

Université de Montréal

Rôle du facteur de croissance transforming growth factor beta-1 (TGF $\beta$ 1) dans  
la synthèse d'oestradiol par les follicules ovariens bovins

par  
Yan Ouellette

Centre de recherche en reproduction animale (CRRA)  
Faculté de médecine vétérinaire

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du  
grade de PhD en sciences vétérinaires option reproduction

Décembre 2003

© Yan Ouellette, 2003



SF  
607  
U54  
2004  
V.010

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Rôle du facteur de croissance transforming growth factor beta-1 (TGF $\beta$ 1) dans  
la synthèse d'oestradiol par les follicules ovariens bovins

Présentée par :  
Yan Ouellette

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Alan K Goff, président-rapporteur  
Paul D. Carrière, directeur de recherche  
Jacques Lussier, membre du jury  
François Richard, examinateur externe  
Jean Sirois, représentant du doyen de la FES

## 1. RÉSUMÉ FRANCAIS

Depuis plusieurs années, le développement folliculaire constitue un sujet d'actualité de la recherche fondamentale et appliquée. L'évolution des connaissances a permis de mettre à jour plusieurs concepts biologiques importants. Un de ces concepts est l'implication des facteurs de croissance dans le développement des follicules ovariens. En effet, le TGF $\beta$  est un de ces facteurs qui a fait l'objet de nombreuses études, surtout in vitro, et malgré le fait que les évidences pointent vers un rôle certain du TGF $\beta$ , la nature de l'implication réelle de ce peptide n'a pas encore été totalement déterminée, d'où les motifs qui ont justifié cette étude. L'hypothèse principale est que le TGF $\beta$  module la stéroïdogénèse des follicules en croissance, ce qui influencerait le développement folliculaire et la sélection du follicule dominant. Pour ce faire, un des meilleurs modèles physiologiques pour étudier l'action des facteurs de croissance a été utilisé, soit le modèle bovin. Dans un premier temps, l'objectif était de déterminer in vivo si le TGF $\beta$  est exprimé de façon différentielle dans les follicules en croissance en voie de passer les différentes étapes de la sélection, et d'établir s'il existe des liens entre ce facteur de croissance et la sécrétion d'oestradiol. Ainsi, une technologie d'avant-garde, soit l'aspiration folliculaire assistée par échographie, a été employée chez des génisses Holstein. L'observation la plus importante de cette thèse a été démontrée dans les échantillons de liquide folliculaire prélevés à différents stades de développement de la première cohorte post-

ovulatoire de follicules antraux > 5 mm. Il a été démontré que le TGF $\beta$ 1 total est associé négativement avec la concentration d'oestradiol et le diamètre folliculaire, seulement au début de l'apparition de la cohorte, c'est-à-dire lorsque le plus gros follicule a atteint 6,5 mm de diamètre. Cette observation inédite a été renforcée par une étude in vitro. En effet, dans un second temps l'objectif était d'examiner in vitro le rôle du TGF $\beta$  sur la stéroïdogénèse en utilisant un système de culture de cellule de granulosa bovine provenant de follicules de 2 à 5 mm. Il a été démontré que les effets stimulateurs de la FSH sur la sécrétion d'oestradiol et de progestérone sont fortement inhibés par le TGF $\beta$ 1 qui agit à un site intracellulaire situé en aval de l'AMPc. Ainsi, lorsque la FSH est impliquée dans le développement des follicules, le rôle du TGF $\beta$ 1 tel que démontré dans ces études in vivo et in vitro serait de freiner la synthèse d'oestradiol ainsi que la croissance des follicules. Par conséquent, ces études suggèrent que le follicule qui renfermera le moins de TGF $\beta$ 1 dans le liquide folliculaire, lors de la montée de FSH sera celui qui aura un avantage définitif sur les autres follicules, en répondant plus favorablement à l'effet stimulateur de la FSH. Ces résultats démontrent des aspects importants du rôle du TGF $\beta$ 1 dans le réseau des interactions autocrines et paracrines des peptides régulateurs qui contrôlent la sécrétion d'oestradiol dans les follicules ovariens bovins.

Mots clés : bovin, oestradiol, progestérone, liquide folliculaire, follicule, échographie, aspiration, granulosa, déviation, sélection

## 2. RÉSUMÉ ANGLAIS

For many years, follicular development has been an exciting subject of fundamental and applied research. The evolution of our knowledge has elucidated many important biological concepts. One of these concepts is the implication of growth factors in ovarian follicular development. Indeed, TGF $\beta$  is one factor that has attracted a lot of interest and has been the subject of many studies, mostly done in vitro. Despite the fact that evidence pointed towards a definitive role of TGF $\beta$  in follicular development, the real implication of this peptide has not yet been elucidated, and thus constitutes the reason for conducting this study. The main hypothesis is that TGF $\beta$  modulates steroidogenesis of growing follicles, which would influence follicular development and selection of the dominant follicle. To reach our objectives, one of the best physiological models to study the action of growth factors in ovarian follicles was used, which is the bovine model. The first objective was to determine in vivo if TGF $\beta$  is differentially expressed in growing follicles passing through the different steps of selection and establish if there are links between this growth factor and estradiol secretion. So, a state of the art technology, which is follicular aspiration assisted by ultrasonography, was used on Holstein heifers. The most important observation in this thesis was demonstrated in follicular fluid samples collected at different stages of development of the first post-ovulatory cohort of antral follicles > 5 mm. It was demonstrated that total TGF $\beta$ 1 is negatively associated with estradiol secretion and follicle diameter only at the beginning of development of the

cohort, when the largest follicle had reached a diameter of 6,5 mm. This observation was reinforced by an in vitro study. In fact, the second objective was to examine in vitro the role of TGF $\beta$  on steroidogenesis by using a cell culture system of granulosa cells collected from 2 to 5 mm follicles. It was demonstrated that the stimulatory effects of FSH on estradiol and progesterone secretion were strongly inhibited by TGF $\beta$ 1, which acts at an intracellular site downstream from cAMP. Thus, when FSH is implicated in follicular development, the role of TGF $\beta$ 1 is to slow down estradiol synthesis and follicle growth. Therefore, these findings suggest that the follicle that has the lowest concentration of TGF $\beta$ 1 in follicular fluid at the beginning of its development, will be the follicle that will have a definitive advantage over the other follicles by responding more favorably to the stimulating effects of FSH. These results demonstrate important aspects of the role of TGF $\beta$ 1 in the network of autocrine and paracrine interactions that control estradiol secretion by bovine ovarian follicles.

Key words: bovine, estradiol, progesterone, follicular fluid, follicle, ultrasound, aspiration, granulosa, deviation, selection



### 3. RÉSUMÉ DE VULGARISATION

La présente thèse aborde un phénomène physiologique qui se produit à l'intérieur de l'ovaire. L'ovaire est une structure qui fournit un ovule par mois chez l'humain et un ovule par 3 semaines chez la vache. Cependant avant de fournir l'ovule, l'ovaire subit plusieurs changements. En effet lorsque l'ovaire fournit cet ovule, cela marque la fin d'une course entre plusieurs follicules d'une même cohorte contenant chacun un de ces ovules.

Les follicules sont des sacs remplis de liquide retrouvés à l'intérieur de l'ovaire et qui de façon imagée pourraient se comparer à un raisin. Le noyau du raisin serait l'équivalent de l'ovule, la chair du raisin serait l'équivalent du liquide folliculaire (liquide nutritif dans lequel baigne l'ovule). La peau du raisin représenterait les différentes couches de cellules qui donnent une structure au raisin et qui produisent les différents facteurs qui agissent sur la croissance de celui-ci. À chaque 3 semaines un seul de ces follicules va se rompre et libérer le noyau du follicule, c'est-à-dire l'ovule. Mais avant qu'il y ait ovulation, il existe une compétition entre plusieurs follicules de laquelle un seul sortira gagnant. En fait, imaginons qu'à l'intérieur de l'ovaire, il y ait une cohorte de plusieurs follicules, l'équivalent d'une grappe de raisins qui se développent tous en même temps. Après une période de croissance, un seul follicule ou raisin de cette grappe serait sélectionné et atteindrait une taille d'environ 15 mm, alors que les autres auront ralenti leur croissance et vont dégénérer (s'atrophier). C'est un mécanisme qui est nécessaire pour assurer qu'il n'y ait qu'un seul ovule de libéré pour donner naissance à un seul veau.

Notre étude cherche donc à comprendre comment un seul raisin ou un seul follicule réussit à se rendre à maturité. Du liquide folliculaire a été récolté de follicules individuels échantillonnés selon des stades précis du développement, c'est-à-dire avant et après qu'il y ait eu sélection du follicule dominant. Dans ce liquide, la concentration d'une hormone clé appelée oestradiol et d'un facteur de croissance appelé "transforming growth factor beta-1" (TGF $\beta$ 1) a été mesurée, afin de déterminer si les changements de concentrations de ces deux hormones étaient liés.

Au début seulement du développement des follicules (avant qu'il y ait eu sélection du follicule dominant), il a été observé que le plus gros follicule contenait la moins grande quantité de TGF $\beta$ 1, alors que les plus petits en contenaient davantage. Il a donc été postulé que le TGF $\beta$ 1 ralentissait le métabolisme en inhibant la synthèse d'oestradiol des plus petits follicules. Il a ensuite été déterminé si ce facteur était bel et bien le facteur qui influence négativement le développement des petits follicules en ajoutant du TGF $\beta$ 1 à des cellules folliculaires cultivées en laboratoire. De cette façon, l'effet négatif direct du TGF $\beta$ 1 sur la synthèse d'oestradiol a été confirmé.

Cette nouvelle découverte n'explique pas en totalité le phénomène de sélection du follicule dominant, car cette sélection n'est pas le fruit d'un seul et unique facteur mais plutôt de l'interaction synchronisée d'une cascade d'événements biologiques hautement contrôlés qui constituent le développement folliculaire et la sélection du follicule dominant.

#### 4. TABLE DES MATIÈRES

PAGE DE TITRE .....	II
IDENTIFICATION DU JURY .....	III
1. RÉSUMÉ FRANCAIS + MOTS CLÉS .....	IV
2. RÉSUMÉ ANGLAIS + MOTS CLÉS .....	VI
3. RÉSUMÉ DE VULGARISATION .....	VIII
4. TABLE DES MATIÈRES .....	X
5. LISTES DES FIGURES ET TABLEAUX .....	XIII
5.1. Étude préliminaire in vivo .....	XIII
5.2. Étude principale in vivo/Article 1 .....	XIV
5.3. Étude préliminaire in vitro .....	XV
5.4. Étude principale in vitro/Article 2 .....	XVI
5.5. Discussion générale.....	XVII
6. LISTE DES ABBRÉVIATIONS .....	XVIII
7. LEXIQUE .....	XIX
8. REMERCIEMENTS .....	XXII
9. AVANT-PROPOS .....	XXV
10. INTRODUCTION .....	1
10.1. Vague folliculaire et contrôle hormonal .....	2
10.2. Folliculogénèse ovarienne .....	6
10.3. Ovulation et développement du corps jaune .....	7
10.4. Stéroïdogénèse folliculaire .....	8
10.5. Atrésie folliculaire .....	9
10.6. Facteurs de croissance .....	12
10.6.1. IGF .....	13
10.6.2. Inhibines, activines et follistatine .....	16
10.6.3. GDF-9, GDF-9B (BMP-15) et BMP-6.....	18
10.6.4. EGF et TGF $\alpha$ .....	19
10.6.5. FGF .....	21
10.6.6. TGF $\beta$ .....	22
10.6.6.1. TGF $\beta$ latent .....	23
10.6.6.2. Récepteurs de TGF $\beta$ .....	24

10.6.6.3.	Rôle du TGF $\beta$ .....	26
10.7.	Objectifs.....	29
11.	MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS .....	30
11.1.	Étude préliminaire in vivo .....	31
11.1.1.	Immunohistochimie .....	36
11.2.	ÉTUDE PRINCIPALE IN VIVO/ARTICLE 1: Transforming Growth Factor $\beta$ 1 is negatively correlated with estradiol and follicle size at the time of emergence of bovine ovarian follicles monitored by ultrasonography .....	46
11.2.1.	Summary .....	48
11.2.2.	Introduction .....	49
11.2.3.	Materials and methods .....	53
11.2.3.1.	Experimental design .....	53
11.2.3.2.	Steroid assays .....	54
11.2.3.3.	TGF $\beta$ assays .....	55
11.2.3.4.	Statistical analysis .....	55
11.2.4.	Results .....	56
11.2.5.	Discussion .....	64
11.2.6.	Acknowledgments .....	67
11.2.7.	References .....	68
11.3.	Étude préliminaire in vitro .....	78
11.4.	ÉTUDE PRINCIPALE IN VITRO/ARTICLE 2: Transforming Growth Factor $\beta$ 1 inhibits FSH-stimulated and 8- br-cAMP-stimulated estradiol and progesterone synthesis in bovine granulosa cells from 2 to 5 mm follicles .....	86
11.4.1.	Summary .....	88
11.4.2.	Introduction .....	90
11.4.3.	Materials and methods .....	92
11.4.3.1.	Cell culture .....	92
11.4.3.2.	Experimental design .....	93
11.4.3.3.	Steroid assays .....	94

11.4.3.4.	Statistical analysis .....	95
11.4.4.	Results .....	95
11.4.5.	Discussion .....	103
11.4.6.	Acknowledgments .....	110
11.4.7.	References .....	111
12.	DISCUSSION GÉNÉRALE.....	116
13.	CONCLUSION GÉNÉRALE.....	122
14.	BIBLIOGRAPHIE .....	126
15.	CURRICULUM VITAE.....	i

## 5. LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

### 5.1.ÉTUDE PRÉLIMINAIRE IN VIVO

FIGURE 1. Échographe Hitachi-515 .....	32
FIGURE 2. Photos de l’ovaire gauche et de l’ovaire droit lors du suivi échographique du jour 1 au jour 4 .....	33
FIGURE 3. Photos des ovaires avec le corps jaune hémorragique (CH) .....	34
FIGURE 4. Photos des ovaires suite à la dissection par le hile. Éclairage par transillumination .....	35
FIGURE 5. Coloration immunohistochimique pour le TGFβ recepteur II (TGFβRII) dans les cellules de la granulosa (GC) et les cellules de la thèque (TC) des follicules plus grand que 5 mm récoltés au jour 4 du cycle oestral .....	39
TABLEAU I. Valeurs moyenne ± SEM des diamètres et des concentrations d’hormones mesurées dans le liquide folliculaire de follicules plus grand que 5 mm récoltés	

au jour 4 du cycle oestral et classifiés par ordre  
décroissant de diamètre .....40

FIGURE 6. Illustration de développement folliculaire chez la vache ...44

FIGURE 7. Photo de l'échographie transvaginale chez les génisses  
Holstein .....45

## 5.2. ÉTUDE PRINCIPALE IN VIVO/ARTICLE 1

FIGURE. 1. Follicle diameter of the F1, F2 and F3 follicles of the first  
follicular wave during four different stages of development  
of the F1 .....57

FIGURE. 2. Relationship between total TGF $\beta$  and estradiol  
concentration in follicular fluid of first-wave cohort  
follicles, when the largest follicle (F1) had reached 6.5,  
7.5, 8.5 and 9.5mm stage of development .....59

FIGURE. 3. Relationship between total TGF $\beta$ 1 in follicular fluid and  
follicle diameter of first-wave cohort follicles, when the  
largest follicle (F1) had reached 6.5, 7.5, 8.5 and 9.5mm  
stage of development .....62

### 5.3.ÉTUDE PRÉLIMINAIRE IN VITRO

FIGURE 8. Effect of increasing concentrations of FSH and recombinant active transforming growth factor beta 1 (TGFβ1) on estradiol production expressed in ng per ug of extracted protein X 10<sup>-1</sup> .....80

FIGURE 9. Effect of increasing concentrations of FSH and recombinant active transforming growth factor beta 1 (TGFβ1) on progesterone production expressed in ng per ug of extracted protein X 10<sup>-1</sup> .....81

FIGURE 10. Effect of increasing concentrations of FSH and latent transforming growth factor beta 1 (TGFβ1) on estradiol production expressed in ng per ug of extracted protein X10<sup>-1</sup> .....82

FIGURE 11. Effect of increasing concentrations of FSH and latent transforming growth factor beta 1 (TGFβ1) on progesterone production expressed in ng per ug of extracted protein X10<sup>-1</sup> .....83



#### 5.4. ÉTUDE PRINCIPALE IN VITRO/ARTICLE 2

FIGURE. 1. Effect of increasing concentrations of recombinant active transforming growth factor beta 1 (TGF $\beta$ 1) on basal production of estradiol (A) and progesterone (B) expressed in ng per ug of extracted protein X 10<sup>-1</sup> .....98

FIGURE. 2. Effect of increasing concentrations of recombinant active transforming growth factor beta 1 (TGF $\beta$ 1) on FSH-stimulated production of estradiol (A) and progesterone (B) expressed in ng per ug of extracted protein X 10<sup>-1</sup> .....99

FIGURE. 3. Effect of increasing concentrations of latent transforming growth factor beta 1 (TGF $\beta$ 1) on FSH-stimulated production of estradiol (A) and progesterone (B) expressed in ng per ug of extracted protein X 10<sup>-1</sup> .....100

FIGURE.4. Effect of 1ng/ml of active TGF $\beta$ 1 on forskolin-stimulated production of estradiol (A) and progesterone (B) expressed in ng per ug of extracted protein X 10<sup>-1</sup> .....101

FIGURE.5. Effect of 1ng/ml of active TGF $\beta$ 1 on cAMP-stimulated  
production of estradiol (A) and progesterone (B) expressed  
in ng per ug of extracted protein X 10<sup>-1</sup> .....102

**5.5. DISCUSSION GÉNÉRALE**

FIGURE.12. Proposition d'un modèle physiologique impliquant des  
boucles de rétrocontrôle entre le TGF $\beta$  et l'oestradiol  
.....125

## 6. LISTE DES ABBRÉVIATIONS :

AMPc: Adénosine monophosphate cyclique

E<sub>2</sub> : Oestradiol 17-β

EGF: Facteur de croissance de l'épiderme ("Epidermal growth factor")

ELISA: Test enzymatique d'immunoabsorption ("Enzyme Linked  
Immunosorbent Assay")

F1 : Follicule ayant le plus grand diamètre

F2 : Follicule ayant le deuxième plus grand diamètre

FS : Moyenne des follicules subordonnés restants

FSH : Hormone folliculo-stimulante ("Follicle stimulating hormone")

GC: Cellules de granulosa

GnRH : Gonadolibérine ("Gonadotropin releasing hormone")

IGF : Facteur de croissance insulino-mimétique ("Insulin-like growth  
factor")

IGFBP: Protéine de liaison du facteur de croissance insulino-mimétique  
("Insulin-like growth factor binding protein")

LAP: Protéine de latence associée ("Latency associated peptide")

LH : Hormone lutéinisante ("Luteinizing hormone")

LTBP: Protéine de liaison du TGFβ latent ("Latent TGFβ binding  
protein")

P<sub>4</sub> : Progestérone

PKA: Protéine kinase A

TC: Cellule de thèque

TGF $\beta$  : Facteur de croissance transformant- $\beta$  ("Transforming growth factor- $\beta$ ")

TGF $\beta$ RII : Récepteur type II du Transforming growth factor- $\beta$

VEGF: Facteur de croissance endothélial vasculaire ("Vascular endothelial growth factor")

## 7. LEXIQUE

Cycle oestral : Ensemble des modifications périodiques des organes génitaux femelles, en rapport avec la libération des ovules par les ovaires, qui sont sous la dépendance des hormones sexuelles et qui préparent ces organes à la fécondation et à la gestation.

Échographie : Méthode d'imagerie médicale qui explore un organe, un tissu ou une structure anatomique par l'enregistrement des échos produits par un faisceau d'ultrasons, lors de son passage à travers l'organisme.

Facteur de croissance : Molécule sécrétée par certaines cellules et qui, en se liant sur des récepteurs membranaires, ont pour fonction de modifier le métabolisme cellulaire.

Follicule : Vésicule sphérique faisant saillie à la surface de l'ovaire et contenant l'ovule entouré de cellules folliculaire et de liquide nutritif appelé liquide folliculaire.

Granulosa : Ensemble de cellules folliculaires contenues entre le liquide folliculaire et la membrane basale, et disposées en couches plus ou moins nombreuses. Un épaissement localisé des cellules de granulosa appelé cumulus oophorus recouvre l'ovocyte (ovule).

Oestradiol : Hormone stéroïdienne sécrétée par les follicules en croissance.

L'oestradiol régit le développement et le maintien des organes sexuels chez la femme, les caractères sexuels secondaires et les glandes mammaires ainsi que certaines fonctions de l'utérus et des organes accessoires. Le niveau d'oestradiol sanguin permet de signaler la présence d'un follicule ovulatoire et de déclencher l'ovulation.

Progestérone : Principale hormone progestative synthétisée et sécrétée en grande quantité par le corps jaune et le placenta au cours de la gestation. Le rôle physiologique de la progestérone varie selon la période de gestation et selon l'espèce étudiée mais en général, il est de préparer la muqueuse utérine à la nidation de l'œuf fécondé, de favoriser le développement de celui-ci et d'empêcher qu'il y ait ovulation durant la gestation ou durant la période qui sépare deux ovulations. Elle est également indispensable au maintien de la grossesse par son action inhibitrice sur les contractions utérines.

Thèque : Ensemble de cellules directement en contact avec la membrane basale faisant suite à la granulosa. On y distingue une couche interne (ou thèque interne) accolée à la membrane basale, riche en vaisseaux,

et sécrétant des androgènes, et une couche externe (ou thèque externe) fibreuse, sans limite nette avec la structure environnante appelée stroma.

## 8. REMERCIEMENTS

Au Docteur Paul Carrière, dit le penseur, qui par sa constante disponibilité, son ouverture d'esprit et sa compréhension, a su me diriger à travers vents et marées. Au fil des années, notre relation a été marquée par une complicité exceptionnelle et une facilité à communiquer hors du commun. Très sincère gratitude.

Au Docteur Alan Goff, dit le sérieux, qui par sa grande sagesse a su me conseiller à travers toutes les étapes importantes de mes études. Profonde gratitude.

Au Docteur Monique Doré, dite la perfectionniste, qui par un sens aiguisé de la rigueur, a su me conseiller et me diriger dans les étapes importantes de mes études.

Au Docteur Christopher Price dit le joyeux, qui par sa rigueur a su me conseiller tout au long de l'évolution de mes recherches. Il a également eu la générosité de partager les espaces de laboratoire sans aucune animosité.

À Mélanie Hamel dite la travaillante, qui a eu la générosité de m'enseigner l'art des cultures de cellules et la patience de m'endurer comme partenaire de laboratoire.



À Melha Salmi dite la constante, qui sans jamais un mot plus haut que l'autre a su être une partenaire de laboratoire exemplaire.

Au Docteur Bruce Murphy dit le farceur, qui impose le respect de tous par ses grandes réalisations, mais qui est un bout en train au quotidien.

Au Docteur Jacques Lussier, dit le rigoureux, qui par sa grande connaissance des techniques de laboratoire a su me fournir conseils et soutien.

Au Docteur Jean Sirois, dit le comique, qui par sa bonne humeur a su mettre de la vie dans les réunions du CRRA.

Au Docteur Lawrence Smith, dit le célèbre, qui malgré lui, a vu sa popularité augmenter en flèche avec son fameux clonage de Starbuck et qui somme toute, est vraiment demeuré un gars simple et terre à terre. Un exemple à suivre.

Au Docteur David Silversides, dit le mystérieux, qui par sa présence a su donner du piquant dans les réunions du CRRA.

À Micheline Sicotte, dite la disponible, qui avec constance et rigueur a su régler beaucoup de détails aussi nombreux qu'importants. Une note sur son incroyable rire qui a su mettre du soleil dans les rassemblements du CRRA.

À Odette Hélie, dite la superwoman, qui par un travail incessant dans l'ombre de Bruce, règle une tonne de choses aussi importantes les unes que les autres.

À Mandjit Singh, dit le généreux, qui m'a donné gracieusement de son temps pour me donner un coup de main sur divers aspects de la recherche.

À Carmen, dite la minutieuse, qui m'a généreusement aidé à avoir accès à du matériel biologique de qualité.

À mon père André qui malgré le fait qu'il soit souvent parti parcourir le monde, a su me soutenir financièrement et moralement au fil des années.

À mon frère Danick, qui m'a toujours encouragé à travers ces années.

À ma copine Julie, qui m'a accompagnée à travers toutes les épreuves que peuvent représenter un PhD.

À ma mère Lisette, qui malgré le fait qu'elle soit décédée, a toujours été présente dans mon cœur dans les moments difficiles.

Mammy... Papy...c'est à vous que je dédie cet ouvrage. Jamais je n'aurais pu en arriver où j'en suis sans votre support et votre générosité.

## 9. AVANT-PROPOS

Il est clair que des mécanismes physiologiques puissants agissent en tout temps pour limiter le nombre de follicules en croissance. Qui plus est, même dans le cas de la croissance cyclique d'une cohorte de gros follicules visibles à l'échographie, des mécanismes finement régulés agissent toujours pour limiter la croissance de la majorité des follicules. Cette thèse démontre que le facteur de croissance TGF $\beta$  fait parti de ce mécanisme de régulation fine, en limitant la production d'oestradiol à un stade critique du développement folliculaire. Ainsi la force vitale menant à la croissance et la sélection d'un seul follicule ovulatoire parmi les autres follicules de la cohorte, sera celle qui permet à ce follicule seulement de s'affranchir de l'effet inhibiteur du TGF $\beta$ , juste assez pour lui permettre de poursuivre les étapes menant à l'ovulation.

## 10. INTRODUCTION

## 10.1. VAGUE FOLLICULAIRE ET CONTRÔLE HORMONAL

Dans l'industrie du bœuf et de la vache laitière du Québec, du Canada et du monde entier, la régulation de la reproduction représente un défi quotidien dont la réussite aura de grandes répercussions sur la rentabilité des entreprises. Ainsi l'intérêt de la recherche dans ce domaine est non seulement motivé par le désir de répondre aux interrogations liées au développement folliculaire et aux mécanismes menant à la sélection du follicule ovulatoire, mais aussi par le besoin d'informations de base pour établir des protocoles de synchronisation des chaleurs et de superovulation. Il est également motivé par le fait que l'étude du développement folliculaire bovin représente un des meilleurs modèles expérimentaux pour caractériser l'action et les interactions des facteurs de croissance. En effet, depuis 20 ans, plusieurs études traitent du rôle des facteurs de croissance nouvellement découverts sur la physiologie des cellules folliculaires (Massagué 1990, 1998). Le fait que ces substances influencent la prolifération, la différenciation et la stéroïdogénèse dans l'ovaire au même titre que les gonadotrophines et les stéroïdes, démontrent à quel point l'étude des facteurs de croissance est primordiale à la bonne compréhension du développement folliculaire. En fait, il est largement reconnu que les hormones pituitaires et les stéroïdes ovariens jouent un rôle capital dans la régulation des fonctions stéroïdogéniques du follicule, mais la sensibilité de réponse de celui-ci aux gonadotrophines est acquise graduellement dans un nombre restreint de follicules, suite à une étroite collaboration entre différents facteurs mitotiques et stéroïdogéniques comme les facteurs de croissance.

Ainsi la recherche en reproduction a permis d'augmenter grandement notre niveau de connaissance du cycle oestral bovin. En 1960 et beaucoup plus tard en 1981, sur la base d'études histologiques, il avait été proposé un modèle de deux vagues folliculaires lors du cycle oestral des bovins (Rajakoski 1960; Matton *et al.*, 1981). Par la suite en 1983, sur la base d'une étude effectuée sur la mesure des follicules et la détermination des stéroïdes dans le liquide folliculaire et dans le sang, il avait été avancé que trois vagues folliculaires se produisaient, ce qui résultait en un follicule dominant pour chacune des vagues (Ireland *et al.*, 1983).

En 1984, une percée technologique a permis de clarifier la nature de la folliculogénèse chez la vache (Pierson and Ginther 1984). En effet, l'arrivée de l'échographie ovarienne transrectale a permis de faire un suivi beaucoup plus précis de la dynamique folliculaire. Ainsi il a été déterminé que l'émergence de la nouvelle vague folliculaire est détectée juste avant le jour de l'ovulation comme étant un groupe de follicules  $\geq 4$  mm (Ginther *et al.*, 1989a). Par la suite, un de ces follicules deviendra un follicule dominant alors que les autres follicules deviendront des follicules subordonnés. Le même processus se répète environ 10 jours postovulation s'il s'agit d'un cycle à deux vagues (Ginther *et al.*, 1989b) et également au jour 16 s'il s'agit d'un cycle à trois vagues (Sirois et Fortune 1988; Savio *et al.*, 1988). En ce qui a trait au

follicule ovulatoire, il origine de la dernière vague folliculaire (Sirois et Fortune 1988; Roche et Boland 1991; Lucy *et al.*, 1992; Fortune 1994).

Chez la vache, l'émergence de la vague folliculaire est stimulée par un pic de FSH (Adams *et al.*, 1992; Sunderland *et al.*, 1994; Gong *et al.*, 1995; Evans *et al.*, 1997b). La montée de FSH atteint un pic pendant que les follicules atteignent 4 mm de diamètre (Bodensteiner *et al.*, 1996a; Kulick *et al.*, 1999). Tous les follicules  $\geq 5$  mm contribuent au déclin des concentrations de FSH (Gibbons *et al.*, 1997, 1999). Cependant même s'il y a une baisse de concentration, la FSH demeure importante pour les follicules en croissance (Bergfelt 2000; Ginther *et al.*, 2000). Ainsi, suite à l'émergence, les deux plus gros follicules grossissent en parallèle durant quelques jours jusqu'à ce qu'ils atteignent des diamètres d'environ 8,5 mm et 7,7 mm (Ginther *et al.*, 1997, 1998, 1999; Kulick *et al.*, 1999). À ce stade, les follicules commencent à subir une déviation dans leurs diamètres qui est caractérisée par la croissance continue du plus gros follicule qui deviendra le follicule dominant et par la réduction, l'arrêt de croissance puis la régression des autres follicules qui deviendront des follicules subordonnés atrétiques (Ginther 2000). En général, le futur follicule dominant émerge 8 h avant le futur deuxième plus gros follicule, et ce dernier atteint un diamètre équivalent après une croissance d'environ 8 h (Ginther 1999).

Plus tard dans le développement, suite à la déviation, c'est le follicule le plus gros qui joue un rôle primaire dans la suppression de la concentration

de la FSH sous les niveaux requis pour les plus petits follicules, ce qui cause leur régression (Bergfelt *et al.*, 2000; Ginther *et al.*, 2000). Les produits sécrétés par ce follicule pour réduire la FSH semblent être l'oestradiol et l'inhibine (Martin *et al.*, 1991; Ireland *et al.*, 1994; Kaneko *et al.*, 1991; Mihm *et al.*, 1997; Evans *et al.*, 1997b). En plus d'augmenter sa capacité à réduire la FSH, le plus gros follicule développe la capacité d'utiliser des concentrations réduites de FSH pour continuer à avoir une croissance soutenue (Ginther *et al.*, 2000).

Durant le cycle oestral bovin qui a une durée moyenne de 21 jours, on assiste à une cascade progressive d'événements hormonaux et comportementaux hautement synchronisés et répétitifs. Parmi ces événements, on retrouve la croissance et la maturation progressive des follicules, l'ovulation et la lutéinisation subséquente du follicule qui s'est rompu et qui forme alors le corps jaune ou corpus luteum. S'il y a absence de gestation, le cycle se répète de lui-même (Bronson 1989).

Les stades initiaux de l'ovogénèse et de la folliculogénèse sont indépendants des hormones pituitaires, à l'opposé des stades finaux de croissance et de maturation folliculaire qui sont hautement dépendants des 2 gonadotrophines, soit la LH (luteinizing hormone) et la FSH (follicle stimulating hormone) (Austin et Short 1991). À mesure que les follicules deviennent matures et qu'ils se rapprochent du moment de l'ovulation, une



majorité de ces follicules vont devenir atrétiques (Hsueh *et al.*, 1994). Durant les stades finaux de croissance folliculaire, l'œstrogène est sécrété par les follicules matures qui se développent à l'intérieur de l'ovaire. En effet, l'aromatase qui convertit les androgènes en oestrogènes est induite dans les cellules de granulosa. Ainsi, la sécrétion d'œstrogènes atteint des niveaux élevés lorsque le follicle est sur le point d'ovuler, ce qui permet une augmentation de l'oestradiol plasmatique qui a pour conséquence de provoquer la relâche de GnRH (gonadotropin-releasing hormone) par l'hypothalamus, ce qui mène au pic ovulatoire de LH et à l'ovulation (Clemens et Weaver 1985, Strauss 1995).

## 10.2. FOLLICULOLOGÈNE OVARIENNE

L'unité fondamentale de l'ovaire, c'est le follicule qui contient le gamète femelle, c'est-à-dire l'ovule. La folliculogénèse prend place lorsque qu'un follicule passe du stade de follicule primordial défini comme étant une cellule germinale entourée par une couche simple de cellules épithéliales, jusqu'à un stade plus avancé où le follicule appelé follicule de Graaf ou follicule tertiaire possède un antrum et la maturité nécessaire pour l'ovulation (Gougeon 1996).

Le développement folliculaire initial, c'est-à-dire le développement qui se produit avant qu'il y ait formation de l'antrum, est indépendant de la stimulation par les gonadotrophines. Le développement plus tardif implique la

sécrétion de stéroïdes qui est grandement dépendante d'une production soutenue d'un niveau minimum d'hormones gonadotrophiques (Fortune 1994). À n'importe quel moment du stade de développement folliculaire, la dégénérescence, ou l'atrésie des follicules, se produit. Ainsi, moins de 1% des follicules présents à la naissance sont destinés à ovuler (Baker 1963). Ce fait détermine quels follicules vont initialement se mettre à croître, quels follicules vont subir une maturation complète, quels follicules vont ovuler et quels follicules vont dégénérer et devenir atrétiques.

### **10.3. OVULATION ET DÉVELOPPEMENT DU CORPS JAUNE**

Le processus physique de l'ovulation se produit lorsque la pression osmotique du liquide folliculaire est augmentée, ce qui permet l'entrée d'eau, au même moment où le support de collagène de la paroi folliculaire se brise. Ces événements sont les résultats de changements enzymatiques provoqués par le pic de LH/FSH. Approximativement 10 à 14 h après l'initiation du pic de gonadotrophine préovulatoire, la rupture du follicule se produit, ce qui expulse l'ovule vers le pavillon de l'oviducte. Comme la réceptivité sexuelle de la femelle se produit quelques heures avant l'ovulation, les spermatozoïdes sont habituellement déjà présents dans l'oviducte au moment où l'ovule atteint le site de fécondation et ils sont déjà capables (Austin 1991; Bronson 1989).

Suite à l'ovulation, le follicule subit des changements majeurs dans sa structure interne à mesure qu'il se développe en un corpus luteum qui sécrètera

de la progestérone. En effet, l'espace antral présent avant l'ovulation sera désormais occupé par les cellules de granulosa et par l'envahissement de cellules provenant de la thèque. La fonction principale du corpus luteum est de sécréter de la progestérone qui est une hormone qui vient compléter la préparation de l'endomètre utérin pour l'implantation de l'ovule fertilisé (Juengel *et al.*, 1999).

