

SF  
607  
U54  
2004  
V. 012

SF  
607  
U54  
2004  
v. 012

**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 :**

**LA RÉGULATION DU GÈNE P450AROMATASE AU NIVEAU DES  
CELLULES DE GRANULOSA BOVINE IN VITRO**

**Présentée par**

**MALHA SAHMI**

**a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:**

**Président du jury : Dr Alan K. Goff**

**Directeur de recherche : Dr Christopher A. Price**

**Membre du jury : Dr Jean Sirois**

**Examineur externe : Dr Jean G. Lehoux**

## RESUMÉ

La fonction de la reproduction est un processus complexe impliquant des signaux extra ovariens tels que les gonadotrophines et des facteurs intrafolliculaires tels que les facteurs de croissance produits localement. Chez la vache, les follicules antraux sont caractérisés par l'induction de l'expression de l'ARN messenger (ARNm) codant pour une panoplie d'enzymes stéroïdogéniques dont le cytochrome P450aromatase (P450arom), 17 $\beta$ -hydroxystéroïde-déshydrogénase (17 $\beta$ -HSD) et la 3 $\beta$ -hydroxystéroïde-déshydrogénase(3 $\beta$ -HSD). Le P450arom et la 17 $\beta$ -HSD sont des enzymes stéroïdogéniques clés pour la synthèse des oestrogènes dans les cellules de granulosa. La sécrétion d'œstradiol est essentielle à la reproduction normale, non seulement au développement des caractères sexuels secondaires mais aussi pour le développement folliculaire. Les oestrogènes sont nécessaires pour l'induction des récepteurs à la LH au niveau des cellules de granulosa, il est donc très important de bien comprendre le mécanisme de régulation de l'ARNm codant pour le P450arom.

L'objectif de la première étude était orienté vers la caractérisation de la différenciation des cellules de granulosa in vitro et de démontrer à quel point ceci reflète la différenciation in vivo. On a commencé par déterminer si les conditions de culture et l'origine des cellules (antrales vs basales) affectent la stéroïdogénèse, puis on a évalué les niveaux d'expression des gènes codant

pour 17 $\beta$ -HSD, 3 $\beta$ -HSD et StAR au niveau des cellules de granulosa en culture, et la régulation de 17 $\beta$ -HSD par la FSH. La culture des cellules de granulosa antrales et basales dans deux milieux différents a révélé que le milieu de culture a un effet significatif sur la sécrétion d'oestradiol et sur la capacité stéroïdogénique des cellules. Les cellules de granulosa mises en culture dans des conditions qui favorisent la synthèse d'oestradiol à long terme n'a montré aucune différence ni dans la sécrétion d'oestradiol ni dans les niveaux d'ARNm. Les analyses par Northern de cellules de granulosa fraîches de follicules moyens et gros ont montré qu'il n'y avait aucune différence dans les niveaux d'ARNm codant pour P450arom, P450 side-chain-cleavage (P450scc), 17 $\beta$ -HSD et 3 $\beta$ -HSD entre les populations de cellules. La FSH stimule significativement la sécrétion d'oestradiol et l'abondance de l'ARNm de P450arom et de 17 $\beta$ -HSD dans les cellules de granulosa en culture, et il n'y avait aucune différence entre les sous-populations de cellules à n'importe quel moment de la culture. Les concentrations d'oestradiol et de progestérone augmentent avec le temps de culture. Le même patron a été observé pour l'ARNm codant pour P450arom, 3 $\beta$ -HSD et 17 $\beta$ -HSD mais pas pour P450scc. L'expression de StAR a été détectée par RT-PCR et ne change pas avec le temps en culture. Il y avait une corrélation significative entre l'accumulation d'oestradiol dans le milieu et les niveaux d'ARNm pour P450arom et 17 $\beta$ -HSD. Il y avait aussi une corrélation entre l'accumulation de progestérone et les niveaux d'ARNm pour 3 $\beta$ -HSD mais pas pour P450scc et StAR.

L'objectif principal de la deuxième étude était de déterminer la demi-vie de l'activité enzymatique et de l'ARNm P450arom in vitro dans les cellules de granulosa bovine non lutéinisées et de déterminer si la stabilité de l'ARNm est régulée. La demi-vie de l'activité de l'aromatase a été estimée à environ 6 heures. Les données des expériences analysées par Northern blot ont révélé que la demi-vie moyenne mesurée suivant l'ajout d'inhibiteurs transcriptionnels tels que le 5-6 dichloro-1- $\beta$ -D ribofuranosylbenzimidazole (DRB) ou l'actynomicine D (Act D) était de 3.1 heures et 2.6 heures respectivement, ce qui est très court comparée à la demi-vie de l'aromatase chez l'humain (environ 12 heures). Il n'y avait pas de différence significative entre l'action de ces deux inhibiteurs. La demi-vie de l'ARNm codant pour P450scc dans ces mêmes échantillons était d'environ 12 heures. L'analyse des données par RT-PCR a démontré la même demi-vie que celle obtenue par analyse Northern. Lorsque les cellules sont stimulées par l'insuline et le dibutyryl-adénosine mono phosphate cyclique (dbAMPc), la demi-vie est augmentée à 6 heures; mais la présence de PD98059, l'inhibiteur des MAPK (MEK), a fait augmenter le niveau de l'ARNm mais n' a pas eu un effet sur la demi-vie, alors que la cycloheximide (CHX) a prolongé la demi-vie et a donc stabilisé l'ARNm P450arom.

L'objectif de la troisième étude était de déterminer le rôle potentiel de la région 3'-non traduite (3'-UTR) de l'aromatase dans la régulation de la stabilité et de localiser la région spécifique de l'UTR qui affecte la stabilité de l'ARNm. Un autre objectif consistait à déterminer le mécanisme moléculaire par lequel

l'UTR affecte la stabilité en identifiant de possible interactions entre l'ARN et les protéines autrement appelées facteurs agissant en *trans*. L'analyse de la séquence de l'ARNm a montré une longue région 3'-UTR. La 3'-UTR contient plusieurs motifs AUUUA et AUUUUA qui sont des sites importants pour la régulation de la stabilité de l'ARNm. La transfection des cellules de granulosa avec un vecteur rapporteur contenant le fragment de l'UTR pleine longueur ainsi que du premier fragment de 1.7 kb avait révélé une chute dramatique de l'activité de la luciférase alors que la transfection avec le premier 0.6 kb n'avait aucun effet significatif. Les études de transfection avec de petits fragments de 0.4 et 0.5 kb à l'intérieur du fragment de 1.7 kb ont révélé que ces fragments n'avaient aucun effet significatif sur l'activité de la luciférase mais que les deux fragments ensemble réduisaient significativement l'activité de la luciférase.

L'analyse par fixation croisée aux UV d'extraits protéiques de cellules de granulosa et de la région 3'-UTR radioactive a montré la formation d'un complexe ARN-protéine d'environ 66 kDa qui est spécifique pour les cellules de granulosa dans la mesure où aucun complexe n'a été observé dans d'autres tissus comme le pancréas, les reins, le corps jaune et la vessie. Ce complexe est spécifique pour la 3'-UTR de l'aromatase car les compétitions avec la région codante de l'aromatase et GAPDH n'ont pas été capables de déplacer la liaison. La liaison a été aussi déplacée par le fragment de 1.7 kb mais pas avec le fragment correspondant au premier 0.6 kb. La compétition



avec les 2 petits fragments du fragment 1.7 n' a pas déplacé la liaison alors que les deux ensemble ont significativement déplacé la liaison.

On conclut par cette étude que les cellules de granulosa mises en culture dans les conditions favorisant la sécrétion d'œstradiol ne se lutéinisent pas et démontrent l'expression d'enzymes stéroïdogéniques dans un patron similaire qu'à ceux ayant lieu lors de la différenciation des follicules in vivo. La 17 $\beta$ -HSD pourrait être aussi importante que le P450arom dans la régulation de la sécrétion d'œstradiol, et la 3 $\beta$ -HSD est plus importante que le P450scc comme régulateur de la sécrétion de la progestérone dans les cellules de granulosa non lutéinisées. La demi-vie de l'aromatase est très courte (environ 3 heures) pour une enzyme stéroïdogénique et est sous régulation. On a démontré une région d'environ 1 kb dans la région 3'-UTR qui inhibe l'activité de la luciférase, probablement par interaction avec des facteurs de régulation agissant en *trans*. Au moins une protéine des cellules de granulosa se lie spécifiquement à cette région 3'-UTR de P450arom.

Mots clés : cellules de granulosa bovine, aromatase, oestradiol, 17 $\beta$ -HSD, 3 $\beta$ -HSD, StAR, stabilité de l'ARNm, demi-vie, 3'-UTR, transfection.

## ABSTRACT

Reproductive function is an integrated process encompassing both extra ovarian signals such as gonadotrophins and intrafollicular factors such as locally produced growth factors. In cattle, antral follicles are characterized by induction of expression of messenger (mRNA) encoding a range of steroidogenic enzymes such as cytochrome P450aromatase (P450arom), 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (17 $\beta$ -HSD) and 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (3 $\beta$ -HSD). P450arom and 17 $\beta$ -HSD are key steroidogenic enzymes for estrogen synthesis in granulosa cells. Estradiol secretion is essential for normal reproduction, not only for the development of secondary sexual characteristics but also follicle development. Estrogen is necessary for induction of LH receptors on granulosa cells. Thus it is important to understand fully the mechanism by which P450arom mRNA is regulated.

The objective of the first study was to characterize granulosa cell differentiation in vitro and to demonstrate to what extent this reflects in vivo granulosa cell differentiation. The objectives of the first study were to determine if culture conditions and cell localization within the follicle affect the steroidogenic ability of the cells, to further characterize the time course of expression of 17 $\beta$ -HSD, 3 $\beta$ -HSD and StAR genes in cultured bovine granulosa cells, and to investigate the regulation of 17 $\beta$ -HSD by FSH. Culture of antral and basal granulosa cells in two different media revealed that culture

medium had a significant effect on estradiol secretion and on the steroidogenic capability of the cells. There were no differences in steroid secretion or in mRNA levels between antral and basal granulosa cells cultured under conditions that promote long-term estradiol synthesis. Northern analysis of fresh granulosa cells from medium and large follicles showed that there were no differences in the levels of mRNA for P450arom, P450scc, 17 $\beta$ -HSD and 3 $\beta$ -HSD between cell populations. FSH significantly stimulated estradiol secretion and the abundance of P450arom and 17 $\beta$ -HSD mRNA in cultured bovine granulosa cells and there were no differences between cell subpopulation at any time of the culture. Expression of StAR was detected by RT-PCR, and did not change with time in culture. There was a significant correlation between estradiol accumulation in the medium and mRNA levels for P450arom and 17 $\beta$ -HSD. There was also a correlation between the accumulation of progesterone and the levels of 3 $\beta$ -HSD mRNA but not P450scc and StAR.

The main objective of the second study was to determine the half-life of P450arom mRNA and enzymatic activity in non-luteinizing bovine granulosa cells in vitro and to determine if mRNA stability is regulated. The half-life of aromatase activity was estimated to be 6 hours. Data from Northern blot analysis revealed that the mean half-life measured following addition of transcription inhibitors such as 5-6 dichloro-1- $\beta$ -D ribofuranosylbenzimidazole (DRB) or actinomycin D (Act D) was 3.1 hours and 2.6 hours respectively,

which is much shorter than the human aromatase half-life (12 hours). There was no significant difference between these two inhibitors. The half-life for P450scc mRNA in the same samples were on average 12 hours. Analysis of the data by RT-PCR provided the same estimate of P450arom decay as Northern blot. When cells were stimulated with insulin and db cAMP, the half-life was 6 hours. The addition of PD98059, an inhibitor of MAPK, increased P450arom mRNA abundance but did not alter mRNA half-life, whereas addition of cycloheximide (CHX) did increase the half-life and stabilize P450 mRNA.

The objective of the third study was to determine the potential role of the aromatase 3'-untranslated region (3'-UTR) in the regulation of stability and to localize the specific region of the 3'-UTR that affects mRNA stability. Another objective was to determine the molecular mechanism by which the UTR affects stability by identifying possible RNA-protein interaction or *trans*-acting factors. Sequence analysis of P450arom mRNA showed a long 3'-UTR. The 3'-UTR contains several AUUUA and AUUUUA motifs, which are important sites of regulation of mRNA stability. Transfection of bovine granulosa cells with reporter vector containing the full-length fragment of the 3'-UTR and the first 1.7 kb revealed a dramatic decrease in luciferase activity whereas transfection with the first 0.6 kb had no significant effect. Transfection studies with smaller fragments of 0.4 and 0.5 kb within the 1.7 kb fragment had no significant effect on luciferase activity but these 2 fragments together did reduce significantly luciferase activity.

UV cross linking analysis of protein extracts from granulosa cells and a 3'-UTR riboprobe showed an RNA-protein complex formation of about 66 kDa which was specific for granulosa cells as no such complex were observed in other tissues as pancreas, kidney, corpus luteum and bladder. This complex was specific for P450arom 3'-UTR as competition with aromatase and GAPDH coding regions did not displace the binding. The binding was also displaced with the 1.7 kb fragment but not with the shorter 0.6 kb RNA competitor. Competition with the two different subfragments within the 1.7 kb fragment revealed that neither significantly displaced binding of the riboprobe or that the two fragments together did.

We conclude that granulosa cells cultured under conditions that promote estradiol secretion do not luteinize and show expression of key steroidogenic enzymes in patterns similar to those occurring in differentiating follicles in vivo. Further, 17 $\beta$ -HSD may be as important as P450arom in regulating estradiol secretion, and 3 $\beta$ -HSD is more important than P450scc as a regulator of progesterone secretion in non-luteinizing granulosa cells. The half-life of bovine aromatase is very short (about 3 hours) for a steroidogenic enzyme and is under regulation. We have demonstrated that a region of about 1 kb within the 3'-UTR inhibits luciferase activity, probably by interaction with *trans* regulating factors. At least, one protein of granulosa cells binds specifically to the P450arom 3'-UTR.

Key words: bovine granulosa cells, aromatase, estradiol, 17 $\beta$ -HSD, 3 $\beta$ -HSD, StAR, mRNA stability, half-life, 3'-UTR, transfection.

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier chaleureusement mon directeur de recherche Dr Christopher A. Price pour avoir accepté de diriger mes travaux de recherche, je le remercie pour sa grande disponibilité, ses conseils judicieux, sa patience et sa confiance.

Je remercie également toute l'équipe du Centre de recherche en reproduction animal pour leur esprit d'équipe et pour avoir partagé avec moi une ambiance chaleureuse et parfaite.

Un remerciement spécial pour notre secrétaire Mme Micheline Sicotte pour son travail toujours bien accompli et sa disponibilité.

Je tiens également à remercier Dr Bruce Murphy et toute l'équipe de son laboratoire, principalement Mme Mira Dobias pour ses nombreux conseils judicieux, sa disponibilité et surtout sa sympathie.

J'aimerais remercier tous ceux qui ont contribué de loin ou de près au bon déroulement de ce projet notamment Dr Edmir Nicola, Dr Nicolas Gévry, Dr Manuel Silva Ramos, Mingju Cao et Linda Jourdain.

Je tiens également à remercier toutes mes amies Mmes Noria Derrar, Mélanie Hamel, Tatiana Ruiz Cortez et Hassna Laggoun pour avoir partagé avec moi les bons moments et les moins bons.

## DÉDICACES

À toute ma famille principalement, mes parents, mes frères et sœurs pour leur amour inconditionnel, pour leur confiance et les nombreux encouragements.

À mon conjoint Madjid et mes deux beaux garçons d'amour Juba et Gaya pour tout leur support moral et affectif.

## TABLES DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	iii
ABSTRACT.....	viii
REMERCIEMENTS.....	Xii
DÉDICACES.....	xiii
TABLES DES MATIÈRES.....	xiv
LISTE DES TABLEAUX.....	xvii
LISTE DES FIGURES.....	xviii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xxi
INTRODUCTION.....	1
RECENSION DE LA LITTÉRATURE.....	4
L'OVAIRE.....	4
LE FOLLICULE.....	4
LA FOLLICULOLOGÈNE.....	9
Les follicules primordiaux.....	10
Les follicules primaires.....	11
Les follicules secondaires.....	12
Les follicules tertiaires ou antraux.....	12
DÉVELOPPEMENT FOLLICULAIRE CHEZ LA VACHE.....	13
Principes de vagues folliculaires.....	13
Atrésie folliculaire.....	16
LA STÉROÏDOGÈNE.....	17
Les enzymes stéroïdogéniques.....	22



P450 side chain cleavage ( P450scc).....	22
3 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase (3 $\beta$ -HSD).....	23
P450 17 $\alpha$ -hydroxylase, C <sub>17-20</sub> lyase (P450 <sub>17OH</sub> ).....	25
17 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase (17 $\beta$ -HSD).....	26
P450aromatase (P450arom).....	27
RÉGULATION DU DÉVELOPPEMENT FOLLICULAIRE.....	30
Gonadotrophines.....	30
Récepteurs aux gonadotrophines.....	34
Facteurs intra-ovariens.....	35
<i>La famille des IGFs</i> .....	35
CONTRÔLE DU DÉVELOPPEMENT FOLLICULAIRE.....	40
RÔLE DES OESTROGÈNES.....	43
Effet sur la folliculogénèse.....	45
Effet sur les récepteurs de gonadotrophines.....	45
L'AROMATASE DANS LE DÉVELOPPEMENT FOLLICULAIRE.....	46
Structure du gène de l'aromatase (CYP19).....	46
Expression du gène de l'aromatase (CYP19).....	49
Régulation du gène de l'aromatase (CYP19).....	55
<i>Régulation transcriptionnelle</i> .....	56
<i>Régulation post-transcriptionnelle</i> .....	59
HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS.....	62
ARTICLE 1.....	63
Expression of 17 $\beta$ - and 3 $\beta$ -hydroxysteroid deshydrogenases and steroidogenic acute regulatory protein in non-luteinizing bovine granulosa cells in vitro.....	64

ARTICLE 2.....	108
Stability of cytochrome P450aromatase mRNA in non-luteinizing bovine granulosa cells in vitro.....	109
ARTICLE 3.....	136
Posttranscriptional regulation of bovine cytochrome P450aromatase mRNA by the 3'-untranslated région.....	137
DISCUSSION GÉNÉRALE.....	171
Directions futures.....	176
CONCLUSION GÉNÉRALE.....	178
BIBLIOGRAPHIE.....	180

**LISTE DES TABLEAUX****Article 1**

**Tableau I.** Effect of different androgens on mean  $\pm$  SEM estradiol secretion and on P450arom and 17 $\beta$ -HSD mRNA levels in granulosa cells from small follicles (<5mm) cultured under non-luteinizing conditions for 6 days.

