker, *Messenger RNA degradation: beginning at the end*. Current Biology, 2002. **12**(8): p. R285-R287.
252. Engels, B.M. and G. Hutvagner, *Principles and effects of microRNA-mediated post-transcriptional gene regulation*. Oncogene, 2006. **25**(46): p. 6163-9.
253. Fiedler, S.D., et al., *Hormonal regulation of MicroRNA expression in periovulatory mouse mural granulosa cells*. Biology of Reproduction, 2008. **79**(6): p. 1030-7.
254. Xu, S., et al., *Micro-RNA378 (miR-378) regulates ovarian estradiol production by targeting aromatase*. Endocrinology, 2011. **152**(10): p. 3941-51.
255. Toloubeydokhti, T., et al., *The expression and ovarian steroid regulation of endometrial micro-RNAs*. Reproductive Sciences, 2008. **15**(10): p. 993-1001.
256. Johnson, E.S., *Protein modification by SUMO*. Annual Review of Biochemistry, 2004. **73**: p. 355-82.

257. Lenz, S., et al., *Expression of the bovine aromatase cytochrome P450 gene (Cyp19) is primarily regulated by promoter 2 in bovine follicles and by promoter 1.1 in corpora lutea*. Molecular Reproduction and Development, 2004. **67**(4): p. 406-13.
258. Mu, Y.M., et al., *Combined treatment with specific ligands for PPARgamma:RXR nuclear receptor system markedly inhibits the expression of cytochrome P450arom in human granulosa cancer cells*. Molecular and Cellular Endocrinology, 2001. **181**(1-2): p. 239-48.
259. Kenealy, M.R., et al., *The 3'-untranslated region of the human estrogen receptor alpha gene mediates rapid messenger ribonucleic acid turnover*. Endocrinology, 2000. **141**(8): p. 2805-13.
260. Nair, A.K. and K.M. Menon, *Regulatory role of the 3' untranslated region of luteinizing hormone receptor: effect on mRNA stability*. FEBS Letters, 2000. **471**(1): p. 39-44.
261. Cok, S.J. and A.R. Morrison, *The 3'-untranslated region of murine cyclooxygenase-2 contains multiple regulatory elements that alter message stability and translational efficiency*. The Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(25): p. 23179-85.
262. Powell, M.J., et al., *Posttranscriptional regulation of IL-10 gene expression through sequences in the 3'-untranslated region*. Journal of Immunology, 2000. **165**(1): p. 292-6.
263. Weems, Y.S., et al., *What regulates placental steroidogenesis in 90-day pregnant ewes? Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2007. **84**(1-2): p. 54-65.
264. Zeleznik, A.J., D. Saxena, and L. Little-Ihrig, *Protein kinase B is obligatory for follicle-stimulating hormone-induced granulosa cell differentiation*. Endocrinology, 2003. **144**(9): p. 3985-94.

265. Zhou, P., et al., *IGF-I signaling is essential for FSH stimulation of AKT and steroidogenic genes in granulosa cells*. *Molecular Endocrinology*, 2013. **27**(3): p. 511-23.
266. Fitzpatrick, S.L. and J.S. Richards, *Regulation of the rat aromatase gene in ovarian granulosa cells and R2C Leydig cells*. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 1993. **44**(4-6): p. 429-33.
267. Kwintkiewicz, J., Z. Cai, and C. Stocco, *Follicle-Stimulating Hormone-Induced Activation of Gata4 Contributes in the Up-Regulation of Cyp19 Expression in Rat Granulosa Cells*. *Molecular Endocrinology*, 2007. **21**(4): p. 933-947.
268. Pisarska, M.D., et al., *Forkhead l2 is expressed in the ovary and represses the promoter activity of the steroidogenic acute regulatory gene*. *Endocrinology*, 2004. **145**(7): p. 3424-33.
269. Garcia-Gras, E.A., P. Chi, and E.A. Thompson, *Glucocorticoid-mediated destabilization of cyclin D3 mRNA involves RNA-protein interactions in the 3'-untranslated region of the mRNA*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000. **275**(29): p. 22001-8.
270. Sahmi, F., E. Nicola, and C.A. Price, *Bioassay for follicle stimulating activity of equine gonadotropic hormone in mare serum using frozen/thawed transiently transfected reporter cells*. *Theriogenology*, 2012. **78**(4): p. 724-30.