#### **10.4. STÉROÏDOGÉNÈSE FOLLICULAIRE**

La biosynthèse des stéroïdes ovariens est sous le contrôle de deux gonadotrophines (LH et FSH), ce qui stimule leur tissu cible par une interaction avec des sites de liaison de haute affinité à la surface de la cellule (Hillier *et al.*, 1994). La densité membranaire de ces récepteurs est importante dans la détermination de la réceptivité des cellules pour leurs gonadotrophines respectives, ce qui implique aussi qu'elle est importante pour le devenir du follicule à n'importe lequel des stades de développement (Puett 1999). Les cellules de granulosa qui sont les principales productrices d'œstrogènes, possèdent des récepteurs FSH à tous les stades de développement et acquièrent les récepteurs LH à un stade de développement plus tardif. À l'opposé, les cellules de la thèque interne, qui produisent des androgènes, possèdent seulement des récepteurs LH (Richards 1994).

Les cellules de granulosa indifférenciées du stade préantral répondent à une stimulation basale de FSH par une augmentation de l'activité de

l'aromatase, une enzyme qui convertit les androgènes en oestrogènes. Plus tard, elles auront également les enzymes qui métabolisent le cholestérol en progestérone (Hillier 1994). Les principaux androgènes, soit la testostérone et l'androstènedione, qui sont produits par les cellules de la thèque sous une stimulation de LH, traversent du côté de la granulosa en passant par les tissus hautement vascularisés environnants (Gore-Langton et Armstrong 1988). C'est donc l'action de la LH sur les cellules de la thèque, en collaboration avec l'action de la FSH sur les cellules de granulosa, qui permet la production d'oestrogènes (Ireland 1987). À mesure que le follicule devient mature, la FSH, en synergie avec la production intracellulaire d'oestrogènes dans les cellules de granulosa, provoque l'apparition des récepteurs de LH sur la membrane des cellules de granulosa. Une fois que les cellules de granulosa ont acquis les récepteurs de LH, elles sont ensuite en mesure de répondre au pic de LH (Bodensteiner *et al.*, 1996b; Evans et Fortune 1997a; Bao *et al.*, 1997; Puett 1999).

### **10.5. ATRÉSIE FOLLICULAIRE**

L'atrésie folliculaire est synonyme de dégénérescence des follicules non-ovulatoires à l'intérieur de l'ovaire. L'atrésie folliculaire est accompagnée par une dégénérescence de l'ovocyte et des cellules environnantes. L'atrésie se produit constamment durant la vie des femelles et les follicules de tous les stades de développement peuvent subir l'atrésie. Certains des follicules subissent l'atrésie durant le stade de développement antral, lorsque la FSH a

déjà agit sur le développement folliculaire (Kaipia et Hsueh 1997). Ainsi il est possible que ces follicules soient devenus FSH-dépendants et que l'atrésie soit causée par une baisse de FSH qui deviendrait alors insuffisante pour supporter leur croissance (Ginther 2000). Il est également possible que sous l'influence du follicule dominant, ils soient devenus insensibles aux niveaux circulants de FSH par une inhibition de l'action de la FSH par certains facteurs de croissance (Ginther 2000).

Durant l'atrésie folliculaire, les cellules de granulosa et l'ovocyte subissent des changements morphologiques. Dans les stades initiaux, des noyaux pycnotiques sont observables dans les cellules de granulosa, spécialement celles qui sont en contact avec l'antrum. La pycnose, qui se manifeste par un noyau assombri et irrégulier à l'intérieur des cellules, a longtemps été reconnue comme un indicateur de l'imminence d'une mort cellulaire et est maintenant reconnue comme étant dû à une fragmentation du matériel génétique (Arends *et al.*, 1990; Schawartzman et Cidlowski 1993). Une réduction marquée de la synthèse d'ADN se produit dans le follicule même si quelques cellules de granulosa peuvent continuer à proliférer. Dans les stades finaux, la prolifération des cellules de granulosa est inexistante, et la mort cellulaire ainsi que la fragmentation de l'ADN sont apparentes. Les débris qui proviennent de la mort de cellules de granulosa s'accumulent dans le liquide folliculaire et des ouvertures dans la membrane basale sont apparentes, alors que les leucocytes commencent à envahir le follicule (Hsueh

*et al.*, 1994; Palumbo et Yeh 1995). À ce point, l'ovocyte du follicule atrétique peut subir un bris de la vésicule germinale semblable à ce qui se produit lors d'une maturation normale de l'ovocyte. La maturation de l'ovocyte durant l'atrésie est appelée pseudomaturation car elle est vraisemblablement produite par une perte de contact avec les cellules du cumulus qui ont la fonction de garder l'ovocyte en arrêt méiotique. Un fait à noter, il est possible de féconder *in vitro* des ovocytes qui ont subi une pseudomaturation (Abeydeera *et al.*, 1994). Durant les derniers stades, les follicules rétrécissent jusqu'à une disparition complète (Kaipia et Hsueh 1997).

Le développement folliculaire, l'ovulation et l'atrésie sont contrôlés par les hormones. La majorité des follicules présents après la naissance sont sous formes de follicules primordiaux avec une couche simple de cellules entourant l'ovocyte, mais il en existe aussi à différents stades de développement au moment du vêlage. La FSH est nécessaire à la maturation des follicules et pour le développement de l'antrum (Fortune 1994).

Plusieurs études ont démontré, lors de l'atrésie, un clivage internucléosomal de l'ADN qui est caractéristique de la mort cellulaire apoptotique (Imig *et al.*, 1993; Arends *et al.*, 1990). En effet, des gènes spécifiques impliqués dans l'apoptose sont exprimés lors de l'atrésie folliculaire. Parmi ces gènes on retrouve Bcl-2, Fas et des membres de la famille des caspases (Sakamaki *et al.*, 1997; Nagata 1997; Porter *et al.*, 2000)

L'implication de ces gènes suggère que des régulateurs de l'atrésie comme les gonadotrophines et des facteurs intraovariens peuvent contrôler le processus d'atrésie en stimulant ou en inhibant le chemin de la mort cellulaire relié à l'apoptose (Quirk *et al.*, 1995) D'autres hormones et facteurs de croissance ont des rôles dans la détermination du devenir des follicules. De façon expérimentale, on a démontré que de tels facteurs pouvaient induire ou inhiber le programme de dégradation de l'ADN dans les cellules de granulosa. La dégradation de l'ADN, qui est caractéristique de l'apoptose, est une indication de l'imminence de l'atrésie folliculaire. Les androgènes, la GnRH et le TNF- $\alpha$  induisent la dégradation de l'ADN de cellules de granulosa (Quirk *et al.*, 1998) alors que la FSH, l'œstrogène, la progestérone, l'EGF, l'IGF-I, l'interleukin-1 $\beta$  et l'activine sont entre autres des facteurs qui préviennent la dégradation de l'ADN de cellules de granulosa (Carson *et al.*, 1981; Adashi *et al.*, 1985; Tilly *et al.*, 1992; Guthrie *et al.*, 1997; Kaipia et Hsueh 1997; Yang et Rajamahendran 2000).

## 10.6. FACTEURS DE CROISSANCE

Les facteurs de croissance qui seront décrits plus bas interagissent avec des récepteurs de surface qui initient une cascade d'événements qui influencent la croissance cellulaire, le métabolisme, la différenciation et la mort cellulaire. Des progrès significatifs ont été faits par la caractérisation de la structure et la fonction des facteurs de croissance, de leurs récepteurs et de leurs protéines de liaison. La majorité de ces progrès sont issus du

développement de facteurs de croissance recombinants, des techniques de clonage moléculaire et des animaux transgéniques. Cependant malgré ces immenses progrès sur la biologie des facteurs de croissance, leurs rôles physiologiques respectifs dans les tissus reproductifs n'ont pas encore été déterminés de façon convaincante. Cette section décrit brièvement certains facteurs de croissance qui ont été localisés dans les ovaires.

### 10.6.1. IGF

L'insulin-like growth factor (IGF) a été découvert en premier comme un facteur qui potentialisait l'effet de l'hormone de croissance sur la croissance somatique et a initialement été nommé somatomédine. Les IGF I et II sont des chaînes polypeptidiques simples qui démontrent une grande homologie avec l'insuline. L'IGF-I et L'IGF-II sont des peptides de faible poids moléculaire (7 kDa) qui partagent 62% de la séquence d'acides aminés, qui possèdent des structures différentes et qui sont reconnus par des récepteurs de surface cellulaire différents (Jones et Clemmons 1995).

Les IGF se lient aux récepteurs IGF-I et IGF-II/mannose-6-phosphate (M-6-P) et aussi avec une affinité moindre, au récepteur de l'insuline. Le récepteur IGF de type I, comme le récepteur de l'insuline, est un hétérotétramère composé de deux sous-unités extracellulaires  $\alpha$  et deux sous-unités transmembranaires  $\beta$ . Ce récepteur lie l'IGF-I avec une plus grande affinité que IGF-II et l'insuline. La sous-unité  $\alpha$  et certaines portions



extracellulaires de la sous-unité  $\beta$  confèrent le pouvoir de liaison du ligand, alors que la sous-unité  $\beta$  intracellulaire possède un domaine catalytique tyrosine kinase (Kim et Fazleabas 1999).

L'action biologique des IGF est modulée par une famille d'au moins six protéines de liaison IGF, les insulin-like growth factor binding protein (IGFBP), qui sont produites par la majorité des tissus et qui sont retrouvées en circulation ou dans des compartiments extracellulaires. Les IGFBP modulent l'action des IGF de différentes façons. Ils agissent entre autres comme protéines de transport dans le plasma. Elles prolongent également les demi-vies des IGF, elles contrôlent leur clairance métabolique et elles modulent directement l'interaction entre les IGF et leurs récepteurs, ce qui revient à dire qu'elles contrôlent leurs actions biologiques (Kim et Fazleabas 1999).

Le rôle du système IGF durant la déviation a seulement été étudié chez la vache. Les niveaux de IGF-I libre ne changent pas dans le plus gros follicule en grossissant de 7,5 à 11,2 mm (Beg *et al.*, 2001). En effet, d'autres études confirment des concentrations élevées d'IGF-I après la déviation (Ginther *et al.*, 2001; Beg *et al.*, 2001). Or les concentrations de IGF-I libre dans le second plus gros follicule diminuent progressivement durant la même période de temps. Ces résultats suggèrent que le système IGF est certainement important dans le processus de déviation, mais les concentrations IGF-I entre les deux

plus gros follicules ne sont pas différentes au moment de la déviation à 8,7 mm (Ginther *et al.*, 2001).

Un aspect intéressant des IGF est leur étroite collaboration avec leurs protéines de liaison. En fait durant la dernière décennie, l'étude du système IGF a été dominée par la découverte de la famille de plus de six protéines de liaison. Chez les mammifères les IGFBP-1, -2, -4 et -5 ont été détectés dans le liquide folliculaire ovin (Monget *et al.*, 1993), porcin (Mondschein *et al.*, 1990a, 1990b; Howard et Ford 1992) et humain (Giudice *et al.*, 1991). En fait il a été observé que les IGFBP-2, -4, -5 diminuent dans le liquide de follicule préovulatoire alors que l'IGFBP-1 ne varie pas entre les différentes grosseurs de follicule (Zhou et Bondy, 1993). Chez le porc, l'ARNm pour l'IGFBP-2 est principalement concentré dans les cellules de granulosa, contrairement au rat qui en a dans la thèque (Samaras *et al.*, 1991, 1992) et son expression est corrélée négativement avec l'inhibine et les stéroïdes (Howard et Ford 1992). Chez l'ovine, la croissance folliculaire est également accompagnée par une diminution des IGFBP (Monget *et al.*, 1993). De plus les IGFBP-2, -4 et -5 sont retrouvés dans les follicules en début d'atrésie et sont encore plus abondants dans les follicules en atrésie avancée (Monget *et al.*, 1993). Chez la vache, les cellules de granulosa expriment l'ARNm du IGFBP-2 mais pas les cellules de la thèque (Armstrong *et al.*, 1998). Les concentrations du IGFBP-2 sont similaires entre le plus gros et le deuxième plus gros follicule au début de la déviation. En fait les différences n'apparaissent que lorsque le plus gros

follicule atteint 9,5-10,5 mm et les niveaux sont alors supérieurs dans le deuxième plus gros follicule (Beg *et al.*, 2001).

L'expression de l'ARNm du IGFBP-4 dans la thèque est similaire dans toutes les grosseurs de follicules et les cellules de granulosa ne l'expriment pas (Armstrong *et al.*, 1998). Cependant les concentrations d'IGFBP-4 dans le liquide folliculaire sont plus élevées dans le deuxième et le troisième plus gros follicule lorsque le plus gros follicule atteint 7,6 mm (Mihm *et al.*, 2000). En fait ces changements dans les niveaux intrafolliculaires du IGFBP-4 ont été attribués à des protéases spécifiques chez la vache (Armstrong *et al.*, 1998; Fortune 2000) et l'humain (Chandrasekher 1995, 1996).

#### 10.6.2. INHIBINES, ACTIVINES ET FOLLISTATINE

Les follicules produisent deux protéines dimériques, soit les activines et les inhibines qui sont structurellement reliés par une même sous-unité  $\beta$ . Ces 2 protéines ont des actions opposées sur les cellules gonadotropes. L'inhibine supprime et l'activine stimule l'action de la FSH (Kim et Fazleabas 1999).

L'inhibine a d'abord été identifié dans le liquide folliculaire de plusieurs espèces comme un régulateur négatif de la sécrétion de FSH, mais pas de LH, par la glande pituitaire, ce qui permettrait de maintenir le nombre d'ovulation spécifique à chacune des espèces. (McCullagh 1932; Marder *et al.*, 1977; Bronson et Channing 1978; Burger 1993, Tilbrok *et al.*, 1993). Les

isoformes A et B sont des hétérodimères de la chaîne  $\alpha$  et  $\beta$  et sont, par leur structure, apparentés au TGF $\beta$ . Chez les animaux domestiques, ils existent des changements de concentrations reliés à la grosseur des follicules. En effet, chez le porc, la concentration maximale est retrouvée dans les follicules de grosseur moyenne et alors que chez la vache c'est dans les follicules de grandes tailles (Lorenzen *et al.*, 1978). En fait la production d'inhibine par les cellules de granulosa bovine augmente avec la taille du follicule et diminue avec l'atrésie, ce qui représente un patron similaire à l'oestradiol (Henderson *et al.*, 1984; Franchimont *et al.*, 1987).

Les activines qui sont des chaînes homodimériques de sous-unités  $\beta$ , nommés activine A et B, ont des actions biologiques sur la glande pituitaire opposées à l'inhibine (Woddruff 1993). Ces protéines sont détectées immunologiquement dans l'ovaire (Shintani *et al.*, 1991) et elles stimulent la relâche de FSH par les cellules hypophysaires en culture (Ling *et al.*, 1986; Ying *et al.*, 1986). Chez le singe rhésus, l'injection in vivo d'inhibine A stimule la sécrétion de LH, de FSH et d'oestrogènes durant la phase folliculaire précoce (Stouffer *et al.*, 1993). Par ailleurs l'activine augmente l'activité aromatasase et la production d'oestradiol (Hutchinson *et al.*, 1987; Xiao *et al.*, 1990; Miro *et al.*, 1991; Xiao et Findlay 1991), augmente le nombre de récepteurs LH (Sugino *et al.*, 1988; Nakamura *et al.*, 1994), augmente la synthèse de progestérone (Sugino *et al.*, 1988; Xiao *et al.*, 1990;

Xiao et Findlay 1991) et augmente le nombre de récepteurs FSH (Hasegawa *et al.*, 1988; Findlay 1993).

Enfin la follistatine est une protéine qui se lie à l'activine et qui contrôle son activité biologique en contrôlant sa biodisponibilité (Findlay 1993; Mather *et al.*, 1993). Il a d'ailleurs été observé que la production de follistatine est stimulée dans l'hypophyse par l'activine elle-même et est couplée avec une diminution de la sécrétion de la FSH (DePaolo *et al.*, 1993). La follistatine est retrouvée dans l'ovaire de la vache (Klein *et al.*, 1991). En effet, dans l'ovaire murin et bovin, l'ARNm de follistatine est détecté dans la granulosa de follicules secondaires et atteint un niveau maximum durant la formation de l'antrum (Nakatani *et al.*, 1991; Shukovski *et al.*, 1992).

### **10.6.3. GDF-9, GDF-9B (BMP15) et BMP-6**

La communication bi-directionnelle entre les cellules somatiques et l'ovocyte est essentielle pour une folliculogénèse normale. Trois membres de la superfamille TGF $\beta$ , soit le growth differentiation factor-9 (GDF-9), le GDF-9B et le bone morphogenetic protein-15 (BMP-15), sont exprimés de façon sélective par l'ovocyte de follicules primaires chez les rongeurs, et l'ovocyte de follicules primordiaux chez les ruminants (McGrath *et al.*, 1995; Jaatinen *et al.*, 1999; Bodensteiner *et al.*, 1999; Elvin *et al.*, 2000; McNatty *et al.*, 2001). La délétion ciblée du gène GDF-9 chez la souris a résulté en un arrêt du développement folliculaire au stade de follicule primaire (Dong *et al.*, 1996).

À l'opposé la délétion du gène BMP-15 ou BMP-6 chez la souris n'a pas eu d'effet (ou très peu) sur le développement folliculaire (Solloway *et al.*, 1998). Par ailleurs, il a été démontré en culture que le GDF-9 recombinant augmente la croissance et la différenciation de follicules ovariens de rongeurs (Hayashi *et al.*, 1999). Cependant chez le bovin, le GDF-9 n'a pas eu d'effet sur l'incorporation de thymidine par les cellules de granulosa et de thèque provenant de follicules antraux.

Les ovocytes continuent d'exprimer le GDF-9, le BMP-15 et le BMP-6 à tous les stades de la folliculogénèse et des expériences *in vitro* sur des rongeurs ont démontré que le GDF-9 recombinant, mais pas le BMP-15 ni le BMP-6, peut imiter plusieurs des actions ovocytes-spécifiques (Elvin *et al.*, 1999, 2000). Enfin de récentes études *in vivo* ont démontré que l'immunisation passive de brebis cycliques contre le BMP-15 réduit le développement folliculaire antral et l'ovulation, ce qui suggère un rôle pour le BMP-15 endogène dans les stades de développement folliculaire plus avancés (Juengel *et al.*, 2002).

#### **10.6.4. EGF ET TGF $\alpha$**

L'epidermal growth factor (EGF) a été isolé en 1961 d'extrait d'une glande submandibulaire d'une souris nouvellement née (Gospodarowicz et Bialecki 1979). En effet, l'EGF et son précurseur sont très abondants dans les glandes salivaires et les reins, alors que des quantités modérées sont détectées dans les ovaires (Rall *et al.*, 1985). L'EGF est une chaîne simple de 6 kDa et

de 53 acides aminés avec trois liens disulfides qui sont responsables de la structure tertiaire de la molécule et de l'activité biologique. Il est synthétisé par un clivage protéolytique d'une grande molécule précurseur de 129 kDa, comprenant 1217 acides aminés dans la famille des muridés et 1207 acides aminés chez l'humain (Kim et Fazleabas 1999). Dans l'ovaire adulte, l'EGF stimule la mitose de cellules isolées de lapin, de porc et d'humain (Gospodarowicz et Bialecki 1979).

En culture de cellules, l'expression des récepteurs est contrôlée par des messagers intracellulaires. En effet, en utilisant des fibroblastes rénaux de rats, il a été démontré que l'EGF lui-même, le TGF $\beta$  et l'acide rétinoïque changent les niveaux d'ARNm pour le récepteur et le nombre de sites de liaison EGF (Thompson *et al.*, 1988; Thompson et Rosen 1989).

Le transforming growth factor  $\alpha$  est un peptide analogue qui se lie au même récepteur que l'EGF et qui est sécrété sous de multiples formes de 5 à 20 kDa (Derynck 1988). En fait, le TGF $\alpha$  est retrouvé immunohistochimiquement dans les cellules de thèque bovine (Kudlow *et al.*, 1987; Skinner *et al.*, 1987) et il stimule la prolifération des cellules folliculaires in vitro (Skinner et Coffey 1988).

L'EGF et le TGF $\alpha$  influencent également la stéroïdogénèse chez le mâle et la femelle. Ils inhibent entre autres l'activité aromatasase et la production

d'œstrogènes stimulée par la FSH dans la granulosa, alors qu'ils diminuent la production de testostérone par les cellules de Leydig. (Hsueh *et al.*, 1981; Schomberg *et al.*, 1983; Adashi *et al.*, 1987). De plus, la sécrétion de progestérone est bloquée dans les cellules de granulosa de mammifères (Schomberg *et al.*, 1983; Pulley et Marrone 1986). L'EGF diminue aussi la synthèse d'androgènes dans les cellules isolées d'ovaires de rats immatures (Erickson et Case 1983). In vivo chez la chèvre, l'infusion d'EGF dans l'ovaire inhibe l'oestradiol et l'inhibine, alors qu'il augmente la progestérone (Murray *et al.*, 1993). Les récepteurs EGF/TGF $\alpha$  sont retrouvés dans les cellules de granulosa, de thèque et de corps jaune de plusieurs espèces (Vlodavsky *et al.*, 1978; Chabot *et al.*, 1986; Skinner et Coffey 1988).

#### 10.6.5. FGF

Les fibroblast growth factors (FGF) ont initialement été isolés du cerveau et de l'hypophyse (Gospodarowicz 1974). Les formes les plus abondantes de FGF démontrant 55% d'homologie sont l'"acidic FGF" (aFGF) et le "basic FGF" (bFGF). Dans l'ovaire de rat, les cellules de granulosa expriment le gène bFGF (Neufeld *et al.*, 1987) et les sites de liaison ont été observés dans les ovaires bovins (Wandji *et al.*, 1992). In vitro le bFGF a des effets semblables à ceux du EGF sur la granulosa de follicules en croissance, en stimulant la prolifération (Gospodarowicz *et al.*, 1977; Gospodarowicz et Bialecki 1978) alors qu'il inhibe la production stimulée par la FSH de progestérone (Jones *et al.*, 1982; Hsueh *et al.*, 1984), d'oestradiol (Baird et



Hsueh 1986; Adashi *et al.*, 1988) et de récepteurs LH (Mondschein et Schomberg 1981; Oury et Darbon 1988). Une autre étude démontre que sur des cellules de granulosa de rats que le bFGF peut avoir une régulation différentielle sur la stéroïdogénèse stimulée par des concentrations suboptimales de FSH, en inhibant la production d'oestradiol et en augmentant la sécrétion de progestérone (Baird et Hsueh 1986).

#### 10.6.6. TGF $\beta$

Le transforming growth factor beta (TGF $\beta$ ) est membre d'une grande superfamille qui porte son nom et qui regroupe plus de 20 peptides distincts impliqués dans des fonctions régulatrices de nombreux systèmes de l'organisme. Ces peptides incluent les activines, inhibines, les substances mullériennes et les protéines morphogéniques des os (Massagué 1990). Les peptides TGF $\beta$  sont une famille de protéines homodimériques de 25 kDa initialement identifiées comme le produit de cellules transformées par un virus (Roberts *et al.*, 1981). Il est d'ailleurs suggéré que ces molécules auraient un gène ancestral commun en raison de la similarité dans leur structure et leur composition en acides aminés. À l'intérieur de cette superfamille, il y a 5 isoformes de TGF $\beta$  hautement homologues : TGF $\beta$ 1 à TGF $\beta$ 5. Le TGF $\beta$ 1, 2 et 3 sont présents chez la plupart des espèces incluant les mammifères (Derynck *et al.*, 1988). Le TGF $\beta$ 4 est retrouvé seulement chez les oiseaux (Jakowlew *et al.*, 1988) tandis que le TGF $\beta$ 5 est seulement présent chez les amphibiens (Kondaiah *et al.*, 1990). L'importance biologique des peptides TGF $\beta$  est

suggérée par le fait que la séquence d'acides aminés est identique chez le poulet, la vache, le porc, les primates et les humains alors qu'elle diffère seulement par un acide aminé chez la souris. Les gènes TGF $\beta$  des différents isoformes ont tous été clonés (Massagué 1990).

#### 10.6.6.1. TGF $\beta$ LATENT

Le TGF $\beta$ 1 synthétisé comme un propeptide de 390 acides aminés subit un changement protéolytique intracellulaire résultant en un peptide C-terminal de 112 acides aminés et un fragment de 278 acides aminés nommé le peptide de latence (LAP) (Border and Noble 1995). Le TGF $\beta$ 1 actif est un dimère formé par la liaison de deux peptides C-terminal par des liens disulfides. Par la suite, le LAP se lie de façon non-covalente au dimère TGF $\beta$ 1 formant un complexe de 100 kDa nommé le TGF $\beta$ 1 latent. Une seconde protéine produite par un autre gène peut se lier de façon covalente au TGF $\beta$  latent, formant un complexe de 225 à 260 kDa. Cette protéine de liaison du TGF $\beta$  latent nommée LTBP (pour Latent TGF $\beta$  Binding Protein) empêche la liaison du dimère à son récepteur ce qui le rend inactif (Lawrence 1996).

Le TGF $\beta$  peut être libéré artificiellement des protéines de latence par un traitement acide, par la chaleur ou par l'urée mais l'activation in vivo se produit aussi de façon enzymatique (Ingman et Robertson 2002). Il a été démontré que l'association du TGF $\beta$  latent avec le récepteur mannose-6-phosphate / IGF II active l'"urokinase plasminogen activator", clivant le

plasminogen en plasmine et libérant le TGF $\beta$  du LAP (Godar *et al.*, 1999). Ainsi, la libération de TGF $\beta$  biologiquement actif peut être obtenue par des protéases incluant la plasmine, les cathepsines B et D, la calpaïne et les glycosidases comme l'endoglycosidase F, la sialidase et la neuraminidase (Khalil 1999). La glycoprotéine thrombospondine-1 se lie au LAP du TGF $\beta$  latent, et induit un changement conformationnel suivit d'une exposition des sites permettant la liaison aux récepteurs TGF $\beta$ . L'importance physiologique de ce mode d'action a été démontrée par le phénotype d'inflammation tissulaire observé suite à une mutation nulle du gène de la thrombospondine-1 qui était en tout point semblable à celui obtenu lors de la mutation du gène de TGF $\beta$ 1 (Shull *et al.*, 1992; Crawford *et al.*, 1998; Kulkarni *et al.*, 1993). Suite à la sécrétion, le TGF $\beta$  latent peut se lier à la protéine associée à la membrane cellulaire, le récepteur mannose-6-phosphate ou à la matrice extracellulaire environnante où il est emmagasiné jusqu'à ce qu'il soit utilisé (Ingman et Robertson 2002).

#### 10.6.6.2. RÉCEPTEURS DE TGF $\beta$

Le TGF $\beta$  peut avoir des effets autocrines ou paracrines. Six différents récepteurs ont été décrits dont le plus récent est l'endogline. Les récepteurs peuvent être divisés en deux types, soit ceux qui produisent un signal intracellulaire et ceux qui servent à emmagasiner ou à présenter les molécules aux récepteurs qui produisent une réponse. En effet deux récepteurs transmembranaires (TGF $\beta$ RI et TGF $\beta$ RII) avec des domaines cytosoliques

sérine/thréonine protéine kinase sont à l'origine de la liaison du TGF $\beta$  et de la transduction du signal dans les cellules cibles (Massagué 1990). Un complexe hétérotétramérique du TGF $\beta$ RI et du TGF $\beta$ RII en association avec le ligand est requis pour la transduction du signal. Le TGF $\beta$ RII lie le TGF $\beta$ 1 et TGF $\beta$ 3 actif avec une haute affinité, et le TGF $\beta$ RI est par la suite recruté. Au contraire le TGF $\beta$ 2 a une faible affinité pour le TGF $\beta$ RII et requiert une co-localisation additionnelle de molécules transmembranaires pour faciliter la liaison au récepteur. Au moins trois autres protéines transmembranaires ont été identifiées comme étant capable de lier le TGF $\beta$ , mais ne sont pas en mesure de produire un signal de transduction. Le betaglycan aussi connu comme le TGF $\beta$ RIII localise le TGF $\beta$ 1, le TGF $\beta$ 2 et le TGF $\beta$ 3 à la membrane plasmatique et est particulièrement important pour stabiliser l'interaction entre le TGF $\beta$ 2 et le TGF $\beta$ RII (Massagué 1992; Ingman et Robertson 2002). Il potentialise la transduction du TGF $\beta$  par une interaction au domaine cytosolique du TGF $\beta$ RII (Blobe *et al.*, 2001). L'endogline est une protéine transmembranaire qui lie le TGF $\beta$ 1 et le TGF $\beta$ 3 et forme un complexe avec les récepteurs du TGF $\beta$  et avec d'autres récepteurs de la superfamille du TGF $\beta$  (Barbara *et al.*, 1999). Plusieurs protéines solubles, comme l' $\alpha$ -macroglobuline par exemple, lient aussi le TGF $\beta$  et agissent pour séquestrer le TGF $\beta$  loin de la surface cellulaire (Miyazono *et al.*, 1993). Ainsi cette combinaison de récepteurs et de protéines de liaison offre un éventail considérable de possibilités de régulation de la liaison du TGF $\beta$  au récepteur

permettant le signal de transduction. En aval de la liaison du TGF $\beta$  à la membrane cellulaire, le TGF $\beta$ RII phosphoryle le TGF $\beta$ RI ce qui cause l'activation de facteurs de transduction intracellulaire qui sont majoritairement ceux de la famille Smad (Mad : Mother against decapentaplegic) (Ingman et Robertson 2002). Cependant le patron d'activation des facteurs de transduction est dépendant de l'activité concurrente de plusieurs cofacteurs synergiques ou antagonistes contrôlés par d'autres voies de signalisation de récepteurs (Ten Dijke *et al.*, 2000).

#### **10.6.6.3. RÔLE DU TGF $\beta$**

Des études de mutations ciblées ou des études de surexpression des isoformes du TGF $\beta$  chez la souris ont permis d'analyser le rôle des protéines de TGF $\beta$  in vivo. Le rôle vital dans le développement et dans la régulation immunologique pour les trois isoformes de TGF $\beta$  retrouvés chez le mammifère, a clairement été démontré par des mutations complètes de chacun de ces trois gènes qui se sont avérées être létales dans les trois cas. De plus, des différences majeures entre les trois phénotypes soulignent l'existence d'activités isoformes-spécifiques in vivo et permettent la mise en évidence de trois isoformes qui ne sont pas fonctionnellement redondants (Shull *et al.*, 1992; Kulkarni *et al.*, 1993; Kaartinen *et al.*, 1995; Proetzel *et al.*, 1995; Sanford *et al.*, 1997; Ingman et Robertson 2002).

Durant la folliculogénèse et la maturation de l'ovocyte qui impliquent un réseau complexe d'interactions cellulaires, les facteurs de croissance agissent comme régulateurs de la prolifération et de la différenciation des cellules ovariennes. Dans l'ovaire, le TGF $\beta$ 1 est localisé dans la thèque chez le porc (Skinner *et al.*, 1987), le hamster (Roy *et al.*, 1992), le rat (Adashi *et al.*, 1989; Teerds et Dorrington 1992) et la souris (Ghiglieri *et al.*, 1995). Le TGF $\beta$ 2 est exprimé dans la granulosa de rat (Mulheron et Schomberg 1990; Mulheron *et al.*, 1991), de souris (Ghiglieri *et al.*, 1995) et de hamster (Roy *et al.*, 1992).

Ces deux formes peuvent stimuler individuellement l'incorporation de thymidine tritiée dans les cellules de hamster provenant de follicules préantraux en potentialisant l'effet de la FSH (Roy 1993). De plus, le TGF $\beta$ 1 et TGF $\beta$ 2 ont tous les deux été rapportés comme étant des facteurs qui augmentent l'expression des récepteurs FSH par les cellules de granulosa de rat (Dunkel *et al.*, 1994). À l'opposé, le TGF $\beta$  peut inhiber l'expression des récepteurs EGF/TGF $\alpha$  et du même coup l'effet positif de ces peptides sur la prolifération des cellules de granulosa (Oury *et al.*, 1992; Roy 1993). De plus, le TGF $\beta$  diminue la croissance *in vitro* et le taux de survie de follicules bovins préantraux isolés et il inhibe complètement les effets stimulants du bFGF (Wandji *et al.*, 1994). Il apparaît donc que le TGF $\beta$  peut avoir des effets stimulateurs et des effets inhibiteurs sur la prolifération cellulaire. Il fut aussi démontré *in vitro* que les peptides TGF $\beta$  ont la capacité de moduler soit

positivement ou négativement la sécrétion des stéroïdes dépendant du compartiment cellulaire utilisé, de l'espèce et des conditions expérimentales.

Par exemple dans les cellules de granulosa isolées de follicules provenant de souris traitées au diethylstilbestrol (DES), le TGF $\beta$  augmente la sécrétion d'oestradiol par la FSH en induisant l'activité aromatasase (Adashi *et al.*, 1989). Au contraire dans les cellules de granulosa de porc, le TGF $\beta$  inhibe l'effet stimuloire de la FSH sur la sécrétion d'oestradiol (Ford et Howard 1997). Le même phénomène peut être observé pour la progestérone. Dans les cellules de granulosa de rats immatures traitées au DES, le TGF $\beta$  augmente la production de progestérone stimulée par la FSH (Hutchinson *et al.*, 1987) alors qu'il l'inhibe dans les cultures de follicules bovins préantraux (Wandji *et al.*, 1996).

Par ailleurs, le TGF $\beta$  peut aussi démontrer un effet biphasique dépendant de la concentration de FSH. En effet, chez les rats traités au DES, le TGF $\beta$  a augmenté l'effet d'une concentration suboptimale de FSH sur les récepteurs de LH. À l'opposé, le TGF $\beta$  inhibe la réponse des récepteurs de LH à une dose optimale de FSH (Knetch *et al.*, 1987).

À la lumière de ces informations, il a déjà été suggéré que le TGF $\beta$  devrait être considéré comme un modulateur cellulaire. Lorsqu'un signal est faible dans la cellule, le TGF $\beta$  le stimule, ou lorsque le signal est fort, le

TGF $\beta$  le réprime (Sporn and Roberts 1990; Sporn and Roberts 1992). Il est donc difficile de prévoir les effets du TGF $\beta$  puisque son rôle dépend des conditions du milieu cellulaire. C'est la raison pour laquelle chez les mammifères, le rôle physiologique réel du TGF $\beta$  n'est pas encore connu. Cette situation est un peu à l'image de tous les facteurs de croissance dont la majorité interviennent au cours du développement folliculaire. Toutefois, le manque d'informations à leur égard dans un contexte physiologique, empêche de définir leur implication réelle dans le développement folliculaire. C'est pourquoi la recherche sur le développement folliculaire et les facteurs de croissance demeure un sujet d'actualité.