88

## LISTE DES FIGURES

### RECENSION DE LA LITTÉRATURE

<b>Figure 1</b> : Structure de l'ovaire.....	5
<b>Figure 2</b> : Follicule antral chez la vache.....	7
<b>Figure 3</b> : Développement folliculaire chez la vache.....	15
<b>Figure 4</b> : Schéma de la stéroïdogénèse ovarienne.....	19
<b>Figure 5</b> : Représentation schématique du complexe enzymatique de l'aromatase (P450arom et le NADPH-cytochrome-P450).....	28
<b>Figure 6</b> : Schéma montrant les différents rôles des œstrogènes dans le développement folliculaire.....	44

### Article1

<b>Figure 1</b> Steroid secretion from bovine antral and basal granulosa cells after two days of culture in different serum-free media.....	90
<b>Figure 2</b> Steroid secretion (A) and expression of steroidogenic enzyme genes (B) during culture of basal and antral granulosa cells.....	92
<b>Figure 3</b> Expression of 17 $\beta$ -HSD during culture of antral and basal granulosa cells measured by semiquantitative RT-PCR.....	94
<b>Figure 4</b> Expression of StAR during culture of antral and basal granulosa cells measured by semiquantitative RT-PCR.....	96
<b>Figure 5</b> Northern analysis of mRNA encoding P450arom, P450scc, 3 $\beta$ -HSD and 17 $\beta$ -HSD in granulosa cell subpopulations of individual medium (5-8mm) and large ( $\geq$ 8 mm) bovine follicles.....	98

<b>Figure 6</b> Effect of FSH on P450arom and 17 $\beta$ -HSD mRNA abundance in granulosa cells in vitro measured by semiquantitative RT-PCR.....	100
---	-----

## Article 2.

<b>Figure 1</b> Relative abundance of mRNA encoding cytochromes P450scc (●) and P450aromatase (○) following treatment with the transcription inhibitor DRB.....	126
---	-----

<b>Figure 2</b> Aromatase activity in bovine granulosa cells following withdrawal of FSH (○) or addition of cycloheximide (▽).....	128
--	-----

<b>Figure 3.</b> Steady-state levels of mRNA encoding cytochrome P450arom (Panel A) and it's half-life (Panel B) following addition of FSH (1 ng/ml); insulin (100 ng/ml); cAMP (300 $\mu$ M); CHX (20 $\mu$ g/ml) and PD98059 (50 $\mu$ M).....	130
--	-----

## Article 3.

<b>Figure 1.</b> Design of bovine P450arom 3'-UTR fragments used for constructing luciferase reporter plasmids and for in vitro transcription.....	154
--	-----

<b>Figure 2.</b> Location of potential RNA destabilizing activity	
---	--

in the P450arom mRNA 3'-UTR.....156

**Figure 3.** Radiolabeled full-length P450arom 3'-UTR RNA

binding to protein extracts (20  $\mu$ g) from bovine tissues..... 158

**Figure 4.** Specificity of protein binding to RNA in bovine

granulosa cells..... 160

**Figure 5.** Competition analysis of fragments of RNA within

the bovine P450arom 3'-UTR binding to granulosa cell protein.....162

**Figure 6.** Luciferase activity in granulosa cells transfected

with sequences within the 3'-UTR of bovine P450arom mRNA.....164

**Figure 7.** Location of protein binding region within the

3'-UTR of bovine P450arom mRNA.....166

**LISTE DES ABRÉVIATIONS**

Act D :	Actynomicine D
ADN :	Acide désoxyribonucléique
AMPc :	Adénosine mono phosphate cyclique
ARNm :	Acide ribonucléique messenger
ARE :	Éléments riches en adénylates et uridylates
AUF 1 :	AU Factor 1
BHLH :	Hélice-boucle-hélice basique
CHX :	Cycloheximide
cm :	Centimètre
CRE :	Élément de réponse à l'AMPc
CREB :	Protéine de liaison à l'élément de réponse à l'AMPc
CLS :	Séquence comme CREB
CYP 17 :	Gène codant pour 17 $\alpha$ hydroxylase
CYP 19 :	Gène codant pour P450aromatase
CYP 21 :	Gène codant pour 21 hydroxylase
Db cAMP:	Dibutyryl-cyclic adenosin mono phosphat
DHEA :	Dehydroépiandrostérone
DHT :	Dihydrotestostérone
DRB :	5-6 dichloro-1- $\beta$ -D ribofuranosylbenzimidazole
EGF :	Facteur de croissance épidermique
EGFr :	Récepteur du facteur de croissance épidermique
Elav :	Embryonic lethal abnormal vision

FSH :	Hormone folliculo-stimulante
FSHr :	Récepteur de l'hormone folliculo stimulante
FGFb :	Facteur de croissance fibroblastique basique
GAPDH :	Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase
GnRH :	Gonadoliberine (Gonadotropin releasing hormone)
HDL :	Lipoprotéine de haute densité
HMG-CoA :	3 hydroxy-3- methyl glutaryl- coenzyme A
hnRNP :	Ribonucleoprotéine nucléaire hétérogène
HSP 70 :	Protéine de choc thermique
3 $\beta$ -HSD :	3 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase
17 $\beta$ -HSD :	17 $\beta$ - hydroxystéroïde déshydrogénase
IGF 1 :	Insulin-like growth factor 1
IGF 2	Insulin-like growth factor 2
IGFBP :	Insulin-like growth factor binding protein
kDa :	Kilodalton
KSRP :	K homology-type splicing regulatory protein
LDL :	Lipoprotéine de faible densité
LH :	Hormone lutéinisante
LHr :	Récepteur de l'hormone lutéinisante
MAPK :	Mitogen-activated protein kinase
$\mu$ m :	Micromètre
NAD <sup>+</sup> :	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH :	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
ng :	Nanogramme



PAPP A :	Pregnancy associated-plasma-protein-A
pb :	Paire de base
PBR :	Récepteur benzodiazepine
P450arom :	Cytochrome P450aromatase
P450C17 :	Cytochrome P450 17 $\alpha$ hydroxylase
P450scc :	Cytochrome P450 side-chain-cleavage
RACE :	Rapid amplification of cDNA end
RT-PCR :	Transcription reverse-réaction de polymérisation en chaine
SF 1 :	Facteur stéroïdogénique de type 1
StAR :	Protéine de la régulation rapide de la stéroïdogénèse
TGF $\alpha$ :	Facteur de croissance transformant de type $\alpha$
TGF $\beta$ :	Facteur de croissance transformant de type $\beta$
TF :	Facteur de transcription
TTP :	Tristetraprolin
3'-UTR :	Région 3'- non traduite

## INTRODUCTION

La croissance folliculaire durant le cycle oestral chez la vache, de même que chez la plupart des mammifères, se manifeste par une alternance de croissance et de régression d'un certain nombre de follicules communément appelée «vague folliculaire». Chaque vague de croissance s'amorce par le recrutement d'une cohorte de 5 à 6 follicules de 2 à 4 mm de diamètre qui vont poursuivre davantage leur croissance. Parmi ces follicules recrutés, un seul est sélectionné pour devenir le follicule dominant et potentiellement le follicule ovulatoire, tandis que le reste des follicules, appelés follicules subordonnés, entrent dans un processus de dégénérescence folliculaire ou atrophie (Ginther et coll., 2001; Fortune et coll., 2001).

Tout au long de la croissance et du développement des follicules, les cellules folliculaires représentées par les cellules de la thèque et les cellules de la granulosa subissent d'importants changements relatifs à leurs capacités de synthétiser les stéroïdes. La première étape de la stéroïdogénèse qui peut avoir lieu aussi bien dans les cellules de la thèque que dans les cellules de granulosa (Fortune, 1986; Conley et Bird, 1997), dépend de l'enzyme responsable du clivage de la chaîne latérale du cholestérol (P450<sub>scc</sub>). Cette enzyme située dans la membrane interne des mitochondries entraîne la transformation du cholestérol en prégnénolone. La prégnénolone est le précurseur de tous les stéroïdes. Cette réaction biochimique nécessite la

translocation préalable du cholestérol dans la mitochondrie par la protéine StAR (Stocco, 2001).

La stéroïdogénèse chez les ruminants utilise principalement la voie  $\Delta 5$  (Conley et Bird, 1997) par laquelle la prégnénolone est métabolisée en déhydroépiandrostérone (DHEA) par le cytochrome P450  $17\alpha$  hydroxylase (P450C17) au niveau des cellules de la thèque et par la suite en androstènedione par la  $3\beta$ -hydroxystéroïde-déshydrogénase ( $3\beta$ -HSD). L'androstènedione pénètre dans les cellules de granulosa où il est converti en oestrone par le cytochrome P450aromatase (P450arom) (Simpson et Davis, 2001), puis en oestradiol par la  $17\beta$ -HSD (Luu-The; 2001). La testostérone pourrait aussi être utilisée comme substrat et elle est convertie directement en oestradiol par P450arom. Étant donné l'absence de l'enzyme P450C17 dans les cellules de granulosa, la prégnénolone pourrait être convertie en progestérone par la  $3\beta$ -HSD (Conley et Bird, 1997).

Durant la croissance folliculaire, il y a une importante augmentation des niveaux d'oestradiol (Badinga et coll., 1992; Price et coll., 1995; Mihm et coll., 2000) et de l'expression de l'ARNm P450arom (Xu et coll., 1995; Bao et coll., 1997a). Les follicules dominants sécrètent plus d'oestradiol (Mihm et coll., 2000; Beg et coll., 2001) et expriment plus d'ARNm P450arom (Evans et Fortune, 1997) que les follicules subordonnés. Une augmentation a été constatée également pour le P450scc (Bao et coll., 1997a). Lorsque le follicule en croissance devient le follicule dominant, les cellules de granulosa commencent à exprimer le récepteur à la LH et la  $3\beta$ -HSD, elles sont alors

capables de convertir la prégnénolone en progestérone et de répondre à la LH, élément considéré comme essentiel pour la maturation du follicule dominant. L'oestradiol est important pour la croissance folliculaire (Beg, 2003) et l'ovulation dans la mesure où les souris «knock out» pour le gène de l'aromatase ne sont pas capables d'ovuler (Fischer et coll., 1998). L'oestradiol est aussi responsable de l'induction des récepteurs LH sur les cellules de granulosa. Quelques heures après le pic de la LH, il y a une chute rapide des niveaux d'oestradiol et de l'expression de l'aromatase (Laurincik et coll., 1996; Komar et coll., 2001). Le même effet a été rapporté au niveau des cellules de granulosa in vitro après réduction de l'insuline et de l'IGF1, cependant le mécanisme de régulation de l'ARNm du P450arom de même que sa demi-vie chez la vache ne sont pas connus. La demi-vie de l'ARNm P450arom chez le rat et le lapin est estimée à environ 7 heures (Fitzpatrick, 1997; Hanoux, 2003) alors que chez l'humain, elle est de 12 heures (Mu, 2001). La cycloheximide, un inhibiteur de la synthèse protéique est capable d'augmenter la stabilité de l'ARNm chez le rat (Fitzpatrick et coll., 1997), ce qui suggère une régulation au niveau post-transcriptionnel.

C'est pourquoi l'objectif de cette étude est d'abord de mieux caractériser le système de culture en examinant l'expression d'autres enzymes impliquées dans la stéroïdogénèse afin d'utiliser ce modèle pour l'étude de la régulation de P450arom au niveau des cellules de granulosa chez la vache.

## RECENSION DE LA LITTÉRATURE

### L'OVAIRE

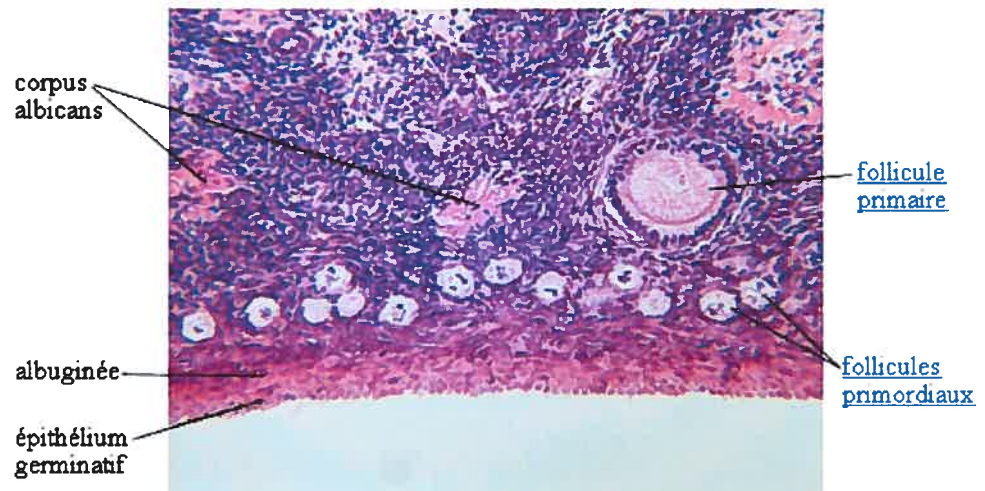
Chez les mammifères, l'ovaire est l'organe responsable de la différenciation et de la libération d'un ovocyte mature pour la fertilisation et la survie de l'espèce. De même, l'ovaire est un organe endocrinien produisant des stéroïdes permettant le développement des caractères sexuels secondaires chez la femelle et le maintien de la gestation.

L'ovaire chez la vache a une forme ovale et une taille approximative de 4 x 2 x 1.5 cm (Dyce et coll., 1987), la couche externe est constituée par l'épithélium germinale de surface (anciennement appelé «epithelium »), il y a une couche dense de tissu conjonctif connu sous le nom de tunique albuginée. Sous la tunique albuginée on retrouve le cortex de l'ovaire qui est formé principalement par les follicules, entourés de fibroblastes, de fibres de collagène et de fibres élastiques (Figure 1). La zone médullaire de l'ovaire contient principalement des vaisseaux sanguins, des vaisseaux lymphatiques et des terminaisons nerveuses. La formation d'un ovaire fonctionnel dépend de trois étapes fondamentales durant la formation des gonades : Formation des follicules, différenciation des cellules stéroïdogéniques et initiation de la méiose.

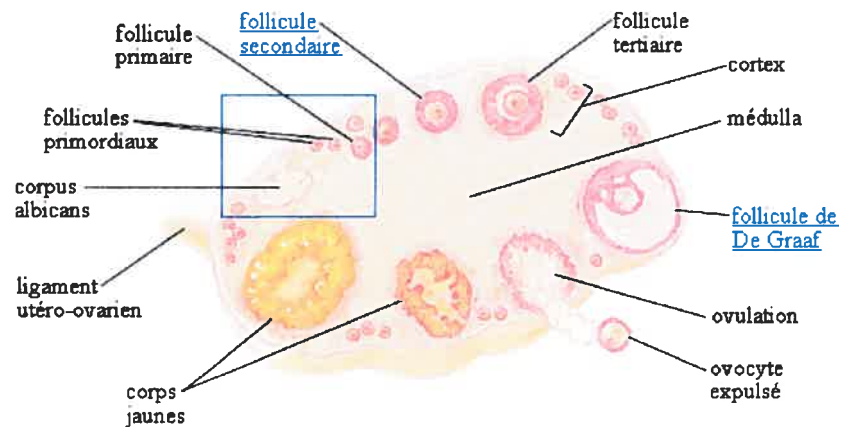
### LE FOLLICULE

Un follicule ovarien est une unité très complexe composée de différents types de cellules. Le follicule comprend plusieurs couches de cellules

A



B



**Figure 1 : Structure de l'ovaire**

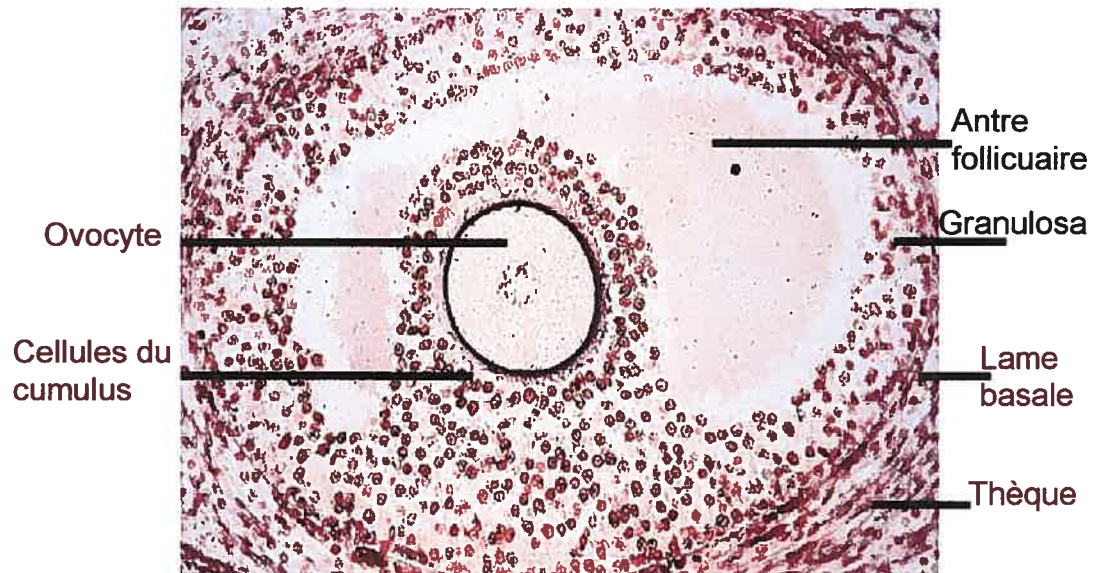
(A) : Coupe histologique montrant une portion de l'ovaire avec un follicule primaire et des follicules primordiaux.