### 10.7 OBJECTIFS

Les travaux de recherche développés dans cette thèse propose une évaluation de la dynamique et du rôle des peptides reliés au "transforming growth factor beta" (TGF $\beta$ ) durant la croissance des follicules de 2 à 5 mm *in vitro* et de 5 à 9,5 mm *in vivo*. L'hypothèse principale est que le TGF $\beta$  module la stéroïdogénèse des follicules en croissance, ce qui influencerait le développement folliculaire et la sélection du follicule dominant. Le premier objectif était initialement de réaliser une étude préliminaire afin de : vérifier la présence du système TGF $\beta$  dans les follicules bovins en croissance; de valider un test ELISA servant à quantifier le TGF $\beta$  dans le liquide folliculaire. Le second objectif (article 1) visait à déterminer si le TGF $\beta$  est exprimé de façon différentielle dans les follicules en croissance, en voie de passer les différentes



étapes de la sélection et d'établir s'il existe des liens entre ce facteur de croissance et la sécrétion d'oestradiol. L'étude de l'article 1 permettra également de cibler un ou des diamètre(s) folliculaire(s) qui serait plus intéressant à continuer d'investiguer. Enfin, les derniers objectifs sont d'examiner le rôle du TGF $\beta$  en utilisant un système de culture de cellule de granulosa bovine dont les paramètres ont été définis dans une étude préliminaire suivie d'une étude complète (article 2). En se basant sur les résultats obtenus dans l'étude in vivo, les cultures de cellules serviront à nous aider à interpréter, à comprendre et à détailler le rôle physiologique du système TGF $\beta$ .

## **11. MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS**

### 11.1 ÉTUDE PRÉLIMINAIRE IN VIVO

Une étude préliminaire exploratoire a d'abord été effectuée à un seul temps du cycle oestral afin de déterminer : 1) la présence des peptides TGF $\beta$  dans le liquide folliculaire bovin; 2) dans l'affirmative, lequel des deux isoformes TGF $\beta$ 1 ou TGF $\beta$ 2 était le plus abondant; 3) s'il existe des différences de TGF $\beta$  entre les follicules d'une même cohorte; 4) si les récepteurs TGF $\beta$ RII étaient présents dans la granulosa et dans la thèque bovine. Ainsi, dans cette première étude, les taures (n=10) ont été synchronisées avec deux injections intramusculaires de 500  $\mu$ g prostaglandine F $_{2\alpha}$  (Estrumate : Coopers Agropharm inc. Ajax, Ontario, Canada) données à 11 jours d'intervalles. La détection des chaleurs a été effectuée deux fois par jour à 08 :00 et 16 :00 durant 30 minutes. L'ovulation et le développement folliculaire ont été suivis par échographie transvaginale avec une sonde microconvexe de 6,5 MHz et un échographe Hitachi-515 (Pieterse *et al.*, 1991) (Fig 1). Une fois par jour, à partir du jour 0 (jour de l'oestrus) jusqu'au jour 4 du cycle, les follicules > 4 mm ont été suivis d'un jour à l'autre, ont été comptés et mesurés (Fig 2). Au jour 4, des ovariectomies bilatérales ont été réalisées par colpotomie (Sirois, 1994). Les ovaires ont été séparés longitudinalement et disséqués à travers le hile (Fig 3). Le nombre de follicules de plus de 5 mm a été déterminé par transillumination (Fig 4) puis ces follicules ont été partiellement disséqués et remesurés avec un micromètre. Le liquide folliculaire a été aspiré doucement et centrifugé durant 15 minutes à 2000 X g. Le surnageant a été congelé à -70°C pour de futures analyses afin de

mesurer l'oestradiol, la progestérone, le TGF $\beta$ 1 et le TGF $\beta$ 2 total (voir la méthodologie détaillée dans l'article 1 section 11.2.3.2 et 11.2.3.3 aux pages 54-55). Les follicules ont été préparés pour l'immunohistochimie.

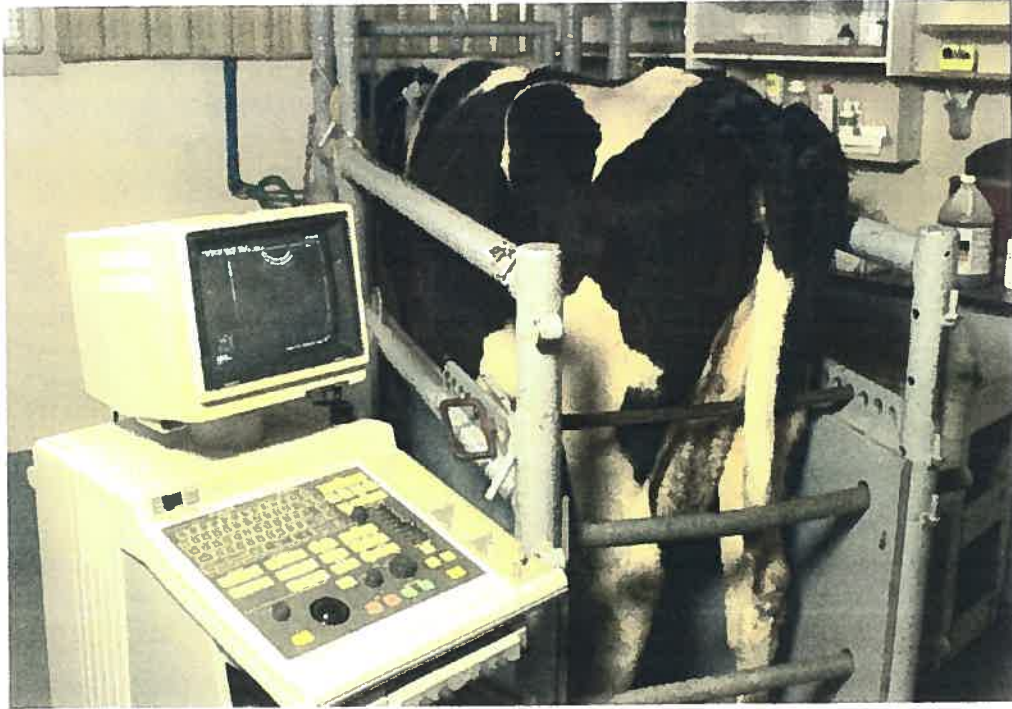


Figure 1. Échographe Hitachi-515 et cage de contention servant à faire le suivi à l'échographie.

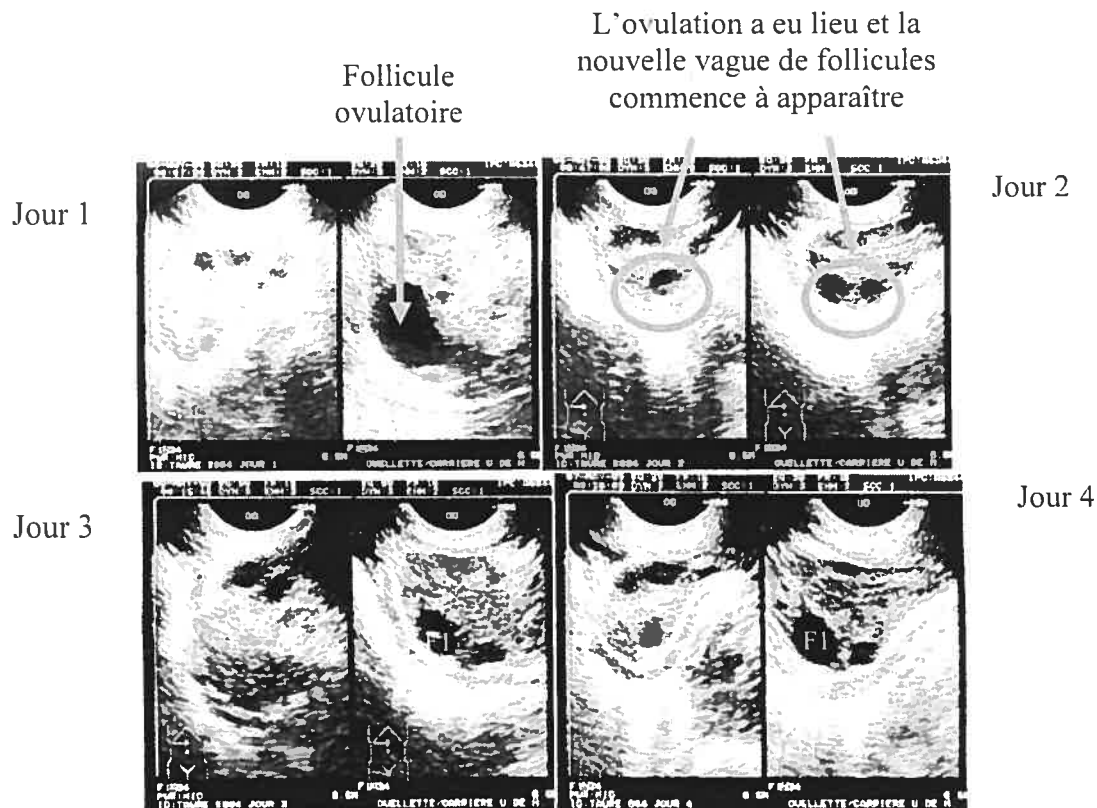


Figure 2. Photos représentatives du suivi échographique de l'ovaire gauche et de l'ovaire droit provenant de taures (n=10) synchronisées avec deux injections intramusculaires de 500 µg de prostaglandine F<sub>2α</sub> données à 11 jours d'intervalles, dont la détection des chaleurs a été effectuée deux fois par jour à 08 :00 et 16 :00 durant 30 minutes et dont l'ovulation et le développement folliculaire ont été suivis par échographie transvaginale avec une sonde microconvexe de 6.5 MHz et un échographe Hitachi-515. Une fois par jour, à partir du jour 0 (jour de l'oestrus) jusqu'au jour 4 du cycle, les follicules > 4 mm ont été suivis d'un jour à l'autre, ont été comptés et mesurés. Au Jour 1, on peut observer le follicule ovulatoire qui est par la suite disparu (ovulé) entre le Jour 1 et le Jour 2. Au Jour 2, le follicule ovulatoire est disparu et une nouvelle vague de follicule se développe. Au Jour 3 et au Jour 4 on peut apercevoir la croissance du plus gros follicule (F1).

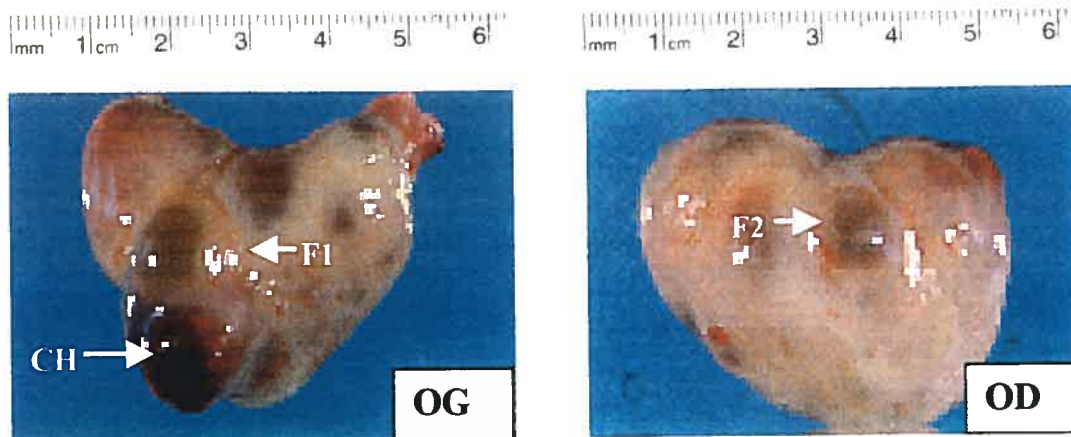


Figure 3. Photos représentatives d'ovaires (ovaire gauche (OG) et ovaire droit (OD)) obtenus de taures (n=10) synchronisées avec deux injections intramusculaires de 500  $\mu$ g de prostaglandine  $F_{2\alpha}$  données à 11 jours d'intervalles, dont la détection des chaleurs a été effectuée deux fois par jour à 08 :00 et 16 :00 durant 30 minutes et dont l'ovulation et le développement folliculaire ont été suivis par échographie transvaginale avec une sonde microconvexe de 6.5 MHz et un échographe Hitachi-515. Au jour 4, des ovariectomies bilatérales ont été faites par colpotomie. Sur le panneau de gauche, le corps hémorragique (CH) nouvellement formé suite à l'ovulation et le plus gros follicule (F1) de la nouvelle vague folliculaire peuvent être observés, alors que le deuxième plus gros follicule (F2) de cette vague folliculaire est présent sur le panneau de droite.

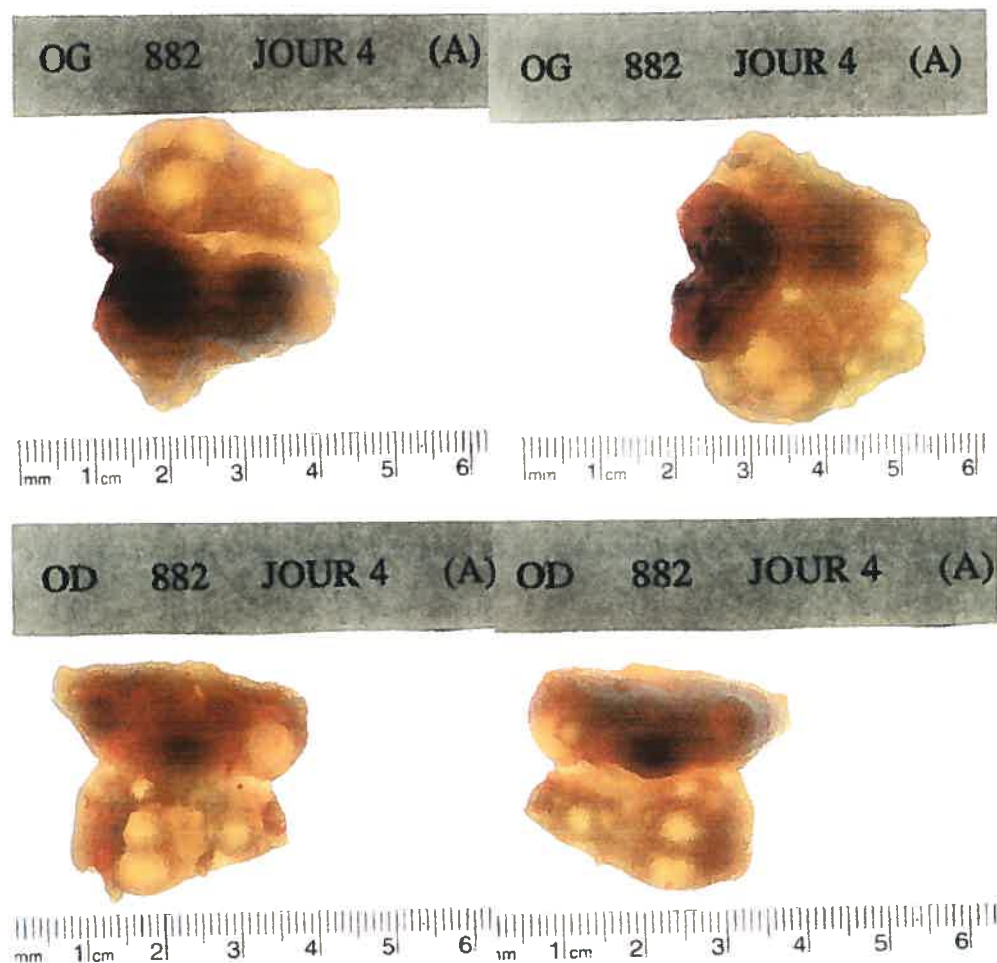


Figure 4. Photos représentatives d'ovaires (ovaire gauche (OG) et ovaire droit (OD)) obtenus de taures (n=10) synchronisées avec deux injections intramusculaires de 500 µg prostaglandine  $F_{2\alpha}$  dont les chaleurs ont suivi 2 fois par jour et dont le développement folliculaire a été suivi du jour 0 (jour de l'oestrus) jusqu'au jour 4 du cycle. Au jour 4, des ovariectomies bilatérales ont été faites par colpotomie et les ovaires ont été séparés longitudinalement et disséqués à travers le hile. Le nombre de follicules > 5 mm a été déterminé par transillumination, puis ces follicules ont été partiellement disséqués et remesurés avec un micromètre.

### 11.1.1 IMMUNOHISTOCHEMIE

Les follicules ont été fixés dans une solution tamponnée de formaldéhyde 10% pour 24 h, avec brassage et à la température de la pièce. Ils ont été enrobés dans la paraffine. Des sections représentatives de quatre microns ont été déparaffinées. La peroxidase endogène a été désactivée par une incubation de 30 minutes dans une solution de 0,3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans le méthanol.

Les sections ont été lavées dans le PBS, bloquées durant 20 minutes avec du sérum de chèvre à la température de la pièce, et incubées pour la nuit à 4°C avec 1 µg/ml d'anticorps polyclonal de lapin anti-récepteur II de TGFβ receptor II (TGFβRII) (C-16) élevé contre le TGFβRII humain (Santa Cruz Biotechnology : Santa Cruz, CA, USA). Après un rinçage, les sections ont été incubées 45 minutes à la température de la pièce avec un anticorps de chèvre anti-lapin couplé à la biotine puis avec l'avidin DH-biotinylated horseradish peroxidase (HRP) dilué 1: 222 dans le PBS, fournit avec le Vectastain avidin : biotin complex kit (ABC kit : Vector Laboratories, Burlington, Ontario, Canada) pour la même durée de temps. Le HRP est visualisé en réagissant avec du diaminobenzidine/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durant 15 minutes. Après un lavage, les sections ont été soumises à une coloration de contraste avec la solution de Gill's haematoxylin #2. Elles ont ensuite été rincées dans l'eau et montées sur lames. Les sections témoins ont été incubées sans anticorps (seulement du



PBS) ou avec l'anticorps préalablement neutralisé avec un excès de 5 fois du peptide de blocage TGF $\beta$ RII obtenu du manufacturier. La coloration brune indique la localisation des récepteurs.

Dans cette expérience, le follicule le plus gros (F1) et le second plus gros (F2) ont été mesurés du jour 1 au jour 4. De façon à déterminer si la déviation dans la croissance des follicules a eu lieu au jour 4, la différence de diamètre entre le F1 et le F2 a été utilisée comme variable et a été analysée dans un ANOVA à mesures répétées (one-way ANOVA : STATA, 2000) en examinant l'effet du facteur temps. La valeur significative a été fixée à  $p < 0.05$ . Les follicules récoltés au jour 4 ont été mesurés et classifiés par diamètre décroissant dans 3 catégories de follicules : F1 (le plus grand diamètre); F2 (le deuxième plus grand diamètre) et FS (la moyenne des valeurs mesurées dans les autres follicules subordonnés de plus de 5 mm de diamètre à la dissection). Un test de T païré a été utilisé pour comparer la concentration de  $E_2$ ,  $P_4$ , ratio  $E_2/P_4$ , TGF $\beta$ 1 et TGF $\beta$ 2 total entre le F1 et F2, le F1 et FS et le F2 et FS. En raison du nombre de tests (3 par variable), l'approche de Bonferroni a été utilisée pour contrôler la valeur significative (Shoukri and Edge, 1996). La valeur significative du test de T a été fixée à  $p < 0.02$ . Pour l'immunohistochimie, la proportion de follicules avec une coloration positive (+ à +++) a été estimée visuellement, mais n'a pas pu être analysée statistiquement en raison de l'absence de précision dans la détermination de l'intensité de la couleur.

Le diamètre moyen du follicule (F1) mesuré à l'échographie était de  $8,9 \pm 0,4$  mm (erreur-type) au jour 4 avec un écart de 6,9 à 10,7 mm. Le diamètre moyen du F2 était de  $7,3 \pm 0,3$  mm. La différence de diamètre entre le F1 et le F2 n'était pas significativement différente dans le temps ( $p=0.28$ ). À la dissection, 4 à 7 follicules  $> 5$  mm ont été récoltés de chacune des taures. Les follicules étaient en moyenne 1 mm plus grand à la dissection qu'à l'échographie. Une taure a été exclue du groupe car les concentrations les plus hautes en oestradiol ont été retrouvées dans les deux plus petits follicules.

L'immunohistochimie a démontrée une coloration intense (++ et +++) pour le TGF $\beta$ RII dans les cellules de granulosa et de thèque dans 70 à 90% des F1, F2 et FS (Fig 5 A et B). La spécificité de l'anticorps a été démontrée par une faible coloration lorsque l'anticorps a été préincubé avec une concentration saturante de peptide de blocage TGF $\beta$ RII (Fig 5 C et D).

Les concentrations de E<sub>2</sub> et les ratio E<sub>2</sub>/P<sub>4</sub> du liquide folliculaire étaient plus élevées dans les F1 à comparer aux F2 ( $p=0.003$ ) et dans les F2 à comparer aux FS ( $p=0.017$ )(tableau I). Il n'y avait pas de différence significative entre aucune des paires de follicules pour la P<sub>4</sub>. Les concentrations intrafolliculaires de TGF $\beta$ 1 et de TGF $\beta$ 2 totaux n'étaient pas significativement différentes entre les F1 et les F2, ni avec FS. Les concentrations totales de TGF $\beta$ 2 étaient cinq fois plus basses que celles du

TGF $\beta$ 1 total. Il n'y avait pas de corrélation significative entre l'E<sub>2</sub> et le TGF $\beta$ 1 total, ni entre l'E<sub>2</sub> et le TGF $\beta$ 2 total dans les follicules examinés au jour 4.

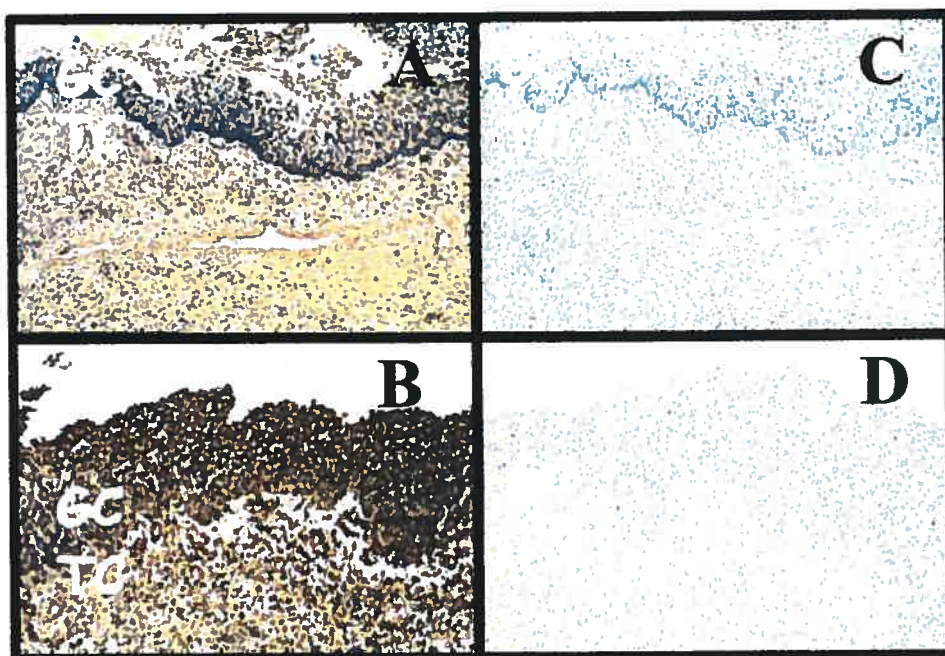


Figure 5. Coloration immunohistochimique pour le TGF $\beta$  récepteur II (TGF $\beta$ RII) dans les cellules de granulosa (GC) et les cellules de thèque (TC) des follicules plus grand que 5 mm récoltés au jour 4 du cycle oestral. Les GC dans les panneaux A et B montrent des exemples représentatifs de l'intensité de la coloration : A (++) , B (+++). Comme contrôle négatif, les panneaux C et D sont des sections de tissu adjacentes à ceux des panneaux A et B, mais qui ont été incubées avec des anticorps préincubés avec un excès de peptide de blocage TGF $\beta$ RII (x200).

TABLEAU I. Valeurs moyenne  $\pm$  SEM des diamètres et des concentrations d'hormones mesurées dans le liquide folliculaire de follicules plus grands que 5 mm récoltés au jour 4 du cycle oestral et classifiés par diamètre décroissant\*.

Catégorie de follicule	Diamètre (mm)	Oestradiol (ng/ml)	TGFβ1 total (ng/ml)	TGFβ2 total (ng/ml)	Progestérone (ng/ml)	Ratio E <sub>2</sub> /P <sub>4</sub>
F1	8.9 $\pm$ 0.4	300.1 $\pm$ 61.2 <sup>a</sup>	12.3 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>	2.2 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	61.2 $\pm$ 9.3 <sup>a</sup>	5.48 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>
F2	7.3 $\pm$ 0.3	64.2 $\pm$ 19.5 <sup>b</sup>	12.8 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	2.3 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	51.6 $\pm$ 13.7 <sup>a</sup>	1.53 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>
FS	5.8 $\pm$ 0.3	3.2 $\pm$ 1.8 <sup>c</sup>	15.6 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	2.8 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	58.1 $\pm$ 22.0 <sup>a</sup>	0.17 $\pm$ 0.1 <sup>c</sup>

\* : Les analyses statistiques n'ont pas été effectuées sur le diamètre étant donné que les follicules ont été classés par taille. Le F1 est le plus gros follicule, le F2 est le deuxième plus gros et le FS est la moyenne des follicules subordonnés restants. Les moyennes avec des lettres différentes en exposant à l'intérieur d'une colonne sont différentes statistiquement (test de t-pairé, p<0.02, n=9)

Les résultats de cette étude ont démontré que: 1) les peptides TGF $\beta$  sont présents et quantifiables dans le liquide folliculaire bovin par ELISA; 2) le TGF $\beta$ 1 est cinq fois plus abondant que le TGF $\beta$ 2; 3) aucune différence significative n'a été observée dans les concentrations de TGF $\beta$ 1 et de TGF $\beta$ 2 entre les follicules d'une même cohorte examinée au jour 4 du cycle oestral; 4) les récepteurs TGF $\beta$ RII sont présents dans la thèque et dans la granulosa de presque tous les follicules d'une même cohorte. À la lumière de ces résultats, nous avons décidé d'aller de l'avant avec une étude plus poussée qui tracerait un portrait plus global de la dynamique du TGF $\beta$  dans le temps. Nous voulions savoir ce qui se passait avant et après la déviation, d'où le profil de la deuxième étude (voir article 1).

Par ailleurs, cette première étude a permis d'établir certains paramètres pour la deuxième étude. Tout d'abord dans l'étude préliminaire, le fait qu'il n'y ait pas eu d'effet du temps du jour 1 à 4 sur la différence de diamètre entre le F1 et le F2 pourrait être dû au fait que les mesures ont été effectuées en fonction du jour du cycle et non pas en fonction du jour d'apparition du premier follicule > 5 mm, ce que Ginther a défini comme le jour de l'émergence (Ginther *et al.*, 2000). En effet, ce qui étonne en récoltant des follicules à un jour donné du cycle c'est la une grande variation dans les diamètres du plus gros follicule au jour 4 (6,9 à 10,7 mm), et la variation élevée dans les concentrations d'oestradiol du plus gros follicule. Il est donc plausible que certaines vaches avaient déjà subi une déviation entre le F1 et le

F2, alors que ce n'était pas le cas chez d'autres vaches. Il n'existe pas de consensus sur l'utilisation du terme déviation, mais selon Ginther (2000), la déviation a lieu lorsqu'il est possible de détecter une réduction ou un arrêt de la croissance des follicules subordonnés incluant le deuxième plus gros follicule. Ainsi pour établir le temps de déviation, Ginther utilise une méthode rétrospective. En effet, il suggère que le temps déviation soit commencé à **l'échographie précédant** la première détection où il y a une différence significative entre le diamètre des deux plus gros follicules. Ainsi au moment où l'on détecte un ralentissement du deuxième plus gros follicule, par exemple lorsque le diamètre du plus gros follicule est de 9,5 mm, on revient un examen en arrière pour déterminer le dernier diamètre que l'on avait mesuré. Selon Ginther, une différence de diamètre entre le F1 et le F2 est présente lorsque le F1 atteint 9,5 mm, ce qui par conséquent signifie que la déviation se situe aux environs de 8,5 mm. Or, pour éviter d'avoir une aussi grande variation dans le diamètre du plus gros follicule, nous avons choisi pour la prochaine étude d'utiliser le diamètre du plus gros follicule, plutôt que le jour du cycle, pour échantillonner les follicules à quatre stades de développement différents, c'est-à-dire lorsque le plus gros follicule a atteint 6,5, 7,5, 8,5 et 9,5 mm (Fig 6 et article 1). De plus, nous avons choisi l'aspiration folliculaire au lieu de la chirurgie. Cette méthode a l'avantage d'être moins coûteuse puisque les prélèvements peuvent être faits à plusieurs reprises sur les mêmes animaux, mais elle a le désavantage de fournir seulement des échantillons de liquide folliculaire, c'est-à-dire que l'on n'a pas accès au follicule comme tel.

Néanmoins, pour les besoins de la deuxième étude, l'aspiration représentait la solution idéale (Fig 7). Enfin, le fait qu'il y ait eu cinq fois moins de TGF $\beta$ 2 que de TGF $\beta$ 1 et que nous voulions déterminer les concentrations de la forme latente et active du TGF $\beta$ , nous avons décidé de mesurer l'isoforme TGF $\beta$ 1 seulement.

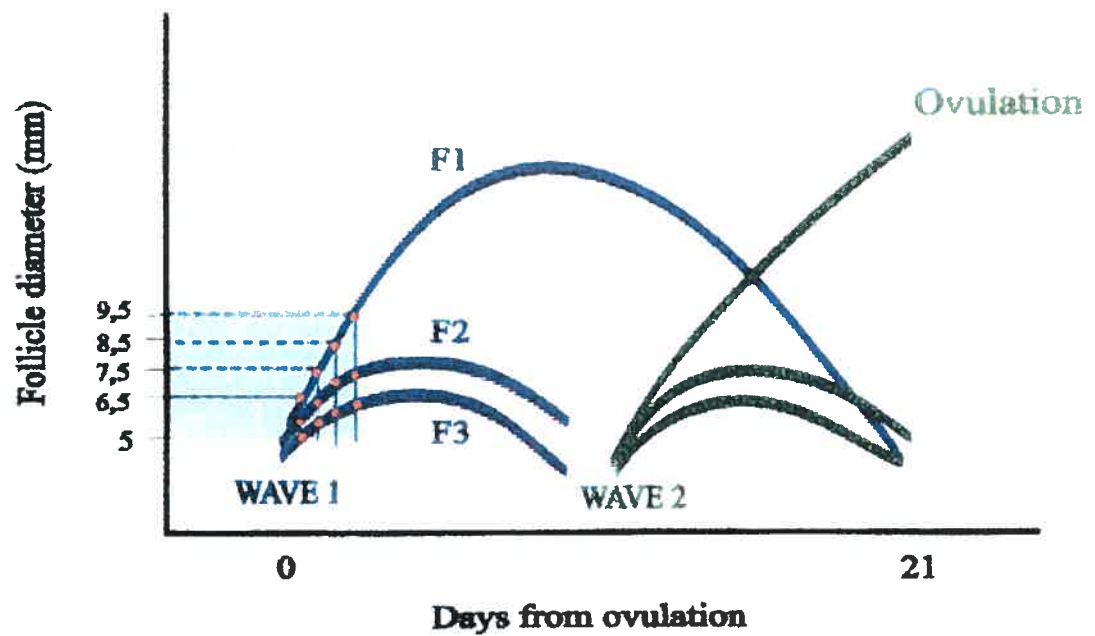


Figure 6. Illustration des quatre stades de prélèvement des follicules de plus de 5 mm dans l'article 1. Ces follicules ont été prélevés lorsque le plus gros follicule (F1) de la première vague folliculaire atteint 6,5, 7,5, 8,5 et 9,5 mm de diamètre (voir matériel et méthode de l'article 1).



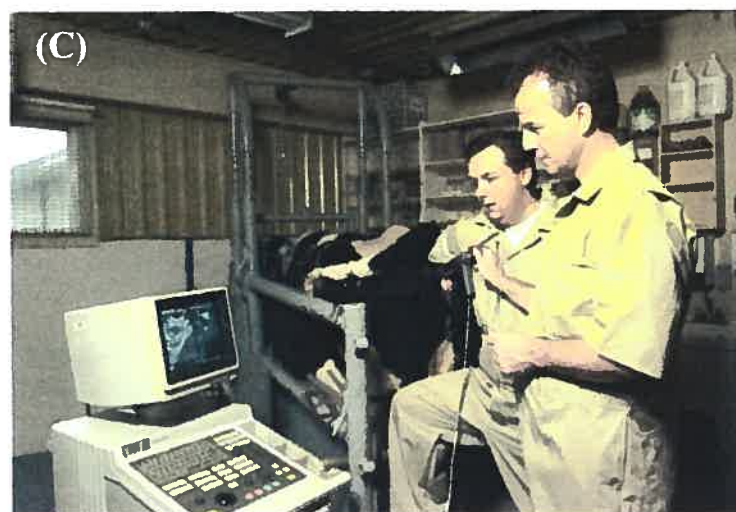


Figure 7. (A) Préparation de l'animal et de la sonde pour faire l'échographie transvaginale. (B) Mise en place de la sonde à l'intérieur du vagin, échographie et mise en place de l'ovaire sur la sonde en vue de l'aspiration (C) Aspiration du follicule par le deuxième opérateur, au signal du premier opérateur.

## 11.2. ÉTUDE PRINCIPALE IN VIVO/ARTICLE 1

RUNNING HEAD: TGF $\beta$  INHIBITION OF OESTRADIOL IN  
BOVINE FOLLICLES

**Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 is negatively correlated with  
estradiol and follicle size at the time of emergence of bovine  
ovarian follicles monitored by ultrasonography <sup>1</sup>**

Yan Ouellette <sup>2</sup> and Paul D. Carrière <sup>2,3</sup>

<sup>2</sup>*Centre de recherche en reproduction animale, Faculté de médecine  
vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada,  
J2S 7C6 .*

<sup>1</sup>Research supported by NSERC

<sup>3</sup>Correspondance: Paul D. Carrière, CRRA, Faculté de médecine  
vétérinaire, Université de Montréal, 3200 Sicotte, St-Hyacinthe,  
Québec, Canada, J2S 7C6, Tel : 450-773-8521 ext. 8328, FAX : 450-  
778-8103, E-mail : [paul.d.carriere@umontreal.ca](mailto:paul.d.carriere@umontreal.ca).

### 11.2.1. SUMMARY

The objective of this study was to characterize the role of transforming growth factor  $\beta 1$  (TGF $\beta 1$ ) and its relation to estradiol during selection of the bovine dominant follicle. TGF $\beta 1$  was measured at different stages of development from follicular fluid of 2-4 follicles (> 5 mm) per heifer sampled by ultrasound-guided-transvaginal aspiration, when the largest follicle (F1) had reached: 6.5, 7.5, 8.5 and 9.5 mm (n=12, repeated-measures). At the earliest stage of development of the first wave cohort when the F1 measured 6.5 mm, there was a significant negative relationship between follicular fluid TGF $\beta 1$  concentration and estradiol on one hand, and TGF $\beta 1$  concentration and follicle size on the other hand. Follicular fluid TGF $\beta 1$  concentration was not associated with estradiol and follicle size at later stages of development including the time of deviation when the follicle was still growing and the second largest follicle (F2) had begun to regress. Transient inhibition of estradiol production and follicle growth by TGF $\beta 1$  at the early stage of development of the follicular wave, may be an important mechanism whereby subordinate follicles limit their development in favour of the continued growth and selection of a single ovulatory follicle.

### 11.2.2. INTRODUCTION

Understanding the hormonal mechanisms that control growth and selection of the ovulatory follicle in the cow has been an area of intensive research for more than 15 years (for review see Roche *et al.*, 1998; Webb *et al.*, 1999; Ireland *et al.*, 2000; Fortune *et al.*, 2001; Ginther *et al.*, 2001). In cattle, ovarian ultrasonography has been used to study the development of cohorts of follicles that were shown to emerge in a cyclical manner termed follicular waves; there are two or three such waves occurring throughout the estrous cycle. During each wave, a single dominant follicle is selected which continues to grow while other follicles of the cohort regress. The manner in which the dominant follicle is selected is similar in all the waves, however the dominant follicle of initial wave(s) eventually regresse(s) whereas the dominant follicle of the last wave ovulates.

Deviation in growth rates between the largest (dominant follicle) and second largest follicle of the first wave occurs around day 4-5 of the oestrous cycle when the largest follicle reaches 8.5 mm in diameter and coincides with an increase in plasma oestradiol concentration (Carriere *et al.*, 1995; Ginther *et al.*, 1996; Ginther 2000). As originally defined by Hodgen (1982), follicular selection begins with recruitment of a cohort of primordial follicles. Therefore, in cows deviation represents the final cycle of selection between the two largest follicles that originate from a previously selected cohort of smaller follicles.

Several studies have shown that oestradiol is a key hormone involved in selection of the dominant follicle. It was shown that the largest follicle had a greater capacity to secrete oestradiol than the second largest follicle before (Bodensteiner *et al.*, 1996; Evans and Fortune 1997; Mihm *et al.*, 2000; Beg *et al.*, 2002) or coincident with deviation at 8.5 mm (Beg *et al.*, 2001). The determinant role of oestradiol in selection of the dominant follicle was also shown by Mihm *et al.*, (2000) who observed that among the cohort of follicles sampled on Day 3 (largest follicle, 7.6 mm), the follicle with the highest oestradiol concentration was the follicle that subsequently became the dominant follicle 78% of the time. Thus the enhanced capacity to produce oestradiol would in part be responsible for the selection and the deviation in growth rate of the dominant follicle.

As the capacity to secrete oestradiol is important for growth of the dominant follicle, it became imperative to understand the intrafollicular mechanisms controlling oestradiol production during follicle selection. Many growth factors from the transforming growth factor- $\beta$  (TGF $\beta$ ) / activin / inhibin / bone morphogenic protein superfamily; the epidermal growth factor (EGF)/ TGF $\alpha$  family and the insulin-like-growth factor (IGF)/IGFBP family have been shown to regulate growth and steroidogenesis in cultured granulosa and theca cells (May *et al.*, 1988; Roberts and Skinner 1991; Stewart *et al.*, 1995; Wrathall and Knight 1995; Spicer *et al.*, 1996; Wandji *et al.*, 1996; Rouiller *et al.*, 1997; Otsuka *et al.*, 2000). Several inhibins and

activins isoforms from the TGF $\beta$ -superfamily have been quantified in follicular fluid of the first-wave follicles in the cow (Mihm *et al.*, 2000; Austin *et al.*, 2001; Beg *et al.*, 2002) but surprisingly, none of these studies have quantified TGF $\beta$  isoforms themselves, even though their presence has been shown in granulosa, theca, interstitial and luteal cells by immunohistochemistry studies in the rat, hamster, human and bovine ovary (Mulheron *et al.*, 1991; Chegini and Flanders 1992; Roy *et al.*, 1992; Teerds and Dorrington 1992).

In fact, expression of TGF $\beta$  peptides has been observed in a large range of tissues and has been mostly studied in inflammation, immune surveillance, development and neoplasia (for review see Sporn 1999; Massagué 1990). The TGF $\beta$  monomers are generally secreted in a latent form (for review see Khalil 1999; Koli *et al.*, 2001). Latent TGF $\beta$  is secreted as a latent complex associated with its propeptide latency-associated peptide (LAP). In vitro studies have shown that enzymatic or physico-chemical removal of LAP from the latent complex or change in conformation of LAP is necessary to release active TGF $\beta$  which then binds to its receptor. The multiple functions of TGF $\beta$  are mediated through the interaction with four receptors sites but a single heterodimeric receptor complex is sufficient to mediate biological effects of TGF $\beta$  ligands (Bassing *et al.*, 1994). Indeed, TGF $\beta$  must bind to TGF $\beta$  receptor type II (TGF $\beta$ RII) which then triggers phosphorylation and signal

transduction through receptor type I (Laiho *et al.*, 1991; for review see Massagué and Chen 2000).

As in other tissues, it is now widely accepted that TGF $\beta$  can have a bifunctional inhibitory or stimulatory effect on ovarian cell proliferation and cellular secretions depending on the set of growth factors present (for review see Mulheron and Schomberg 1993). In cultured bovine or porcine GC, TGF $\beta$  inhibited EGF-stimulated DNA synthesis and mitosis (Skinner *et al.*, 1987; Gangrade and May 1990) but it can also augment FSH-stimulated DNA synthesis and mitosis in rat GC (Dorrington *et al.*, 1993). Similarly, TGF $\beta$  was shown to inhibit FSH-induced oestradiol production in cultured porcine GC and bovine preantral follicles (Chang *et al.*, 1996; Ford and Howard 1997; Wandji *et al.*, 1996), but it can also augment oestradiol secretion by FSH in rat GC (Adashi *et al.*, 1989).

These in vitro studies strongly suggest that TGF $\beta$  can exert both inhibitory and stimulatory effects on GC proliferation and oestradiol secretion, further emphasizing the need to assess the function of this growth factor in vivo in a well characterized model of follicle development. Therefore, the objective of the present study was to use the bovine model, one of the best known physiological models to study follicle development, to measure TGF $\beta$ 1 concentrations in follicular fluid at different stages of development of the first post ovulatory cohort of growing follicles monitored by high resolution



ultrasonography. We hypothesized that TGF $\beta$  is differentially expressed in follicular fluid of dominant and subordinate follicles during development of the first follicular wave and that concentrations of TGF $\beta$  in follicular fluid are related to changes in oestradiol secretion.

### **11.2.3. MATERIALS AND METHODS**

#### *11.2.3.1. EXPERIMENTAL DESIGN*

The experiment was carried out with mature Holstein heifers aged between 1.5 and 3 years. The animals were housed indoors for the duration of the experiment and were fed concentrate and hay twice daily. All animal experimentation was approved by the Animal Care Committee of the Faculty of Veterinary Medicine, according to Canadian Council of Animal Care Guideline.

Twelve heifers were used in a repeated-measures design. Follicular fluid (FF) was collected by ultrasound-guided transvaginal follicle aspiration, as previously described (Pieterse *et al.*, 1991), with the following modifications: the tubing connected to the aspiration needle was left open to collect FF from individual follicles by capillarity; and fluid was expelled by injecting air into the tubing, which was changed between each FF aspiration. Heifers were first synchronized with two injections of PGF $_{2\alpha}$  11 days apart. Further synchronizations were achieved by a single injection of PGF $_{2\alpha}$  given 5 to 6 days after follicular aspiration to induce ovulation and a new luteal phase.

Ovulation and follicular development was monitored daily or twice daily by transvaginal ultrasonography, until the predetermined time of aspiration had been reached. Fluid from the 2 to 4 largest follicles greater than 5 mm was aspirated once in each of the four consecutive induced cycles, when the diameter of the largest follicle had reached 6.5, 7.5, 8.5 or  $9.5 \pm 0.5$  mm, which correspond generally to day 2, 3, 4 et 5 of the oestrous cycle. Follicle aspirations were repeated in the same heifer at each of the four stages of development sampled in random order (i.e. heifer #1: sampled at 6.5 mm, then 8.5 mm, then 7.5 mm, then 9.5 mm; heifer #2 sampled at 9.5 mm, then 7.5 mm, then 6.5 mm, then 8.5 mm, etc). Only clear FF samples without blood contamination were used. The FF was centrifuged for 15 min at  $2000 \times g$  and the supernatant frozen at  $-70^{\circ}\text{C}$  until further analysis. Follicular fluid was assayed for  $\text{E}_2$ ,  $\text{P}_4$  and total  $\text{TGF}\beta 1$ .

#### 11.2.3.2 STEROID ASSAYS

The FF was assayed without extraction by radioimmunoassay (RIA) to determine concentrations of  $\text{E}_2$  and  $\text{P}_4$ , using double antibody precipitation or charcoal precipitation methods respectively (Lafrance and Goff 1985; Carriere *et al.*, 1995). The methods were validated for use with bovine follicular fluid. Spiking FF samples with 2 pg/tube and 5 pg/tube of  $\text{E}_2$  gave 81% and 107% recovery respectively. Spiking FF samples with 100 pg/tube and 500 pg/tube of  $\text{P}_4$  gave 115% and 97% recovery respectively. Intra- and inter-assay coefficients of variation were respectively 5% and 10% for  $\text{E}_2$ , and, 7% and

8% for P<sub>4</sub>. RIA data values were obtained using a four parameter logistic (FPL) equation designed to obtain the best fit on a sigmoid calibration curve (Rodbard 1974).

#### *11.2.3.3. TGFβ ASSAYS*

Commercial TGFβ1 (Promega : Nepean, Ontario, Canada) were validated for use with bovine follicular fluid. Active TGFβ1 was measured directly from untreated samples and total TGFβ1 was measured using the acid treatment protocol as described by the manufacturer. Using this system, TGFβ can be quantified in the range of 32-1000 pg/ml, without loss of parallelism. According to the assay specifications, both kits have less than 5% cross-reactivity with other TGFβ proteins. Intra- and inter-assay coefficients of variation were respectively 5% and 13% for total TGFβ1. Spiking FF samples with 5 pg/tube and 50 pg/tube of TGFβ1 gave respectively 112% and 106% recoveries.

#### *11.2.3.4. STATISTICAL ANALYSIS*

Data were analysed using a linear model (Proc Mixed, SAS, version 8.0) with individual cow treated as a random factor. TGFβ1 and estradiol concentration data were log transformed to normalize their distribution. Tukey's post-hoc test was used to determine at which stage of development

the deviation in diameter between the largest follicle (F1) and the second largest follicle (F2) occurred.

#### 11.2.4. RESULTS

The difference in diameter between the largest follicle (F1) and the second largest follicle (F2) was greater at the 9.5 mm stage of development of the F1 follicle than at all other stages ( $p < 0.0001$ ) (Fig 1). According to Ginther's method, the beginning of deviation should be judged as the last examination where there was no significant change in diameter between F1 and F2 follicles, which correspond to our 8.5mm stage. Therefore, this would indicate that deviation in growth between the F1 and F2 follicles began at the 8.5 mm and was observable at the 9.5 mm stages. This observation is in agreement with the results obtained by Ginther *et al.*, (2001) and confirms that repeated follicle aspirations per se did not have any detrimental effect on the subsequent pattern of follicle growth leading to the selection of the dominant follicle.

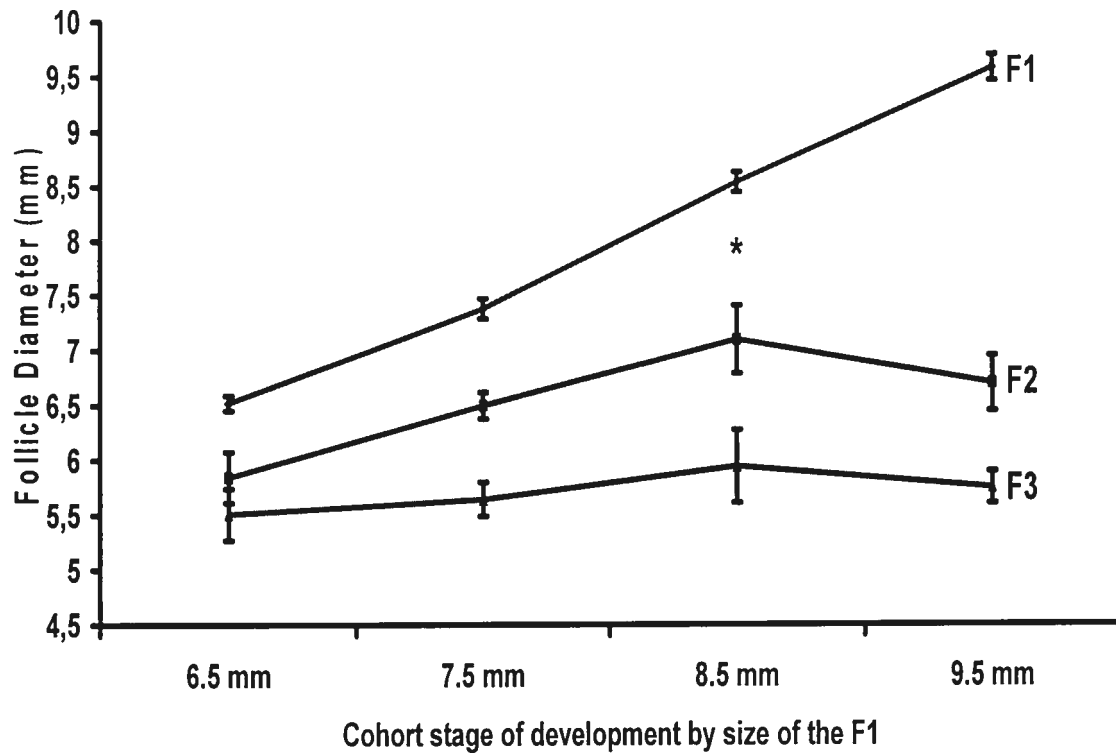
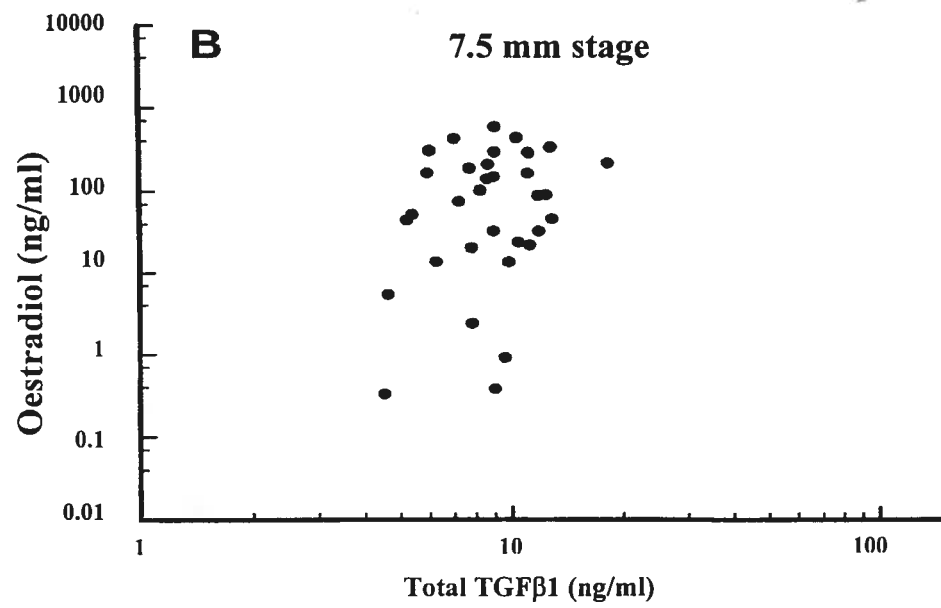
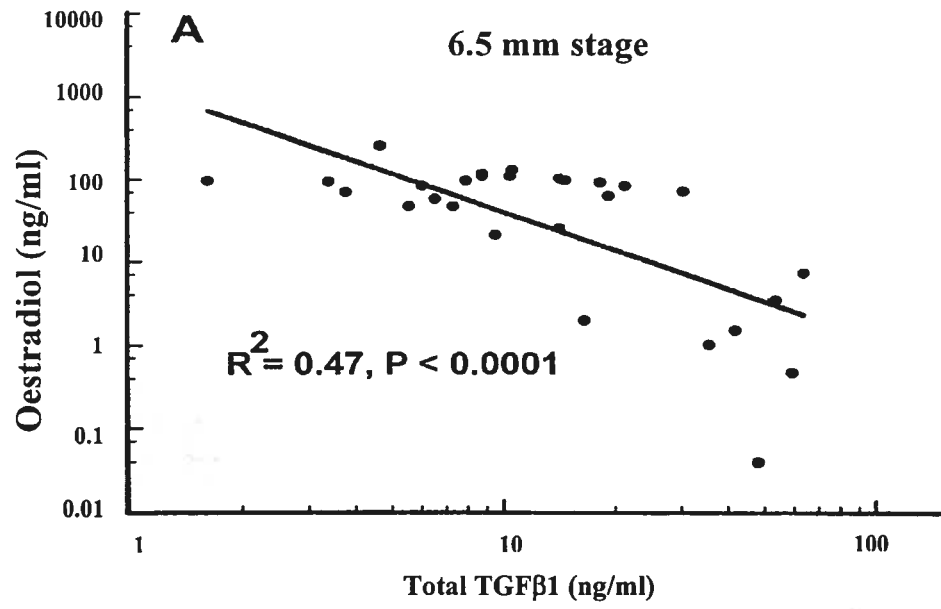


Figure 1. Follicle diameter of the F1, F2 and F3 follicles of the first follicular wave during four different stages of development of the F1.

The figure 2 shows individual data points of total TGF $\beta$ 1 and oestradiol concentrations in F1, F2, F3 and F4 follicles examined at each of the 4 different stages of development of the F1 follicle. Three data points at the 8.5 mm stage (2 from the same cow) and one data point at the 9.5 mm stage, had elevated TGF $\beta$ 1 concentrations and were considered to be outliers (see open circles, lower right panel of Fig 2 C-D). These data were not included in the analysis.



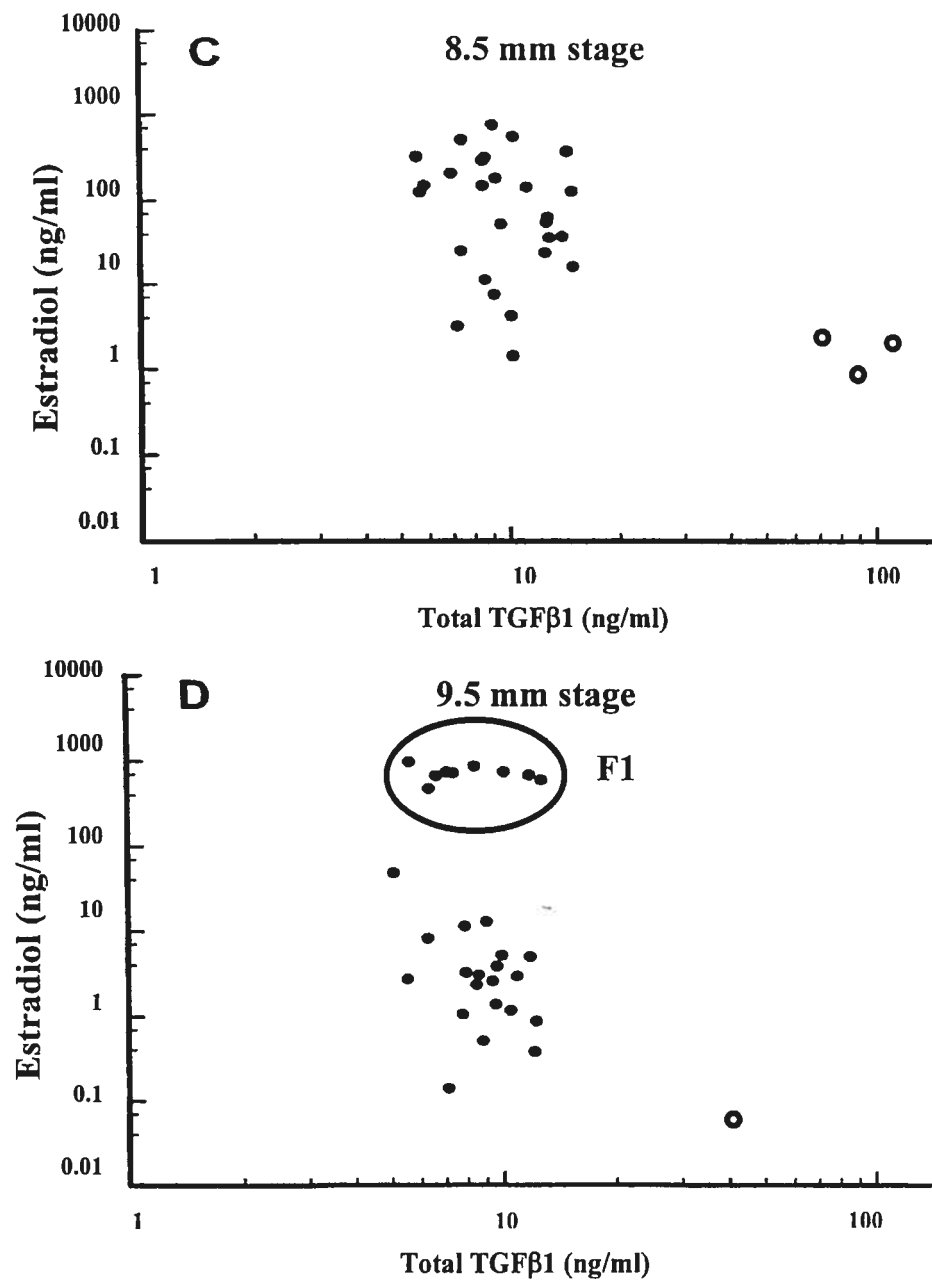
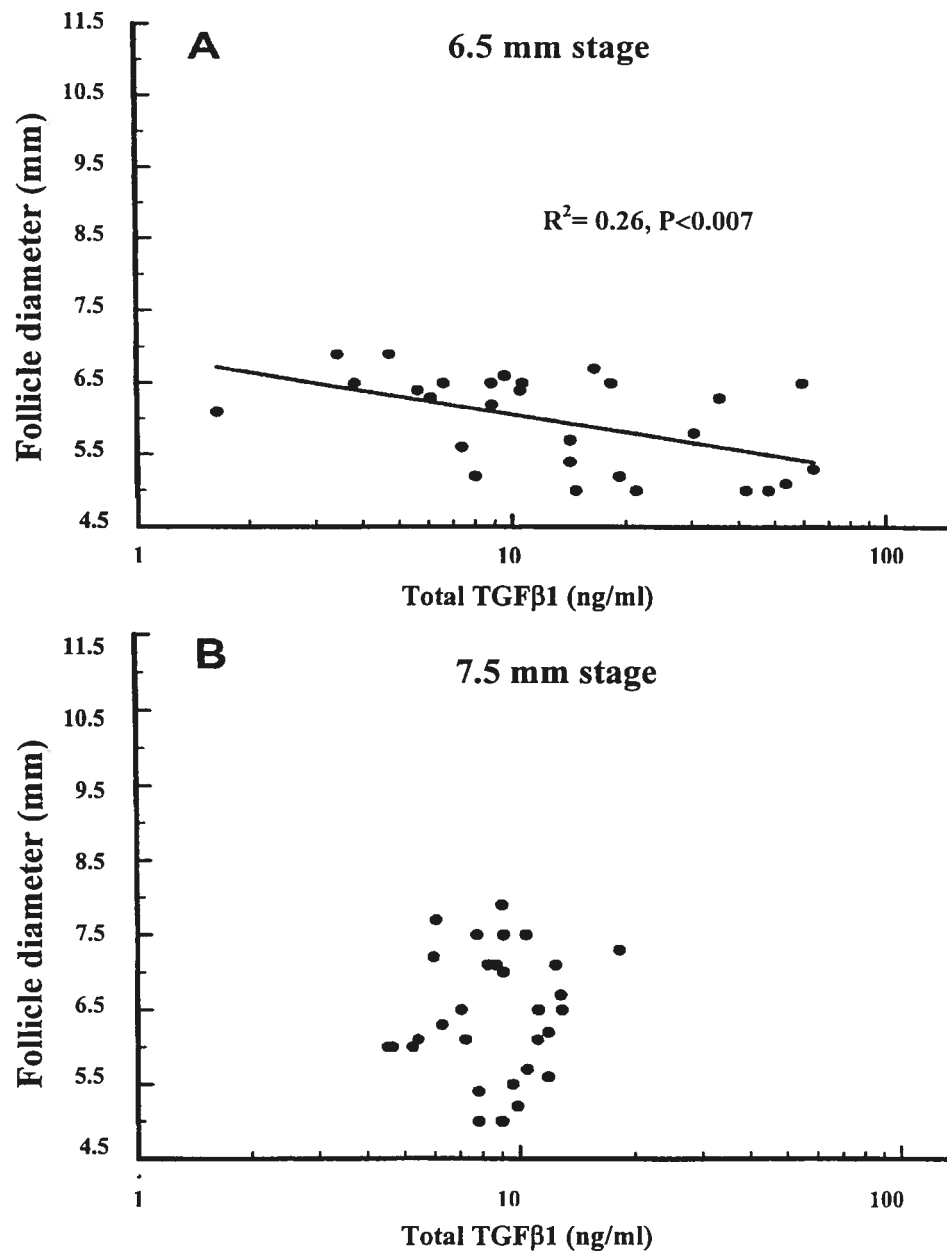


FIG. 2. Relationship between total TGFβ1 and estradiol concentrations in follicular fluid of the first wave cohort follicles >5 mm aspirated when the largest follicle (F1) had reached 6.5 (A), 7.5 (B), 8.5 (C) and 9.5 mm (D) stage of development. Three data points at the 8.5 mm stage (2 from the same cow) and one data point at the 9.5 mm stage, had elevated TGFβ1 concentrations and were considered to be outliers (see open circles of Fig 2 C-D). These data were not included in the analysis.



There was a significant negative relationship between the log of TGFβ1 and the log of estradiol ( $R^2 = 0.47$ ;  $p < 0.0001$ ) at the earliest phase of development of the first wave cohort when the F1 follicle measured 6.5 mm (Fig 2 A). There was no significant relationship between the log of TGFβ1 and the log of estradiol at any of the three later stages of development of the first wave cohort (Fig 2 B, C and D). Note that F1 follicles from all cows sampled at the 9.5 mm stage of development (i.e. after deviation in growth from F2) have the highest estradiol concentrations follicles (Fig 2 D, circled) but TGFβ1 concentrations are in the same range as F2, F3 and F4.

There was a significant negative relationship between the log of TGFβ1 and follicle diameter ( $R^2 = 0.26$ ;  $p < 0.007$ ) at the emerging phase of development of the first wave cohort when the follicle measured 6.5 mm (Fig 3 A). There was no significant relationship between the log of TGFβ1 and follicle diameter at any of three later stages of development of the first wave cohort (Fig 3 B, C and D). Note the similar range of TGFβ1 concentrations in F1 follicles at the 9.5 mm stage of development (Fig 3 D, circled) compared to F2, F3 and F4 follicles.



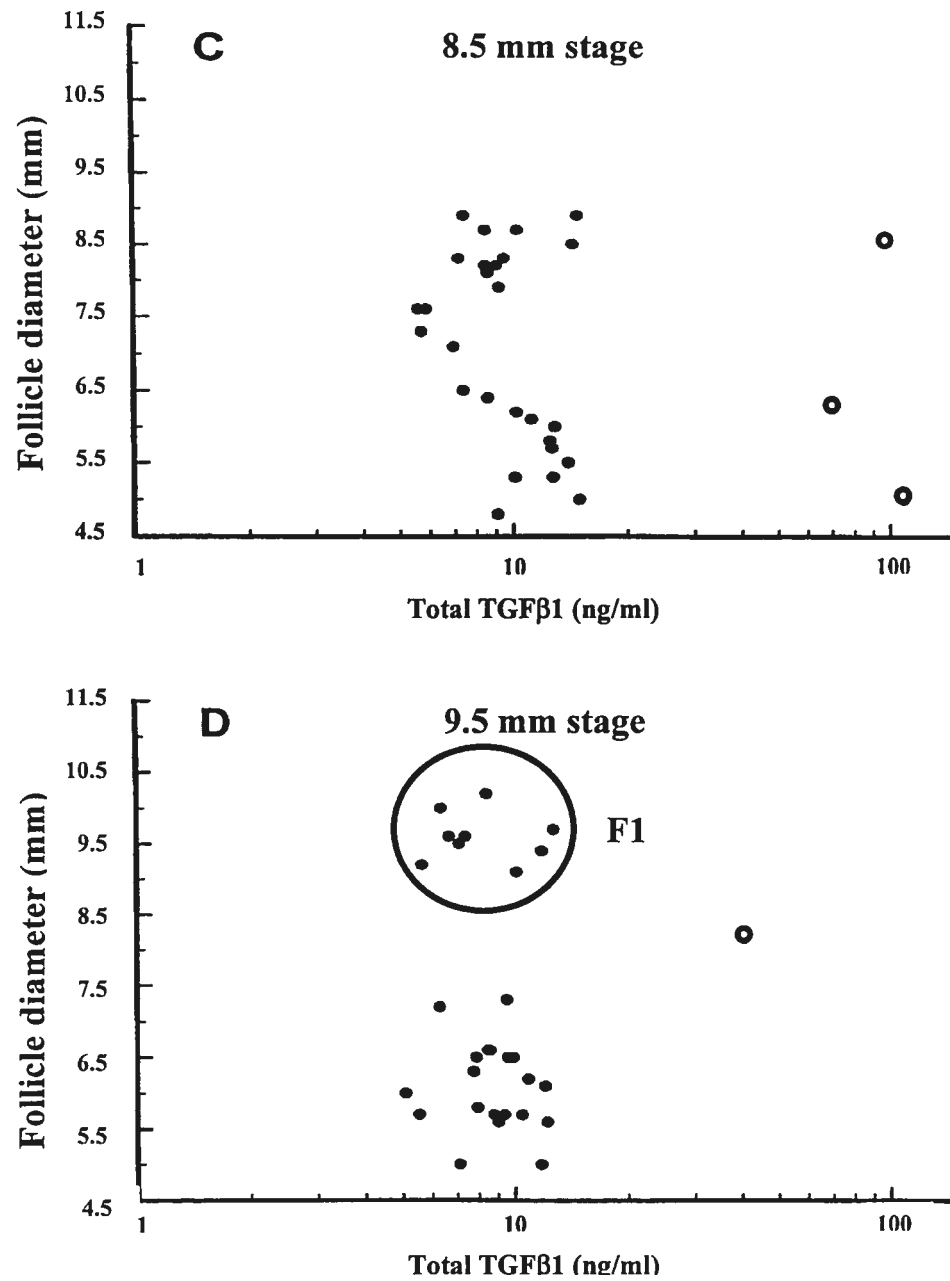


FIG. 3. Relationship between total TGFβ1 in follicular fluid and follicle diameter of the first wave cohort follicles > 5 mm aspirated when the largest follicle (F1) had reached 6.5 (A), 7.5 (B), 8.5 (C) and 9.5 mm (D) stage of development. Three data points at the 8.5 mm stage (2 from the same cow) and one data point at the 9.5 mm stage, had elevated TGFβ1 concentrations and were considered to be outliers (see open circles of Fig 3 C-D). These data were not included in the analysis.

There was no significant relationship between progesterone and TGF $\beta$ 1 concentrations or follicle diameter (data not shown). There was no significant relationship between estradiol, or progesterone, or follicle diameter with active TGF $\beta$ 1 at any of the four stages of development (data not shown). Median values for active TGF $\beta$ 1 are respectively 2.56, 3.14, 3.33 and 2.79ng/ml for 6.5, 7.5, 8.5 and 9.5 mm stages of development.

#### **11.2.5. DISCUSSION**

In this study, we report for the first time changes in TGF $\beta$ 1 measured in follicular fluid of normally developing bovine antral follicles. Using classification of follicles by stages of development, a marked transient increase in total TGF $\beta$ 1 concentration was observed in the lowest oestradiol-producing follicle at the earliest stage of development of the first-wave cohort at 6.5 mm. Although the exact significance of these observations requires further experimentation, we propose that TGF $\beta$ 1 is involved in the inhibition of oestradiol secretion in a subpopulation of recently emerged follicles and that this mechanism contributes to selection of the dominant follicle.

The response to TGF $\beta$  is known to be bifunctional since it can stimulate or inhibit cellular proliferation and secretion. Our results suggest that TGF $\beta$  may exert an inhibitory effect on estradiol production and follicle development. The negative correlation observed between total TGF $\beta$ 1 and estradiol at the 6.5 mm stage of development is in agreement with *in vitro*

studies in domestic animals. The addition of TGF $\beta$  was shown to inhibit oestradiol production in porcine granulosa cells (Chang *et al.*, 1996; Ford and Howard 1997) and to antagonize FSH-stimulated steroid production in cultured bovine preantral follicles (Wandji *et al.*, 1996). Furthermore, TGF $\beta$  has also been shown to hinder EGF or TGF $\alpha$ -stimulated DNA synthesis in bovine GC and theca cells (Skinner *et al.*, 1987; Roberts and Skinner, 1991). Together with the present study, these findings suggest that TGF $\beta$ 1 could play a significant role in limiting estradiol secretion and subsequent development of subordinate follicles within the follicular wave.

In humans, measurable amounts of total TGF $\beta$ 1 were found in FF of large preovulatory follicles obtained from patients undergoing gonadotropin treatments (Fried and Wramsby 1998). However, to our knowledge, measurements of total TGF $\beta$ 1 concentrations in follicular fluid of normally developing bovine ovarian follicles has not been reported previously. The source of TGF $\beta$ 1 measured in bovine follicular fluid is probably from the theca since cultured bovine theca cells were shown to produce 400% more TGF $\beta$ , secreted mostly in the latent form, than bovine granulosa cells (Skinner *et al.*, 1987).

This finding suggests that elevated levels of the total TGF $\beta$ 1 measured in follicular fluid is related somehow to estradiol secretion and may reflect an important physiological mechanism that prevents the rise in estradiol secretion

in subordinate follicles. The underlying mechanism that could explain this finding would require further study but a possible explanation might involve direct action of latent TGF $\beta$ . In this respect it has been shown that the small latent form of TGF $\beta$  can bind directly to cell surface receptors and undergo conformational changes such that the active form is not released by enzymatic cleavage of LAP, but the active site of TGF $\beta$  is exposed and binds to TGF $\beta$ RII receptors (for review see Khalil 1999).

In conclusion, these results demonstrate that TGF $\beta$ 1 as measured in follicular fluid plays an important role in the autocrine-paracrine network that regulates estradiol secretion during selection of the dominant follicle. This is a first step to better characterize the physiological role of TGF $\beta$  in cattle. Further studies are needed to understand the mechanism of regulation and activation of the TGF $\beta$  system particularly in GC and theca cells examined during the initial stage of development soon after recruitment of the first follicular wave.

### 11.2.6. ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Alan K. Goff, CRRA, Université de Montréal for providing progesterone antibody; Dr. Jean Sirois, CRRA, Université de Montréal for demonstration of the colpotomy surgical technique; Dr. Yves Lepage, Département de Mathématiques et de Statistiques, and Dr. Guy Beauchamp, Université de Montréal for advice and assistance on statistical analysis; Dr. Manjit Singh Rana for his critical appraisal of this manuscript; Farm staff Normand Houle, Jacques Breault and Robert Pinsonneault and Marie-Ève Paradis for assistance in follicle aspiration.