([www.callisto.si.usherb.ca:8080/.../primo10.htm](http://www.callisto.si.usherb.ca:8080/.../primo10.htm))

(B) : Schéma représentant les différents stades de développement folliculaire, l'ovulation et la formation du corps jaune.

([www.callisto.si.usherb.ca:8080/.../ova](http://www.callisto.si.usherb.ca:8080/.../ova))

somatiques entourant une cavité (l'antra) remplie d'un liquide appelé liquide folliculaire dans lequel baigne l'ovocyte entouré de cellules somatiques. Le follicule assure donc un environnement spécialisé pour la croissance de l'ovocyte, et il est responsable de la production des hormones (Gordon, 1994). L'ovocyte et les cellules somatiques composant le follicule demeurent étroitement associés tout au long du développement à partir du stade primordial jusqu'au stade préovulatoire. La paroi du follicule préovulatoire mature est composée de cellules de granulosa, de la thèque interne et de la thèque externe. Les cellules de granulosa sont des cellules d'origine épithéliale dont le rôle est essentiel pour la croissance et la survie de l'ovocyte. Les cellules de granulosa ne sont pas homogènes mais des sous-populations de cellules spécialisées dont : les cellules de la corona radiata, cellules du cumulus, cellules de granulosa antrales et cellules de granulosa basales (Figure 2). Les cellules du cumulus représentent une sous-population de cellules de granulosa entourant l'ovocyte, les cellules du cumulus qui sont en contact de l'ovocyte sont connues sous le nom de corona radiata, elles sont en étroit contact avec l'ovocyte à travers les prolongements cytoplasmiques qui traversent la zone pellucide (De loos et coll., 1991); les cellules de la corona radiata communiquent avec les cellules du cumulus par les jonctions lacunaires perméables formant ainsi un véritable syncytium électrophysiologique (De loos, 1991). Les cellules du cumulus nourrissent l'ovocyte (Buccione et coll., 1990) et participent à la formation de la zone pellucide. De plus, les cellules du cumulus sont aussi impliquées dans la



**Figure 2 : Follicule antral chez la vache**

Coupe histologique montrant les différents compartiments d'un follicule (ovocyte, cellules de granulosa et thèque)  
([www.ac-amiens.fr/.../cycles/ovaire2](http://www.ac-amiens.fr/.../cycles/ovaire2) )



modulation ou dans la formation d'inhibiteurs de la maturation ovocytaire (Tsafriri et coll., 1982, Eppig et Downs, 1984).

Les cellules de granulosa proche de la lame basale sont connues sous le nom de cellules basales, alors que les cellules proches de l'antra folliculaire sont connues sous le nom de cellules antrales. L'antra contient le liquide folliculaire dont la composition est proche de celle du plasma sanguin (Fortune et Hansel, 1985), avec les produits de sécrétion et de métabolisme sécrétés localement (Gordon et Lu, 1990). La lame basale contient différents types de collagène (collagène IV alpha 1 et alpha 2, de faible quantité de alpha 3 et alpha 5), de fibronectine, de laminine et des protéoglycans (Rodgers et coll. 1999). Les cellules de la thèque interne et de la thèque externe sont des cellules stromales ou des cellules fibroblastiques qui constituent l'enveloppe du follicule antral. La thèque externe est formée par les cellules de tissus conjonctifs comprenant les fibroblastes, les cellules nerveuses et les capillaires, qui donnent une anastomose avec le système capillaire stromale (plexus interne). La thèque interne est la principale source d'androgènes durant le développement du follicule (Moor, 1977). Les follicules peuvent être classés en follicules primordiaux, follicules préantraux (follicules primaires et follicules secondaires), follicules antraux et préovulatoires (Figure1).

## LA FOLLICULOLOGÈNE

La folliculogénèse est le processus responsable du développement du follicule ovulatoire aboutissant à la libération d'un ovocyte mature dans un interval de temps fixe au cours de la vie reproductive d'une femelle.

La folliculogénèse implique une série de transformations cellulaires et moléculaires des différentes composantes du follicule, à savoir l'ovocyte, les cellules de granulosa et les cellules de la thèque (Picton, 2001). Chez la vache, le nombre de follicules à la naissance est estimé entre 40 000 et 800 000 (Erickson, 1966). Après la naissance, des follicules ovariens vont s'échapper continuellement de la réserve pour commencer leur croissance, atteindre la maturité et, par la suite ovuler ou se dégénérer dont 90 % des cas par un processus appelé atresie folliculaire. Les follicules sont recrutés continuellement jusqu'à l'épuisement de la réserve folliculaire. Chez la vache le follicule préovulatoire atteint près de 300 à 400 fois le diamètre du follicule primaire de 50  $\mu\text{m}$  (soit 15 - 20 mm) (Rajakoski 1960). Le processus entier de la croissance folliculaire à partir du stade primordial (50 – 60  $\mu\text{m}$ ) jusqu' au stade ovulatoire (10 - 15 mm) prend environ 180 jours chez la vache (Lussier et coll., 1987), période durant laquelle il y a accumulation d'importants facteurs connus et inconnus impliqués dans la fertilisation et le développement embryonnaire précoce.

## Les follicules primordiaux

Le follicule primordial comprend un ovocyte au stade diplotène (pachytène entouré d'une simple couche de cellules pavimenteuses non-différenciées appelées cellules de prégranulosa (Byskov, 1978). L'ovocyte et les cellules folliculaires dépendent les unes des autres. En effet l'ovocyte nécessite la présence de cellules de granulosa pour sa croissance et sa survie (Byskov et Lintern-Moore, 1973; Picton, 2001). Les cellules de granulosa non-différenciées sont séparées des cellules stromales par la lame basale, les cellules stromales donneront origine aux cellules de la thèque (Goujeon, 1996). La réserve des follicules primordiaux n'est pas renouvelable et sert pour toute la vie de l'individu. Les follicules primordiaux sont détectables au 90 ième jour de gestation (Erikson, 1966; Szollosi, 1991). Chez la vache leur diamètre est  $\leq 40 \mu\text{m}$  (Braw-Tal et Youssefi, 1997; Fair, 1995; Van Den Hurk et coll., 1997; Van Wezel et Rodgers, 1996).

Chaque follicule primordial contient un ovocyte d'environ  $30 \mu\text{m}$  de diamètre (Picton, 2001), les follicules primordiaux sont localisés à la périphérie du cortex de l'ovaire (Zamboni, 1974) et se déplacent en profondeur au fur et à mesure qu'ils s'accroissent et deviennent visibles en surface après le développement de l'antra folliculaire. Le mécanisme de l'activation des follicules primordiaux demeure inconnu, certaines études ont démontré que leurs croissances pouvaient être initiées en l'absence d'hormones gonadotrophes ou de facteur de croissance (Campbell et coll.,

1995). En effet, les follicules à ce stade ne sont pas très vascularisés, ce qui indique que les facteurs paracrines plutôt qu'endocrines contrôleraient la croissance folliculaire (Suzuki et coll., 1998).

La réserve de follicules est établie aux environs du 140 ième jour de gestation (Rüsse, 1983). Le nombre de follicules primordiaux est déterminé avant la naissance et la plupart demeure en état de quiescence. Tout au long de la vie reproductive et même avant, un certain nombre de ces follicules primordiaux quittent la réserve et entrent en croissance (recrutement), le follicule se développe au stade antral et la majorité dégènèrent par atresie folliculaire. Cependant quelques follicules sont sélectionnés pour atteindre le stade préovulatoire. La fin de la vie reproductive de la femelle a généralement lieu après épuisement de cette réserve (Mc Gee et Hsueh, 2000).

### **Les follicules primaires**

Les follicules primordiaux commencent à s'activer en follicules primaires vers le 140 ième jour de gestation chez la vache (Rüsse, 1983). Le follicule primaire contient un ovocyte d'environ 30  $\mu\text{m}$  entouré par des cellules de granulosa cuboïdales (Hyttel et coll., 1997; Rüsse, 1983; Van Wezel et Rodgers, 1996). L'ovocyte amorce sa croissance quand il y a environ 40 cellules de granulosa (Brow-Tal et Youssefi, 1997). Les follicules primordiaux et primaires forment la réserve de l'ovaire et représentent plus de 90 % de la population folliculaire (Saumande, 1991a). Même si la taille des ovocytes

n'augmente pas à ce stade, d'importants changements apparaissent, la corona radiata développe des prolongements cytoplasmiques appelés jonctions lacunaires perméables avec l'ovocyte et il y a formation de la zone pellucide entre l'ovocyte et les cellules de la corona radiata (Fair, 1995; Picton, 2001; Rüsse 1983).

### **Les follicules secondaires**

Des follicules secondaires apparaissent au 210 ième jour de gestation lorsque l'unique couche de cellules cuboïdales commence à proliférer par d'intenses divisions mitotiques. Les follicules secondaires contiennent au moins 2 couches de cellules de granulosa. De plus on peut identifier les cellules de la thèque en dehors de la lame basale ainsi qu'un réseau capillaire de vaisseaux sanguins. La multiplication des cellules de granulosa amène la formation de petites vacuoles qui sont dispersées entre les cellules de la couche granuleuse et qui deviennent subséquentement l'antra folliculaire.

### **Les follicules tertiaires ou antraux**

Les follicules antraux ou les follicules tertiaires sont caractérisés par la présence de l'antra, une cavité remplie de liquide folliculaire. L'antra est détectable lorsque le follicule atteint de 0.12 à 0.28 mm de diamètre (Lussier et coll., 1987; Monniaux et coll., 1997). Le premier follicule antral apparaît aux alentours du 230 ième jour de gestation (Rüsse, 1983). Par la suite, il y a

alignement des cellules stromales près de la lame basale qui forment ainsi la thèque interne et la thèque externe. Les cellules de la thèque jouent un rôle critique dans le développement folliculaire et dans la stéroïdogénèse en sécrétant des androgènes nécessaires à la biosynthèse des oestrogènes par les cellules de granulosa (voir section stéroïdogénèse). Contrairement aux follicules primordiaux qui entrent en phase de croissance continuellement, les follicules tertiaires sont recrutées par «vagues». Une autre caractéristique de ce stade de développement est la présence de jonctions perméables entre les cellules de granulosa et entre les cellules de granulosa et l'ovocyte à travers la zone pellucide ce qui va permettre l'apport en nutriments et signaux régulateurs à l'ovocyte (Espey, 1994), de même qui mèneront à la maturation finale. Le développement du follicule antral au stade préovulatoire prend environ 42 jours, soit l'équivalent de 2 cycles oestral (Lussier et coll., 1987).

## **DÉVELOPPEMENT FOLLICULAIRE CHEZ LA VACHE**

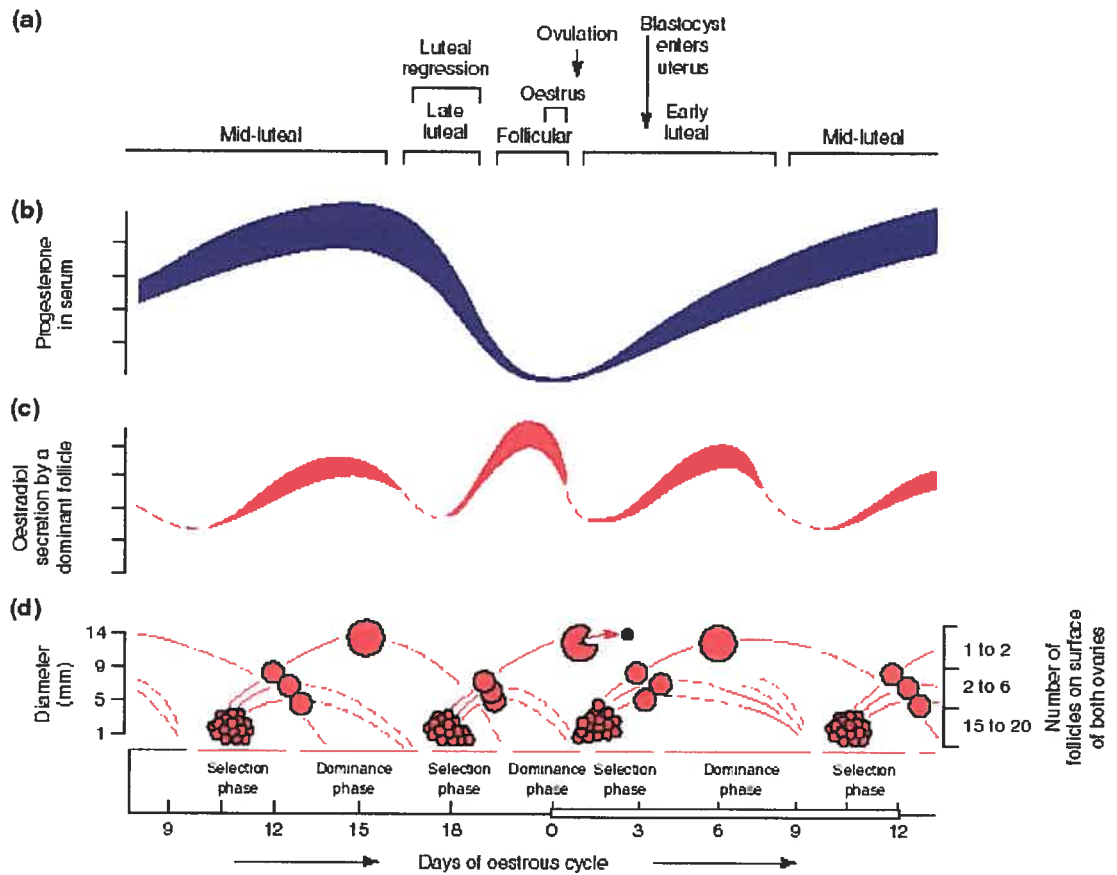
### **Principes de vagues folliculaires**

Une vague folliculaire est caractérisée par la croissance synchrone d'un groupe de 3 à 6 follicules. Dépendamment de l'espèce, il peut y avoir une ou plusieurs vagues dans un cycle oestral. Le premier jour de la vague étant le jour de l'émergence où on peut distinguer, par ultrasonographie, un groupe de follicules en croissance. L'émergence est souvent synonyme de recrutement (Ginther et coll., 1996) et cette phase est plus exactement définie

comme étant la croissance de follicules de 4 à 6 mm de diamètre qui sont devenus dépendant des gonadotrophines (Driancourt, 2001).

La sélection folliculaire étant le processus qui résulte en un seul follicule dominant et une diminution du nombre de follicules en croissance dans la vague. Le follicule dominant est défini quand sa taille est supérieure aux follicules subordonnés. Le moment où on remarque la divergence dans les niveaux de croissance est souvent appelé déviation (Ginther et coll., 1996). Le follicule dominant est celui qui poursuit son développement au moment où les autres follicules cessent leur croissance. Ces derniers sont souvent identifiés comme follicules subordonnés (Figure 3).

Chez la vache, les follicules dominants atteignent le diamètre maximal d'environ 10 – 20 mm (Fortune et coll., 1988; Savio et coll., 1988; Ginther et coll., 1989c), et le follicule subordonné atteint environ 8 mm (Ginther et coll., 1989a). La majorité des cycles présente 2 ou 3 vagues folliculaires. L'émergence de ces vagues a lieu aux environs du jour 9 à 11 du cycle pour les animaux présentant 2 vagues, et aux environs du jour 2, 9 et 16 jour du cycle pour les animaux à 3 vagues (Sirois et Fortune 1988). Les vaches laitières de races Holstein ont tendance à avoir 2 vagues folliculaires (Taylor et Rajamhendran, 1991; Townson et coll., 2002) alors que les génisses ont tendance à avoir 2 ou 3 vagues par cycle (Savio et coll., 1988, Sirois et Fortune, 1988; Ginther et coll., 1989c). L'étude de Towson en 2002 indique que les vaches à 2 vagues folliculaires ont tendance à avoir des cycles courts



**Figure 3 : Développement folliculaire chez la vache**

Schéma illustrant la notion de vagues folliculaires et les différents stades de croissances folliculaires.

(Roche, 1996)



et ovulent un follicule plus grand et plus vieux et ces vaches sont moins fertiles que les vaches à trois vagues. Chez les vaches de la sous-espèce *Bos indicus*, il y a souvent 4 vagues folliculaires dans un cycle (Bo et coll., 2003), ce qui n'est pas le cas pour *Bos taurus*. Plus que 4 vagues folliculaires par cycle est souvent associé à une absence de lutéolyse, ou absence d'ovulation (Adams, 1999). Par ailleurs des cycles courts de vagues folliculaires ont été rapportés aux environs de la puberté (Evans et coll., 1994a) et aussi après la première ovulation après la mise bas (Savio et coll., 1990). Les vagues folliculaires sont également présentes lors de la gestation (Bergfelt et Ginther, 1996; Ginther et coll., 1996).

### **Atrésie folliculaire**

L'atrésie folliculaire est un processus de dégénérescence physiologique qui atteint près de 99% des follicules en croissance (Fortune, 1994). L'atrésie peut survenir à n'importe quel stade de développement folliculaire (Monniaux et coll., 1998). Les premiers signes de l'atrésie des follicules antraux se manifestent par une chute des concentrations plasmatiques en oestradiol (Webb et England, 1982; McNatty et coll., 1984) et perte de l'aromatase dans les cellules de granulosa (Huet et coll., 1997, 1998).

Il semble qu'il y ait prédominance de l'atrésie folliculaire pour les follicules de diamètre de 3-7 mm de diamètre. En effet le pourcentage de follicules atrétiques est faible pour les follicules préantraux et les petits

antraux, augmente avec les follicules moyens et demeure élevé durant la phase terminale de la croissance folliculaire (Lussier et coll., 1987; 1994). Les caractéristiques morphologiques d'un follicule atrétique sont représentées par la présence de pycnoses dont le nombre détermine le degré d'atrésie, de même qu'une altération des jonctions lacunaires perméables et l'involution de l'ovocyte. Par ailleurs, il y a une réduction de la vascularisation des cellules de la thèque. Du point de vue hormonal, les follicules atrétiques comparés aux follicules sains présentent plus d'androgènes dans leurs liquides folliculaires, un ratio androstèdione/oestradiol élevé et une activité aromatasase très faible. En effet, les cellules de granulosa de follicules en dégénérescence perdent la capacité de répondre à la FSH.

Le mécanisme de contrôle de l'atrésie folliculaire n'est pas bien connu, il semble que les gonadotrophines et les différents facteurs de croissance EGF, TGF $\alpha$  et FGFb jouent un rôle inhibiteur sur l'apoptose.

## **LA STÉROÏDOGÉNÈSE**

La stéroïdogénèse est le processus responsable de la synthèse des hormones stéroïdiennes. Parmi les stéroïdes, on distingue les glucocorticoïdes, sécrétés par la surrénale et qui jouent un rôle dans le métabolisme des hydrates de carbone et dans la réponse au stress, les minéralocorticoïdes, sécrétés également par la surrénale et qui sont importants dans la régulation des sels et le maintien de la pression sanguine, les stéroïdes sexuels, sécrétés principalement par les ovaires et les

testicules, et qui jouent un rôle très important dans la régulation des fonctions reproductives. Les stéroïdes sexuels peuvent être classés en trois principaux groupes selon leurs actions physiologiques et le nombre de carbones qu'ils renferment (Gore-Langton et Armstrong, 1994). Les œstrogènes (C17) sont synthétisés principalement par les cellules de granulosa des follicules (Ying et Zhang, 1999) et ils jouent un rôle fondamental dans la reproduction surtout chez les femelles (Brown, 1999; Van Voorhis, 1999). Les androgènes (C19) sont synthétisés principalement par les cellules de la thèque interne chez la femelle et représentent le précurseur des œstrogènes pour les cellules de granulosa. Les progestagènes (C21) sont sécrétés principalement par les cellules du corps jaune et du placenta; ils jouent un rôle très important dans l'implantation de l'embryon (Van Voorhis, 1999).

Les différents groupes de stéroïdes partagent généralement la même structure. Ils possèdent un noyau cyclo-pentanophénanthrénique comportant trois anneaux cyclohexanes A, B, C, et un noyau cyclopentane D (Brown, 1999).

La biosynthèse des stéroïdes (Figure 4), requiert un précurseur qui est le cholestérol et diverses enzymes qui sont localisées soit dans la mitochondrie, soit dans le réticulum endoplasmique des cellules stéroïdogéniques. Les cellules stéroïdogéniques présentent des caractéristiques structurelles qui facilitent l'acquisition du cholestérol et sa conversion en stéroïdes. L'une des caractéristiques est la présence de

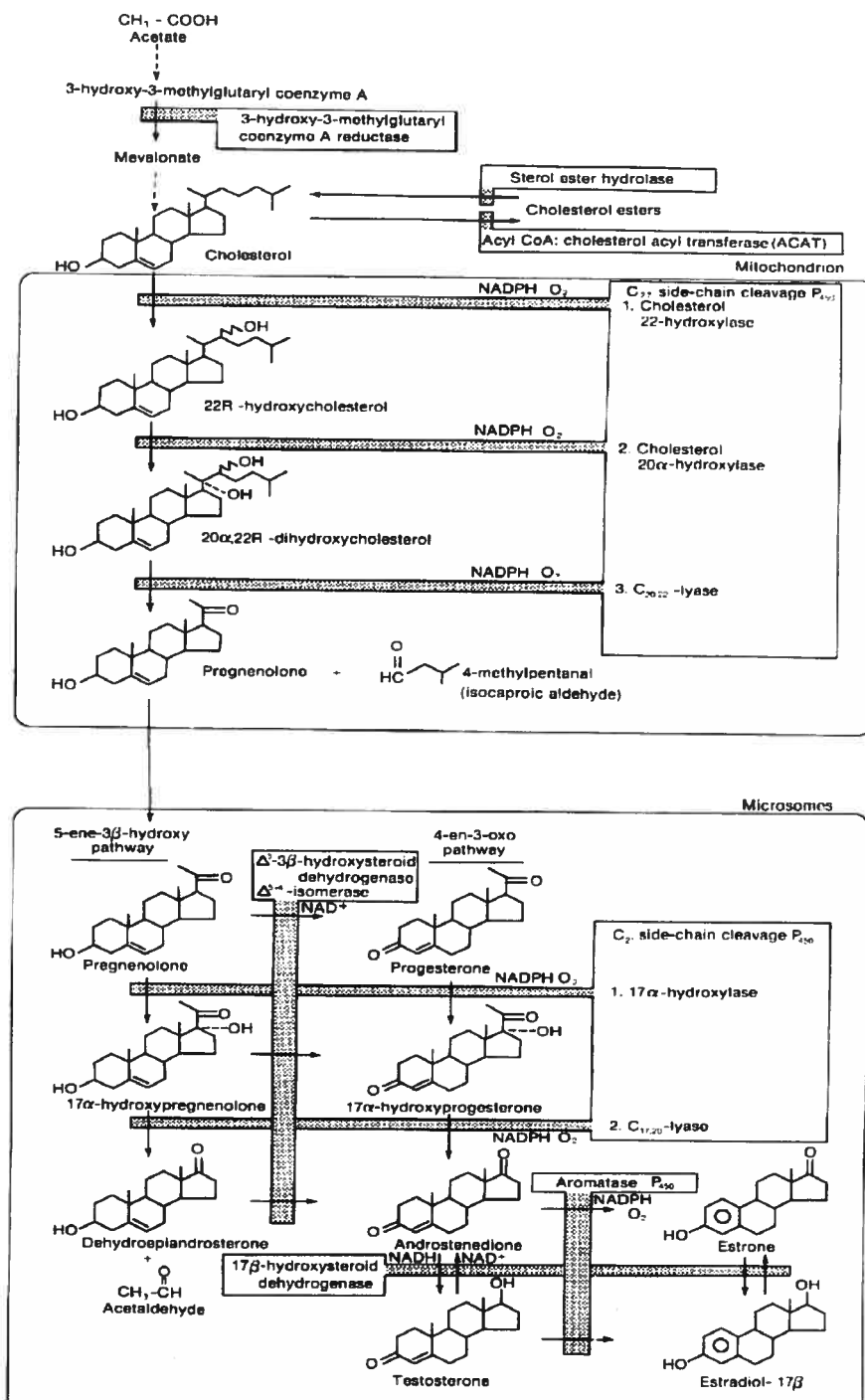


Figure 4 : Schéma de la stéroïdogénèse ovarienne (Gore-Langton et Armstrong, 1994)

microvillosités et des prolongements cytoplasmiques «Clathrin-coated pits» sur la membrane cytoplasmique, où sont localisés les récepteurs pour les LDL par exemple (Paavola et coll., 1985; Malassine et coll., 1987). Il y a également abondance du réticulum endoplasmique lisse, site où réside la plupart des enzymes impliquées dans la stéroïdogénèse telles que 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-coA) réductase, enzyme limitante dans la biosynthèse du cholestérol, et les enzymes impliquées dans la synthèse des stéroïdes dont la  $17\alpha$ -hydroxylase, 17-20 lyase (CYP17),  $3\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase, P450side-chain-cleavage (CYP11A) et le cytochrome P450aromatase (CYP19) (Hall, 1986). Une autre caractéristique est l'abondance des gouttelettes lipidiques contenant du cholestérol estérifié, principalement en acides gras insaturés, triglycérides et quelques phospholipides. Ces gouttelettes lipidiques représentent donc une source importante de substrat pour la stéroïdogénèse. Étant donné la localisation de l'enzyme P450side-chain cleavage (P450scc) ou l'enzyme coupant la chaîne latérale à l'intérieur des mitochondries, les cellules stéroïdogéniques présentent un grand nombre de mitochondries d'apparence sphérique.

Le cholestérol est le substrat utilisé pour la synthèse de toutes les hormones stéroïdes, il peut provenir de deux sources possibles :

- a) endogène : synthétisé par la cellule à partir de composés contenant deux carbonates dérivant du métabolisme des hydrates de carbone grâce à l'acetyl-coenzyme A (Hinshelwood, 1999).
- b) exogène : qui arrive par la circulation sanguine où il circule sous forme de lipoprotéines et se lie à son récepteur pour pénétrer dans la cellule.

On distingue les lipoprotéines de faible densité (LDL) et les lipoprotéines de haute densité (HDL).

La deuxième source de cholestérol est la plus utilisée pour la stéroïdogénèse (Adashi, 1994; Van Voorhis, 1999). La prise des molécules de LDL et HDL est contrôlée au niveau du récepteur. L'excès de cholestérol dans la cellule est estérifié et stocké dans des gouttelettes lipidiques qui servent de réserve de cholestérol libre. L'hydrolyse des esters de cholestérol en cholestérol est catalysée par l'enzyme estérase de cholestérol qui peut être activée par la LH. Généralement, les follicules maintiennent un faible taux de synthèse de cholestérol et utilisent prédominamment la voie des lipoprotéines LDL pour leurs besoins en cholestérol (Gore-Langton et Armstrong, 1994; Gwynne et Strauss, 1982).

Il existe de nombreuses enzymes impliquées dans la synthèse et le métabolisme des hormones stéroïdes actifs, et il reste beaucoup à apprendre quant à leur fonction et régulation.

La première étape de la biosynthèse des stéroïdes est la conversion du cholestérol (stéroïde de 27 carbones) en prégnénone. Ceci ayant lieu par l'intervention de l'enzyme P450<sub>scc</sub> localisée à l'intérieur des mitochondries. Le cholestérol hydrophobe nécessite des protéines de transport pour franchir la barrière mitochondriale interne (Stocco, 2000). Cette étape est limitante pour la biosynthèse des hormones stéroïdiennes (Christenson et Strauss, 2000; Stocco, 2001a). Les protéines impliquées dans le transport du cholestérol à travers la membrane mitochondriale sont : la protéine de

régulation rapide de la stéroïdogénèse (StAR) et le récepteur benzodiazépine mitochondrial de type périphérique (PBR) (Stocco et Clark, 1996).

Chez les ruminants, StAR est exprimée au niveau du corps jaune (Juengel et coll., 1995; Hartung et coll., 1995) et les cellules de granulosa lutéinisées in vitro (Mamluk et coll., 1999) mais pas au niveau des cellules de granulosa de follicules en croissance (Soumano et Price, 1997; Bao et coll., 1998). La FSH et la LH sont les principaux stimulateurs de StAR alors que l'IGF 1 favoriserait la réponse des cellules aux gonadotrophines (Balasubramanian et coll., 1997; Sekar et coll., 2000). Une fois le cholestérol à l'intérieur de la mitochondrie, le cholestérol devient la cible pour les enzymes stéroïdogéniques pour être converti soit en progestérone et subséquemment, en androgènes et en œstrogènes.

## **LES ENZYMES STÉROÏDOGÉNIQUES**

### **P450 scc (clivant la chaîne latérale)**

L'enzyme P450scc est exprimée au niveau des gonades et des surrénales. Elle est également présente au niveau du placenta, du cerveau, de la peau et du système nerveux central et périphérique (Van Voorhis, 1999). Dans l'ovaire, la P450scc est exprimée au niveau de la thèque interne et les cellules de granulosa. La P450scc est localisée dans la mitochondrie, elle est codée par le gène CYP11A. La réaction enzymatique implique une série de transformations, notamment deux hydroxylations et une coupure de

la chaîne latérale du cholestérol au niveau des carbones 20-22 (Brown, 1999) aboutissant à la formation de la prégnénone et à l'acide isocaproïque (Gore-Langton et Armstrong, 1994). La réaction utilise 3 moles de NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) et 3 molécules d'oxygènes pour chaque molécule de cholestérol. Les électrons de NADPH sont captés par l'adrénodoxine dans la matrice mitochondriale, ce dernier transfère les électrons à l'enzyme P450<sub>scc</sub>. Chez la vache, l'ARNm P450<sub>scc</sub> augmente dans les cellules de granulosa avec le développement folliculaire (Bao et coll., 1997a) et diminue de façon transitoire dans les follicules après le pic de LH et par la suite augmente considérablement lors du développement du corps jaune avant de chuter de nouveau avec la régression de la stéroïdogénèse. Chez le rat et le porc, P450<sub>scc</sub> (ARNm et protéine) est stimulée principalement par la FSH et l'IGF 1 (Eimerl et Orly, 2002; Adashi et coll., 1988; Urban et coll., 1990).

### **3 $\beta$ -HSD : (3 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase)**

Cette enzyme a deux activités catalytiques majeures, elle est responsable de l'oxydation et de l'isomérisation de  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -hydroxystéroïdes en  $\Delta^4$ -3-cétostéroïdes. Cette réaction est essentielle pour la formation des androgènes et des œstrogènes (Conley et Bird, 1997), de même que pour la biosynthèse des glucocorticoïdes et des minéralocorticoïdes (Hinshelwood, 1999). L'enzyme utilise NAD<sup>+</sup> comme accepteur d'électrons, et dans les



conditions physiologiques, la réaction est irréversible (Brown, 1999). L'enzyme est aussi importante dans la conversion de  $17\alpha$ -hydroxyprégnénone en  $17\alpha$ -hydroxyprogestérone et de déhydroépiandrostérone (DHEA) en androstènedione. Contrairement aux enzymes de la famille des P450 qui sont codées par un seul gène, la  $3\beta$ -HSD présente plusieurs formes qui sont codées par différents gènes. Chez l'humain, on retrouve 5 gènes qui codent pour  $3\beta$ -HSD, dont seulement 2 sont fonctionnels, alors que chez la souris, il y a 6 gènes. L'existence de ces multiples gènes sont le résultat d'une duplication avec une homologie de séquences de 72-93% pour l'ADNc (Hinshelwood, 1999). Ces différentes formes de  $3\beta$ -HSD impliquent différentes affinités pour les substrats et une expression spécifique aux différents tissus. La nomenclature de ces différentes formes varie dépendamment de l'espèce, dans la plupart du temps les isoformes sont nommés par ordre de leur clonage et pas par leur localisation (Hinshelwood et coll., 1995). Chez la vache,  $3\beta$ -HSD est exprimée au niveau des cellules de granulosa de follicules ayant atteints 7 à 8 mm de diamètre (Bao et coll., 1997b; Beg et coll., 2001). Au niveau des cellules de la thèque,  $3\beta$ -HSD, stimulée par la LH assure la conversion du déhydroépiandrostérone (DHEA) en androstènedione (Fortune, 1986).

### **P450C17 (P450 17 $\alpha$ -hydroxylase)**

L'enzyme P450C17 est une enzyme capable de catalyser deux réactions, une 17 $\alpha$ -hydroxylation et une activité de clivage en C17 et C21 et le ratio de ces deux activités peut varier selon les tissus. Au niveau des gonades, on a plus d'activité de clivage en C17 et C21, ce qui résulte en une plus grande production de DHEA ou de l'androstènedione. L'activité du complexe enzymatique du P450C17 est nécessaire pour convertir soit la prègnénone ou la progestérone en leurs produits respectifs, DHEA et androstènedione : ces deux voies alternatives sont identifiées par la voie 5-ène-3 $\beta$ -hydroxy ( $\Delta$ 5) et 4-ène-3 $\beta$ -hydroxy ( $\Delta$ 4). Cette enzyme est localisée dans le réticulum endoplasmique. L'enzyme est présente dans les cellules de la thèque interne du follicule ovarien et aussi dépendamment de l'espèce dans le corps jaune. L'expression de P450C17 dans le placenta est spécifique à l'espèce et au stade de développement. Chez la vache, il y a augmentation de l'expression de la P450C17 vers la fin de la gestation, qui résulte en une forte production d'œstradiol au détriment de la progestérone (Hinshelwood, 1999). L'expression de la P450C17 dans les gonades, est régulée par la LH via l'AMPc (Hinshelwood, 1999).