### 11.2.7. REFERENCES

1. Adashi EY, Resnick CE, Hernandez ER, May JV, Purchio AF, Twardzik DR. 1989. Ovarian transforming growth factor-beta (TGF beta): cellular site(s), and mechanism(s) of action. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 61: 247-256.
2. Austin EJ, Mihm M, Evans AC, Knight PG, Ireland JL, Ireland JJ, Roche JF. 2001. Alterations in intrafollicular regulatory factors and apoptosis during selection of follicles in the first follicular wave of the bovine estrous cycle *Biology of Reproduction*. 64: 839-848.
3. Bassing GH, Howe DJ, Segarini PR, Donahoe PK, Wang WF. 1994. A single heterodimeric receptor complex is sufficient to mediate biological effects of transforming growth factor- beta ligands *Journal of Biological Chemistry*. 269: 14861-14864.
4. Beg MA, Bergfelt DR, Kot K, Wiltbank MC, Ginther OJ. 2001. Follicular fluid factors and granulosa-cell gene expression associated with follicle deviation in cattle. *Biology of Reproduction*. 64: 4432-4441.



5. Beg MA, Bergfelt DR, Kot K, Ginther OJ. 2002. Follicle selection in cattle: dynamics of follicular fluid factors during development of follicle dominance. *Biology of Reproduction* 66: 120-126.
6. Bodensteiner KJ, Wiltbank MC, Bergfelt DR, Ginther OJ. 1996. Alterations in follicular estradiol and gonadotropin receptors during development of bovine antral follicles. *Theriogenology* 45: 499-512.
7. Carrière PD, Amaya D, Lee B. 1995. Ultrasonography and endocrinology of ovarian dysfunctions induced in heifers with estradiol valerate *Theriogenology*. 43: 1061-1076.
8. Chang WY, Shidaifat F, Uzunucu M, Lin YC. 1996. Effects of transforming growth factor- $\beta$ 1 and activin-A on in vitro porcine granulosa cell steroidogenesis. *Theriogenology*. 45: 1463-1472.
9. Chegini N, Flanders KC. 1992. Presence of transforming growth factor-beta and their selective cellular localization in human ovarian tissue of various reproductive stages. *Endocrinology*. 130: 1707-1715.
10. Dorrington JH, Bendell JJ, Khan SA. 1993. Interactions between FSH, estradiol-17 beta and transforming growth factor-beta regulate

growth and differentiation in the rat gonad. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 44: 441-447.

11. Evans AC, Fortune JE. 1997. Selection of the dominant follicle in cattle occurs in the absence of differences in the expression of messenger ribonucleic acid for gonadotropin receptors. *Endocrinology*. 138: 2963-2971.
12. Ford JJ, Howard HJ. 1997. Activin inhibition of estradiol and progesterone production in porcine granulosa cells. *Journal of Animal Science* 75: 761-766.
13. Fortune JE, Rivera GM, Evans ACO, Turzillo AM. 2001. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biology of Reproduction*. 65: 648-654.
14. Fried G, Wramsby H. 1998. Increase in transforming growth factor  $\beta$ 1 in ovarian follicular fluid following ovarian stimulation and in-vitro fertilization correlates to pregnancy. *Human Reproduction*. 13: 656-659.

15. Gangrade BK, May JV. 1990. The production of transforming growth factor- $\beta$  in the porcine ovary and its secretion in vitro. *Endocrinology*. 127: 2372-2380.
16. Ginther OJ, Wiltbank MC, Fricke PM, Gibbons JR, Kot K. 1996. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biology of Reproduction* 55: 1187-1194.
17. Ginther OJ. 2000. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Animal Reproduction Science*. 60-61:61-79.
18. Ginther OJ, Beg MA, Bergfelt DR, Donadeu FX, Kot K. 2001. Follicle selection in monovular species. *Biology of Reproduction*. 65: 638-647.
19. Hodgen GD. 1982. The dominant ovarian follicle. *Fertility and Sterility*. 38: 281-300.
20. Ireland JJ, Mihm M, Austin E, Diskin MG, Roche JF. 2000. Historical perspective of turnover of dominant follicles during the bovine estrous cycle: key concepts, studies, advancements, and terms. *Journal of Dairy Science*. 83: 1648-1658.

21. Khalil N. 1999. TGF- $\beta$ : from latent to active. *Microbes and Infection*. 1: 1255-1263.
22. Koli K, Saharinen J, Hyytiainen M, Penttinen C, Keski-Oja J. 2001. Latency, activation, and binding proteins of TGF $\beta$ . *Microscopy Research and Technique*. 52: 354-362.
23. Lafrance M, Goff AK. 1985. Effect of pregnancy on oxytocin-induced release of prostaglandin F<sub>2</sub> alpha in heifers. *Biology of Reproduction* 33: 1113-1119.
24. Laiho M, Weiss FMB, Boyd IRA, Massagué J. 1991. Responsiveness to transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) restored by genetic complementation between cells defective in TGF- $\beta$  receptors I and II. *Journal of Biological Chemistry*. 266: 9108-9112.
25. Massagué J. 1990. The transforming growth factor-beta family. *Annual Review of Cell Biology*. 6: 597-641.
26. Massagué J, Chen YG. 2000. Controlling TGF- $\beta$  signaling. *Genes and Development*. 14: 627-644.

27. May JV, Frost JP, Schomberg DW. 1988. Differential effects of epidermal growth factor, somatomedin-C/insulin-like growth factor I, and transforming growth factor-beta on porcine granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation. *Endocrinology*. 123: 168-179.
28. Mihm M, Austin EJ, Good TE, Ireland JL, Knight PG, Roche JF, Ireland JJ. 2000. Identification of potential intrafollicular factors involved in selection of dominant follicles in heifers. *Biology of Reproduction*. 63: 811-819.
29. Mulheron GW, Danielpour D, Schomberg DW. 1991. Rat thecal/interstitial cells express transforming growth factor-beta type 1 and 2, but only type 2 is regulated by gonadotropin in vitro. *Endocrinology*. 129: 368-374.
30. Mulheron GW, Schomberg DW. 1993. The intraovarian transforming growth factor system. In *The Ovary* pp 337-361 Eds EY Adashi and PCK Leung. Raven Press, New York.
31. Otsuka F, Yao Z, Lee T, Yamamoto S, Erickson GF, Shimasaki S. 2000. Bone morphogenetic protein-15. Identification of target cells

and biological functions. *Journal of Biological Chemistry*. 275: 39523-39528.

32. Pieterse MS, Vos PLAM, Kruip THAM, Wurth YA, Van Beneden ThH, Willemsse AH, Taverne MAM. 1991. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. *Theriogenology*. 35: 19-24.
33. Roberts AJ, Skinner MK. 1991. Transforming growth factor- $\alpha$  and - $\beta$  differentially regulate growth and steroidogenesis of bovine thecal cells during antral follicle development. *Endocrinology*. 129: 2041-2048.
34. Roche JF, Mihm M, Diskin MG, Ireland JJ. 1998. A review of regulation of follicle growth in cattle. *Journal of Animal Science*. 76: 16-29.
35. Rodbard D. 1974. Statistical quality control and routine data processing for radioimmunoassays and immunoradiometric assays. *Clinical Chemistry*. 20: 1255-1270.
36. Rouillier P, Sirard MA, Matton P, Guilbault LA. 1997. Immunoneutralization of transforming growth factor alpha present in

bovine follicular fluid prevents the suppression of the follicle-stimulating hormone-induced production of estradiol by bovine granulosa cells cultured in vitro. *Biology of Reproduction*. 57: 341-346.

37. Roy SK, Ogren C, Roy C, Lu B. 1992. Cell-type-specific localization of transforming growth factor-beta 2 and transforming growth factor-beta 1 In the hamster ovary: differential regulation by follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. *Biology of Reproduction*. 46: 595-606.
38. Skinner MK, Keski-Oja J, Osteen KG, Moses HL. 1987. Ovarian thecal cells produce transforming growth factor- $\beta$  which can regulate granulosa cell growth. *Endocrinology*. 121: 786-792.
39. Spicer LJ, Hamilton TD, Keefer BE. 1996. Insulin-like growth factor I enhancement of steroidogenesis by bovine granulosa cells and thecal cells: dependence on de novo cholesterol synthesis. *Journal of Endocrinology*. 151: 365-373.
40. Sporn MB. 1999. TGF $\beta$ : 20 years and counting. *Microbes and Infection* 1 1251-1253.

41. Stewart RE, Spicer LJ, Hamilton TD, Keefer BE. 1995. Effects of insulin-like growth factor I and insulin on proliferation and on basal and luteinizing hormone-induced steroidogenesis of bovine thecal cells: involvement of glucose and receptors for insulin-like growth factor I and luteinizing hormone. *Journal of Animal Science*. 73: 3719-3731.
42. Teerds KJ, Dorrington JH. 1992. Immunohistochemical localization of transforming growth factor-beta 1 and -beta 2 during follicular development in the adult rat ovary. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 84: R7-R13.
43. Wandji SA, Eppig JJ, Fortune JE. 1996. FSH and growth factors affect the growth and endocrine function in vitro of granulosa cells of bovine preantral follicles. *Theriogenology*. 45: 817-832.
44. Webb R, Campbell BK, Garverick HA, Gong JG, Gutierrez CG, Armstrong DG. 1999. Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection. *Journal of Reproduction and Fertility*. Supplement 54: 33-48.



45. Wrathall JHM, Knight PG. 1995. Effects of inhibin-related peptides and oestradiol on androstenedione and progesterone secretion by bovine theca cells in vitro. *Journal of Endocrinology*. 145 : 491-500.

### 11.3. ÉTUDE PRÉLIMINAIRE IN VITRO

Suite à l'étude principale in vivo, il a été établi que lors du développement des follicules au-delà de 7,5 mm, il n'existe pas de relation entre la sécrétion d'oestradiol, le diamètre folliculaire et la sécrétion de TGF $\beta$ 1, ce qui suggère que le TGF $\beta$ 1 n'influence pas le développement tardif des follicules antraux en croissance. De plus, il ne semble pas intervenir dans la déviation entre les deux plus gros follicules. À l'opposé, les résultats semblent pointer vers un effet inhibiteur du TGF $\beta$ 1 sur la production d'oestradiol des petits follicules en croissance. En fait le TGF $\beta$ 1 est davantage présent dans les petits follicules avoisinants les 5 mm, lorsque le plus gros follicule a atteint 6,5 mm. Ainsi, afin de pousser encore plus loin la compréhension du système TGF $\beta$  ovarien, il est clair que nous devons porter notre attention sur les petits follicules de moins de 5 mm. Cependant, il nous semblait difficile d'enchaîner avec une autre étude in vivo sur des follicules de cette taille, étant donné la difficulté technique d'échantillonner des follicules de moins de 5 mm en contexte physiologique. Par ailleurs, l'étude principale in vivo a permis d'établir une relation entre le TGF $\beta$  et l'oestradiol, mais elle ne nous permet pas d'établir un lien direct de cause à effet. Pour répondre à cette question, nous avons opté pour une étude in vitro sur des cultures de cellules de granulosa de follicules de 2 à 5 mm provenant de l'abattoir. De cette façon, il nous était possible d'émettre l'hypothèse que le TGF $\beta$  modifie la sécrétion d'oestradiol par les cellules de granulosa bovine. Un fait à noter, dans le design expérimental des études in vitro, nous avons pris soin de doser

l'oestradiol et la progestérone sur les mêmes échantillons de culture, de façon à bien pouvoir suivre l'évolution en parallèle de ces deux hormones stéroïdiennes.

Une étude préliminaire in vitro sur des cultures de cellules de granulosa a donc été effectuée pour déterminer les doses de FSH et de TGF $\beta$ , actif et latent, à utiliser lors de l'étude principale in vitro (Fig 8 à 11) (voir la méthodologie détaillée dans l'article 2 section 11.4.3 aux pages 92 à 95). Nous avons ainsi pu établir in vitro qu'il existe une interaction significative entre le TGF $\beta$  actif et la FSH sur la production d'oestradiol et de progestérone (Fig 8 et 9). Les concentrations de TGF $\beta$  actif de 1 et 10 ng/ml ont inhibé de façon significative l'effet stimulateur de 0.5 et de 1 ng/ml de FSH sur la synthèse d'oestradiol, et ont aussi inhibé l'effet stimulateur de 1, 10 et 100 ng/ml de FSH sur la synthèse de progestérone. Il n'y avait pas d'interaction significative entre le TGF $\beta$  latent et la FSH sur la sécrétion d'oestradiol; ni d'effet significatif du TGF $\beta$  latent sur la stimulation d'oestradiol par la FSH (Fig 10), alors que la FSH seule a un effet significatif sur la production d'oestradiol ( $p < 0.0001$ ). Il n'y avait pas d'interaction significative entre le TGF $\beta$  latent et la FSH sur la sécrétion de progestérone alors que globalement le TGF $\beta$  latent, à des doses de 1 et 10 ng/ml, inhibait la synthèse de progestérone (Fig 11).

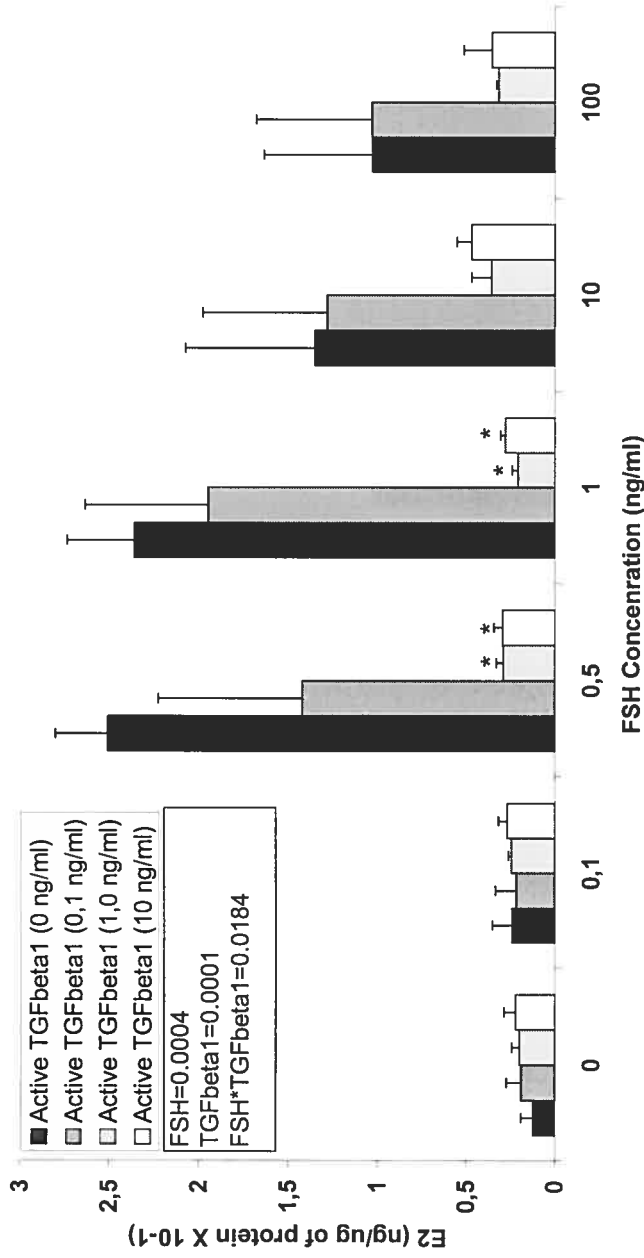


Figure 8. Effets de concentrations croissantes de FSH et de “transforming growth factor beta 1” actif et recombinant (TGFβ1) sur la production d’oestradiol exprimée en ng par ug de protéines extraites. Le milieu a été récolté au Jour 6 et représente la relâche de stéroïdes durant les 48 dernières heures de culture de cellules de granulosa bovine. (two-way ANOVA, contraste de Dunnett, Moyenne de 3 expériences ± SEM ). La boîte sous la légende des concentrations de TGFβ représente respectivement les valeurs p pour la FSH seulement, le TGFβ actif seulement, et l’interaction entre ces facteurs. Si une interaction est significative, un des deux facteurs a été fixé avant les analyses de contrastes. Par exemple, si une interaction est observée entre le TGFβ actif et la FSH pour la sécrétion d’oestradiol, les analyses de contrastes sont faites sur les différentes concentrations de TGFβ à une concentration spécifique de FSH. Si aucune interaction n’est observée, les analyses de contrastes sont faites entre les concentrations de TGFβ pour toutes les concentrations de FSH ensemble.

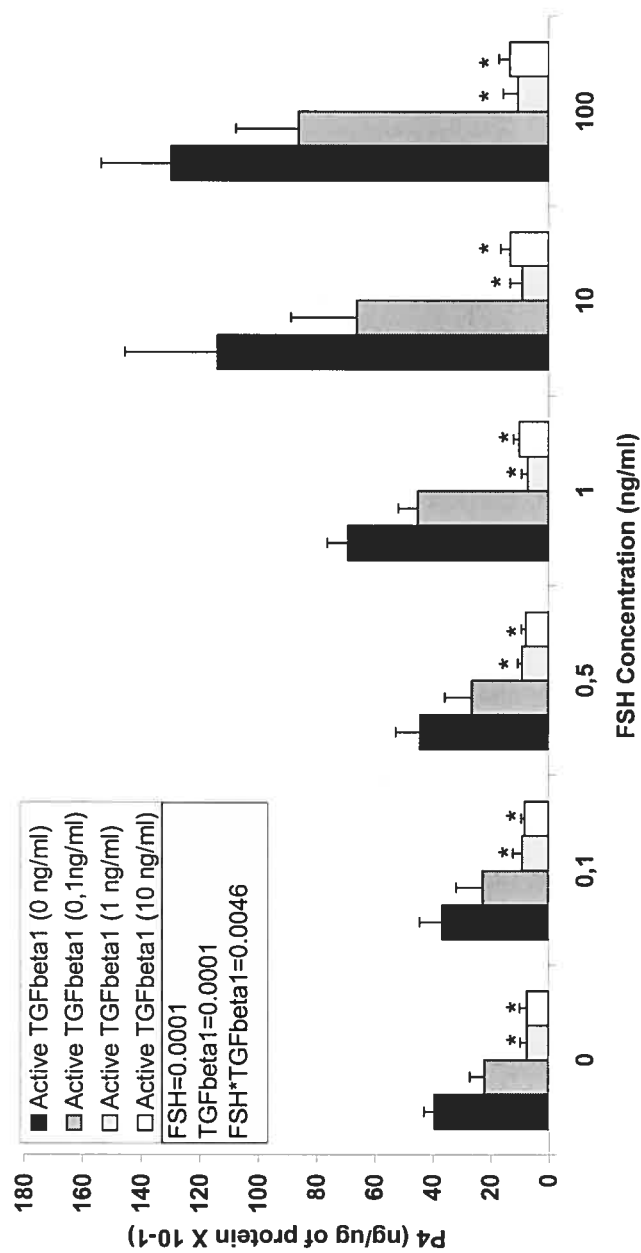


Figure 9. Effets de concentrations croissantes de FSH et de “transforming growth factor beta 1” actif et recombinant (TGFβ1) sur la production de progestérone exprimée en ng par ug de protéines extraites. Le milieu a été récolté au Jour 6 et représente la relâche de stéroïdes durant les 48 dernières heures de culture de cellules de granulosa bovine. (two-way ANOVA, contraste de Dunnet, Moyenne de 3 expériences ± SEM ). La boîte sous la légende des concentrations de TGFβ représente respectivement les valeurs p pour la FSH seulement, le TGFβ actif seulement, et l’interaction entre ces facteurs. Si une interaction est significative, un des deux facteurs a été fixé avant les analyses de contrastes. Par exemple, si une interaction est observée entre le TGFβ actif et la FSH pour la sécrétion d’oestradiol, les analyses de contrastes ont été faites sur les différentes concentrations de TGFβ à une concentration spécifique de FSH. Si aucune interaction n’est observée, les analyses de contrastes ont été faites entre les concentrations de TGFβ pour toutes les concentrations de FSH ensemble.

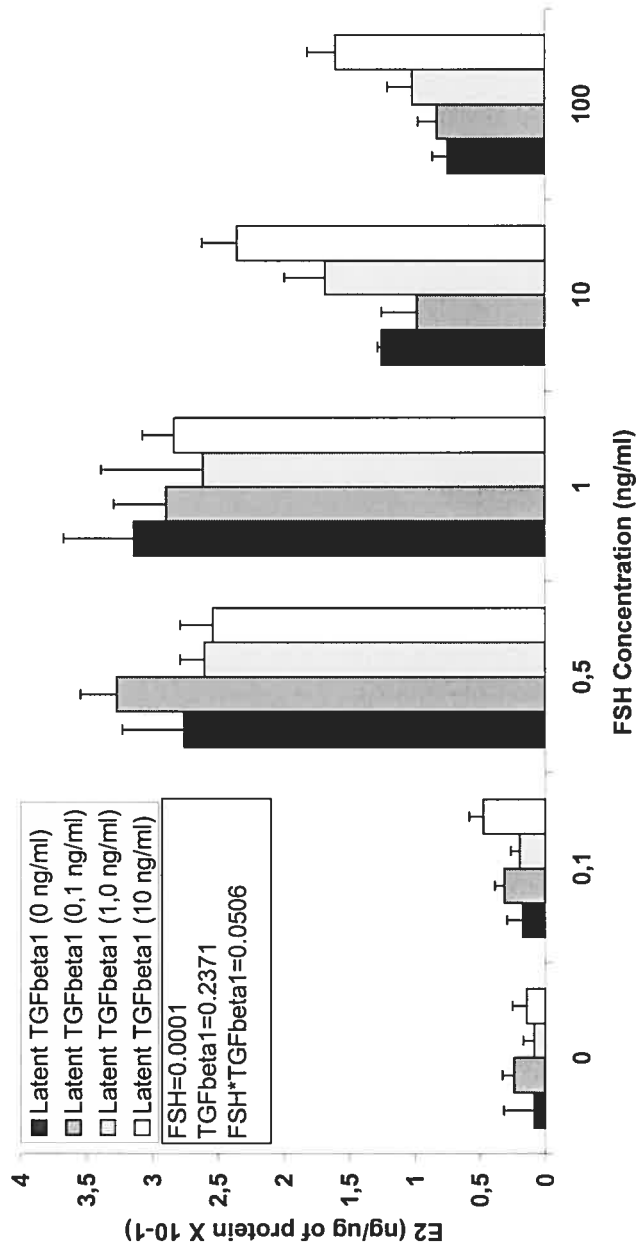


Figure 10. Effets de concentrations croissantes de FSH et de “transforming growth factor beta 1” latent (TGFβ1) sur la production d’oestradiol exprimée en ng par ug de protéines extraites. Le milieu a été récolté au Jour 6 et représente la relâche de stéroïdes durant les 48 dernières heures de culture de cellules de granulosa bovine. (two-way ANOVA, contraste de Dunnet, Moyenne de 3 expériences ± SEM ). La boîte sous la légende des concentrations de TGFβ représente respectivement les valeurs p pour la FSH seulement, le TGFβ latent seulement, et l’interaction entre ces facteurs. Si une interaction est significative, un des deux facteurs a été fixé avant les analyses de contrastes. Par exemple, si une interaction est observée entre le TGFβ latent et la FSH pour la sécrétion d’oestradiol, les analyses de contrastes ont été faites sur les différentes concentrations de TGFβ à une concentration spécifique de FSH. Si aucune interaction n’est observée, les analyses de contrastes ont été faites entre les concentrations de TGFβ pour toutes les concentrations de FSH ensemble.

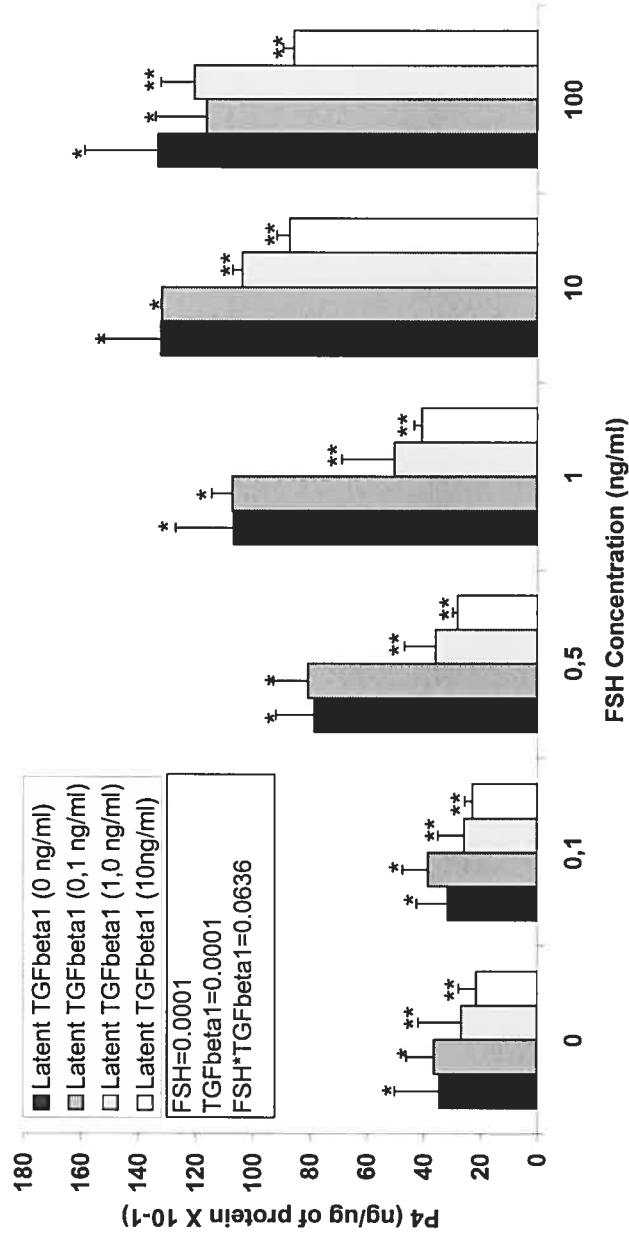


Figure 11. Effets de concentrations croissantes de FSH et de “transforming growth factor beta 1” latent (TGFβ1) sur la production de progestérone exprimée en ng par ug de protéines extraites. Le milieu a été récolté au Jour 6 et représente la relâche de stéroïdes durant les 48 dernières heures de culture de cellules de granulosa bovine. (two-way ANOVA, contraste de Dunnet, Moyenne de 3 expériences ± SEM ). La boîte sous la légende des concentrations de TGFβ représente respectivement les valeurs p pour la FSH seulement, le TGFβ latent seulement, et l’interaction entre ces facteurs. Si une interaction est significative, un des deux facteurs a été fixé avant les analyses de contrastes. Par exemple, si une interaction est observée entre le TGFβ latent et la FSH pour la sécrétion d’oestradiol, les analyses de contrastes ont été faites sur les différentes concentrations de TGFβ à une concentration spécifique de FSH. Si aucune interaction n’est observée, les analyses de contrastes ont été faites entre les concentrations de TGFβ pour toutes les concentrations de FSH ensemble.

Ces premiers essais encourageants semblaient nous indiquer un effet du TGF $\beta$ 1 sur la synthèse des stéroïdes en fonction des conditions utilisées. En se basant sur les résultats préliminaires obtenus, nous avons initialement déterminé l'effet du TGF $\beta$ 1 sur la production basale de stéroïdes (sans FSH), de façon à mimer une situation physiologique où les petits follicules (< 5 mm) n'auraient pas encore amorcé leur croissance suite à l'augmentation post-ovulatoire de FSH. Les doses de TGF $\beta$  actif utilisées en absence de FSH étaient basées sur les valeurs médianes mesurées in vivo plus quatre valeurs logarithmique décroissante. Deuxièmement, nous avons déterminé l'effet du TGF $\beta$ 1 sur la production de stéroïdes stimulée par la FSH, de façon à mimer l'effet d'une augmentation post-ovulatoire de FSH. Les doses de TGF $\beta$  actif utilisées en présence de FSH étaient basées sur les valeurs de l'étude préliminaire in vitro montrant un effet inhibiteur significatif entre 0,1 et 1 ng/ml. Troisièmement, nous avons déterminé l'effet du TGF $\beta$ 1 latent sur la production basale et la production stimulée de stéroïdes. Malgré le fait que physiologiquement le TGF $\beta$  soit majoritairement retrouvé sous forme latente, il n'existe pas d'information sur l'effet du TGF $\beta$  latent sur la production de stéroïdes par les cellules folliculaires. Les doses de TGF $\beta$  latent utilisées en présence de FSH étaient basées sur les valeurs de l'étude préliminaire in vitro montrant un effet inhibiteur significatif à 1 ng/ml et 10ng/ml.

Enfin, nous avons déterminé à quel niveau de la voie de signalisation intracellulaire du récepteur FSH (voie de la PKA) se produisaient les effets inhibiteurs du TGF $\beta$  observés lors des expériences précédentes. Ainsi, nous



avons déterminé l'effet du  $TGF\beta$  sur la production de stéroïdes stimulée par la forskoline et l'AMPc, de façon à déterminer si les effets du  $TGF\beta$  se font en amont ou en aval de la production d'AMPc stimulée par la FSH. De cette façon, si les effets observés du  $TGF\beta$  se font en amont de l'AMPc, nous saurons qu'il s'agit d'une régulation de la réceptivité des cellules à la FSH par le  $TGF\beta$ , alors que si les effets du  $TGF\beta$  se font en aval de l'AMPc, nous pourrions fortement suggérer qu'il y a un effet direct du  $TGF\beta$  sur les enzymes de la stéroïdogénèse.

#### **11.4. ÉTUDE PRINCIPALE IN VITRO/ARTICLE 2**

**Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 inhibits FSH and 8-br-cAMP-stimulated estradiol and progesterone synthesis in bovine granulosa cells from 2 to 5 mm follicles<sup>1</sup>**

Yan Ouellette , Christopher A. Price , and Paul D. Carrière<sup>2</sup>

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

<sup>1</sup>Research supported by NSERC

<sup>2</sup>Correspondence : Paul D. Carrière, CRRA, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, 3200 Sicotte, St-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6, Tel : 450-773-8521 ext 8328, FAX : 450-778-8103, E-mail : [paul.d.carriere@umontreal.ca](mailto:paul.d.carriere@umontreal.ca).

Key Words:

Ovary, Oestradiol, Follicular development, Growth factors, Polypeptide receptors

#### 11.4.1. SUMMARY

In studies on TGF $\beta$  peptides, it has already been demonstrated that TGF $\beta$  should be regarded as an important paracrine and autocrine regulator of follicular growth and differentiation. However in the bovine species, the specific role of TGF $\beta$  on estradiol and progesterone is not known, so the objective of this study was to examine the effect of latent and active recombinant TGF $\beta$ 1 on basal and FSH-stimulated steroid secretion by cultured bovine granulosa cells (GC) collected from 2 to 5 mm follicles. Estradiol and progesterone were assayed from the same culture well to follow their evolution in parallel. In the presence of active TGF $\beta$ 1 (> 1 ng/ml) without FSH, basal estradiol secretion by GC during the last 48h of culture was at least 400% higher than control. Active TGF $\beta$ 1 at low dose (0.0001 ng/ml) stimulated basal progesterone secretion but inhibited progesterone at doses > 1 ng/ml. In FSH-stimulated bovine GC, active TGF $\beta$ 1 had a strong dose-dependent inhibiting effect on estradiol and progesterone secretion beginning as low as 0.2 and 0.1 ng/ml. Latent TGF $\beta$ 1 up to 5 ng/ml had no significant effect on basal estradiol and progesterone secretion, or on FSH-stimulated estradiol secretion. However, latent TGF $\beta$ 1 (> 4 ng/ml) had a significant inhibitory effect on FSH-stimulated progesterone secretion. Estradiol and progesterone secretion stimulated by forskolin and 8-br-cAMP were inhibited by 1ng/ml of active TGF $\beta$ 1. According to these results, we suggest TGF $\beta$ 1 could be mainly

regarded as an inhibitor of FSH-stimulated steroidogenesis in small antral follicles, by modulating directly the effects of FSH on steroidogenic enzymes.

#### 11.4.2. INTRODUCTION

Intrafollicular mechanisms controlling oestradiol production and selection of the dominant follicle in single ovulating species are poorly understood, but the members of the TGF $\beta$  family could play a significant role in the regulation of growth and differentiation of bovine follicles.

Immunohistochemistry studies in the rat, hamster and human ovary have shown the presence of TGF $\beta$  isoforms in granulosa, theca, interstitial and luteal cells (Mulheron *et al.*, 1991, Chegini *et al.*, 1992, Roy *et al.*, 1992, Teerds and Dorrington 1992). In the bovine species, a recent study (Nilsson *et al.*, 2003) on the expression and localization of the TGF $\beta$  isoforms by immunohistochemistry and RT-PCR demonstrated that bovine ovarian follicles have a unique pattern of TGF $\beta$  isoform expression when compared to other species (i.e. rodent, pig and human). They observed that TGF $\beta$ 1 protein can be found in granulosa cells of early preantral, early antral and in 1-2 mm follicles, but not in larger follicles. TGF $\beta$ 1 mRNA expression in granulosa cells was decreased by FSH which correlated with the lack of detection of TGF $\beta$ 1 protein in large follicles.

The exact role of the TGF $\beta$  system in ovarian physiology remains unclear since TGF $\beta$  peptides have been shown to either increase or decrease steroid secretion. In GC obtained from diethylstilbestrol-treated immature mice, TGF $\beta$  has been shown to increase oestradiol (E<sub>2</sub>) secretion by FSH

(Adashi *et al.*, 1989). However, in porcine GC, TGF $\beta$  was shown to inhibit the stimulatory effect of FSH on E<sub>2</sub> secretion (Ford and Howard 1997). Similarly, in GC of immature rats treated with DES, TGF $\beta$  enhanced FSH induced progesterone (Hutchinson *et al.*, 1987) while in cultured bovine preantral follicles, TGF $\beta$  inhibited FSH-stimulated progesterone (Wandji *et al.*, 1996). TGF $\beta$  can also exert a biphasic effect depending on FSH concentration. In DES treated rats, a suboptimal concentration of FSH increased LH receptors in GC by 100-fold and TGF $\beta$  increased this response even further. In contrast, TGF $\beta$  inhibited the LH receptor response to an optimal dose of FSH by 50% and was inactive in the absence of gonadotropin (Knecht *et al.*, 1987).

Thus it is difficult to predict the effects of TGF $\beta$  in the cow because its role can change depending on cell type, physiological conditions and species. Therefore we examined the effect of active TGF $\beta$  on basal and FSH-stimulated estradiol and progesterone secretion of bovine granulosa cells collected from 2 to 5 mm follicles. The first objective was to replicate two physiological environments in which small antral follicles would develop: namely in the absence of FSH to mimick the earlier stage of gonadotropin-independent folliculogenesis and in the presence of FSH to mimick the later stage of gonadotropin-dependent folliculogenesis. The second objective was to test if the latent TGF $\beta$  could produce an effect on steroid secretion which would imply that the latent TGF $\beta$  can be activated directly by bovine granulosa cells. Even if physiologically TGF $\beta$  is mainly present in its latent

forms, there is presently no information on the effect of latent TGF $\beta$  on follicular steroidogenesis. Finally, the last objective was to determine the mechanism of action of TGF $\beta$  on the PKA pathway by measuring the effects of TGF $\beta$  on steroid hormone secretion stimulated directly by forskolin an activator of adenylate cyclase and by 8-bromo-cAMP (8-br-cAMP).