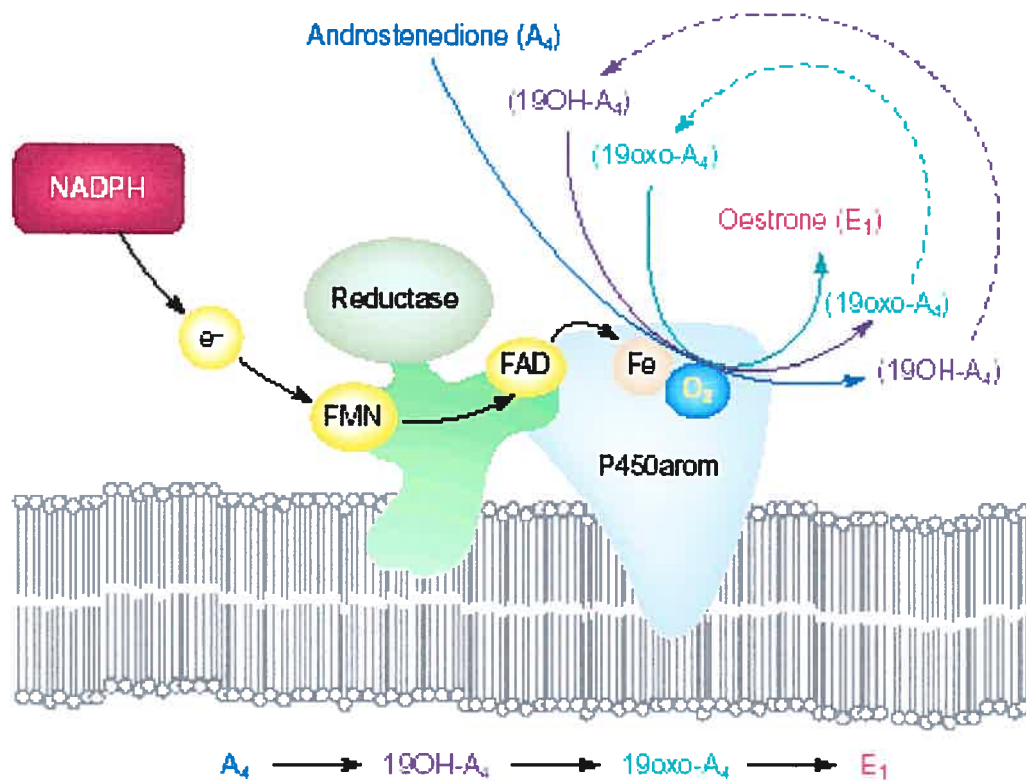
### **17 $\beta$ -HSD (17 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase)**

L'enzyme est responsable de l'étape finale de production des androgènes. L'enzyme catalyse l'interconversion des 17-cétostéroïdes en leurs correspondants 17 $\beta$  hydroxystéroïdes (androstènedione en testostérone de même que la testostérone en androstènedione; oestrone en oestradiol; Hinshelwood, 1999). Il existe différents isoformes dont l'expression et le substrat préférentiel utilisé diffèrent en fonction des tissus (Hinshelwood, 1999). Chez l'humain, on distingue 5 isoformes de 17 $\beta$ -HSD. Le type 1 est cytosolique et catalyse préférentiellement la réduction de l'oestrone en oestradiol dans les cellules intactes avec le NADPH comme cofacteur. L'enzyme est présente à des niveaux très faibles dans les tissus extra gonadiques mais elle est très abondante au niveau du syncytiotrophoblaste du placenta et des cellules de granulosa du follicule ovarien. Le type 2 est microsomal et catalyse préférentiellement les oxydations des hydroxystéroïdes en C18, C19 et C21 à la position C17 avec NAD<sup>+</sup> comme cofacteur. Il est exprimé principalement dans l'endomètre et faible dans le placenta et le foie. Le type 3 est aussi microsomal et se présente principalement dans les testicules où il catalyse la réduction de l'androstènedione en testostérone avec le NADPH comme cofacteur. Le type 4 se retrouve dans les peroxysomes de la plupart des tissus et catalyse la conversion oxydative de l'oestradiol en oestrone en présence de NAD<sup>+</sup> et peut servir comme moyen pour inactiver l'oestradiol 17- $\beta$  dans les tissus

périphériques. Le type 5 est présent dans le cytosol, principalement dans le foie et les muscles squelettiques, il catalyse la réduction des stéroïdes en C 19 et C 21 en présence de NADPH. Chez le rat, l'expression de 17 $\beta$ -HSD augmente pendant le développement folliculaire et diminue avec la lutéinisation (Ghersevich et coll., 1994).

### **P450arom ( P450 aromatase)**

L'enzyme P450aromatase (P450arom) est un produit du gène CYP19 et elle est localisée dans les microsomes. Elle est l'enzyme responsable de la conversion des stéroïdes à C19 en 4 ène-C19, soit androstènedione en oestrone et la testostérone et en oestradiol (Figure 5). L'ovaire chez le ruminant produit principalement de l'œstradiol 17- $\beta$ , alors que le placenta produit l'oestriol et le tissu adipeux souvent l'œstrone. Dans l'ovaire, P450arom est exprimée dans les cellules de granulosa qui représente le site majeur pour la production des œstrogènes chez la femelle (Sasano et coll., 1989). Le complexe enzymatique de l'aromatase est nommé ainsi à cause de la structure aromatique du produit formé. L'aromatase est composée de deux polypeptides NADPH-cytochrome P450 réductase qui est une flavo protéine ubiquiste et le cytochrome P450aromatase (Simpson et coll., 1994a). L'aromatase catalyse par oxydation une cascade de réactions aboutissant à l'enlèvement du groupement méthyle au niveau du C-10, donnant ainsi naissance à l'acide formique, suivi d'un réarrangement de l'anneau A en



**Figure 5 : Représentation schématique du complexe enzymatique de l'aromatase (P450arom et le NADPH-cytochrome-P450)**

La réaction nécessite le NADPH, et 3 moles d'O<sub>2</sub> et implique trois hydroxylations.

(Conley et Hinshelwood, 2001)

structure aromatique (Brown, 1999). La réaction implique deux hydroxylations consécutives au niveau du groupement méthyle du C19 (activité 19-hydroxylase) du substrat, formant ainsi 19-hydroxy-A4 et éventuellement 19-oxo-A4 (Figure 5) et une troisième réaction d'oxydation, aboutit au clivage du groupement méthyle en C-19 (activité desmolase ou 19-déméthylase). L'androstènedione et la testostérone sont les substrats préférentiellement utilisés (Conley et Hinshelwood, 2001). Même si le placenta chez l'humain peut utiliser le 16-hydroxyandrostènedione pour la synthèse d'oestriol, le 16-OH étant produit par le foie du fœtus suite au métabolisme des DHEAs durant la gestation. La réaction de l'aromatase n'est pas toujours complétée, les produits intermédiaires tels que 19-OH et 19-oxo-A4 et testostérone sont relâchés durant le métabolisme des androgènes, ils sont considérés comme des produits additionnels. Il semble que la libération de ces produits augmente quand l'expression de la réductase n'est pas adéquate pour saturer la P450arom (Swinney et coll., 1993).

Les petits follicules expriment très peu ou pas de P450arom (Bao et coll., 1997a), au fur et à mesure que le follicule s'acroît, il y a expression de plus en plus d'ARNm P450arom (Xu et coll., 1995; Bao et coll., 1997a) avec un maximum au niveau du follicule dominant (Evans et Fortune, 1997). L'expression de P450arom est induite principalement par la FSH durant la phase folliculaire du cycle oestral, juste avant l'émergence de la vague folliculaire (Adams et coll., 1992). La FSH a un effet biphasique au niveau des cellules de granulosa in vitro, dans la mesure où de faibles doses (1 ng/ml) stimulent et de fortes doses (100 ng/ml) ont un effet inhibiteur (Manuel silva et

Price, 2000). L'insuline et l'IGF 1 sont nécessaire à l'induction de l'aromatase par la FSH (Silva et Price, 2002).

## RÉGULATION DU DEVELOPPEMENT FOLLICULAIRE

### Gonadotrophines

Les hormones gonadotrophes folliculo-stimulante (FSH) et lutéinisante (LH) sont des hormones glycoprotéiques sécrétées par l'hypophyse antérieure sous l'influence de l'hormone de relâche des gonadotrophines (GnRH) sécrétée par l'hypothalamus (Van Voorhis, 1999).

De nos jours, il est assez évident que la FSH et la LH jouent un rôle très important dans le développement folliculaire. Les études effectuées sur des souris et des rats hypophysectomisés sont venues élucider le rôle de ces deux gonadotrophines. En effet, la FSH seule peut stimuler la croissance folliculaire et même l'ovulation chez certaines espèces dont le rat mais pas chez la vache.

La phase de croissance exponentielle du follicule ovarien dépend principalement des gonadotrophines, le développement du follicule antral au stade ovulatoire implique une division accrue des cellules de granulosa ainsi qu'une augmentation de la stéroïdogénèse folliculaire qui sont tous les deux sous le contrôle des hormones gonadotrophes.

L'entrée en croissance des follicules primordiaux peut avoir lieu en absence des gonadotrophines (Campbell et coll., 2000; Fortune et coll.,

2000). Cependant, les études traitant de l'expression des gènes dans les follicules préantraux ont démontré que les récepteurs FSH peuvent être détectés dans les follicules avec un ou deux couches de cellules (Bao et Garverick, 1998) et que plus tard dans le développement, la FSH peut accélérer le développement aussi bien in vivo (Campbell et coll., 2000) qu'in vitro (Gutierrez et coll., 2000). Le mécanisme de la régulation de l'activation des follicules primordiaux demeurent très obscur. Juste après la formation de la thèque interne, il y a expression d'ARNm codant pour les enzymes stéroïdogéniques, telles que la P450scc, P450C17 et la 3 $\beta$ -HSD. L'expression de P450arom est spécifique aux cellules de granulosa, elle est détectée plus tard dans les follicules antraux (Bao et Garverick, 1998) même si les follicules sont capables de produire de l'œstradiol très tôt durant leur développement (Thomas et coll., 2001).

L'émergence de la vague folliculaire est précédée par une augmentation des concentrations de la FSH (Adams et coll., 1999; Sunderland et coll., 1994) et le pic de la FSH est observé 1 à 2 jours avant la détection des follicules de 4 à 5 mm par ultrasonographie. Ceci étant bien confirmé par les études de Campbell (2003) lesquelles ont démontrées que le liquide folliculaire et l'œstradiol induisent significativement la croissance et le développement folliculaire des vaches hypogonadotrophiques. Par ailleurs, l'effet de la FSH a été démontré en utilisant un agoniste de GnRH (Garverick et coll., 2002) ce qui résulte en l'arrêt de la croissance folliculaire à environ 4 mm de diamètre. Cependant après traitement avec de la FSH, on a stimulé la



croissance folliculaire  $\geq 8,5$  mm, de même on a pu stimuler l'expression de l'ARNm codant pour les enzymes stéroïdogéniques telles que P450scc, P450arom dans les cellules de granulosa et P450C17 dans les cellules de la thèque (Webb et coll., 2003) ce qui confirme le rôle de la FSH dans la croissance folliculaire et la différenciation cellulaire.

De plus le développement d'un système de culture sans sérum par Campbell et coll., (1995) et Gutierrez et coll., (1997) capable de maintenir le phénotype folliculaire de lutéinisation a permis d'étudier le rôle des facteurs impliqués dans la régulation locale de la fonction ovarienne. Le système de culture a été utilisé pour démontrer le rôle de la FSH dans l'induction de la production d'œstradiol par les cellules de granulosa (Gutierrez et coll., 1997) et que cette induction est liée à une augmentation de l'expression de l'ARNm codant pour P450arom (Silva et Price, 2000). Ce même système de culture est utilisé pour identifier un grand nombre de facteurs locaux impliqués dans la régulation de la croissance folliculaire, incluant les membres de la famille de TGF $\beta$ , FGF et EGF/TGF $\alpha$  (Armstrong et Webb, 1997; Webb et coll., 1999).

La sélection du follicule dominant est associée à une diminution des concentrations de la FSH; en effet un traitement avec de la FSH recombinante, empêche l'émergence du follicule dominant (Mihm et coll., 1997). Cette diminution de la FSH pourrait être due à la sécrétion d'œstradiol par le follicule dominant (Ginther et coll., 2000a) ou par d'autres facteurs retrouvés dans le liquide folliculaire comme l'inhibine (Price, 1991). Le

follicule dominant peut continuer sa croissance et tirer profit des faibles concentrations de la FSH soit en augmentant la sensibilité des follicules à la FSH, ou alors en transformant les cellules dépendantes de la FSH en cellules dépendantes de la LH (Ginther 2000). Le mécanisme de la sélection du follicule ovulatoire semble être lié au moment de l'expression de l'ARNm codant pour le récepteur à la LH (LHr) et 3 $\beta$ -HSD dans les cellules de granulosa (Bao et coll., 1997a,b).

La LH joue un rôle très important dans la régulation de la fonction ovarienne, elle est responsable de l'ovulation et de la transformation des cellules folliculaires en cellules lutéales (Smith et coll., 1994). Une augmentation transitoire des concentrations de la LH plasmatique correspond au début de la déviation folliculaire (Ginther, 2000). Une diminution des concentrations de la LH interfère avec la croissance du follicule dominant mais ce dernier n'atteint pas le profil de croissance et de développement du follicule subordonné (Ginther et coll., 2001). La LH favorise l'augmentation de la sécrétion d'œstradiol par une augmentation de l'androstènedione. En effet, la LH stimule la thèque qui libère l'androstènedione qui est absorbée par les cellules de granulosa qui le convertit en oestradiol sous contrôle de la FSH.

Les gonadotrophines FSH et LH jouent également un rôle dans la stéroïdogénèse par le modèle assez connu de « deux cellules, deux gonadotrophines » (Fortune 1986) : les deux hormones FSH et LH, de même que les deux types de cellules granulosa et thèque sont nécessaires pour la production d'œstradiol. L'œstradiol est synthétisé par l'enzyme P450arom présente dans les cellules de granulosa. La LH stimule les cellules de la

thèque qui libèrent de l'androstènedione. Ce stéroïde est absorbé par les cellules de granulosa qui le convertit en œstradiol sous contrôle de la FSH.

Les expériences visant à réduire les pulsations de la LH en utilisant de la progestérone exogène ont aussi affecté la croissance du follicule dominant par une augmentation des protéines de liaison IGFBP 2 dans le liquide folliculaire, une réduction de la taille et possiblement une perte de la dominance et atresie (Bao et coll., 1995; Ginther et coll., 2001). En absence de la LH, la sécrétion d'œstradiol par le follicule demeure faible car la production des androgènes par la thèque est limitée.

### **Récepteurs aux gonadotrophines**

La localisation et la quantification de l'ARNm codant pour les récepteurs gonadotrophiques FSHr et LHR ont été caractérisées (Bao et Garverick, 1998; Webb et coll., 1999a). Au fur et à mesure que le follicule se développe et augmente de taille, il y a augmentation simultanée des récepteurs à la FSH sur les cellules de granulosa et les récepteurs LH sur les cellules de la thèque. Le récepteur LH est exprimé dans les cellules de granulosa entre deux et quatre jours après l'émergence de la vague folliculaire (Xu et coll., 1995) ceci correspond au moment de la déviation quand le follicule dominant se différencie du follicule subordonné (Kulick et coll., 1999). L'expression du récepteur à la LH, de même que sa liaison au ligand sur les cellules de granulosa étant associée au follicule dominant dont le diamètre est supérieur

à 9 mm (Xu et coll., 1995a; Bao et coll., 1997; Ireland et Roche., 1982; Webb et England, 1982).

### **Facteurs intra-ovariens**

Les facteurs de croissance jouent un rôle fondamental dans la prolifération et la différenciation cellulaire. Les facteurs de croissance sont subdivisés en familles sur la base de leur structure et de leur activité biologique. On distingue la famille des somatomedines (IGF 1), la famille du facteur de croissance épidermique (EGF), facteurs de croissance fibroblastique (FGF) et facteurs de croissance transformant  $\beta$ (TGF $\beta$ ). Ici, on décrit l'importance de la famille IGF pour la folliculogénèse, et ne mentionnons les autres familles que brièvement.

#### ***La famille des IGFs***

Le système IGF 1 comprend deux ligands (IGF 1 et IGF 2), un récepteur à l'IGF de type 1 (IGFR) et six différentes protéines de liaison de l'IGF (IGFBP) qui empêche l'interaction avec le récepteur en se liant fortement au ligand. Récemment, on a identifié des protéases spécifiques à la protéine IGFBP4, il s'agit de PAPP A pour «Pregnancy-associated-plasma-protéine-A»(Spicer et Echterkamp, 1995; Rivera et coll., 2001; Mazerbourg et coll.,2001). IGF 1 et IGF 2 stimulent l'activité mitotique des cellules ovariennes et augmentent l'effet stimulateur des gonadotrophines sur la

stéroïdogénèse (Webb et coll., 1999b; Lucy, 2000; Spicer et Echterkamp, 1995; Monget et coll., 2002; Giudice et coll., 2002). Ils stimulent la croissance folliculaire en culture (Gutierrez et coll., 2000). Le rôle des facteurs de croissance dans le développement folliculaire dépend des gonadotrophines et du stade de différenciation (Webb et coll., 2003).

La spécificité de ces facteurs de croissance pour l'ovaire dépend de l'espèce; chez l'humain, on retrouve l'IGF 2 dans les cellules de granulosa mais pas IGF 1 (Spicer et Echterkamp, 1995; Giudice, 2001; Geisthovel et coll., 1989) alors que chez le rat, c'est l'inverse, on retrouve IGF 1 (Spicer et Echterkamp, 1995; Adashi et coll., 1997). Cependant, chez la vache, les cellules de granulosa expriment les deux (Spicer et Echterkamp, 1995; Armstrong et coll., 2000) mais IGF 1 est le mieux utilisé par les cellules de granulosa. D'autres études par contre ont démontré que l'expression de l'ARNm IGF 2 est plus abondant que l'ARNm IGF 1 et que IGF 2 serait donc le régulateur majeur de la croissance des follicules antraux (Armstrong et coll., 1998, 2000; Webb et coll., 1999).

Des études réalisées *in vitro* ont démontré que l'IGF 1 et l'insuline agissent en synergie avec la FSH pour réguler directement la fonction ovarienne au niveau du follicule, principalement l'activité aromatasase (Gutierrez et coll., 1997; Spicer et coll., 2002). Dépendamment des concentrations de la FSH, l'IGF 1 stimule non seulement la prolifération des cellules de granulosa et la synthèse d'oestradiol mais aussi la sécrétion d'inhibine et d'activine *in vitro* (Glister et coll., 2001).

Dans la plupart des espèces, la croissance folliculaire aussi bien que l'atréxie sont souvent associées aux protéines de liaisons IGFBPs (Stewarts et coll., 1996). Il existe au moins six protéines d'environ 22-45 KDa qui se lient soit à l'IGF 1 ou à IGF 2, soit pour permettre de prolonger sa demi-vie ou dans la plupart des cas bloquer son action (Hwa et coll., 1999; Ui et coll., 1989; Spicer et coll., 1997). Différentes protéines vont se retrouver dans les différentes cellules (granulosa et thèques) dépendamment de l'espèce. Un exemple, les cellules de granulosa chez la vache produisent principalement IGFBP2, 4 et 5 alors que chez l'humain, on retrouve juste IGFBP2 et 5 (Spicer et Chamberlain, 2002). De plus, l'activité oestradiol d'un follicule est inversement proportionnelle aux concentrations des IGFBP intra-folliculaires (Echternkamp et coll., 1994; Mazerbourg et coll., 2000).