### **11.4.3. MATERIALS AND METHODS**

#### *11.4.3.1. CELL CULTURE*

The cell culture system was based on that described for ovine by Campbell *et al.*, (1996) and adapted for bovine by Guitiérrez *et al.*, (1996). All materials were obtained from Gibco BRL Canada (Burlington, ON, Canada) unless otherwise stated. Bovine ovaries were collected from adult cows, irrespective of stage of the oestrous cycle, at a local abattoir. Follicles were dissected free of surrounding tissue, and small follicles (2-5 mm diameter) were bisected into Minimum Essential Medium  $\alpha$ -modification (MEM) at room temperature. Granulosa cells were recovered by pipetting the follicle walls repeatedly through a disposable pipette. Cells were isolated by centrifugation at 800 X g for 15 min and washed 3 times in MEM. Washed cells were resuspended in culture medium, and cell viability was estimated at 40% by Trypan blue exclusion.

Cells were seeded into 24-well tissue culture plates (Corning Glass Works, Corning, NY, USA) at a density of  $10^6$  viable cells in 1 ml of MEM



with L-glutamine containing sodium bicarbonate (10 mM), Hepes (20 mM), protease-free BSA(0.1%), selenium (4 ng/ml), transferrin (2.5 µg/ml), androstenedione ( $10^{-7}$  M), insulin (10 ng/ml), human recombinant insulin-like growth factor I (10 ng/ml), nonessential amino acid mix (1.1 mM), penicillin (100 IU/ml), and streptomycin (100 µg/ml). Cultures were maintained at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> in air for 6 days, with 700 µl of medium being replaced every 2 days.

Total protein was extracted with 100µl of NaOH (1M) added to each well and incubated for 2 hours at room temperature. After incubation, 100µl of HCl (1M) was added to stop the reaction and each sample was processed with 1ml of Bio-Rad reagent (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Instructions from the manufacturer were followed. Optical density was read at 595 nm to estimate protein concentration..

#### *11.4.3.2. EXPERIMENTAL DESIGN*

To determine the effects of active and latent transforming growth factor beta 1 (TGFβ1) (R & D system, Minneapolis, MN, USA) on basal and on FSH-stimulated oestradiol and progesterone secretion, bovine granulosa cells were cultured 6 days with or without FSH (oFSH, AFP-5332B; NIDDKD, Torrence, CA). To determine the effect of active TGFβ1 on forskolin-stimulated or 8-br-cAMP-stimulated estradiol and progesterone production, bovine granulosa cells were cultured for 6 days with or without forskolin, and with or without 8-br-cAMP. Active or latent transforming TGFβ1 as well as

FSH, forskolin and 8-br-cAMP were added on the first day of culture and at each 48 h with the change of culture medium. Oestradiol and progesterone were measured in the same medium collected on Day 6 and thus represents steroid hormones released during the last 48-h of culture of bovine granulosa cells. Doses of active TGF $\beta$  used in absence of FSH were based on median values measured in vivo plus four decreasing logarithmic values. Doses of active TGF $\beta$  used in presence of FSH were based on values of the in vitro preliminary study showing a significant inhibitory effect between 0.1 and 1 ng/ml. Doses of latent TGF $\beta$  latent used were also based on preliminary in vitro results showing a significant inhibitory at 1 ng/ml and 10ng/ml. The results are the mean response of three separate experiments. Steroid hormone concentrations were corrected for cell number by expressing concentrations relative to cell protein content on Day 6.

#### *11.4.3.3. STEROID ASSAYS*

The culture medium was assayed without extraction by radioimmunoassay (RIA) to determine concentrations of E<sub>2</sub> and P<sub>4</sub>, using double antibody precipitation or charcoal precipitation methods respectively (Carrière *et al.*, 1995, Tremblay and Bélanger 1984). The methods were validated for use on bovine follicular fluid. Spiking culture medium with 2 pg/tube and 5 pg/tube of E<sub>2</sub> gave 81% and 107% recovery respectively. Spiking culture medium samples with 100 pg/tube and 500 pg/tube of P<sub>4</sub> gave 115% and 97% recovery respectively. Intra- and inter-assay coefficients of

variation were respectively 5% and 10% for E<sub>2</sub>, and, 7% and 7% for P<sub>4</sub>. RIA data values were obtained using a four parameter logistic (FPL) equation designed to obtain the best fit on a sigmoid calibration curve (Rodbard 1974).

#### 11.4.3.4. STATISTICAL ANALYSIS

Box plot graphics showed that the variance was probably not homogeneous between groups. According to this information, analysis was made using the mixed procedure of SAS. The Akaike's Information Criterion (AIC) was used to determine which of the following model have the best fit with our data: homogeneous or heterogeneous variance between groups (Littell *et al.*, 1996). The Akaike's Information Criterion is essentially the log likelihood value penalized for the number of parameters estimated. The covariance structure with the smallest value of the criteria is considered most desirable. One or two-way ANOVA was used to test the main effect of recombinant active TGF $\beta$ 1, forskolin and 8-br-cAMP on oestradiol and progesterone secretion. Differences between groups and control were identified with the Dunnet contrast (Shoukri and Edge 1996).

#### 11.4.4. RESULTS

With 5 and 10ng/ml of recombinant active TGF $\beta$ 1, the basal estradiol secretion by the bovine granulosa cells during the last 48h of culture was at least 400% higher than the control (Fig 1A). In the same experiment, TGF $\beta$

had a biphasic effect on basal progesterone secretion. At 0.0001ng/ml, recombinant active TGF $\beta$ 1 increased the basal progesterone secretion almost at 100% compared with the control (Fig 1B). On the other hand, from 1 to 10ng/ml of recombinant active TGF $\beta$ 1, there was at least a 65% decrease in progesterone compared to the controls (Fig 1B). In FSH-stimulated bovine GC, recombinant active TGF $\beta$ 1 had a dose-dependent inhibitory effect on estradiol and progesterone secretion (Fig 2A and 2B). The recombinant active TGF $\beta$ 1 started to have a significant effect on FSH-stimulated estradiol production at 0.2ng/ml with a 27% inhibition compared with the control, down to a 95% inhibition at 1ng/ml (Fig 2A). In contrast, recombinant active TGF $\beta$ 1 started to have a significant effect at a lower concentration for progesterone but the inhibition was less at higher concentration. In fact, 0.1ng/ml of recombinant active TGF $\beta$ 1 inhibited 65% of FSH-stimulated progesterone secretion compared with the control, down to almost a 95% inhibition at 1ng/ml (Fig 2B).

Latent TGF $\beta$ 1 had no significant effect on basal estradiol and progesterone secretion (data not shown), nor on FSH-stimulated estradiol secretion (Fig 3A). On the other hand, compared with the controls, latent TGF $\beta$ 1 had a significant inhibiting effect on FSH-stimulated progesterone of respectively 47% and 45% at 4 ng/ml and 5ng/ml (Fig 3B).

There was a strong interaction between the effect of forskolin and active TGF $\beta$ 1 on estradiol and progesterone production ( $p < 0.0001$ , Fig 4A and 4B). The effect of forskolin on estradiol and progesterone production was highest at 10 ng/ml; and at 100ng/ml of forskolin, estradiol and progesterone secretion were downregulated. The contrast analysis showed a strong inhibitory effect of 1ng/ml of active TGF $\beta$ 1 on estradiol production stimulated by 10ng/ml of forskolin. For progesterone, a strong inhibitory effect of 1ng/ml of active TGF $\beta$ 1 was observed on progesterone stimulated by 0.5, 1, 10 and 100ng/ml of forskolin.

There was also a strong interaction between the effect of 8-br-cAMP and active TGF $\beta$ 1 on estradiol and progesterone production ( $p < 0.0001$ , Fig 5A and 5B). The effect of 8-br-cAMP on estradiol production was highest at 250 and 500  $\mu$ M of 8-br-cAMP but was downregulated at 1000 and 1500  $\mu$ M of 8-br-cAMP. In contrast, the progesterone production was stimulated progressively up to 1500 $\mu$ M of 8-br-cAMP. The contrast analysis showed a strong inhibitory effect of 1ng/ml of active TGF $\beta$ 1 on estradiol production stimulated by 250 and 500  $\mu$ M of 8-br-cAMP. For progesterone, a strong inhibitory effect of 1ng/ml of active TGF $\beta$ 1 was observed on progesterone at all doses up to 1500 $\mu$ M of 8-br-cAMP.

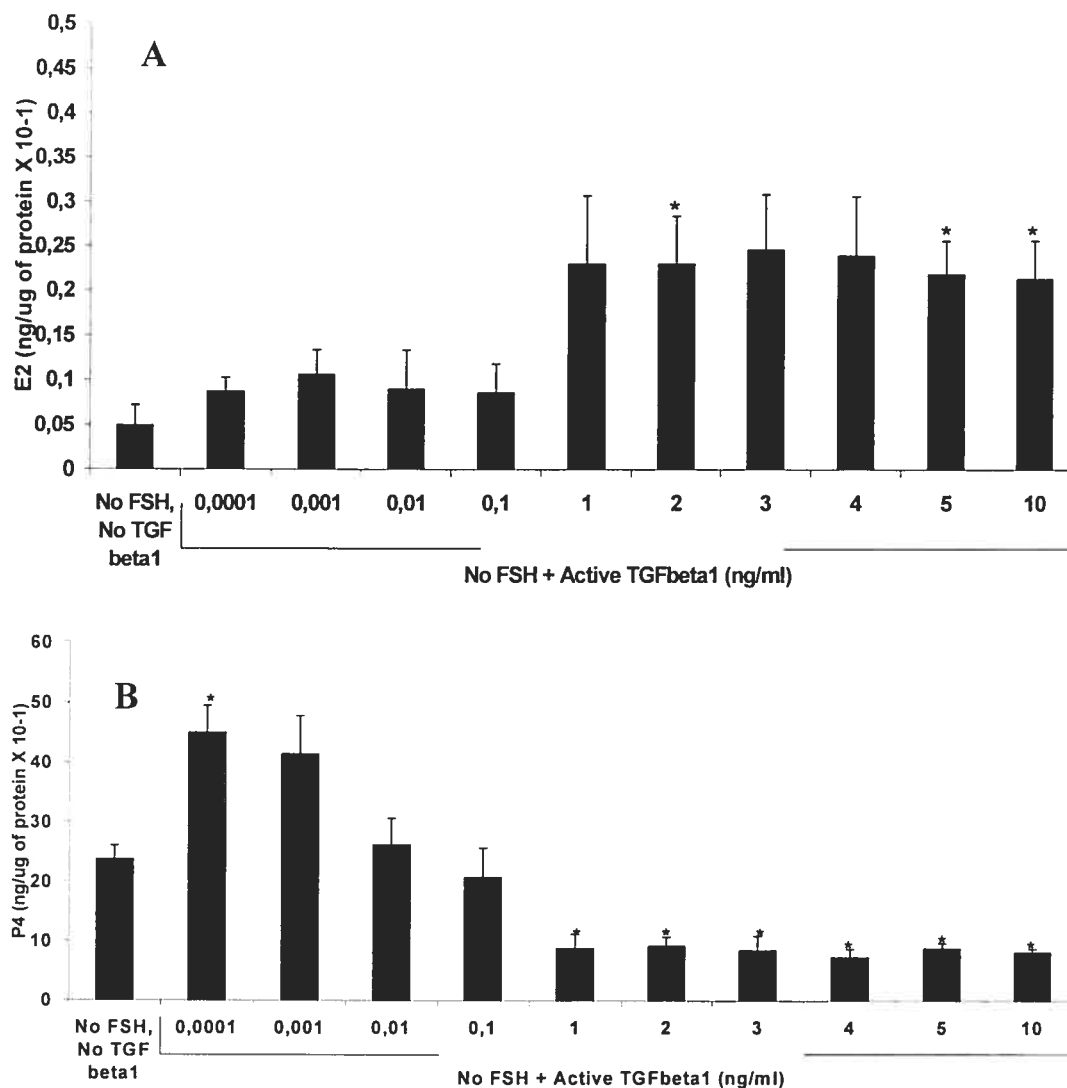


Figure 1. Effect of increasing concentrations of recombinant active transforming growth factor beta 1 (TGF $\beta$ 1) on basal production of oestradiol (A) and progesterone (B) expressed in ng per ug of extracted protein X 10<sup>-1</sup>. The medium was collected on Day 6 and represents steroid released during the last 48-h of cultured bovine granulosa cells. Asterisk (\*) indicates that oestradiol (A) or progesterone (B) production is significantly different ( $p < 0.005$ ) from the control wells with no FSH/no TGFbeta1. (One-way ANOVA with Dunnet contrast, Means of 3 experiments  $\pm$  SEM).

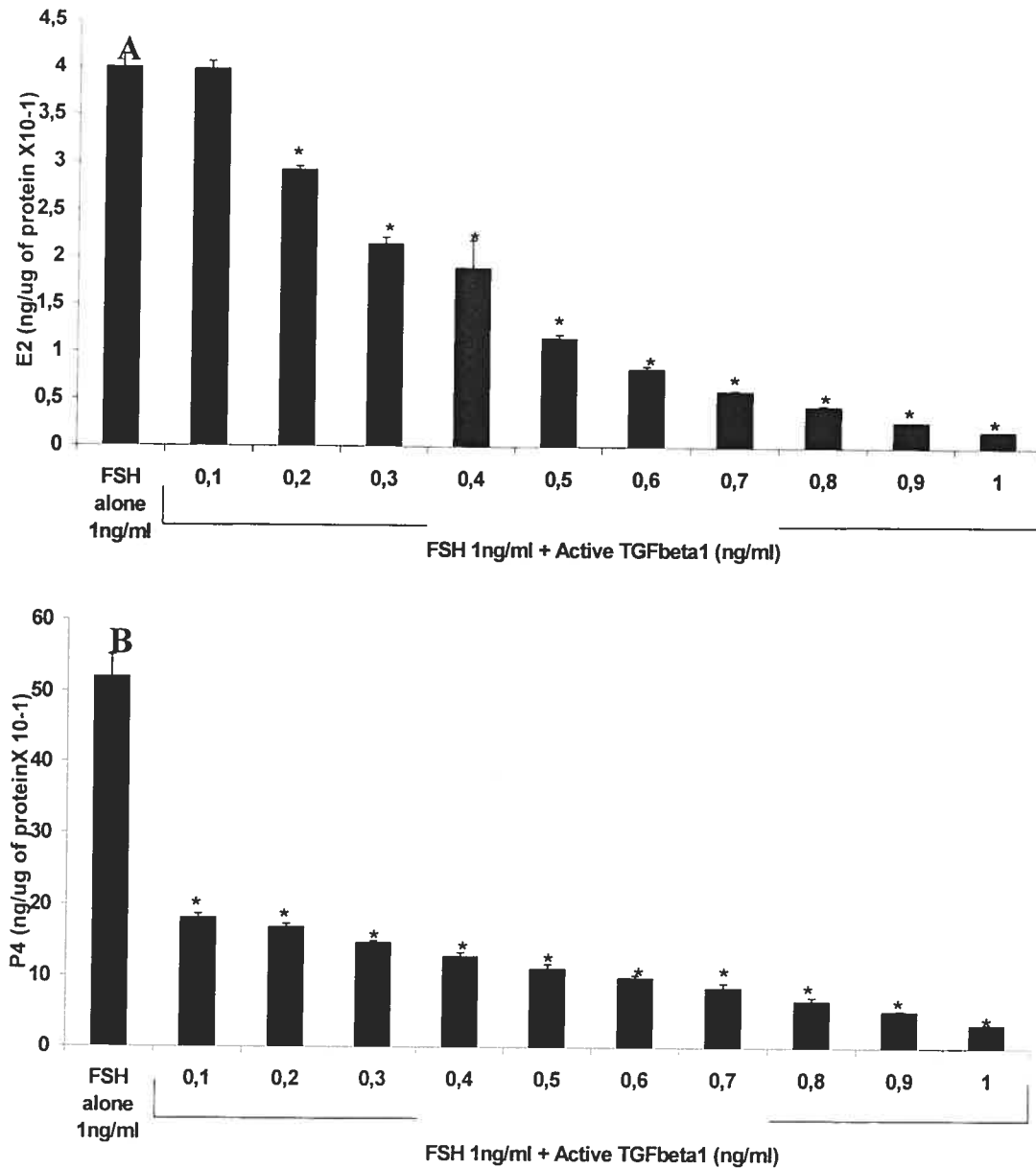


Figure 2. Effect of increasing concentrations of recombinant active transforming growth factor beta 1 (TGFβ1) on production of FSH-stimulated oestradiol (A) and progesterone (B) expressed in ng per ug of extracted protein X 10<sup>-1</sup>. The medium was collected on Day 6 and represents steroid released during the last 48-h of cultured bovine granulosa cells. Asterisk (\*) indicates that oestradiol (A) or progesterone (B) production is significantly different (p < 0.005) from the well FSH alone (1 ng/ml). (One-way ANOVA with Dunnet contrast, Means of 3 experiments ± SEM).

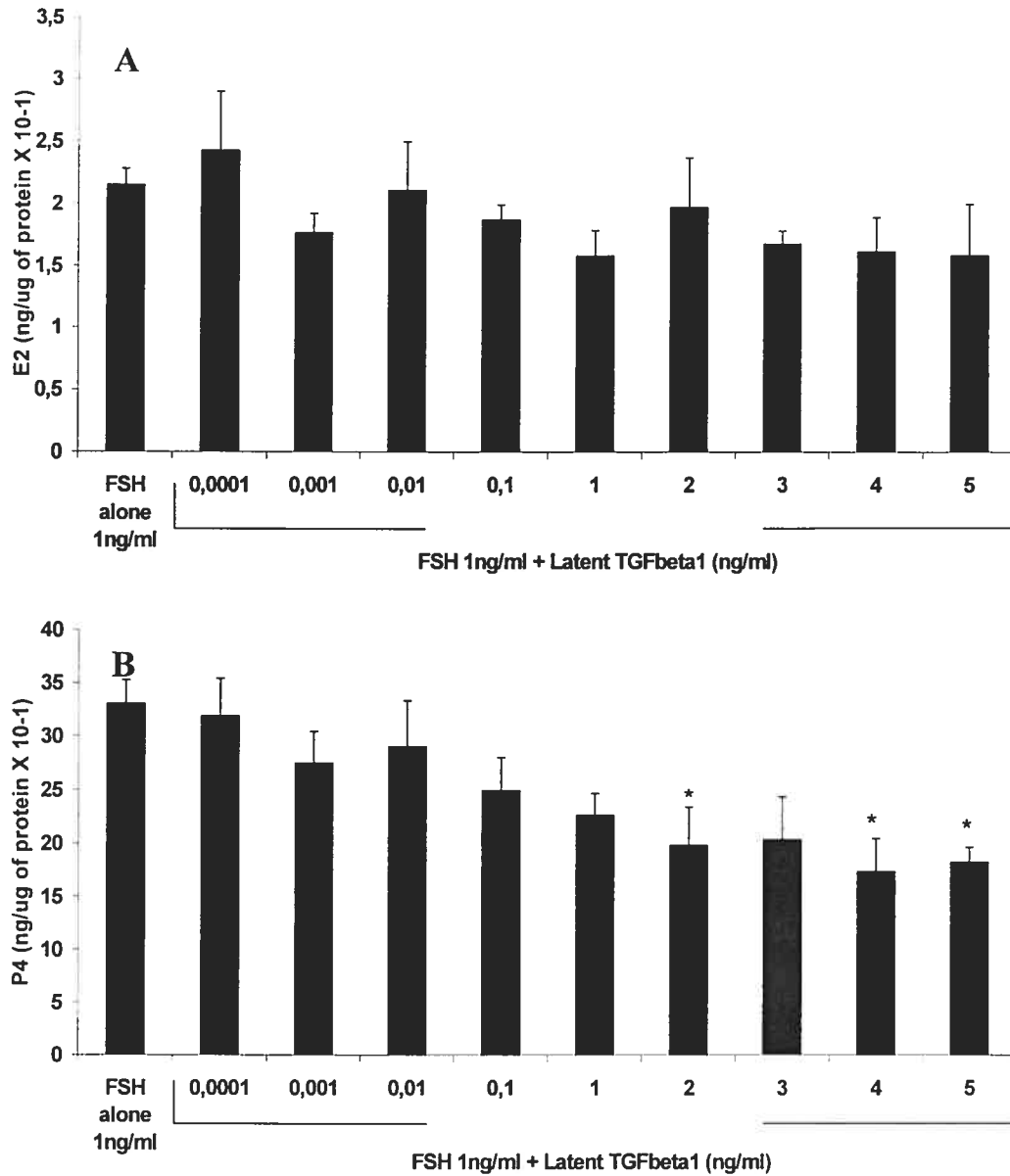


Figure 3. Effect of increasing concentrations of latent transforming growth factor beta 1 (TGFβ1) on production of FSH-stimulated oestradiol (A) and progesterone (B) expressed in ng per ug of extracted protein X 10<sup>-1</sup>. The medium was collected on Day 6 and represents steroid released during the last 48-h of cultured bovine granulosa cells. Asterisk (\*) indicates that oestradiol (A) or progesterone (B) production is significantly different (p < 0.005) from the well FSH alone (1 ng/ml). (One-way ANOVA with Dunnet contrast, Means of 3 experiments ± SEM).



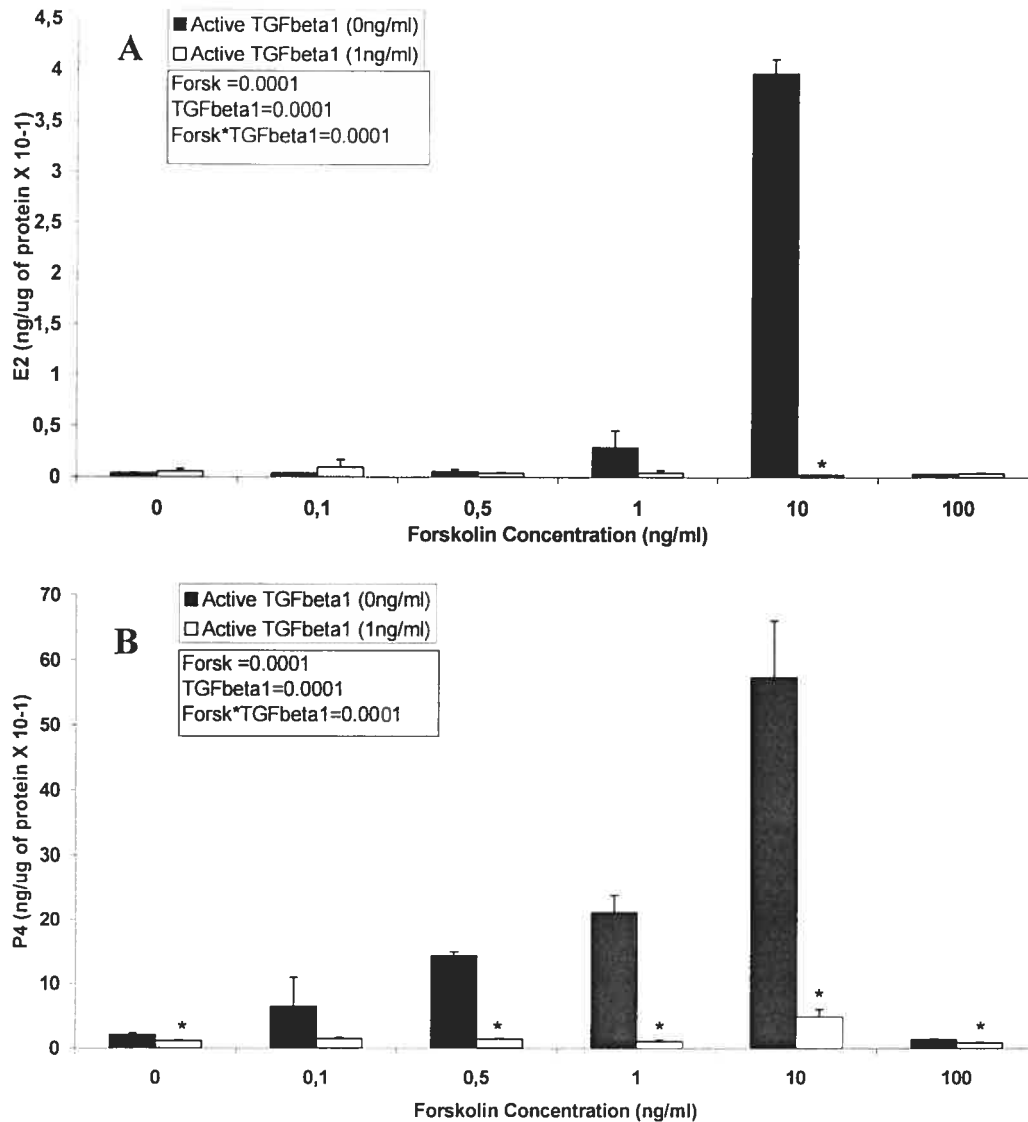


Figure 4. Effect of 1ng/ml of active TGFβ1 on forskolin-stimulated production of estradiol (A) and progesterone (B) expressed in ng per ug of extracted protein X 10<sup>-1</sup>. The medium was collected on Day 6 and represents steroid released during the last 48-h of cultured bovine granulosa cells. Different superscript letter indicates that oestradiol (A) or progesterone (B) production is significantly different ( $p < 0.005$ ) from the well without active TGFβ1 (1ng/ml). (two-way ANOVA with Dunnett contrast, Means of 3 experiments  $\pm$  SEM ). The box under the TGFβ concentrations legend represents respectively the p values for forskolin alone, active TGFβ alone, and interaction between these factors. If an interaction was significant, one of the two factors was fixed before contrast analysis. For example if an interaction was observed between active TGFβ and forskolin for estradiol secretion, contrast analysis were done on the different TGFβ concentrations at a specified concentration of forskolin. If no interaction was observed, contrast analysis were made between TGFβ concentrations for all forskolin concentrations together.

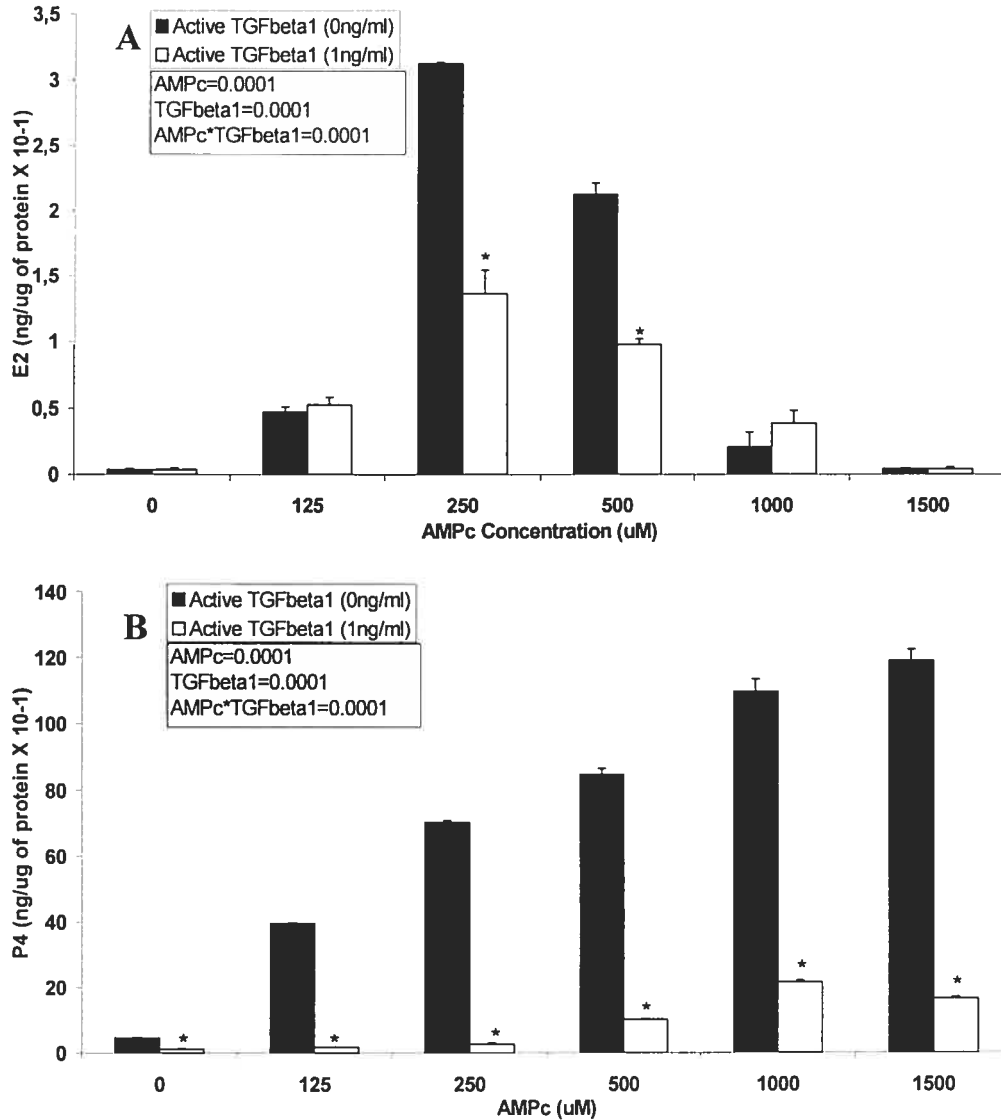


Figure 5. Effect of 1ng/ml of active TGFβ1 on AMPc-stimulated production of estradiol (A) and progesterone (B) expressed in ng per ug of extracted protein X 10<sup>-1</sup>. The medium was collected on Day 6 and represents steroid released during the last 48-h of cultured bovine granulosa cells. Different superscript letter indicates that oestradiol (A) or progesterone (B) production is significantly different ( $p < 0.005$ ) from the well without active TGFβ1 (1ng/ml). (two-way ANOVA with Dunnett contrast, Means of 3 experiments  $\pm$  SEM). The box under the TGFβ concentrations legend represents respectively the p values for AMPc alone, active TGFβ alone, and interaction between these factors. If an interaction was significant, one of the two factors was fixed before contrast analysis. For example if an interaction was observed between active TGFβ and AMPc for estradiol secretion, contrast analysis were done on the different TGFβ concentrations at a specified concentration of AMPc. If no interaction was observed, contrast analysis were made between TGFβ concentrations for all AMPc concentrations together.

#### 11.4.5. DISCUSSION

The present study provides evidence in support of a functional TGF $\beta$  system in cultured bovine granulosa cells collected from small antral follicles (2-5 mm). From the many contradictory results reported in other species, it was not possible to predict if TGF $\beta$  would be able to regulate steroidogenesis of bovine granulosa cells. In this study we demonstrate the ability of TGF $\beta$  to regulate both basal and stimulated estradiol and progesterone production in bovine granulosa cells.

The most striking observation was the strong dose-dependent inhibitory effect of TGF $\beta$ 1 on FSH-stimulated steroidogenesis. This study shows that recombinant active TGF $\beta$ 1 inhibits FSH-stimulated, forskolin-stimulated and 8-br-cAMP-stimulated estradiol and progesterone secretion, thus pointing towards a direct regulation of steroidogenic enzymes. On the other hand, active TGF $\beta$ 1 stimulated basal estradiol secretion without FSH while it had a bifunctional role on basal progesterone production by stimulating the secretion at low concentration and inhibiting it at higher concentrations. Latent TGF $\beta$ 1 had an inhibiting effect only on FSH-stimulated progesterone secretion. To our knowledge this is the first study to provide evidence of an effect of TGF $\beta$  on the basal production of estradiol and

progesterone by bovine granulosa cell. It is also the first study to report an effect of latent TGF $\beta$  on granulosa cells progesterone production.

This is in agreement with Skinner *et al.*, (1987) who showed that bovine thecal cells and rat thecal/interstitial cell preparations produced TGF $\beta$  which can regulate granulosa cells growth. This is also in agreement with Wandji *et al.*, (1993) who showed in cultured bovine preantral follicles that TGF $\beta$  could inhibit FSH-stimulated steroid production, while in porcine granulosa cells, TGF $\beta$  was shown to inhibit the stimulatory effect of FSH on estradiol secretion (Ford and Howard 1997). So these in vitro studies suggested that TGF $\beta$  could be a factor involve in bovine follicular steroidogenesis. However, Rouillier *et al.*, (1997) using bovine granulosa cells failed to demonstrate an effect of TGF $\beta$  on steroidogenesis. This can be explained by the fact that granulosa cells were harvested from mature pre-ovulatory follicles (> 8 mm) present on ovaries of eCG-treated prepubertal female calves. In a previous study, we have shown that high follicular fluid concentration of TGF $\beta$ 1 is associated with low estradiol and reduced follicle size in emerging cohort follicles only (Ouellette *et al.*, 2004, to be submitted). When the largest follicle of the cohort has attained a diameter > 6.5 mm, there is no more association between estradiol and TGF $\beta$ 1 in all follicles of the cohort, which suggests steroidogenesis of granulosa cells collected from follicles > 8 mm would not be sensitive to TGF $\beta$  stimulation anymore. Also, the fact that follicles were harvested from prepubertal calves instead of cycling

heifers and the fact that granulosa cells were collected from eCG-treated follicles can explain the divergence in the results. When granulosa cells are collected from treated follicles (eCG-treated or treated with estradiol), they don't seem to react the same way. For example, in granulosa cells obtained from diethylstilbestrol-treated immature mice, TGF $\beta$  has been shown to increase estradiol secretion by FSH (Adashi *et al.*, 1989). In short, culture conditions should be compared to explain differences between results of others in vitro studies.

The results of the present study strongly suggest a role of the TGF $\beta$  peptide in bovine steroidogenesis and follicular development. When the cells are not stimulated by FSH, which may reproduce the early stage of folliculogenesis independent from pituitary hormones (i.e. before emergence and FSH peak) (Austin et Short 1991), active TGF $\beta$ 1 seems to act as a regulator of differentiation of granulosa cells. At 1 ng/ml, TGF $\beta$  inhibited progesterone while it stimulated estradiol. In short, TGF $\beta$  seems to favour a positive estradiol/ progesterone ratio. On the other hand, when FSH is present in the culture system, which may reproduce a later stage of folliculogenesis strongly dependent on pituitary hormones (i.e. during emergence, at the FSH peak), the stimulatory effect of TGF $\beta$  is changed to a strong inhibitory effect acting downstream from cAMP regulation, probably directly on steroidogenic enzyme expression or activity. This would be in agreement with Fournet *et al.*, (1996) who have already observed that TGF $\beta$  can inhibit thecal 17-

$\alpha$ hydroxylase activity by a direct noncompetitive mechanism. In fact, for the enzymes implicated in estradiol secretion by granulosa cells, both stimulating and inhibiting effects on the activity and the expression of these enzymes were reported. Using an independent assay that relies on the response of the aromatase complex, Bendell and Dorrington (1988) showed on rat granulosa cells that TGF $\beta$  alone did not influence the basal levels of aromatase activity, but it augmented FSH-induced aromatase activity. Fiorelli *et al.*, (1998) also demonstrated with southern blot of RT-PCR products with a <sup>32</sup>P-labeled cDNA probe for human aromatase that the human leukaemic cell line FLG 29.1 expresses aromatase mRNA which was stimulated in a time-dependent fashion by 0.01 to 0.5ng/ml of TGF $\beta$ 1. It was also shown in granulosa cells collected from the DES rat model that TGF $\beta$  strongly enhanced 17 $\beta$  HSD type 1 activity and expression (Kaminski *et al.*, 1997). In contrast, Rainey *et al.*, (1992) showed by immunoblotting using an antibody directed against human placental aromatase that TGF $\beta$  blocked basal as well as Bu<sub>2</sub>cAMP stimulated aromatase activity by over 50%. Furthermore, immunodetectable aromatase decreased in parallel with activity following TGF $\beta$  treatment of human fetal hepatocytes (Rainey *et al.*, 1992).

For TGF $\beta$  and the enzymes implicated in progesterone secretion by granulosa cells, both stimulating and inhibiting effects were also reported. In cultured granulosa cells isolated from the DES treated rat model, EGF augmented the action of FSH on 3 $\beta$  HSD activity and this interaction was

further enhanced by TGF $\beta$  (Bendell and Dorrington 1990). Using cultured human fetal adrenal cells, Lebrethon *et al.*, (1994) showed that TGF $\beta$  enhanced the stimulatory effects of ACTH on 3 $\beta$  HSD mRNA. Analysis by immunoblotting also showed that TGF $\beta$  alone or in combination with LH stimulated an increase in P450<sub>scc</sub> content in thecal-interstitial cells isolated from the ovaries of hypophysectomized immature rats and increased progesterone secretion (Magoffin *et al.*, 1989). On the other hand, it was also shown that TGF $\beta$ 1 can be an inhibitor of 3 $\beta$ HSD in mouse adrenal tumor cell line Y1 (Cherradi *et al.*, 1995). An inhibition of the basal enzymatic activity was observed after TGF $\beta$ 1 treatment which was correlated with a decrease in 3 $\beta$  HSD protein and mRNA levels.

So there is much evidence demonstrating the capacity of TGF $\beta$  to regulate steroidogenesis by positively or negatively modulating the steroidogenic enzymes, but what causes the biphasic effect of TGF $\beta$  on progesterone, under the same conditions? Derynck *et al.*, (2003) in a recent review on TGF $\beta$  signaling pathways observed that the intracellular effectors of TGF $\beta$  signalling, the Smad proteins, are activated by TGF $\beta$  receptors and translocate into the nucleus. However, even if this pathway is quite simple, interactions of the heteromeric TGF $\beta$  receptors and Smad complexes, receptor-interacting and Smad-interacting proteins, and cooperation with sequence-specific transcription factors allow substantial versatility and diversification of TGF $\beta$  responses. Moreover, other signalling pathways

further regulate Smad activation and function. TGF $\beta$  receptors can also activate Smad-independent pathways that not only regulate Smad signalling, but also allow Smad-independent responses. Thus a ligand can induce different signalling pathways depending on the composition of the TGF $\beta$  receptor complex and the composition of the heteromeric receptor complex and the interaction of co-receptors that not only dictate ligand-binding specificity, but may also confer differential intracellular routing, thereby regulating receptor signalling. Thus, it's possible that only a different TGF $\beta$  concentration can exert opposite effects on progesterone secretion by activating different co-receptors interaction and various intracellular signaling pathways.

This finding is also in agreement with Nilsson *et al.*, (2003) who observed a loss of TGF $\beta$ 1 immunostaining in large more advanced stage follicles and also that FSH decreased granulosa cell TGF $\beta$ 1 mRNA expression. Taken together with the present study, these findings suggest that a low level of TGF $\beta$ 1 in large antral follicles is necessary to sustain higher estradiol secretion. This is also reinforced by the fact that TGF $\beta$ 1 inhibits theca androgens the substrate for estradiol production and that estradiol inhibits theca TGF $\beta$ 1 production (Magoffin *et al.*, 1989, 1995). Consequently, estradiol would inhibit a strong inhibitor (TGF $\beta$ 1) of its own production, which would result in a much higher responsiveness to FSH stimulation. In



summary, the presence of FSH and estradiol would upregulate estradiol secretion by inhibiting the «inhibitor TGF $\beta$ 1».

Finally the fact that the latent TGF $\beta$ 1 had only an inhibitory effect on FSH-stimulated progesterone secretion in vitro, but not estradiol, is understandable by the fact that progesterone seems to be more sensitive to low TGF $\beta$ 1 concentration, since progesterone was more inhibited at lower concentration than estradiol. Therefore, if only a small portion of the latent TGF $\beta$  can be activated directly by bovine granulosa cells, then it will be more probable to have a significant effect of TGF $\beta$  on progesterone. It is clear with progesterone that granulosa cells can activate at least a certain percentage of the latent form, but this activation doesn't seem to be sufficient to produce a significant effect on estradiol in vitro. In spite of this discrepancy, it is likely that the mechanism of activation of latent TGF $\beta$  observed in the present in vitro study under FSH stimulation is suboptimal and that in vivo, more complex molecular interactions would result in a much higher percentage of activation of the latent form, and result in inhibition of oestradiol.

In conclusion, these results suggest that the TGF $\beta$  system may be part of the autocrine-paracrine network that regulates estradiol and progesterone secretion in growing bovine antral follicles. Receptor and ligand of the TGF $\beta$  system are present in bovine antral follicles and TGF $\beta$ 1 appears to regulate differentially bovine granulosa cell steroidogenesis depending on the stimulation exerted by FSH. This is a first step to better characterize the

physiological role of TGF $\beta$  in single ovulating species such as the cow.

Further studies are needed to understand the mechanism of activation and regulation of the steroidogenic enzymes affected by the TGF $\beta$  peptide.

#### 11.4.6. ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Yves Tremblay, CHUL, Université Laval for providing progesterone antibody; Dr Yves Lepage, Département de mathématiques et de statistiques, Université de Montréal for advice and assistance on statistical analysis; Dr. Manjit Singh Rana for is critical apparaisal of this manuscript.

#### 11.4.7. REFERENCES

1. Adashi EY, Resnick CE, Hernandez ER, May JV, Purchio AF, Twardzik DR. 1989. Ovarian transforming growth factor- $\beta$  (TGF $\beta$ ) : cellular site(s), and mechanism(s) of action. *Mol Cell Endocrinol* 61: 247-256.
2. Bendell JJ, Dorrington J. 1988. Rat thecal/interstitial cells secrete a transforming growth factor-beta-like factor that promotes growth and differentiation in rat granulosa cells. *Endocrinology* 123(2) : 941-8.
3. Bendell JJ, Dorrington JH. 1990. Epidermal growth factor influences growth and differentiation of rat granulosa cells. *Endocrinology* 127(2) : 533-40.
4. Campbell BK, Scaramuzzi RJ, Webb R. 1996. Induction and maintenance granulosa cell development of oestradiol and immunoreactive inhibin production with FSH by ovine granulosa cells cultures in serum-free media. *J Reprod Fertil* 106 : 7-16.
5. Carrière PD, Amaya D, Lee B. 1995. Ultrasonography and endocrinology of ovarian dysfunctions induced in heifers with estradiol valerate. *Theriogenology* 43 : 1061-1076.

6. Chegini N, Flanders KC. 1992. Presence of transforming growth factor- $\beta$  and their selective cellular localization in human ovarian tissue of various reproductive stages. *Endocrinology* 130 : 1707-1715.
7. Cherradi N, Chambaz EM, Defaye G. 1995. Type beta 1 transforming growth factor is an inhibitor of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase isomerase in mouse adrenal tumor cell line Y1. *Endocr Res* 21(1-2) :61-6.
8. Derynck R, Zhang YE. 2003. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 425(6958) :577-84.
9. Fiorelli G, Frediani U, Martinetti V, Franchi A, Gori F, Franceschelli F, Tanini A, Serio M, Brandi ML. 1998. Aromatase expression and activity in the human leukaemic cell line FLG 29.1. *J Steroid Biochem Mol Biol* 66(3): 105-12.
10. Ford JJ, Howard HJ. 1997. Activin inhibition of estradiol and progesterone production in porcine granulosa cells. *J Anim Sci* 75: 761-766.

11. Fournet N, Weitsman SR, Zachow RJ, Magoffin DA. 1996. Transforming growth factor $\beta$  inhibits ovarian 17- $\alpha$ hydroxylase activity by a direct noncompetitive mechanism. *Endocrinology* 137:166-174.
12. Guitiérrez CG, Campbell BK, Webb R. 1996. Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle-stimulating hormone, and morphologic characteristics. *Biol Reprod* 56: 608-616.
13. Hutchinson LA, Findlay JK, de Vos FL, Robertson DM. 1987. Effects of bovine inhibin, transforming growth factor-beta and bovine Activin-A on granulosa cell differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 146(3): 1405-12.
14. Kaminski T, Akinola L, Poutanen M, Vihko R, Vihko P. 1997. Growth factors and phorbol-12-myristate-13-acetate modulate the follicle-stimulating hormone- and cyclic adenosine-3',5'-monophosphate-dependent regulation of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression in rat granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 136(1) : 47-56.
15. Knecht M, Feng P, Catt K. 1987. Bifunctional role of transforming growth factor- $\beta$  during granulosa cell development. *Endocrinology* 120: 1243-1249.

16. Lebrethon MC, Jaillard C, Naville D, Begeot M, Saez JM. 1994. Regulation of corticotropin and steroidogenic enzyme mRNAs in human fetal adrenal cells by corticotropin, angiotensin-II and transforming growth factor beta 1. *Mol Cell Endocrinol* 106(1-2): 137-43.
17. Littell RC, Milliken GA, Stroup WW, Wolfinger RD. 1996. *SAS System for Mixed Models*, Cary, NC: SAS Institute Inc. Pages 101-102.
18. Magoffin DA, Gancedo B, Erickson GF. 1989. Transforming growth factor-beta promotes differentiation of ovarian thecal-interstitial cells but inhibits androgen production. *Endocrinology* 125(4): 1951-8.
19. Magoffin DA, Hubert-Leslie D, Zachow RJ. 1995. Estradiol-17 beta, insulin-like growth factor-I, and luteinizing hormone inhibit secretion of transforming growth factor beta by rat ovarian theca-interstitial cells. *Biol Reprod* 53(3): 627-35.
20. Mulheron GW, Danielpour D, Schomberg DW. 1991. Rat thecal/interstitial cells express transforming growth factor- $\beta$  type 1 and 2, but only type 2 is regulated by gonadotropin *in vitro*. *Endocrinology* 129: 368-374.

21. Nilsson EE, Doraiswamy V, Skinner MK. 2003. Transforming growth factor-beta isoform expression during bovine ovarian antral follicle development. *Mol Reprod Dev* 66(3): 237-46.
22. Ouellette Y, Carrière PD. 2004. Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 is negatively correlated with estradiol and follicle size at the time of emergence of bovine ovarian follicles monitored by ultrasonography. (à soumettre)
23. Rainey WE, Price TM, Means GD, Carr BR. 1992. Effect of type 1 transforming growth factor-beta on the level of aromatase cytochrome P-450 in human fetal hepatocytes. *J Endocrinol* 133(2): 311-20.
24. Rodbard D. 1974. Statistical quality control and routine data processing for radioimmunoassays and immunoradiometric assays. *Clin Chem* 20: 1255-1270.
25. Rouillier P, Sirard MA, Matton P, Guilbault LA. 1997. Immunoneutralization of transforming growth factor alpha present in bovine follicular fluid prevents the suppression of the follicle-stimulating hormone-induced production of estradiol by bovine granulosa cells cultured in vitro. *Biol Reprod* 57: 341-346.



26. Roy SK, Ogren C, Roy C, Lu B. 1992. Cell-type-specific localization of transforming growth factor- $\beta$ 2 and transforming growth factor- $\beta$ 1 in the hamster ovary: differential regulation by follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. *Biol Reprod* 46: 595-606
27. Shoukri MM, Edge VL. 1996. *Statistical methods for health sciences*. Florida: CRC Press: 247-281.
28. Skinner MK, Keski-Oja J, Osteen KG, Moses HL. 1987. Ovarian thecal cells produce transforming growth factor-beta which can regulate granulosa cell growth. *Endocrinology*. 121(2):786-792.
29. Teerds KJ, Dorrington JH. 1992. Immunohistochemical localization of transforming growth factor- $\beta$ 1 and - $\beta$ 2 during follicular development in the adult ovary. *Mol Cell Endocrinol* 84: 7-13.
30. Tremblay Y, Bélanger A. 1984. Effect of acute ACTH administration on plasma steroid levels in the dog. *Steroids* 44: 57-66
31. Wandji SA, Srsen V, Voss AK, Eppig JJ, Fortune JE. 1996. Initiation in vitro of growth of bovine primordial follicles. *Biol Reprod* 55(5): 942-8.

## **12. DISCUSSION GÉNÉRALE**

Cette thèse de doctorat visait d'abord et avant tout à établir le rôle réel du TGF $\beta$  durant le développement folliculaire, et plus particulièrement durant la sélection du follicule dominant. Pour ce faire, nous avons utilisé un des meilleurs modèles qui soit pour faire ce genre d'étude. Nous avons également utilisé des techniques de prélèvements d'échantillons in vivo qui nous ont permis de tracer un portrait du TGF $\beta$  dans le liquide folliculaire, ce qui à notre connaissance n'a pas encore été fait, dans un contexte physiologique de développement folliculaire normal. Les résultats les plus probants de cette thèse sont que le TGF $\beta$ 1 inhibe la sécrétion d'oestradiol dans les follicules subordonnés lorsque le plus gros follicule a atteint 6,5 mm de diamètre. Cette observation a été renforcée par une étude in vitro dans laquelle il a été démontré que la sécrétion de progestérone et d'oestradiol stimulée par la FSH, dans les cellules de granulosa bovine provenant de follicule de 2 à 5 mm, est fortement inhibée par le TGF $\beta$ .

En se basant sur les études in vitro concernant l'effet du TGF $\beta$  sur la production d'oestradiol, des études qui pour la plupart ont été réalisées sur des rats traités au DES et qui suggéraient un effet positif du TGF $\beta$  sur l'activité aromatasase et la production d'oestradiol, on aurait pu croire que le TGF $\beta$  serait un activateur de cette production d'oestradiol au moment de la sélection du follicule dominant. Cependant, suite à notre étude in vivo de l'article 1, on s'est rapidement rendu compte que le TGF $\beta$  n'est pas impliqué dans le phénomène de déviation entre les deux plus gros follicules. Par contre, nos

résultats nous ont plutôt dirigés vers un autre rôle du TGF $\beta$ . En effet, nous avons étalé notre étude à quatre temps de développement du plus gros follicule soit de 6,5 mm à 9,5 mm, sans quoi nous aurions probablement conclu à un effet négligeable du TGF $\beta$  sur la production d'oestradiol. Ainsi nous avons mis à jour un rôle complètement insoupçonné du TGF $\beta$  chez la vache, un rôle qui à première vue ne semble pas être le même que celui observé chez l'espèce murine. Or avant de conclure à un rôle réel du TGF $\beta$ , nous avons d'abord dû trouver une explication plausible au fait que dans l'expérience in vivo, les différences significatives ont été observées sur les mesures de TGF $\beta$  total, mesurées après traitement acide. Alors comment expliquer qu'il n'y ait pas eu de différences enregistrées dans les concentrations de TGF $\beta$  actif?

Une explication possible serait que la quantité de TGF $\beta$  actif est fonction du taux d'activation du latent. Une fois activé, le TGF $\beta$  actif se distribue entre le récepteur et le liquide folliculaire (d'où la distinction entre le TGF $\beta$  actif lié et le TGF $\beta$  actif libre). Le fait que la concentration de TGF $\beta$  actif libre demeure relativement constante d'un follicule à l'autre, suggère que le nombre de récepteurs TGF $\beta$  est en excès par rapport au substrat. Ainsi cet excès ferait en sorte qu'une majorité du TGF $\beta$  actif se dirige rapidement vers les récepteurs pour induire le signal, au lieu de se retrouver dans le liquide folliculaire. Ceci expliquerait l'absence de différence du TGF $\beta$  actif et la

raison pour laquelle les niveaux de TGF $\beta$  actif ne représentent qu'une fraction du TGF $\beta$  total.

Par ailleurs avant de conclure à un effet réel du TGF $\beta$ , il nous fallait établir un lien direct de cause à effet entre le TGF $\beta$  et l'oestradiol car nos études *in vivo* ne nous permettaient pas d'en venir à une telle conclusion. Établir une relation entre deux facteurs ne permet pas d'établir un lien de cause à effet. C'est pourquoi, on considérait indispensable d'enchaîner avec des cultures de cellules qui nous permettraient de démontrer ce lien. Ainsi nous avons démontré un effet inhibiteur dose-dépendant du TGF $\beta$ 1 actif sur la production d'oestradiol et de progestérone stimulée par la FSH. Or dans l'étude *in vivo*, les concentrations élevées de TGF $\beta$ 1 au stade 6,5 mm n'étaient pas associées à une diminution de progestérone contrairement à l'oestradiol. Il est probable que la progestérone mesurée dans le liquide folliculaire provienne également d'une autre source que les cellules de granulosa, possiblement par les cellules hautement stéroïdogènes de la thèque. À ce propos, il fut démontré que TGF $\beta$  stimule la production de progestérone par les cellules de la thèque (Magoffin *et al.*, 1989, Roberts and Skinner 1991).

Dans le même ordre d'idées, on doit être prudent avant de conclure à un effet positif réel du TGF $\beta$  actif sur la production basale (sans FSH) d'oestradiol, car physiologiquement, il y a toujours une certaine quantité de FSH circulante. Par contre, cela pourrait suggérer que lorsque le développement des follicules est indépendant de la FSH, le TGF $\beta$  pourrait

jouer un rôle de « switch on » en permettant aux follicules de produire une petite quantité d'oestradiol ou en augmentant l'effet oestrogénique, en diminuant la sécrétion de progestérone, ce qui enclencherait le début de certains changements métaboliques profitables à la croissance de ces follicules. Un approfondissement de nos connaissances à ce sujet pourrait donner la chance de mettre à jour un des mécanismes qui permettrait la production d'oestradiol et la croissance de follicules préantraux sans support de la FSH.

En ce qui concerne le TGF $\beta$  latent, les études *in vitro* ne semblent pas démontrer d'effet de ce dernier sur la production d'oestradiol, alors qu'il a un effet sur la production de progestérone stimulée par la FSH. Cette inhibition nous indique qu'en culture de cellules, il existe un certain niveau d'activation du TGF $\beta$  latent par les cellules de granulosa. Ainsi, il est possible qu'une faible activation en culture soit suffisante pour obtenir un effet significatif du TGF $\beta$  latent sur la progestérone, alors qu'elle ne serait pas suffisante pour l'oestradiol, étant donné que *in vitro*, la progestérone est plus sensible à l'effet du TGF $\beta$  actif que l'oestradiol. Or, peu importe le taux d'activation qui existe en culture, il est très probable qu'il existe plusieurs autres mécanismes d'activation du TGF $\beta$ , comme la présence d'enzymes dans le liquide folliculaire par exemple (Ingman et Robertson 2002, Koli *et al.*, 2001). En effet, Rivera et Fortune (2001) ont démontré qu'un composant du système IGF nommé protéase IGFBP-4 est associé avec l'établissement de la dominance

folliculaire. Les protéases IGFBP dégradent les IGFBPs, ce qui libère les IGF qui peuvent par la suite interagir avec leurs récepteurs, ce qui procure généralement un effet positif sur la stéroïdogénèse (Giudice 1992). Ainsi, ils ont démontré que le liquide folliculaire bovin provenant de follicules préovulatoires dégradait environ 80% de IGFBP-4 recombinant humain à l'intérieur de 18 heures d'incubation. Ils ont également démontré, dans le liquide folliculaire prélevés au jour 2 et au jour 3 de la vague folliculaire, que l'activité protéolytique IGFBP-4 est respectivement 2 à 3.5 fois et 5 fois plus élevée dans le follicule dominant comparés aux follicules subordonnés (Rivera et Fortune 2001, Rivera *et al.*, 2001). Dans le même ordre d'idées, serait-il possible qu'un tel système enzymatique soit effectif pour le TGF $\beta$  latent? De façon spéculative, sans doute que oui. Comme les protéases IGFBP, il serait probable de détecter une activité enzymatique permettant la libération du TGF $\beta$  actif lorsque les follicules sont en début de développement. Or, contrairement aux protéases IGFBPs, l'hypothèse serait que l'activité enzymatique est plus élevée dans les follicules subordonnés, puisque l'effet du TGF $\beta$  est principalement inhibiteur de la stéroïdogénèse, à l'opposé des IGF. Il serait donc plus vraisemblable de retrouver une forte activité enzymatique dans les follicules subordonnés, ce qui résulterait en une inhibition de l'oestradiol. À l'opposé, une faible activité enzymatique permettrait au follicule dominant de s'affranchir de l'effet inhibiteur du TGF $\beta$ . Ainsi, les mécanismes par lequel le TGF $\beta$  est activé pourraient constituer une suite intéressante à cette thèse. Dans un autre ordre d'idées, on pourrait se demander

pourquoi le TGF $\beta$  est emmagasiné sous forme latente dans le liquide folliculaire? Une suggestion de réponse serait que le TGF $\beta$  latent a une demi-vie plus longue que le TGF $\beta$  actif, à l'image des IGF et de leurs protéines de liaisons (les IGFBPs).



### **13. CONCLUSION GÉNÉRALE**

Cette thèse démontre clairement une implication du TGF $\beta$  dans le développement folliculaire ovarien bovin. Les objectifs suivants ont été satisfaits :

- 1) s'assurer de la présence du système TGF $\beta$  dans les follicules bovins en croissance;
- 2) valider un test ELISA servant à quantifier le TGF $\beta$  dans le liquide folliculaire;
- 3) déterminer si le TGF $\beta$  est différentiellement contrôlé dans les follicules en croissance en voie de passer les différentes étapes de la sélection;
- 4) établir l'existence de liens entre ce facteur de croissance et la sécrétion d'oestradiol;
- et 5) valider ces résultats par des cultures de cellules.

La réalisation de ces objectifs a permis d'établir que le principal rôle physiologique du TGF $\beta$ , concernant le développement folliculaire, est de limiter la production d'oestradiol dans les follicules subordonnés en début de développement.

À la lumière des nouvelles informations décrites dans cette thèse, nous proposons un modèle de régulation de l'oestradiol par le TGF $\beta$  qui pourrait s'établir de la façon suivante in vivo (Fig 12). Premièrement, lorsque le développement folliculaire est indépendant de la FSH ou en présence d'une concentration basale de FSH (avant l'émergence), le TGF $\beta$  stimule de façon transitoire la sécrétion d'oestradiol puis inhibe la progestérone dans les follicules de la future vague folliculaire, augmentant le ratio oestradiol/progestérone. Comme l'oestradiol inhibe l'expression du TGF $\beta$ , le follicule le plus oestrogénique à ce moment, c'est à-dire celui qui répond le mieux à cette stimulation du TGF $\beta$ , inhibe précocement l'expression du TGF $\beta$ . À l'opposé, les follicules qui sécrètent moins d'oestradiol n'inhibent pas suffisamment l'expression du TGF $\beta$ . Ainsi, une accumulation du TGF $\beta$ 1 se produirait dans le liquide folliculaire des follicules les

moins oestrogéniques. Deuxièmement, la montée de FSH correspondant à l'émergence de la nouvelle vague folliculaire aurait pour conséquence d'inverser le rôle du TGF $\beta$  qui passerait alors d'activateur à inhibiteur de la sécrétion d'oestradiol, comme il a été démontré dans notre étude in vitro lorsqu'on est en présence de FSH. Ainsi la présence de TGF $\beta$  aurait pour conséquence de freiner la sécrétion d'oestradiol par la FSH jusqu'à un diamètre critique de 6,5 mm. Après ce stade, on n'observe plus de concentrations élevées de TGF $\beta$  intrafolliculaire et d'autres mécanismes assurent alors l'augmentation de l'oestradiol du follicule dominant. Comme le follicule le plus oestrogénique est celui qui contient le moins de TGF $\beta$ , il devient alors avantagé par rapport à ceux qui en ont accumulé davantage, et il répond mieux à la montée de FSH. De cette façon, le TGF $\beta$  agirait comme régulateur de la réponse à la FSH par les follicules. Ainsi le TGF $\beta$  et l'oestradiol seraient intimement liés dans une boucle de rétrocontrôle qui tournerait à l'avantage du follicule destiné à devenir le follicule dominant, au détriment des autres follicules. Par conséquent, il est donc possible que le TGF $\beta$  soit indirectement impliqué dans la sélection du follicule dominant par un mécanisme qui découlerait de la capacité du futur follicule dominant de s'affranchir transitoirement de l'effet inhibiteur du TGF $\beta$  à un diamètre de 6.5 mm ou moins, lui permettant ainsi de poursuivre les étapes de développement menant à l'ovulation.

En conclusion, dans l'avenir, afin de mieux comprendre le fonctionnement du système TGF $\beta$ , il serait intéressant de caractériser les mécanismes par lesquels le TGF $\beta$  latent est activé. Pour ce faire, il pourrait être déterminé si le liquide

folliculaire de follicules subordonnés prélevés à 6,5 mm possède une activité protéolytique endogène qui permettrait l'activation d'une concentration connue de TGF $\beta$  latent exogène. Dans le même ordre d'idées, il serait aussi approprié de continuer à caractériser le mécanisme post AMPc par lequel le TGF $\beta$  provoque une inhibition de la sécrétion d'oestradiol en présence de FSH, alors qu'il la stimule en absence de FSH, tout comme le mécanisme par lequel le TGF $\beta$ , en faible concentration, stimule la production de progestérone alors qu'à plus fortes doses, il l'inhibe, et ce, dans les mêmes conditions de culture. Les enzymes stéroïdogéniques affectées par la présence du TGF $\beta$  seraient également des composantes importantes à cibler dans une future étude. Enfin, une vue d'ensemble du fonctionnement des autres isoformes du TGF $\beta$  permettrait de tracer un portrait encore plus réel du fonctionnement du système TGF $\beta$  dans le développement folliculaire bovin et dans la sélection du follicule dominant.

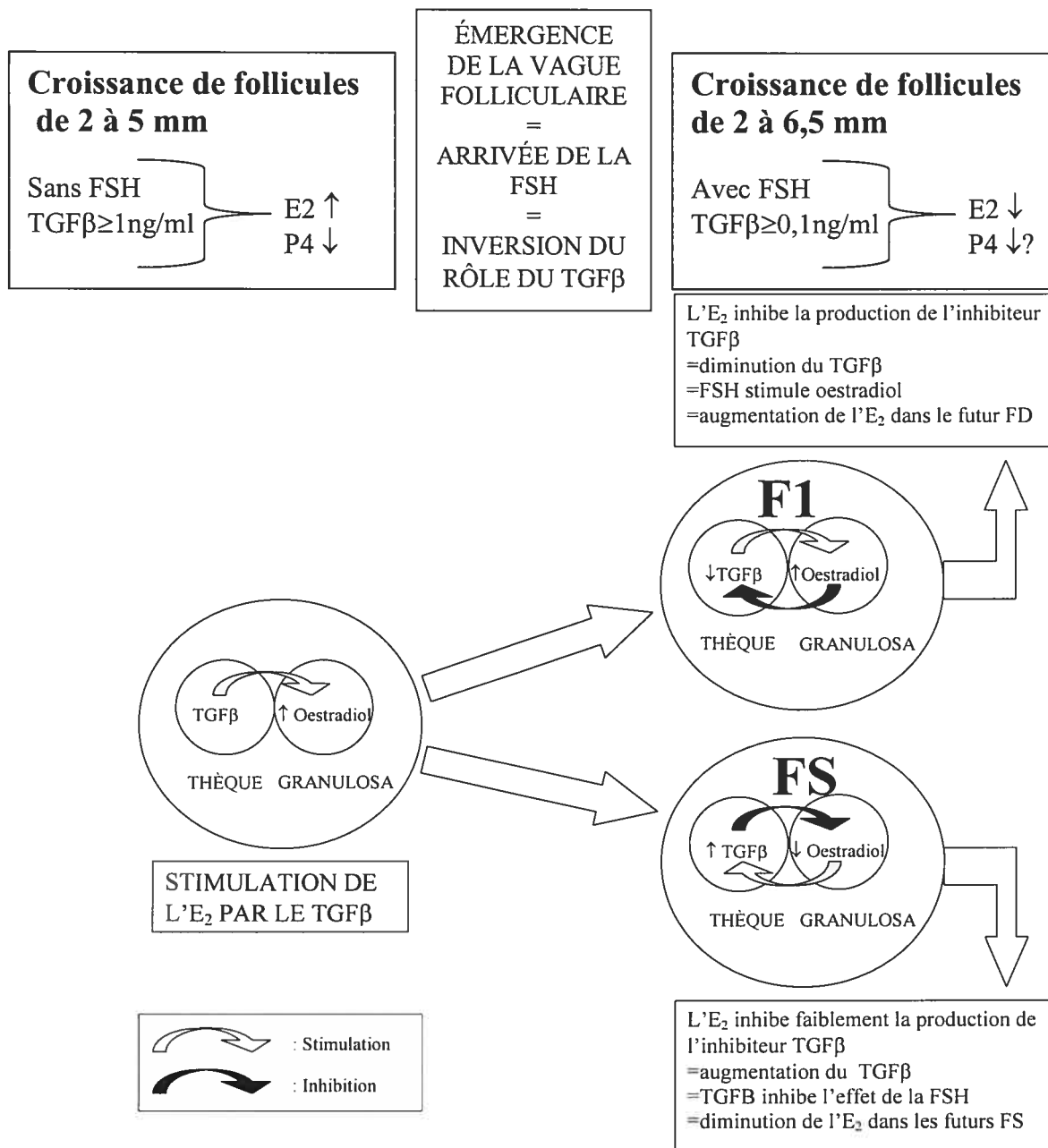


Figure 12. Proposition d'un modèle physiologique impliquant des boucles de rétrocontrôle entre le TGFβ et l'oestradiol. Les gros cercles représentent des follicules de 2 à 5 mm en absence de FSH (à gauche) ou de 2 à 6,5 mm en présence de FSH (à droite). Sans FSH, la sécrétion d'oestradiol est stimulée par la présence du TGFβ. Or, lorsque la FSH augmente au moment de l'émergence de la vague folliculaire, il y a inversion du rôle du TGFβ qui passe alors d'activateur à inhibiteur de l'oestradiol. Ainsi en présence de FSH, des boucles de rétrocontrôle s'établissent entre l'oestradiol et le TGFβ. Dans le futur F1, la présence de l'oestradiol diminue la concentration de TGFβ, ce qui stimule la production d'oestradiol. Dans les futurs FS, la faible concentration d'oestradiol inhibe faiblement le TGFβ, ce qui a pour conséquence d'augmenter le TGFβ résultant en une inhibition de l'oestradiol (voir les encadrés).

## 14. BIBLIOGRAPHIE

1. Adams GP, Matteri RL, Kastelic JP, Ko JC, Ginther OJ. 1992. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J Reprod Fertil.* 94 (1): 177-88.
2. Adashi EY, Resnick CE, D'Ercole AJ, Svoboda ME, Van Wyk JJ. 1985. Insulin-like growth factors as intraovarian regulators of granulosa cell growth and function. *Endocr Rev.* 6: 400-420.
3. Adashi EY, Resnick CE, Twardzik DR. 1987. Transforming growth factor-alpha attenuates the acquisition of aromatase activity by cultured rat granulosa cells. *J Cell Biochem.* 33(1): 1-13.
4. Adashi EY, Resnick CE, Croft CS, May JV, Gospodarowicz D. 1988. Basic fibroblast growth factor as a regulator of ovarian granulosa cell differentiation: a novel non-mitogenic role. *Mol Cell Endocrinol.* 55(1): 7-14.
5. Adashi EY, Resnick CE, Hernandez ER, May JV, Purchio AF, Twardzik DR. 1989. Ovarian transforming growth factor-beta (TGF

- beta): cellular site(s), and mechanism(s) of action. *Mol Cell Endocrinol.* 61: 247-256.
6. Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH. Apoptosis: the role of the endonuclease. 1990. *Am J Pathol.* 136: 593-608.
  7. Armstrong DG, Baxter G, Gutierrez CG, Hogg CO, Glazyrin AL, Campbell BK, Bramley TA, Webb R. 1998. Insulin-like growth factor binding protein-2 and -4 messenger ribonucleic acid expression in bovine ovarian follicles: effect of gonadotropins and developmental status. *Endocrinology* 139: 2146-2154.
  8. Austin CR, Short RV. 1991. *Reproduction in mammals*. Volume 3. Cambridge University press, Chicago.
  9. Baird A, Hsueh AJ. 1986. Fibroblast growth factor as an intraovarian hormone: differential regulation of steroidogenesis by an angiogenic factor. *Regul Pept.* 16(3-4): 243-50.
  10. Baker TG. 1963. A quantitative and cytological study of germ cells in the human ovaries. *Proc. R. Soc. London, Ser. B* 158: 417-33.



11. Bao B, Garverick HA, Smith GW, Smith MF, Salfen BE, Youngquist RS. 1997. 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. *Biol Reprod.* 56: 1158-1168.
12. Barbara NP, Wrana JL, Letarte M. 1999. Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily. *J Biol Chem.* 274: 584-594.
13. Beg MA, Bergfelt DR, Kot K, Wiltbank MC, Ginther OJ. 2001. Follicular-fluid factors and granulosa-cell gene expression associated with follicle deviation in cattle. *Biol Reprod.* 64: 24-33.
14. Bergfelt DR, Kulick LJ, Kot K, Ginther OJ. 2000. Follicular and hormonal responses to experimental suppression of FSH during follicular deviation in cattle. *Theriogenology.* 54: 1191-1206.
15. Blobel GC, Schiemann WP, Pepin MC, Beauchemin M, Moustakas A, Lodish HF, O'Connor McCourt MD. 2001. Functional roles for the cytoplasmic domain of the type III transforming growth factor

- beta receptor in regulating transforming growth factor beta signaling. *J Biol Chem.* 276: 24627-24637.
16. Bodensteiner, K.J., Kot, K., Wiltbank, M.C. and Ginther, O.J., 1996a. Synchronization of emergence of follicular waves in cattle. *Theriogenology* 45: 1115–1128.
  17. Bodensteiner KJ, Wiltbank MC, Bergfelt DR, Ginther OJ. 1996b. Alterations in follicular estradiol and gonadotropin receptors during development of bovine antral follicles. *Theriogenology.* 45: 499-512.
  18. Bodensteiner KJ, Clay CM, Moeller CL, Sawyer HR. 1999. Molecular cloning of the ovine growth/differentiation factor-9 gene and expression of growth/differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries. *Biol. Reprod.* 60: 381–386.
  19. Border WA, Noble NA. 1995. TGF- $\beta$ . *Scientific American Science and Medicine:* 68-77.
  20. Bronson FH, Channing CP. 1978. Suppression of serum follicle-stimulating hormone by follicular fluid in the maximally estrogenized, ovariectomized mouse. *Endocrinology.* 103(5): 1894-1898.