Une réduction des protéines de liaison IGFBP4 et 5 et donc un très haut niveau d'IGF 1 disponible semble essentiel à la sélection du follicule dominant, lui permettant de survivre et de poursuivre son développement malgré les faibles concentrations de FSH. La présence de ces protéines de liaisons est régulée entre autres, par la présence de protéases et il semblerait que la présence de ces protéases et leurs affinités pour chacune des protéines dans le liquide folliculaire dépendent également de l'espèce. Parmi les protéases identifiées à ce jour, on retrouve PAPP-A (Spicer et coll., 2001) et PAPP-A2 (Overgaard et coll., 2001).

Des études récentes, ont montré que l'expression de PAPP-A au niveau folliculaire est directement proportionnelle à l'aromatase (Mazerbourg et coll., 2001) par contre, il n'y a pas de différence dans l'expression de

l'ARNm codant pour PAPP-A entre le follicule préovulatoire et le follicule subordonné. Le mécanisme d'action et de régulation de ces protéases dans le liquide folliculaire demeure inconnu.

Une deuxième famille est représentée par les deux facteurs de croissance épidermique (EGF) et transformant ( $TGF\alpha$ ). Ces facteurs sont des polypeptides qui partagent le même récepteur (récepteur du facteur de croissance épidermique; EGF-R), localisé dans les cellules de granulosa d'une variété d'espèces. Leurs concentrations dans le liquide folliculaire diminuent avec le développement folliculaire. Des études réalisées in vitro suggèrent que ces deux facteurs stimulent la prolifération des cellules de granulosa et inhibent la production d'oestradiol, ils agissent donc comme des inhibiteurs de la différenciation cellulaire (Van Voorhis, 1999).

La famille des facteurs de croissances transformants  $TGF\beta$  comprend plusieurs membres d'étroite parenté et un nombre croissant de polypeptides de structure plus éloignée. Actuellement, six  $TGF\beta$  homologues sont connus :  $TGF\beta$ 1, 2, 3, 4, 5 et 6. Parmi les analogues structuraux de la  $TGF\beta$ , on trouve l'inhibine, l'activine et la follistatine. L'expression de l'ARNm de  $TGF\beta$  et sa protéine a été démontré au niveau des cellules de la thèque interne, de la granulosa et des cellules lutéales, avec une augmentation relative de leurs concentrations en fonction du stade de développement folliculaire. Il exerce un effet stimulateur sur la prolifération des cellules de granulosa, (Van

Voorhis, 1999) cependant son importance dans la physiologie de l'ovaire n'est pas très claire.

L'inhibine est une glycoprotéine hétérodimère composée d'une sous unité  $\alpha$  et d'une ou deux sous unités  $\beta$ , alors que l'activine est formée de deux sous- unités  $\beta$ . La follistatine est une protéine de liaison de grande affinité pour l'inhibine et l'activine. Chez les ruminants, l'inhibine est sécrétée par les cellules de granulosa (Torney et coll., 1989). Les follicules oestrogéniques, non atrétiques contiennent moins d'inhibines dimériques et donc actives que les follicules atrétiques (Price et coll., 1995a). De part leurs rôles modulateurs sur la sécrétion des gonadotrophines (FSH) par l'hypophyse, des études réalisées in vitro suggèrent que l'inhibine agit également sur les cellules de la thèque pour stimuler la production d'androgènes, alors que les activines stimulent la prolifération et l'expression de l'aromatase par les cellules de granulosa.

La follistatine, quant à elle, semble jouer un rôle indirect en se liant soit à l'inhibine, soit à l'activine et en réduisant leurs activités biologiques (Van Voorhis, 1999).

La famille des facteurs de croissance fibroblastiques (FGF) compte environ 23 membres, dont le FGF basique (ou FGFb) qui est le plus connu. FGFb est produit dans divers tissus dont les cellules de granulosa et stimule la prolifération des cellules de la thèque interne (Spicer et Stewart, 1996) et de la granulosa et inhibe la stéroïdogénèse des cellules de la thèque. FGFb inhibe la différenciation des cellules de granulosa (Vernon et Spicer, 1994) et



donc la production de l'oestradiol et même l'acquisition des récepteurs à la LH par les cellules de granulosa chez le rat (Baird et Hsueh, 1986). Par sa fonction angiogénique, le FGF serait impliqué dans la formation du corps jaune et de son organisation (Adashi et coll., 1992).

## **CONTRÔLE DU DÉVELOPPEMENT FOLLICULAIRE**

Chez la vache, chaque vague folliculaire est précédée par une augmentation des concentrations plasmatiques de la FSH (Lucy et coll., 1992; Adams et coll., 1992; Fortune, 1994), qui induit le recrutement d'une vague folliculaire. Les caractéristiques associées à ce phénomène de recrutement est l'apparition de l'activité aromatasase et l'expression de l'ARNm codant pour P450arom et P450scc dans les cellules de granulosa (Xu et coll., 1995b; Bao et coll., 1997) qui seraient stimulées par la FSH au début d'une vague folliculaire. L'activité de l'aromatase est d'abord détectée dans les follicules ayant un diamètre de 3 à 4 mm (Ginther et coll., 1996; Driancourt et coll., 1996). Elle se traduit par une production d'oestradiol qui augmente avec le développement folliculaire. Les follicules vont par la suite contribuer à réduire les concentrations de la FSH (Gibbons et coll., 1999). Ainsi lorsque le follicule dominant atteint un diamètre d'environ 8.5 mm, il y a déviation folliculaire (Ginther et coll., 1996). Deux caractéristiques fondamentales du follicule dominant sont requises pour la déviation (Ginther, 2001). Il s'agit de la capacité à réduire la FSH plasmatique à des niveaux inférieurs aux besoins des autres follicules en croissance et l'acquisition d'un

plus grand nombre de récepteurs à la FSH lui permettant de tirer profit des faibles quantités de FSH plasmatique (Ginther, 2001) et de sécréter de plus en plus d'oestradiol (Evans et coll., 1997). Ceci contribue à l'acquisition des récepteurs à la LH par les cellules de granulosa.

Certaines études suggèrent que l'acquisition des récepteurs à la LH par les cellules de granulosa augmenterait l'expression de l'aromatase suite à une stimulation non seulement par la FSH mais aussi par la LH, d'autres par contre avancent l'hypothèse que les cellules vont se transformer de FSH dépendante en LH dépendante ce qui va contribuer à maintenir une forte production de l'oestradiol. Cependant chez la vache, il n'existe aucune étude à ce jour démontrant la stimulation de la production de l'oestradiol dans les cellules de granulosa par la LH. Au contraire, de fortes doses de LH (simulant le pic de la LH) inhibe la sécrétion d'oestradiol mais pas de la progestérone (Berndtson et coll., 1995). Ce qui n'est pas le cas pour les cellules de granulosa des primates et du rat pour lesquels la LH stimulerait l'aromatisation des androgènes dans les follicules préovulatoires (Willis et coll., 1998, Fortune et coll., 1986). Cependant dans ces espèces même le corps jaune synthétise de l'oestradiol. Certaines études réalisées chez les primates (Zelevnik, 2001) et chez les ovins (Campbell et coll., 1999) appuient l'hypothèse que la LH est critique pour la survie du follicule dominant après la chute de la FSH; cependant le mécanisme par lequel la LH maintient la production d'oestradiol n'est pas aussi clair. Il y a une hypothèse qui stipule que les cellules de la thèque pourraient être la première cible pour la LH durant cette période de développement folliculaire et les androgènes produits

par les cellules de la thèque seraient un facteur limitant pour la production de l'oestradiol par le follicule dominant. Il y a évidence que la production de la progestérone par les cellules de granulosa augmente la production des androgènes par les cellules de la thèque en augmentant la quantité des précurseurs disponibles (Fortune, 1986), alors que la LH augmente la production de progestérone par les cellules de granulosa des follicules dominants et indirectement la production d'oestradiol.

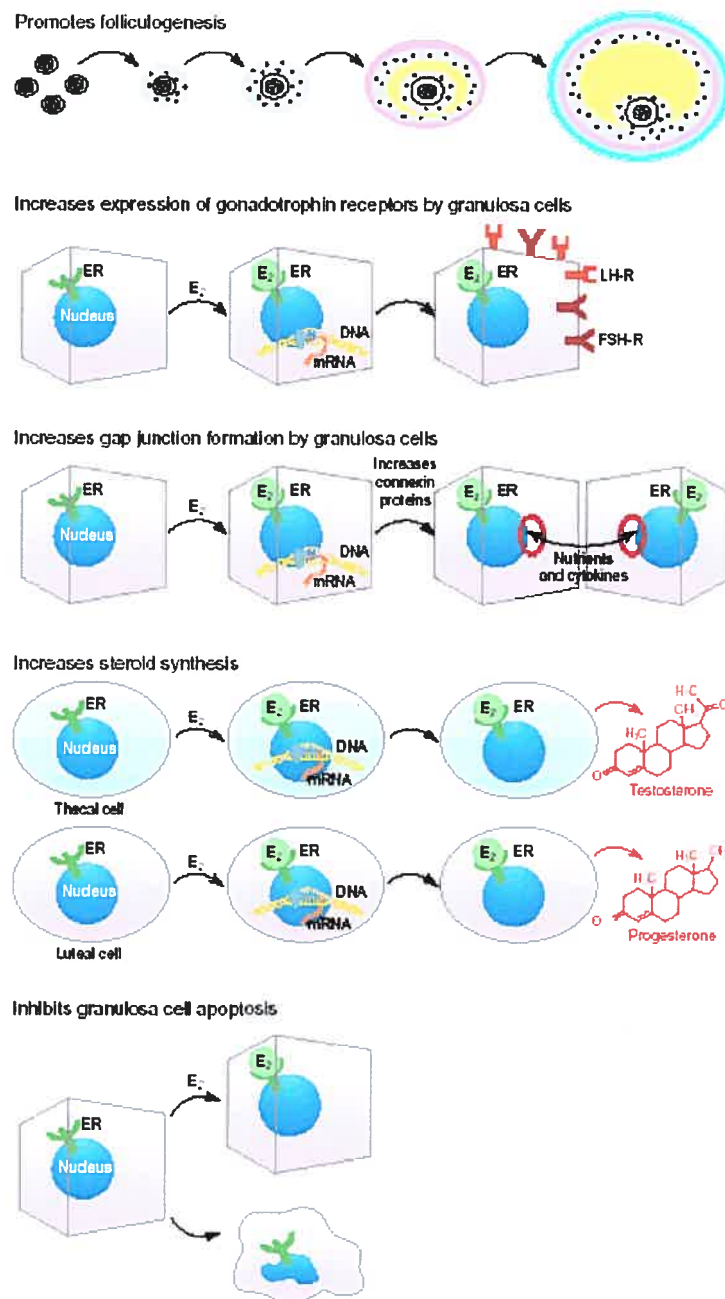
Une forte production d'oestradiol principalement par le follicule dominant provoquerait une diminution de la concentration de la FSH (Ginther, 2001). Cette diminution de la FSH est souvent associée à la sélection du follicule dominant (Adams et coll., 1992; Ginther, 2000). Ces faibles concentrations de FSH sont maintenues à des niveaux inférieurs aux besoins des follicules subordonnés plus petits (Ginther, 2001). De plus, l'oestradiol semble avoir aussi un rôle dans l'acquisition des récepteurs à la LH par les cellules de granulosa de rats (Richards et coll., 1987). Plusieurs études suggèrent que l'acquisition des récepteurs à la LH par les cellules de granulosa joue un rôle important dans la sélection du follicule dominant (Jolly et coll., 1994; Gong et coll., 1995; Xu et coll., 1995a; Bao et coll., 1997). Ce follicule dominant ainsi sélectionné exerce un effet inhibiteur afin d'empêcher le recrutement d'une nouvelle cohorte de follicules d'une nouvelle vague folliculaire (Lucy et coll., 1992; Fortune, 1994). Si la croissance du follicule dominant coïncide avec la présence d'un corps jaune actif, ce follicule subira l'atrésie due à l'absence de fortes concentrations de la LH (Webb et coll., 1992) et une nouvelle vague folliculaire s'amorce. Cependant, s'il coïncide

avec la régression du corps jaune, le follicule va continuer à se développer davantage et va sécréter de plus en plus d'oestradiol capable de déclencher l'ovulation ( Kastellic et coll., 1990a; Lucy et coll., 1992; Stock et fortune, 1993) (Figure 3).

## **RÔLE DES OESTROGÈNES DANS LE DÉVELOPPEMENT FOLLICULAIRE**

Les œstrogènes jouent un rôle très important dans la régulation des hormones hypothalamiques et hypophysaires qui vont contrôler à leur tour la fonction ovarienne (Figure 6), Les androgènes sont généralement produits par les cellules de la thèque et sont utilisés par les cellules de la granulosa qui les convertissent en oestrogènes principalement en oestradiol par l'enzyme P450arom

Chez le porc (Lautincik et coll., 1994), les cellules de la thèque peuvent aussi synthétiser des oestrogènes. Les oestrogènes ainsi produits sont relâchés dans le système vasculaire pour aller agir soit au niveau de l'utérus, de l'hypothalamus, de la glande mammaire et bien d'autres organes. Les oestrogènes peuvent aussi exercer localement un effet sur l'ovaire. Les œstrogènes favorisent le développement folliculaire, la formation du corps jaune, l'expression des récepteurs aux gonadotrophines par les cellules de granulosa, et la formation des jonctions lacunaires perméables.



**Figure 6 :Schéma montrant les différents rôles des oestrogènes dans le développement folliculaire (Rosenfeld et coll., 2001)**

### **Effet sur la folliculogénèse**

Au fur et à mesure que le follicule s'accroît, il y a production d'importantes quantités d'oestrogènes, ce qui va stimuler la synthèse et la relâche des hormones gonadotrophes FSH et LH, favorisant ainsi la croissance folliculaire (Fortune 1994). Certaines études ont démontré que les estrogènes augmenteraient directement le nombre et la taille des follicules in vivo et la taille des follicules préantraux du rat, souris et vache en culture (Goldenberg et coll, 1972; Gore-Langton et Daniel, 1990). Cependant il y a d'autres études qui n'ont pas appuyé ces résultats (Spears et coll, 1998).

### **Effet sur l'expression des récepteurs gonadotrophiques**

Les oestrogènes augmentent l'expression des récepteurs FSH et LH dans les cellules de granulosa de rat (Richards et coll., 1979). Il semblerait que les follicules qui produisent plus d'oestradiol sont susceptibles d'avoir plus de récepteurs gonadotrophiques (Richards et coll., 1979). Cependant, les études réalisées sur les souris "knock-out" pour le gène du récepteur à l'oestradiol de type  $\alpha$  ont montré une augmentation dans l'expression des récepteurs à la LH par les cellules de la thèque et de la granulosa (Schomberg et coll., 1999); on n'a pas d'information sur l'expression des récepteurs aux gonadotrophines par les souris knock-out pour le récepteur  $\beta$  ou  $\alpha$  et  $\beta$ .

## L'AROMATASE DANS LE DÉVELOPPEMENT FOLLICULAIRE

La capacité à synthétiser d'importantes concentrations d'oestradiol par un follicule est souvent synonyme de santé (Ireland et Roche., 1983; Badinga et coll., 1992; Sunderland et coll.,1994; Mihm et coll,1997; Austin et coll., 2001). Cette forte capacité à synthétiser l'oestradiol est souvent liée à une augmentation de l'expression des gènes pour P450arom, mais aussi à une augmentation de 3 $\beta$ -HSD et FSHr et l'acquisition de LHr par les cellules de granulosa (Ireland et Roche., 1983; Xu et coll., 1995; Bao et coll., 1997a,b; Evans et Fortune., 1997)

### Structure du gène de l'aromatase (CYP19)

L'enzyme clé de la biosynthèse des oestrogènes est le cytochrome P450arom, elle est codée par le gène CYP19. Chez la vache, le gène a été localisé sur le chromosome 10 en position q2.6 (Goldammer et coll. 1994). Le gène CYP19 a été cloné et caractérisé pour la première fois chez l'humain (Mean et coll., 1989; Harada et coll., 1990), ensuite chez le rat (Hickey et coll., 1990.), la vache (Hinshelwood et coll., 1993), le porc (Conley et coll., 1997a) et chez le poisson (Shen et coll., 1994) entre autres. La majorité des études effectuées chez des mammifères portant sur les gènes qui codent pour P450arom ont démontré que l'enzyme P450arom est codée par un seul gène sauf chez le porc. Ainsi, P450arom exprimée dans les différents tissus représente seulement une protéine, qui elle est constituée d'une seule

séquence d'acides aminés. Le porc étant le seul mammifère connu à exprimer trois transcrits, issus de trois gènes distincts, qui codent pour différentes enzymes à savoir celle exprimée dans les gonades (Corbin et coll., 1995), dans le placenta (Corbin et coll., 1995) et dans le trophoblaste (Choi et coll., 1996). Chez la vache, on a rapporté l'existence d'un pseudogène de l'aromatase qui est le résultat d'une duplication (Vanselow et Fürbass, 1995).