21. Bronson FH. 1989. *Mammalian reproductive biology*. University of Chicago press, Chicago.
22. Burger HG. 1993. Evidence for a negative feedback role of inhibin in follicle stimulating hormone regulation in women. *Hum Reprod.* 8 Suppl 2: 129-32.
23. Carson RS, Findlay JK, Clarke IJ, Burger HF. 1981. Estradiol, testosterone, and androstenedione in ovine follicular fluid during growth and atresia of ovarian follicles. *Biol Reprod.* 24: 105–113.
24. Chabot JG, Walker P, Pelletier G. 1986. Distribution of epidermal growth factor binding sites in the adult rat liver. *Am J Physiol.* 250: 760-764.
25. Chandrasekher YA, van Dessel HJHM, Fauser BCJM. 1995. Estrogen- but not androgen-dominant human ovarian follicular fluid contains an insulin-like growth factor binding protein-4 protease. *J Clin Endocrinology Metab* 80:2734-2739.
26. Chandrasekher YA, Evans ACO, Giudice LC, Fortune JE. 1996. Ovarian follicular dominance is associated with the presence of

insulin-like growth factor binding protein-4 (IGFBP-4) protease activity in cattle. *Biol Reprod* 54(suppl 1): 186 (abstract 519).

27. Clemens L, Weaver D. 1985. The role of gonadal hormones in the activation of feminine sexual behavior. In *Handbook of behavioural neurobiology* (N. Adler, D. Pfaff, et R. Goy, Eds) 183-227. Plenum, New York.
28. Crawford SE, Stellmach V, Murphy-Ullrich JE, Ribeiro SM, Lawler J, Hynes RO, Boivin GP, Bouck N. 1998. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo. *Cell* 93: 1159-1170.
29. DePaolo LV, Mercado M, Guo Y, Ling N. 1993. Increased follistatin (activin-binding protein) gene expression in rat anterior pituitary tissue after ovariectomy may be mediated by pituitary activin. *Endocrinology* 132(5): 2221-2228.
30. Derynck R. 1988. Transforming growth factor alpha. *Cell*.54(5): 593-595.
31. Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N, Matzuk MM. 1996. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 383: 531-535.

32. Dunkel L, Tilly JL, Shikone T, Nishimori K, Hsueh AJ. 1994. Follicle-stimulating hormone receptor expression in the rat ovary: increases during prepubertal development and regulation by the opposing actions of transforming growth factors beta and alpha. *Biol Reprod* 50: 940-948.
33. Elvin JA, Clark AT, Wang P, Wolfman NM, Matzuk MM. 1999. Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. *Mol. Endocrinol.* 13: 1035–1048.
34. Elvin JA, Yan C, Matzuk MM. 2000. Oocyte-expressed TGF-beta superfamily members in female fertility. *Mol. Cell. Endocrinol.* 159: 1–5.
35. Erickson GF, Case E. 1983. Epidermal growth factor antagonizes ovarian theca-interstitial cytodifferentiation. *Mol Cell Endocrinol.* 31(1): 71-76.
36. Evans AC, Fortune JE. 1997a. Selection of the dominant follicle in cattle occurs in the absence of differences in the expression of messenger ribonucleic acid for gonadotropin receptors. *Endocrinology.* 138(7): 2963-2971.

37. Evans AC, Komar CM, Wandji SA, Fortune JE. 1997b. Changes in androgen secretion and luteinizing hormone pulse amplitude are associated with the recruitment and growth of ovarian follicles during the luteal phase of the bovine estrous cycle. *Biol Reprod.* 57(2): 394-401.
38. Findlay JK. 1993. An update on the roles of inhibin, activin, and follistatin as local regulators of folliculogenesis. *Biol Reprod.* 48(1): 15-23.
39. Ford JJ, Howard HJ. 1997. Activin inhibition of estradiol and progesterone production in porcine granulosa cells. *J Anim Sci.* 75(3): 761-766.
40. Fortune JE. 1994. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod.* 50(2): 225-232.
41. Fortune JE. 2000. Differentiation of dominant vs. subordinate follicles in cattle. *Biol Reprod.* 62(suppl 1): 92 (abstract M30).
42. Franchimont P. 1987. Inhibin. *Ann Endocrinol (Paris).* 48(6): 442-51.

43. Ghiglieri C, Khatchadourian C, Tabone E, Hendrick JC, Benahmed M, Menezo Y. 1995. Immunolocalization of transforming growth factor-beta 1 and transforming growth factor-beta 2 in the mouse ovary during gonadotrophin-induced follicular maturation. *Hum Reprod.* 10: 2115-2119.
44. Gibbons JR, Wiltbank MC, Ginther OJ. 1997. Functional interrelationships between follicles greater than 4 mm and the follicle-stimulating hormone surge in heifers. *Biol Reprod.* 57: 1066–1073.
45. Gibbons JR, Wiltbank MC, Ginther OJ. 1999. Relationship between follicular development and the decline in the follicle-stimulating hormone surge in heifers. *Biol Reprod.* 60: 72–77.
46. Ginther OJ, Kastelic JP, Knopf L. 1989a. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. *Anim Reprod Sci.* 20: 187-200.
47. Ginther OJ, Knopf L, Kastelic JP. 1989b. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. *J Reprod Fertil.* 87(1): 223-230.

48. Ginther OJ, Kot K, Kulick LJ, Wiltbank, MC. 1997. Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. *Theriogenology*. 48: 75–87.
49. Ginther OJ. 1998. *Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Book 3, Cattle*, Equiservices Publishing, Cross Plains, WI, USA.
50. Ginther OJ, Bergfelt DR, Kulick LJ, Kot, K. 1999. Selection of the dominant follicle in cattle: establishment of follicle deviation in less than 8 h through depression of FSH concentrations. *Theriogenology* 52: 1079–1093.
51. Ginther OJ, Bergfelt DR, Kulick LJ, Kot, K. 2000. Selection of the dominant follicle in cattle: role of two-way functional coupling between follicle-stimulating hormone and the follicles. *Biol Reprod*. 62: 920–927.
52. Ginther OJ, Bergfelt DR, Beg MA, Kot K. 2001. Follicle selection in cattle: role of luteinizing hormone. *Biol Reprod*. 64: 197-205.
53. Giudice LC. 1992. Insulin-like growth factors and ovarian follicular development. *Endocr Rev* 13: 641-669.



54. Giudice LC, Milki AA, Milkowski DA, el Danasouri I. 1991. Human granulosa contain messenger ribonucleic acids encoding insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBPs) and secrete IGFBPs in culture. *Fertil Steril.* 56(3): 475-480.
55. Godar S, Horejsi V, Weidle UH, Binder BR, Hansmann C, Stockinger H. 1999. M6P/IGFII-receptor complexes urokinase receptor and plasminogen for activation of transforming growth factor-beta1. *Eur J Immunol.* 29: 1004-1013.
56. Gong JG, Bramley TA, Gutierrez CG, Peters AR, Webb R. 1995. Effects of chronic treatment with a gonadotrophin-releasing hormone agonist on peripheral concentrations of FSH and LH, and ovarian function in heifers. *J Reprod Fertil.* 105(2): 263-70.
57. Gore-Langton RE , Armstrong DT. 1988. Follicular steroidogenesis and its control. In : *Physiology of Reproduction* (E Knobil et JD Neill, Eds) 331-385. Raven Press, New York.
58. Gospodarowicz D, Jones KL, Sato G. 1974. Purification of a growth factor for ovarian cells from bovine pituitary glands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 71(6): 2295-2299.

59. Gospodarowicz D, Ill CR, Birdwell CR. 1977. Effects of fibroblast and epidermal growth factors on ovarian cell proliferation in vitro. II. Proliferative response of luteal cells to FGF but not EGF. *Endocrinology*. 100(4): 1121-1128.
60. Gospodarowicz D, Thakral KK. 1978. Production a corpus luteum angiogenic factor responsible for proliferation of capillaries and neovascularization of the corpus luteum. *Proc Natl Acad Sci USA*. 75(2): 847-851.
61. Gospodarowicz D, Bialecki H. 1979. Fibroblast and epidermal growth factors are mitogenic agents for cultured granulosa cells of rodent, porcine, and human origin. *Endocrinology*. 104(3): 757-764.
62. Gougeon A. 1996. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev*. 17(2): 121-155.
63. Guthrie HD, Garrett WM, Cooper BS. 1997. Follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor-I attenuate apoptosis in cultured porcine granulosa cells. *Biol Reprod* 58: 390–396.
64. Hasegawa Y, Miyamoto K, Abe Y, Nakamura T, Sugino H, Eto Y, Shibai H, Igarashi M. 1988. Induction of follicle stimulating hormone

- receptor by erythroid differentiation factor on rat granulosa cell.  
*Biochem Biophys Res Commun.* 156(2): 668-674.
65. Hayashi M, McGee EA, Min G, Klein C, Rose UM, van Duin M, Hsueh AJ. 1999. Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early ovarian follicles. *Endocrinology* 140: 1236–1244.
66. Henderson KM, Franchimont P, Charlet-Renard C, McNatty KP. 1984. Increase in ovulation rate after active immunization of sheep with inhibin partially purified from bovine follicular fluid. *J Endocrinol.* 102(3): 305-9.
67. Hillier SG, Whitelaw PF, Smyth CD. 1994. Follicular oestrogen synthesis: the 'two-cell, two-gonadotrophin' model revisited. *Mol Cell Endocrinol.* 100(1-2): 51-54.
68. Howard HJ, Ford JJ. 1992. Relationships among concentrations of steroids, inhibin, insulin-like growth factor-1 (IGF-1), and IGF-binding proteins during follicular development in weaned sows. *Biol Reprod.* 47(2): 193-201.

69. Hsueh AJ, Welsh TH, Jones PB. 1981. Inhibition of ovarian and testicular steroidogenesis by epidermal growth factor. *Endocrinology*. 108(5): 2002-2004.
70. Hsueh AJW, Billig H, and Tsafiriri A. 1994. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocr Rev*. 15: 1-18.
71. Hutchinson LA, Findlay JK, de Vos FL, Robertson DM. 1987. Effects of bovine inhibin, transforming growth factor-beta and bovine Activin-A on granulosa cell differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*. 146(3): 1405-1412.
72. Imig JL, Juengel BE, Salfen BE, Youngquist RS, Hamilton SA, Smith MF, Garverick HA. 1993. Evidence for a role of oligonucleosome formation (apoptosis) in follicular atresia in cattle. *Biol Reprod* 48(suppl 1): 120 (abstract 245).
73. Ingman WV, Robertson SA. 2002. Defining the actions of transforming growth factor beta in reproduction. *Bioessays*. 24(10): 904-14.

74. Ireland JJ, Roche JF. 1983. Development of nonovulatory antral follicles in heifers: changes in steroids in follicular fluid and receptors for gonadotropins. *Endocrinology*. 112(1): 150-156.
75. Ireland JJ. 1987. Control of follicular growth and development. *J Reprod Fertil* 34 (suppl): 39-54.
76. Ireland JL, Good TE, Knight PG, Ireland JJ. 1994. Alterations in amounts of different forms of inhibin during follicular atresia. *Biol Reprod*. 50: 1265–1276.
77. Jaatinen R, Laitinen MP, Vuojolainen K, Aaltonen J, Louhio H, Heikinheimo K, Lehtonen E, Ritvos O. 1999. Localization of growth differentiation factor-9 (GDF-9) mRNA and protein in rat ovaries and cDNA cloning of rat GDF-9 and its novel homolog GDF-9B. *Mol. Cell. Endocrinol*. 156: 189–193.
78. Jakowlew SB, Dillard PJ, Sporn MB, Roberts AB. 1988. Complementary deoxyribonucleic acid cloning of a messenger ribonucleic acid encoding transforming growth factor beta 4 from chicken embryo chondrocytes. *Mol Endocrinol*. 2(12): 1186-1195.

79. Jones PB, Welsh TH Jr, Hsueh AJ. 1982. Regulation of ovarian progesterin production by epidermal growth factor in cultured rat granulosa cells. *J Biol Chem.* 257(19): 11268-11273.
80. Jones JI, Clemmons DR. 1995. Insulin-like growth factors and their binding proteins: Biological actions. *Endocrine reviews.* 16: 3-34.
81. Juengel JL, McIntush EW, Niswender GD. 1999. Corpus Luteum. In: *Encyclopedia or reproduction.* Volume 2. 703- 709. Academic Press, Chicago.
82. Juengel JL, Hudson NL, Smith P, Reader KL, McNatty KP. 2002. Bone morphogenetic protein 15 is essential for both the early and late stages of follicle development in sheep. *Biol. Reprod.* 66 (Suppl. 1): 110 (abstract no. 31).
83. Kaartinen V, Voncken JW, Shuler C, Warburton D, Bu D, Heisterkamp N, Groffen J. 1995. Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF-beta 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction. *Nat Genet.* 11: 415-421.
84. Kaipia A, Hsueh AJ. 1997. Regulation of ovarian follicle atresia. *Annu Rev Physiol.* 59: 349-363.

85. Kaneko H, Terada T, Taya K, Watanabe G, Sasamoto S, Hasegawa Y, Igarashi M. 1991. Ovarian follicular dynamics and concentrations of oestradiol-17 $\beta$ , progesterone, luteinizing hormone and follicle stimulating hormone during the periovulatory phase of the oestrous cycle in the cow. *Reprod. Fertil. Dev.* 3: 529–535.
86. Khalil N. 1999. TGF-beta: from latent to active. *Microbes Infect.* 1: 1255-1263.
87. Kim JJ, Fazleabas AT. 1999. Growth Factors. In : *Encyclopedia or reproduction*. Volume 2. 573-583. Academic Press, Chicago.
88. Klein R, Robertson DM, Shukovski L, Findlay JK, de Kretser DM. 1991. The radioimmunoassay of follicle-stimulating hormone (FSH)-suppressing protein (FSP): stimulation of bovine granulosa cell FSP secretion by FSH. *Endocrinology.* 128(2): 1048-1056.
89. Knecht M, Feng P, Catt K. 1987. Bifunctional role of transforming growth factor-beta during granulosa cell development. *Endocrinology.* 120(4): 1243-1249.

90. Kondaiah P, Sands MJ, Smith JM, Fields A, Roberts AB, Sporn MB, Melton DA. 1990. Identification of a novel transforming growth factor-beta (TGF-beta 5) mRNA in *Xenopus laevis*. *J Biol Chem.* 265(2): 1089-1093.
91. Kudlow JE, Kobrin MS, Purchio AF, Twardzik DR, Hernandez ER, Asa SL, Adashi EY. 1987. Ovarian transforming growth factor-alpha gene expression: immunohistochemical localization to the theca-interstitial cells. *Endocrinology.* 121(4): 1577-1579.
92. Kulick LJ, Kot K, Wiltbank MC, Ginther OJ. 1999. Follicular and hormonal dynamics during the first follicular wave in heifers. *Theriogenology* 52: 913-921.
93. Kulkarni AB, Huh C, Becker D, Geiser A, Lyght M, Flanders KC, Roberts AB, Sporn MB, Ward JM, Karlsson S. 1993. Transforming growth factor  $\beta$ 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90: 770-774.
94. Lawrence DA. 1996. Transforming growth factor-beta: a general review. *Eur Cytokine Netw.* 7: 363-374.



95. Ling N, Ying SY, Ueno N, Shimasaki S, Esch F, Hotta M, Guillemin R. 1986. Pituitary FSH is released by a heterodimer of the beta-subunits from the two forms of inhibin. *Nature*. 321: 779-82.
96. Lorenzen JR, Channing CP, Schwartz NB. 1978. Partial characterization of FSH suppressing activity (folliculostatin) in porcine follicular fluid using the metestrous rat as an in vivo bioassay model. *Biol Reprod*. 19(3): 635-640.
97. Lucy MC, Savio JD, Badinga L, De La Sota RL, Thatcher WW. 1992. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *J Anim Sci*. 70(11): 3615-3626.
98. Magoffin DA, Cancedo B, Erickson GF. 1989. Transforming growth factor- $\beta$  promotes differentiation of ovarian thecal-interstitial cells but inhibits androgen production. *Endocrinology* 125: 1951-1958.
99. Marder ML, Channing CP, Schwartz NB. 1977. Suppression of serum follicle stimulating hormone in intact and acutely ovariectomized rats by porcine follicular fluid. *Endocrinology*. 101(5): 1939-1942.

100. Martin TL, Fogwell RL, Ireland JJ. 1991. Concentrations of inhibins and steroids in follicular fluid during development of dominant follicles in heifers. *Biol Reprod* 44: 693–700.
101. Massagué J. 1990. The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol.* 6: 597-641.
102. Massagué J. 1992. Receptors for the TGF-beta family. *Cell.* 69(7): 1067-70.
103. Massagué J. 1998. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 67: 753-791.
104. Mather JP, Roberts PE, Krummen LA. 1993. Follistatin modulates activin activity in a cell- and tissue-specific manner. *Endocrinology.* 132(6): 2732-2734.
105. McCullagh DR. 1932. Dual endocrine activity of testes. *Science* 76: 19-20.
106. McGrath SA, Esquela AF, Lee SJ. 1995. Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9. *Mol Endocrinol.* 9: 131-136.

107. McNatty KP, Juengel JL, Wilson T, Galloway SM, Davis GH. 2001. Genetic mutations influencing ovulation rate in sheep. *Reprod. Fertil. Dev.* 13: 549–555.
108. Matton P, Adalakoun V, Couture Y, Dufour JJ. 1981. Growth and replacement of the bovine ovarian follicles during the estrous cycle. *J Anim Sci.* 52(4): 813-20.
109. Mihm M, Good TEM, Ireland JLH, Ireland JJ, Knight P, Roche J. 1997. Decline in serum follicle-stimulating hormone concentrations alters key intrafollicular growth factors involved in selection of the dominant follicle in heifers. *Biol Reprod.* 57: 1328–1337.
110. Mihm M, Austin EJ, Good TEM, Ireland JLH, Knight PG, Roche JF, Ireland JJ. 2000. Identification of potential intrafollicular factors involved in selection of dominant follicles in heifers. *Biol Reprod.* 63: 811-819.
111. Miro F, Smyth CD, Hillier SG. 1991. Development-related effects of recombinant activin on steroid synthesis in rat granulosa cells. *Endocrinology.* 129(6): 3388-3394.

112. Miyazono K, Ichijo H, Heldin CH. 1993. Transforming growth factor-beta: latent forms, binding proteins and receptors. *Growth Factors*. 8: 11-22.
  
113. Mondschein JS, Schomberg DW. 1981. Growth factors modulate gonadotropin receptor induction in granulosa cell cultures. *Science*. 211: 1179-80.
  
114. Mondschein JS, Smith SA, Hammond JM. 1990a. Production of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) by porcine granulosa cells: identification of IGFBP-2 and -3 and regulation by hormones and growth factors. *Endocrinology*. 127(5): 2298-2306.
  
115. Mondschein JS, Etherton TD, Hammond JM. 1990b. Characterization of insulin-like growth factor-binding proteins of porcine ovarian follicular fluid. *Biol Reprod*. 44: 315-320.
  
116. Monget P, Monniaux D, Pisselet C, Durand P. 1993. Changes in insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF-II, and their binding proteins during growth and atresia of ovine ovarian follicles. *Endocrinology*. 132(4): 1438-1446.

117. Mulheron GW, Schomberg DW. 1990. Rat granulosa cells express transforming growth factor-beta type 2 messenger ribonucleic acid which is regulatable by follicle-stimulating hormone in vitro. *Endocrinology*. 126(3): 1777-1779.
118. Mulheron GW, Danielpour D, Schomberg DW. 1991. Rat thecal/interstitial cells express transforming growth factor-beta type 1 and 2, but only type 2 is regulated by gonadotropin in vitro. *Endocrinology*. 129(1): 368-374.
119. Murray JF, Downing JA, Evans G, Findlay JK, Scaramuzzi RJ. 1993. Epidermal growth factor acts directly on the sheep ovary in vivo to inhibit oestradiol-17 beta and inhibin secretion and enhance progesterone secretion. *J Endocrinol*. 137(2): 253-64.
120. Nagata S. 1997. Apoptosis by death factor. *Cell*. 88: 355-365.
121. Nakamura K, Nakamura M, Igarashi S, Miyamoto K, Eto Y, Ibuki Y, Minegishi T. 1994. Effect of activin on luteinizing hormone-human chorionic gonadotropin receptor messenger ribonucleic acid in granulosa cells. *Endocrinology*. 134(6): 2329-2335.

122. Nakatani A, Shimasaki S, Depaolo LV, Erickson GF, Ling N. 1991. Cyclic changes in follistatin messenger ribonucleic acid and its protein in the rat ovary during the estrous cycle. *Endocrinology*. 129(2): 603-611.
123. Neufeld G, Ferrara N, Mitchell R, Schweigerer L, Gospodarowicz D. 1987 Granulosa cells produce basic fibroblast growth factor. *Endocrinology* 121: 597-603.
124. Oury F, Darbon JM. 1988. Fibroblast growth factor regulates the expression of luteinizing hormone receptors in cultured rat granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 156(2): 634-643.
125. Oury F, Faucher C, Rives I, Bensaid M, Bouche G, Darbon JM. 1992. Regulation of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase activity and regulatory subunit RII beta content by basic fibroblast growth factor (bFGF) during granulosa cell differentiation: possible implication of protein kinase C in bFGF action. *Biol Reprod*. 47(2): 202-212.
126. Palumbo A, Yeh J. 1995. Apoptosis as a basic mechanism in the ovarian cycle: follicular atresia and luteal regression. *J Soc Gynecol Investig*. 2(3): 565-573.

127. Pierson RA, Ginther OJ. 1984. Ultrasonography of the bovine ovary. *Theriogenology*. 21: 495-504.
128. Pieterse MS, Vos PLAM, Kruip THAM, Wurth YA, Van Beneden ThH, Willemsse AH, Taverne MAM. 1991. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. *Theriogenology*. 35: 19-24.
129. Porter DA, Vickers SL, Cowan RG, Huber SC, Quirk SM. 2000. Expression and function of Fas antigen vary in bovine granulosa and theca cells during ovarian follicular development and atresia. *Biol Reprod*. 62(1): 62-66.
130. Proetzl G, Pawlowski SA, Wiles MV, Yin M, Boivin GP, Howles PN, Ding J, Ferguson MW, Doetschman T. 1995. Transforming growth factor-beta 3 is required for secondary palate fusion. *Nat Genet*. 11: 409-414.
131. Puett D. 1999. Gonadotropin Receptors. In: *Encyclopedia or reproduction*. Volume 2. 521-528. Academic Press, Chicago.

132. Pulley DD, Marrone BL. 1986. Inhibitory action of epidermal growth factor on progesterone biosynthesis in hen granulosa cells during short term culture: two sites of action. *Endocrinology*. 118(6): 2284-2291.
133. Quirk SM, Cowan RG, Josh SG, Henrikson KP. 1995. Fas antigen-mediated apoptosis in human granulosa/luteal cells. *Biol Reprod*. 52: 279-287.
134. Quirk SM, Porter DA, Huber SC, Cowan RG. 1998. Potentiation of Fas-mediated killing of murine granulosa cells by interferon-gamma, tumor necrosis factor- $\alpha$  and cycloheximide. *Endocrinology* 139: 4860-4869.
135. Rajakoski E. 1960. The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special reference to seasonal, cyclical, and left-right variations. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 34(Suppl 52): 1-68.
136. Rall LB, Scott J, Bell GI, Crawford RJ, Penschow JD, Niall HD, Coghlan JP. 1985. Mouse prepro-epidermal growth factor synthesis by the kidney and other tissues. *Nature*. 313: 228-231.



137. Richards JS. 1994. Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocr Rev.* 15(6): 725-51.
138. Roberts AB, Anzano MA, Lamb LC, Smith JM, Sporn MB. 1981. New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues. *Proc Natl Acad Sci USA.* 78: 5339-5343.
139. Roberts AJ and Skinner MK. 1991. Transforming growth factor- $\alpha$  and - $\beta$  differentially regulate growth and steroidogenesis of bovine thecal cells during antral follicle development. *Endocrinology.* 129: 2041-2048.
140. Roche JF, Boland MP. 1991. Turnover of dominant follicles in cattle of different reproductive states. *Theriogenology.* 35: 81-90.
141. Roy SK, Ogren C, Roy C, Lu B. 1992. Cell-type-specific localization of transforming growth factor- $\beta$  2 and transforming growth factor- $\beta$  1 in the hamster ovary: differential regulation by follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. *Biol Reprod.* 46(4): 595-606.

142. Roy SK. 1993. Epidermal growth factor and transforming growth factor-beta modulation of follicle-stimulating hormone-induced deoxyribonucleic acid synthesis in hamster preantral and early antral follicles. *Biol Reprod.* 48(3): 552-557.
143. Sakamaki K, Yoshida H, Nishimura Y, Nishikawa S-I, Manabe N, Yonehara S. 1997. Involvement of Fas antigen in ovarian follicular atresia and luteolysis. *Mol Reprod Dev.* 47: 11-18.
144. Samaras S, Hagan D, Gadsby J, Shimasaki S, Ling N, Hammond J. 1991. Ontogeny and localization of porcine ovarian insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) mRNA. *Biol Reprod.* 44 (suppl.): 187.
145. Samaras SE, Hagen DR, Shimasaki S, Ling N, Hammond JM. 1992. Expression of insulin-like growth factor-binding protein-2 and -3 messenger ribonucleic acid in the porcine ovary: localization and physiological changes. *Endocrinology.* 130(5): 2739-44.
146. Sanford LP, Ormsby I, Gittenberger de Groot AC, Sariola H, Friedman R, Boivin GP, Cardell EL, Doetschman T. 1997. TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-

- overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes. *Development*. 124: 2659-2670.
147. Savio JD, Keenan L, Boland MP, Roche JF. 1988. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. *J Reprod Fertil*. 83(2): 663-671.
148. Schomberg DW, May JV, Mondschein JS. 1983. Interactions between hormones and growth factors in the regulation of granulosa cell differentiation in vitro. *J Steroid Biochem*. 19(1A): 291-295.
149. Schwartzman RA, Cidlowski JA. 1993. Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr Rev*. 14: 133-151.
150. Shintani Y, Takada Y, Yamasaki R, Saito S. 1991. Radioimmunoassay for activin A/EDF. Method and measurement of immunoreactive activin A/EDF levels in various biological materials. *J Immunol Methods*. 137(2): 267-274.
151. Shukovski L, Zhang ZW, Michel U, Findlay JK. 1992. FSH-suppressing protein (FSP) mRNA expression in bovine ovarian tissues. *J Reprod Fertil* 95: 861-867.

152. Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski SA, Diebold RJ, Yin M, Allen R, Sidman C, Proetzel G, Calvin D, Annunziata N, Doetschman T. 1992. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor  $\beta 1$  gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature*. 359: 693-699.
153. Sirois J, Fortune JE. 1988. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol Reprod*. 39(2): 308-317.
154. Sirois J. 1994. Induction of prostaglandin endoperoxide synthase-2 by human chorionic gonadotropin in bovine preovulatory follicles in vivo. *Endocrinology*. 135(3): 841-8.
155. Skinner MK, Keski-Oja J, Osteen KG, Moses HL. 1987. Ovarian thecal cells produce transforming growth factor-beta which can regulate granulosa cell growth. *Endocrinology*. 121(2):786-792.
156. Skinner MK, Coffey RJ Jr. 1988. Regulation of ovarian cell growth through the local production of transforming growth factor-alpha by theca cells. *Endocrinology*. 123(6): 2632-2638.

157. Solloway MJ, Dudley AT, Bikoff EK, Lyons KM, Hogan BL, Robertson EJ. 1998. Mice lacking Bmp6 function. *Dev. Genet.* 22 : 321–339.
158. Sporn MB, Roberts AB. 1990. The transforming growth factor-betas: past, present, and future. *Ann NY Acad Sci.* 593: 1-6.
159. Sporn MB, Roberts AB. 1992. Transforming growth factor-beta: recent progress and new challenges. *J Cell Biol.* 119(5): 1017-1021.
160. Stouffer RL, Woodruff TK, Dahl KD, Hess DL, Mather JP, Molskness TA. 1993. Human recombinant activin-A alters pituitary luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone secretion, follicular development, and steroidogenesis, during the menstrual cycle in rhesus monkeys. *J Clin Endocrinol Metab.* 77(1): 241-248.
161. Strauss JF 3rd, Steinkampf MP. 1995. Pituitary-ovarian interactions during follicular maturation and ovulation. *Am J Obstet Gynecol.* 172: 726-735.
162. Sugino H, Nakamura T, Hasegawa Y, Miyamoto K, Abe Y, Igarashi M, Eto Y, Shibai H, Titani K. 1988. Erythroid differentiation factor

- can modulate follicular granulosa cell functions. *Biochem Biophys Res Commun.* 153(1): 281-288.
163. Sunderland SJ, Crowe MA, Boland MP, Roche JF, Ireland JJ. 1994. Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of heifers. *J Reprod Fertil.* 101(3): 547-555.
164. Teerds KJ, Dorrington JH. 1992. Immunohistochemical localization of transforming growth factor-beta 1 and -beta 2 during follicular development in the adult rat ovary. *Mol Cell Endocrinol.* 84(1-2): R7-13.
165. Ten Dijke P, Miyazono K, Heldin CH. 2000. Signaling inputs converge on nuclear effectors in TGF-beta signaling. *Trends Biochem Sci.* 25: 64-70.
166. Thompson KL, Assoian R, Rosner MR. 1988. Transforming growth factor-beta increases transcription of the genes encoding the epidermal growth factor receptor and fibronectin in normal rat kidney fibroblasts. *J Biol Chem.* 263(36): 19519-19524.

167. Thompson KL, Rosner MR. 1989. Regulation of epidermal growth factor receptor gene expression by retinoic acid and epidermal growth factor. *J Biol Chem.* 264(6): 3230-3234.
168. Tilbrook AJ, De Kretser DM, Clarke IJ. 1993. Human recombinant inhibin A suppresses plasma follicle-stimulating hormone to intact levels but has no effect on luteinizing hormone in castrated rams. *Biol Reprod.* 49(4): 779-788.
169. Tilly JL, Billig H, Kowalski KI, Hsueh AJW. 1992. Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor suppress the spontaneous onset of apoptosis in cultured rat ovarian granulosa cells and follicles by a tyrosine kinase-dependent mechanism. *Mol Endocrinol.* 6:1942-1950.
170. Vlodaysky I, Brown KD, Gospodarowicz D. 1978. A comparison of the binding of epidermal growth factor to cultured granulosa and luteal cells. *J Biol Chem.* 253(10): 3744-3750.
171. Wandji SA, Pelletier G, Sirard MA. 1992. Ontogeny and cellular localization of 125I-labeled insulin-like growth factor-I, 125I-labeled follicle-stimulating hormone, and 125I-labeled human chorionic

- gonadotropin binding sites in ovaries from bovine fetuses and neonatal calves. *Biol Reprod.* 47(5): 814-822.
172. Wandji SA, Eppig JJ, Fortune JE. 1994. Regulation of growth and function of bovine preantral follicles in vitro by FSH and growth factors. *Biol Reprod.* 50 (suppl.1): 94.
173. Wandji SA, Srsen V, Voss AK, Eppig JJ, Fortune JE. 1996. Initiation in vitro of growth of bovine primordial follicles. *Biol Reprod.* 55(5): 942-948.
174. Woodruff TK, Krummen LA, Lyon RJ, Stocks DL, Mather JP. 1993. Recombinant human inhibin A and recombinant human activin A regulate pituitary and ovarian function in the adult female rat. *Endocrinology.* 132(6): 2332-2341.
175. Xiao S, Findlay JK, Robertson DM. 1990. The effect of bovine activin and follicle-stimulating hormone (FSH) suppressing protein/follistatin on FSH-induced differentiation of rat granulosa cells in vitro. *Mol Cell Endocrinol.* 69(1): 1-8.
176. Xiao S, Findlay JK. 1991. Interactions between activin and follicle-stimulating hormone-suppressing protein and their mechanisms of



action on cultured rat granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol.* 79(1-3): 99-107.

177. Yang MY, Rajamahendran R. 2000. Morphological and biochemical identification of apoptosis in small, medium, and large bovine follicles and the effects of follicle-stimulating hormone and Insulin-Like Growth Factor-I on spontaneous apoptosis in cultured bovine granulosa cells. *Biol Reprod.* 62: 1209-1217.
178. Ying SY, Becker A, Baird A, Ling N, Ueno N, Esch F, Guillemin R. 1986. Type beta transforming growth factor (TGF-beta) is a potent stimulator of the basal secretion of follicle stimulating hormone (FSH) in a pituitary monolayer system. *Biochem Biophys Res Commun.* 135(3): 950-956.
179. Zhou J, Bondy C. 1993. Anatomy of the human ovarian insulin-like growth factor system. *Biol Reprod.* 48(3):467-482.

## 15. CURRICULUM VITAE

### RENSEIGNEMENTS GÉNÉRAUX

Nom: Yan Ouellette

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED] (819) 762-0971 poste 2436 (travail)

[REDACTED]

### FORMATION UNIVERSITAIRE

- Université de Montréal, Faculté de Médecine Vétérinaire
  - Doctorat (PhD) en sciences vétérinaires avec spécialisation en reproduction (dépôt de la thèse prévu pour décembre 2003)
  - Maîtrise en sciences vétérinaires avec spécialisation en reproduction (1997 à 1999)
  
- Université du Québec à Montréal
  - Baccalauréat (Bsc) en biologie moléculaire (1994 à 1997)

### EXPÉRIENCES PERTINENTES

- Séminaire au congrès international SSR 2000 (Society for study of reproduction) au Madison, Wisconsin
  
- Séminaires à l'ACFAS (Association Canadienne Française d'Avancement des Sciences), au Ottawa reproductive biology workshop et à la journée de recherche des biologistes en reproduction de la région de Montréal
  
- Collaboration avec Vétuquinol N.-A. afin de vérifier l'efficacité d'une GnRH commerciale.
  
- Élu sur le comité conseil de biomédecine vétérinaire de la Faculté de Médecine Vétérinaire

- Démonstrateur aux laboratoires d'histologie (Faculté de Médecine Vétérinaire) (Session hiver 1998 et 1999)
  - Diriger les étudiants dans l'apprentissage de l'histologie des différents systèmes
- Démonstrateur aux laboratoires de cytologie vaginale chez la ratte (Faculté de Médecine Vétérinaire) (Session hiver 1999 et 2000)
  - Diriger les étudiants dans l'utilisation de la cytologie vaginale pour déterminer le temps du cycle oestral chez la ratte
- Conseiller aux affaires internes de l'association étudiante REEBUQAM (1996 à 1997)
  - Organisation (budgets et assurances) de projets tel que : journal, rencontre inter-universitaire annuelle, activités sportives, bal des finissants...

## PUBLICATIONS

- Ouellette Y, Carrière PD. 2003. Transforming Growth Factor $\beta$ 1 is negatively correlated with estradiol and follicle size at the time of emergence of bovine ovarian follicles monitored by ultrasonography. Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB) Summer Research Conference: The TGF-B Superfamily: Signaling and Development. Abstract p.26. July 12-17, 2003, Tucson, Arizona, USA.
- Ouellette Y, Carrière PD. 2004. Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 is negatively correlated with estradiol and follicle size at the time of emergence of bovine ovarian follicles monitored by ultrasonography (à soumettre)
- Ouellette Y, Price CA, Carrière PD. 2004. Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 inhibits FSH and cAMP-stimulated estradiol and progesterone synthesis in bovine granulosa cells from 2 to 5 mm follicles (à soumettre)
- Résumé au SSR 2000 (Society for study of reproduction)
- Résumé à l'ACFAS (Association Canadienne Française d'Avancement des Sciences)
- Affiche au congrès FASEB 2003