Le gène CYP19 bovin est composé d'au moins 14 exons ( 1.1; 1.2a; 1.2b; 1.3; 1.4 et 2 – 10 ) comprenant plus de 56 kb d 'ADN génomique. La région codante se résume au exons 2 – 10 (Furbass et coll., 1997). Elle comprend 1509 pb et présente 87, 78, 78% d'homologie de séquence avec l'humain, le rat et la souris respectivement. La taille des transcrits diffère considérablement dépendamment de l'espèce . On distingue deux transcrits de 3,4 et 2,9 Kb chez l'humain, trois transcrits de 2,7; 2,2 et 1,7 kb chez le rat (Mendelson et Simpson, 1987, Hickey et coll.,1990), et trois transcrits chez la vache de 6,5; 3,4 et 1,8 kb (Soumano et coll., 1996). La longueur du transcrit chez la vache comparée à l'humain est principalement due à la longue région 3'non-traduite (3'-UTR) chez la vache (Vanselow et Fürbass, 1995). De multiples promoteurs peuvent être impliqués dans l'expression spécifique tissulaire parmi lesquels on trouve le promoteur 1.1 et 1.3 exprimés principalement au niveau du placenta chez la vache, le promoteur 1.4 au niveau du cerveau (Furbass et coll., 1997). La technique appelée 5' RACE (amplification rapide de l'ADN complémentaire du bout 5') et l'extension des amorces a permis d'identifier 6 transcrits du gène CYP19 qui sont différents



par leur région 5' non-traduite, alors que la région codante reste identique. Aussi deux des 6 transcrits ont montré une homologie avec les différentes espèces, il s'agit de l'exon 1.4 et les premières 152 pb de l'exon 2 alors que les exons 1.1; 1.2a; 1.2b et 1.3 n'ont montré aucune homologie de séquence avec les autres espèces. Ces derniers sont principalement exprimés dans le placenta alors que les transcrits comprenant l'exon 2 prédominent dans les cellules de granulosa et les transcrits 1.4 dans le cerveau. Les transcrits du gène se retrouvent à différentes concentrations avec le plus haut niveau dans les cellules de granulosa et du placenta, des niveaux intermédiaires dans les testicules et le cerveau et des niveaux faibles dans le foie et la glande surrénale. (Fürbass et coll., 1997).

En raison de la place très importante qu'occupe l'enzyme dans le succès de la reproduction de toutes les espèces, il apparaît évident qu'il y a une conservation du gène, ceci étant bien élucidé par des études comparatives entre les espèces, sur les promoteurs et les régions non traduites responsables de l'expression spécifique tissulaire. Ces études ont révélé un très haut niveau de conservation parmi les espèces. L'ADNc et le gène cloné d'un bon nombre d'espèces (aquatiques, quelques oiseaux et plusieurs mammifères) ont démontré que la conservation est particulièrement évidente au niveau du premier exon et du promoteur des gonades et du cerveau. De plus l'analyse des séquences génomiques révèle une très grande homologie. La séquence qui lie le facteur stéroïdogénique SF1, séquence essentielle à l'expression d'un grand nombre d'enzymes stéroïdogéniques (Lala et coll., 1992) ainsi que la boîte TATA sont

parfaitement conservées entre l'homme, la vache, le rat et la poule. De ce fait, il existe une forte conservation non seulement de la séquence en générale mais aussi des éléments de réponse.

### **Expression du gène de l'aromatase (CYP19)**

Sachant que le gène CYP19 joue un rôle très important dans le développement et la régulation du cycle reproductif de la femelle, il est considéré comme candidat potentiel pouvant affecter la performance de la fertilité chez l'espèce bovine; dans ce contexte un intérêt particulier est accordé quant au mécanisme de la régulation du gène et l'expression spécifique tissulaire. Au niveau de l'ovaire, l'expression de l'aromatase est plus importante dans les cellules de granulosa des follicules préovulatoires que des petits follicules (Hickey et coll., 1988). Certaines espèces, comme l'humain et les rongeurs peuvent exprimer l'aromatase au niveau du corps jaune (Doody et coll, 1990). Chez le porc, on a rapporté l'expression de l'aromatase dans les cellules de la thèque interne des follicules préovulatoires, de la surrénale fœtale et du trophoblaste du blastocyste chez le cheval (Walters et coll., 2000).

Chez l'humain, en plus de son expression dans le cerveau et les gonades, l'aromatase est aussi présente dans plusieurs tissus à savoir le placenta (syncytiotrophoblaste), cellules stromales du tissu adipeux, cellules ostéoblastiques dans l'os, les cellules fibroblastiques de la peau, certaines portions du système vasculaire et certains tissus fœtaux comme le foie

(Simpson et coll., 1994; Harada et coll., 1999). L'expression de l'aromatase dans le placenta n'est pas attribuée juste à l'humain, mais également chez la vache (Fürbass et coll., 1997), le porc (Conley et coll., 1997a) et le cheval (Marshall et coll., 1996). Par ailleurs, il semble que le tissu adipeux chez la vache et le placenta et le tissu adipeux chez les rongeurs ne synthétisent pas d'oestradiol (Simpson et coll., 1994a). Chez l'humain et la vache, l'expression spécifique tissulaire du gène est régulée par l'utilisation de différents promoteurs. Ceci résulte en plusieurs transcrits avec différentes régions 5' non traduites (5'UTR)(Simpson et coll., 1994; Means et coll., 1991, Hinshelwood et coll., 1995, Honda et coll., 1996, Fürbass et coll., 1997, Vanselow et coll., 1999). Chez l'humain, l'expression au niveau du placenta est sous contrôle du promoteur 1.1 qui est situé à environ 35 kb en amont du site de début de traduction (Kamat et coll., 1999), alors que le principal promoteur qui dirige la transcription au niveau de l'ovaire est le promoteur 2 (Fürbass, 1997; Hinshelwood et coll., 1995), bien que le promoteur 1.1 peut avoir un rôle sur les cellules de granulosa (Fürbass, 1997).

Les études comparatives entre la vache et le mouton en rapport avec l'expression spécifique tissulaire du gène de CYP19 ont montré que le promoteur 2 prédomine dans l'ovaire et le promoteur 1.4 prédomine dans le cerveau. Cependant le promoteur 1.1 spécifique au placenta demeure prédominant au niveau du placenta de la vache alors que chez le mouton, c'est le promoteur 1.5 qui prédomine. Ceci suggère que le mécanisme de régulation dans le placenta n'est pas conservé comme dans l'ovaire et le cerveau, d'où la complexité de la régulation au niveau du placenta. Les

études avec les gènes rapporteurs réalisées par Vanselow et coll., 2001 ont démontré que la séquence de 404 pb en amont du promoteur 1.1 située au environ de 35 kb en amont du site d'initiation de la traduction est une région active. L'analyse de la séquence a montré l'existence de sites de liaisons potentiels, pour les facteurs de transcription tel que BHLH (basic Helix-Loop-Helix), il s'agit des motifs H2 et E2 (E box)(Vanselow et coll., 2001). Suite à cela, on a pu démontrer chez les rongeurs qu'un premier exon spécifique au cerveau qui présente de fortes homologues à celui de l'humain est aussi présent (Honda et coll., 1994, 1996, Yamadamouri et coll., 1996).

Dans le tissu adipeux et le foie du fœtus, le promoteur est situé 15 kb en amont du site de traduction (promoteur 1.4 et 1.b) (Mahendroo et coll., 1993), cependant d'autres exons (1.3 et 2) sont utilisés aussi par les cellules stromales du tissu adipeux traités à l'AMPc et à l'ester de phorbol (Mahendroo et coll., 1993; Zhao et coll., 1995). Le promoteur 1.4 chez l'humain prédomine dans les tissus régulés par les glucocorticoïdes.

Chacun de ces promoteurs va coder pour la région 5'-UTR de l'ARNm dans ces tissus. Les exons vont subir l'épissage alternatif pour former un site commun en avant du site d'initiation de la traduction aux environs de 39 pb. De ce fait, la protéine exprimée dans les différents tissus est identique (Simpson et coll., 1994). Actuellement, le mécanisme qui détermine le choix du promoteur à utiliser n'est pas connu. Une expression aberrante du gène CYP19 est souvent associée à des processus pathologiques tels que le cancer du sein, des testicules et du foie (Sasano et Harada, 1998); et l'endométriose (Zeitoun et Bulun, 1999). Souvent le

promoteur utilisé pour diriger la transcription dans ces tissus est le même que le promoteur utilisé pour diriger la transcription dans l'ovaire, c'est à dire le promoteur 2. Il y a « un switch », et le mécanisme qui détermine le promoteur à utiliser est méconnu. Les études réalisées sur des patients diagnostiqués pour des déficiences du gène CYP19 (Simpson et coll., 1997; Simpson, 2000) de même que les études portant sur les souris «knock out» pour le gène (Fisher et coll., 1998; Honda et coll., 1998) ont démontré le rôle très important du gène dans les deux sexes. Chez la femelle, on note une ambiguïté génitale, représentée par l'hypogonadisme hypergonadotrophique, une virilisation du fœtus femelle dans l'utérus résultant d'une aromatisation inadéquate des androgènes dérivant de la surrénale fœtale. Ceci démontre l'importance de l'aromatase dans le métabolisme des androgènes. Il y a également une dégénérescence kystique de l'ovaire, caractérisée par l'absence du développement folliculaire et de l'ovulation (Britt et coll., 2000). Chez le mâle, on note une dégénérescence testiculaire (Robertson et coll., 1999), une augmentation des concentrations de gonadotrophines plasmatiques et une diminution de la libido (Honda et coll., 1998). Un traitement des singes femelles sexuellement mûres avec des inhibiteurs de l'aromatase, induit une augmentation significative des concentrations de la FSH et de l'androstènedione et une diminution de l'oestradiol plasmatique, de même qu'une inhibition du pic préovulatoire de LH ce qui a pour effet d'empêcher l'ovulation. Il existe plusieurs similitudes entre l'humain et la vache. Les deux espèces sont des espèces mono-ovulatoires et le placenta synthétise de l'oestradiol. Le gène CYP19 chez les deux utilise le même

promoteur pour diriger la transcription dans l'ovaire. Les études *in vivo* et *in vitro* (McNatty et coll., 1984) ont démontré que les cellules de granulosa des follicules préovulatoires expriment CYP19 et sécrètent l'oestradiol (Voss et Fortune, 1993), cependant les niveaux d'oestradiol sont beaucoup plus faibles chez la vache que chez la femme (McNatty et coll., 1976).

Il a été démontré que les cellules de granulosa synthétisent de l'oestradiol suite à une stimulation par la FSH. La liaison de la FSH à son récepteur sur les cellules de granulosa résulte en une augmentation de l'AMPc intracellulaire qui à son tour va stimuler l'expression de la P450arom aussi bien chez l'humain (Steinkampf et coll., 1987) que chez le rat (Hickey et coll., 1988, 1990). Après la décharge ovulatoire de la LH qui amorce le processus de l'ovulation et de lutéinisation, les niveaux de l'oestradiol diminuent de façon transitoire et augmentent par la suite durant la phase lutéale chez la femme (McNatty et coll., 1976) ou la gestation chez le rat (Hickey et coll., 1988). Cette augmentation dans la production d'oestradiol par le corps jaune est due à une augmentation de l'expression de CYP19. Chez la vache, le patron de l'expression de l'aromatase et de la synthèse de l'oestradiol est très différent de celui de l'homme et du rat. Des cellules de granulosa synthétisent de l'oestradiol (McNatty et coll., 1984), cependant avant l'ovulation il y a chute de l'oestradiol et de l'aromatase (Voss et Fortune, 1993). Ces résultats ont été reproduits *in vitro* juste après 24 heures de culture de cellules de granulosa (Voss et Fortune, 1993; Berndtson et coll., 1995). Quand les cellules de granulosa bovines sont mises en culture *in vitro*,

l'activité chute en l'intervalle de 12 heures (Voss et Fortune, 1993 ; Berndtson et coll., 1995).

L'étude de la fonction des cellules de granulosa in vivo est très difficile à cause des interactions avec les cellules de la thèque et de nombreux facteurs paracrines en général. Un système de culture capable d'induire et de maintenir la sécrétion d'oestradiol avec le temps a été développé (Gutierrez et coll., 1997). Ce système de culture représente le modèle préférentiel pour l'étude de la fonction des cellules de granulosa in vitro. Dans la mesure où les cellules gardent le phénotype folliculaire à savoir l'augmentation de l'expression de l'aromatase et la sécrétion d'oestradiol avec le temps en culture en réponse à une dose stimulante de FSH et/ou insuline (Silva et Price, 2000, 2002). L'ARNm P450arom est stimulée par la FSH chez les rongeurs, l'humain et le bovin (Fitzpatrick et Richards, 1991; Steinkampf, 1987; Silva, 2000; Garverick, 2002) et l'insuline et/ou IGF 1 (Silva, 2002) alors que la LH a un effet inhibiteur sur les niveaux d'ARNm P450arom chez le rat et la vache (Fitzpatrick, 1997; Voss et Fortune, 1993; Komar, 2001) mais le mécanisme de la régulation n'est pas très connu. Les sous populations de cellules de granulosa diffèrent dans la distribution de récepteurs tels que les récepteurs de la LH et les récepteurs des androgènes. Chez le rat, les niveaux des récepteurs de la LH sont plus élevés dans les cellules murales que dans les cellules antrales (Amsterdam et coll. 1975; Peng et coll., 1991), par ailleurs les récepteurs aux androgènes sont plus abondants dans les cellules antrales (Tetsuka et coll., 1995). Il semble qu'il y aient des différences entre les espèces : chez le rat et les primates, la

protéine P450arom est plus abondante dans les cellules basales comparées aux cellules antrales et elle n'est pas détectable dans les cellules du cumulus (Inkster et Brodie 1991; Turner et coll., 2002). Chez le porc, les cellules basales sécrètent plus d'oestradiol in vitro que les cellules antrales (Duda, 1997). Cependant chez les ruminants les résultats sont controversés, certaines études réalisées in vitro ont montré que les niveaux sont plus élevés dans les cellules antrales par rapport aux cellules basales (Lautincik et coll., 1994) et les cellules antrales sécrètent plus d'oestradiol que les cellules murales (Roberts et Echterkamp, 1994; Rouiller et coll., 1994, 1996 et 1998).

### **Régulation du gène de l'aromatase (CYP19)**

Les quantités de protéines synthétisées par une cellule ne sont pas nécessairement fixes, mais varient en fonction des besoins de la cellule. Cette variation du niveau d'expression de la protéine peut résulter d'une régulation transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle du gène cible.

La régulation de l'expression des gènes est fondamentale dans de nombreux processus biologiques. L'étude de cette régulation s'est longtemps concentrée sur le contrôle de l'initiation de la transcription, ce n'est que pendant ces quinze dernières années qu'une importance plus marquée a été donnée au contrôle post-transcriptionnel. Nous allons aborder dans les prochains paragraphes, les différents niveaux de régulation en mettant l'accent sur la régulation post-transcriptionnelle.



### ***Régulation transcriptionnelle***

L'initiation de la transcription nécessite la présence dans la région promotrice d'un complexe multiprotéique formé notamment de facteurs transcriptionnels (TF). On distingue principalement une famille de TFII qui se fixe sur la boîte TATA et stabilise le complexe d'initiation formé par l'ARN polymérase et les facteurs de transcriptions. Par ailleurs, il existe d'autres séquences régulatrices. Les éléments cis-régulateurs sont généralement constitués de quelques nucléotides et peuvent être éloignés (en amont et même en aval) du site d'initiation de la transcription et c'est sur ces séquences que viennent se fixer les facteurs trans-régulateurs. Parmi les séquences cis-régulatrices, on a les «enhancers» ou activateurs ou «silencers» ou séquences extinctrices. Parmi les nombreux cis-régulateurs connus, on a la boîte CRE, élément de réponse à l'AMPc dont la séquence est représentée par l'octamère palindromique TGACGTCA retrouvé dans la région promotrice des gènes inductibles par l'AMPc. Cette séquence serait reconnue par une protéine CREB (CRE Binding Protein) qui présente une région dite «leucine Zipper».

Le gène CYP19 est l'un des gènes dont la régulation est assurée par différents promoteurs spécifiques tissulaires. L'expression de l'aromatase est sujette à une régulation multifactorielle par divers facteurs et groupes hormonaux dont les hormones gonadotrophiques, l'AMPc et des facteurs de croissances et stéroïdes qui diffèrent significativement selon les tissus.

L'expression de l'aromatase au niveau des ovaires est régulée à différents stades du cycle principalement par la FSH et la LH. En effet, l'expression de l'aromatase (ARNm et protéine) est absente dans les petits follicules avant le stade de recrutement, apparaît avec le recrutement puis augmente avec le développement du follicule dominant (Xu et coll., 1995b; Bao et coll., 1997a; Launtincik et coll., 1994). L'expression de l'aromatase dans les cellules de granulosa est principalement sous le contrôle de la FSH, l'action de la FSH est médiée par l'AMPc. La régulation de l'aromatase dans l'ovaire est principalement dirigée par le promoteur 2. La FSH se lie à son récepteur et active l'adénylcyclase, qui résulte en une formation de l'AMPc et activation de la voie PKA. La PKA va phosphoryler CREB qui va se lier à une séquence CLS (CREB like sequence) sur le promoteur 2. En aval du CLS, on retrouve également un site de liaison SF1 (Dodson et coll., 1997). La liaison de ces deux facteurs à leurs sites respectifs ou (éléments de réponse) va par la suite recruter un grand nombre de coactivateurs qui vont activer l'expression spécifique par le promoteur 2. Les études comparatives entre l'humain et la vache réalisées par Hinshelwood (1997) sur le promoteur 2 de l'ovaire, ont montré que malgré 88% d'homologie de séquence, il existe une différence très marquée quant à l'expression des gènes rapporteurs dans les cellules de granulosa lutéinisées ou les cellules lutéales stimulées avec la forskoline. Il semblerait qu'il y ait une délétion d'une paire de base au niveau de la séquence CLS bovine. La mutation de cette région chez la vache n'a pas restauré complètement l'activité d'un gène rapporteur, suggérant l'existence d'une autre séquence dans cette région contribuant à l'absence de

l'expression de l'aromatase dans les cellules lutéinisées chez la vache. Ceci peut-être due à la présence d'un facteur répresseur agissant en trans qui est exprimé après la lutéinisation des cellules de granulosa ou bien à la présence d'éléments en amont de ceux chez l'humain qui sont recrutés pour faciliter la régulation de l'expression du gène dans l'ovaire en absence de la séquence CLS fonctionnelle. Certaines études suggèrent que c'est le SF1 qui joue le rôle d'élément de réponse à l'AMPc dans le promoteur 2 (Furbass, 1997).

La régulation de l'expression de l'aromatase diffère selon les tissus; au niveau des ovaires et des testicules, la FSH et la LH stimulent l'expression de l'aromatase via une augmentation de l'AMPc intracellulaire alors qu'au niveau du cerveau, l'AMPc a un effet inhibiteur sur l'activité de l'aromatase alors que les androgènes peuvent induire son expression (Roselli et Resko, 1993). Le promoteur 1.4 est utilisé dans les cellules stromales du tissu adipeux et du foie du fœtus. Dans le tissu adipeux, le promoteur 1.4 peut être stimulé par les glucocorticoïdes, cytokines (IL-6, IL-11, LIF et  $TNF\alpha$ ). Dans le cerveau, plusieurs promoteurs peuvent être utilisés dont le promoteur 2, 1.4 et un promoteur spécifique au cerveau, ce qui peut expliquer pourquoi plusieurs protéines kinases (PKA, PKC et PKG) peuvent stimuler l'expression de l'aromatase.

### ***Régulation post-transcriptionnelle***

La régulation post-transcriptionnelle chez la plupart des eucaryotes implique certains facteurs capables d'induire la dégradation rapide de l'ARNm. Un certain nombre de séquences cis-régulatrices, de même que des protéines agissant en trans ont été identifiées comme étant des facteurs déterminants pour la stabilité de l'ARNm (Ross, 1995). La plupart des séquences caractérisées et bien élucidées sont principalement localisées dans la région 3'-UTR (Guhaniyogi et Brewer, 2001) comme c'est le cas pour un grand nombre de gènes dont le récepteur à l'œstradiol, le récepteur la LH, la cyclooxygénase-2 et l'interleukin-10 (Kenealy, 2000; Naire et Menon, 2000; Cok et Morrison, 2001; Powell, 2000). L'ARNm P450arom chez la vache est environ 3 kb de plus que l'ARNm chez le rat et l'humain (Soumano et coll., 1996). Cette différence est liée principalement à la présence d'une longue région 3'-UTR. La région 3'-UTR est caractérisée par la présence de multiples régions riches en adénylates et en uridyates nommées ARE.

Les facteurs cis-régulateurs jouent un rôle très important dans la régulation de la stabilité de l'ARNm (Bevilacqua et coll., 2003). Plusieurs copies des motifs AUUUUA et AUUUA peuvent exister à l'intérieur de la région 3'-UTR. Certaines études ont démontré que ces motifs AUUUA lorsque présents dans une région ARE ont des fonctions de déstabilisation (Naire et Menon, 2000). Un autre motif nonamérique UUAUUUAUU a été

identifié comme étant la séquence minimale requise pour la dégradation de l'ARNm (Zubiaga et coll., 1995).

Les facteurs trans-régulateurs sont en contact direct avec ARE et comprend au moins 17 protéines identifiées dans les extraits cellulaires. Parmi les plus étudiées, on distingue AU factor 1 (AUF1), tristetraproline (TTP), protéine régulatrice de l'épissage de type K homologue (KSRP), ELAV et HSP70. AUF1 est la plus commune et plusieurs études ont démontré son implication dans la régulation de l'ARNm à travers la région ARE (Chen et Shyu, 1995; Wilusz et coll., 2001). Il existe 4 isoformes avec différents poids moléculaires générés par épissage alternatif P37, P40, P42 et P47. P42 et P45 sont exprimées normalement dans le noyau (Arao et coll., 2000), alors que P37 et P40 sont associées à la dégradation de l'ARNm par ARE (DeMaria et Brewer, 1996). AUF1 peut agir comme stabilisateur ou déstabilisateur dépendamment du type cellulaire, de la région ARE et de l'environnement cellulaire (Xu et coll., 2001). La Protéine nucléaire ribonucléique (hnRNP) est principalement localisée dans le noyau ainsi que d'autres protéines de la famille des ELAV (Embryonic Lethal Abnormal Vision), représentée par HuC; HuD et HuR. Une autre famille implique la protéine de choc thermique HSP 70. Le mécanisme d'action de ces protéines n'est pas très clair, il en résulte donc une hypothèse qui avance l'idée d'interaction directe de la protéine de liaison avec une déadénylase pour moduler son activité, ou alors empêcher la liaison des protéines spécifiques à la queue polyA (PABP) qui va exposer la queue polyA à divers ribonucléases (Wilusz et coll., 2001). Récemment, on a démontré que le recrutement d'un

exosome par les PABPs empêcherait la liaison avec d'autres protéines stabilisatrices susceptibles de protéger le transcrit de la dégradation (Van Hoof et Parker, 2002). Il semble que la protéine de choc thermique (HSP 70) favoriserait la liaison en éliminant les structures secondaires ou alors en agissant elle-même comme facteur trans-régulateur. L'activité de ces facteurs trans-régulateurs peut être régulée différemment en réponse à des stimulations extracellulaires particulières (Nair et coll., 1994; Schiavone et coll., 2000).

## HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

L'étude de la régulation de la sécrétion d'œstradiol et de l'expression du gène codant pour P450arom dans les cellules de granulosa est rendue possible grâce au système de culture développé par Guttierrez et coll. (1997). Dans ces conditions, la sécrétion d'œstradiol de même que l'expression du gène codant pour P450arom sont induites et maintenues avec le temps en culture (Silva et Price, 2000). Notre hypothèse de départ est que le comportement des cellules de granulosa dans ces conditions reflète bien leur comportement in vivo et de ce fait, ce système peut être utilisé pour évaluer le mécanisme de la régulation de P450arom au niveau des cellules de granulosa non-lutéinisées.

Les objectifs de cette étude sont :

- 1/ Mieux caractériser les conditions de culture en examinant l'expression de 17 $\beta$ -HSD, 3 $\beta$ -HSD et StAR, de même que la régulation de 17 $\beta$ -HSD par la FSH.
  
- 2/ Évaluer la demi-vie et la stabilité de l'ARNm codant pour P450arom en réponse à la FSH, l'insuline, l'AMPc, la cycloheximide et l'inhibiteur des MAPkinase (PD98059).
  
- 3/ Déterminer le mécanisme moléculaire de contrôle de la stabilité de l'ARNm codant pour P450arom.

## **ARTICLES**

### **Article 1**





**Expression of 17 $\beta$ - and 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases and steroidogenic acute regulatory protein in non-luteinizing bovine granulosa cells in vitro.**

M. Sahmi, E.S. Nicola, J.M. Silva<sup>†</sup> and C.A. Price\*

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

\*Correspondence Fax: 450-778-8103

Email: [christopher.price@umontreal.ca](mailto:christopher.price@umontreal.ca)

Key words: 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase, steroidogenic acute regulatory protein, granulosa cells.

<sup>†</sup>Present address: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Zacatecas, Zacatecas, Mexico.

Short title: StAR and 17 $\beta$ -HSD in bovine granulosa cells in vitro

## Resumé

Les cellules de granulosa se différencient *in vitro* dans un milieu sans sérum, ceci résulte en une augmentation de la sécrétion d'œstradiol et une abondance de l'ARNm codant pour le cytochrome P450aromatase (P450arom). On a testé l'hypothèse que la différenciation *in vitro* implique aussi une augmentation de l'expression de 3 $\beta$ - et 17 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase (HSD) en absence de l'expression de la protéine de régulation rapide de la stéroïdogénèse (StAR), comme cela a été observé *in vivo*. Les cellules de granulosa de petits follicules (6 mm de diamètre) ont été mises en culture pour 6 jours, et les concentrations de l'ARNm quantifiées par Northern ou par RT-PCR. Les concentrations d'œstradiol et de progestérone dans le milieu augmentent avec le temps en culture, de même pour l'ARNm codant pour P450arom, 3 $\beta$ - et 17 $\beta$ -HSD mais pas pour P450scc. Les niveaux de P450arom et 17 $\beta$ -HSD sont significativement corrélés avec l'accumulation d'œstradiol dans le milieu. La sécrétion de progestérone est corrélée avec l'ARNm 3 $\beta$ -HSD mais pas avec P450scc. L'ARNm de StAR est détecté par RT-PCR et ne change pas tout au long de la culture et n'est pas corrélé avec la sécrétion de progestérone. La FSH stimule significativement l'ARNm P450arom et 17 $\beta$ -HSD. L'origine des cellules (cellules antrales ou cellules basales) n'a pas affecté la stéroïdogénèse. On conclut que dans ces conditions de culture, les cellules ne se lutéinisent pas et le patron

d'expression des enzymes stéroïdogéniques clés est similaire à celui des follicules in vivo. De plus, les données suggèrent que  $17\beta$ -HSD pourrait être aussi importante que P450arom pour la régulation de la sécrétion d'œstradiol et que  $3\beta$ -HSD est plus importante que P450scc comme régulateur de la sécrétion de progestérone dans les cellules de granulosa non-lutéinisées.

## Abstract

Granulosa cells of small follicles differentiate *in vitro* in serum-free medium, resulting in increased estradiol secretion and abundance of mRNA encoding cytochrome P450 aromatase (P450arom). We tested the hypothesis that differentiation *in vitro* also involves increased expression of 3 $\beta$ - and 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases (HSD) in the absence of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) expression, as has been observed *in vivo*. Granulosa cells from small (<6mm diameter) follicles were cultured for up to 6 days, and mRNA levels quantified by Northern hybridization or RT-PCR. Estradiol and progesterone concentrations in medium increased with time in culture, as did mRNA encoding P450arom, 3 $\beta$ - and 17 $\beta$ -HSD but not P450scc. Both P450arom and 17 $\beta$ -HSD were significantly correlated with estradiol accumulation in culture medium. Progesterone secretion was correlated with 3 $\beta$ -HSD but not P450scc mRNA levels. StAR mRNA was detectable by RT-PCR, did not change with duration of culture and was not correlated with progesterone secretion. FSH significantly stimulated P450arom and 17 $\beta$ -HSD mRNA levels. Cell origin (from the antral or the basal layer of the membrana granulosa) did not affect steroidogenesis. We conclude that under the present cell culture system granulosa cells do not luteinize, and show expression of key steroidogenic enzymes in patterns similar to those occurring in differentiating follicles *in vivo*. Further, the data suggest that 17 $\beta$ -HSD may be as important as P450arom in regulating

estradiol secretion, and that 3 $\beta$ -HSD is more important than P450scc as a regulator of progesterone secretion in non-luteinizing granulosa cells.

## Introduction

Ovarian follicle growth in cattle and sheep occurs in 'waves'. A cohort of small growing antral follicles emerges from the reservoir of growing preantral follicles, and from this cohort, one follicle is 'selected' to become the dominant and potentially ovulatory follicle (reviewed in [1, 2]). The remaining 'subordinate' follicles regress. During these waves of growth and regression, the theca and granulosa cells undergo regulated proliferation and differentiation, followed by atresia if the follicle does not ovulate. A major indicator of follicle dominance and health is the integrity of the membrana granulosa [3], and atresia appears first in granulosa cells. Factors regulating granulosa cell function may therefore have an important impact on follicle health.

Studies of follicular steroidogenesis during the development of the first follicle wave have indicated that granulosa cells undergo sequential changes in steroidogenic capability as the dominant follicle emerges and grows. The first step in steroidogenesis is the conversion of cholesterol to pregnenolone by the enzyme cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage (P450scc), which occurs in theca and granulosa cells [4, 5]. Steroidogenesis occurs primarily through the  $\Delta 5$  pathway in ruminants [5], in which pregnenolone is

metabolized to dehydroepiandrosterone by cytochrome P450 17 $\alpha$ -hydroxylase (P450c17) in theca cells, and then to androstenedione by 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (3 $\beta$ -HSD). Androstenedione enters the granulosa cells, and is converted to estrone by cytochrome P450 aromatase (P450arom) [6], which is then converted to estradiol by 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (17 $\beta$ -HSD) (Luu-The, 2001). As granulosa cells do not express P450c17, pregnenolone may be converted to progesterone by 3 $\beta$ -HSD [5].

Small follicles contain low concentrations of estradiol [7] and little if any P450arom [8]. As follicles grow to the selection stage (6-8 mm in cattle), there are marked increases in estradiol content [9-11] and P450arom mRNA abundance [8, 12], and dominant follicles secrete more estradiol than subordinate follicles [11, 13] and express greater levels of P450arom [14]. Abundance of P450scc mRNA also increased in granulosa cells as follicles became dominant, although these changes were less marked than those for P450arom [8]. Granulosa cell expression of 3 $\beta$ -HSD was detected by in situ hybridization only upon the onset of follicle dominance in one study [15], but other studies have indicated that enzyme activity [16] and mRNA levels as measured by quantitative RT-PCR [13] did not change with follicle development. The importance of granulosa cell progestin production is unclear, as these cells express little if any steroidogenic acute regulatory protein (StAR) [17, 18], important for the translocation of cholesterol from the outer to the inner mitochondrial membrane [19].

The study of granulosa cell function *in vivo* is complicated by the effects of thecal cells and peripheral hormones and growth factors. Our understanding of granulosa cell physiology during follicle growth has been limited by the use of *in vitro* culture systems in which the cells lose the ability for estradiol secretion [20-23] and P450arom expression [24]. Several groups have explored the usefulness of serum-free media, and Saumande (1991) [25] and Rouillier et al. (1996) [26] demonstrated FSH-responsive estradiol and progesterone secretion from granulosa cells of large follicles, although estradiol secretion decreased with time of culture. Interestingly, the origin of the cells (basal or antral layer) had a significant impact on steroid secretion *in vitro* [26, 27].

Another serum-free culture system was developed for ovine [28] and bovine [29] granulosa cells, in which estradiol secretion increases with time in culture and is responsive to FSH, insulin and IGF-1. In this culture system, we have found that P450arom mRNA abundance increases with time in culture, and is responsive to FSH and insulin [30, 31]. This model therefore offers the potential for controlled *in vitro* studies of granulosa cells that maintain the follicular phenotype (i.e. express P450arom and secrete estradiol). As mentioned above, granulosa cells also express the genes encoding  $3\beta$ - and  $17\beta$ -HSD *in vivo*. It has been hypothesized that  $3\beta$ -HSD is important for follicular dominance [15], and although  $17\beta$ -HSD is essential for the production of estradiol from androstenedione, it is not known how the expression pattern of this enzyme changes with follicle development. It is of



fundamental interest therefore to determine if this granulosa cell model expresses the genes encoding these enzymes in vitro.

The objectives of the present study were to determine the time-course of expression of StAR, 3 $\beta$ - and 17 $\beta$ -HSD genes in granulosa cells displaying the follicular phenotype, to test the hypothesis that differentiation of these cells in vitro mirrors that in vivo. We also determined if 17 $\beta$ -HSD expression is regulated by FSH. Additionally, we determined if cell origin within the follicle affects the steroidogenic ability of the cells, as cells near the antrum have been reported to secrete more steroids than cells closer to the basement membrane in other estrogen-secreting granulosa cell models [26].

## **Materials and Methods**

### *Culture of cells from large follicles*

Large follicles ( $\geq 8$ mm) were obtained from dairy cows at random stages of the estrous cycle at a local abattoir. Follicle diameter, throughout the study, was measured with a vernier calliper. Follicles with an obviously atretic appearance (avascular theca and debris in the antrum) were discarded. 'Antral' granulosa cells were obtained by aspiration of follicular fluid with a 22-gauge needle attached to a syringe, and 'basal' cells were recovered by

moderate scraping of the follicle wall. The cells were rinsed three times in  $\alpha$ -MEM to remove red blood cells and follicular fluid, and each pool divided into two for culturing in different media; 'Medium A' was that described by Rouillier et al. (1996), in which estradiol secretion decreases with time in culture but they retain short-term responsiveness to FSH, and 'Medium B' was as described by Gutiérrez et al. (1997), in which estradiol secretion increases with time in culture. Medium 'A' was used to replicate the apparent difference between antral and basal cells previously reported [26]. Cells were plated at a density of  $0.5 \times 10^6$  viable cells/well in 48-well culture plates (Corning Glass Works, Corning, NY), and cultured in 'Medium A' (Ham's F-12 medium containing 100 iu/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin, 250  $\mu$ g/ml amphotericin B, 1  $\mu$ M androstenedione, 1 $\mu$ g/ml insulin, and 0.1% BSA (Sigma Chemical Co., St-Louis, MO)) or 'Medium B' ( $\alpha$ -MEM with L-glutamate containing 10 mM sodium bicarbonate, 20 mM Hepes, 0.1 % BSA, 4 ng/ml sodium selenite, 2.5  $\mu$ g/ml transferrin,  $10^{-7}$  M androstenedione, 10 ng/ml insulin, 10 ng/ml insulin-like growth factor-1, 10 ng/ml bovine FSH (AFP 5310B), 1.1 mM non essential amino acid mix, 100 iu/ml penicillin, and 100  $\mu$ g/ml streptomycin). Cells were maintained at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> in air for 2 days. Unless specified, all media and supplements were obtained from Gibco BRL Canada (Burlington, ON, Canada). At the end of the culture period, the medium was harvested for measurement of estradiol, estrone and progesterone. At least two wells per plate represent each sample per replicate, and experiments were performed four times.

### *Culture of cells from small follicles*

Undifferentiated cells from small follicles (2-5mm) were cultured under conditions that promote long-term estradiol secretion [29] and induction of P450<sub>arom</sub> gene expression [30]. Briefly, antral and basal cells were cultured separately in  $\alpha$ -MEM supplemented as above ("Medium B") in 24-well culture plates ( $10^6$  viable cells/well), and medium was changed every 48 h. For time course experiments, spent culture medium and cells were recovered after 2, 4 and 6 days of culture for measurement of steroid secretion and gene expression. The regulation of 17 $\beta$ -HSD expression was investigated by incubating cells for 6 days in the presence of 0, 0.1, 1, 10 or 100 ng FSH/ml, or with testosterone or dihydrotestosterone (DHT) replacing androstenedione as androgen substrate. After removal of medium, Trizol was added to the wells for DNA and RNA extraction. Eight to ten wells per plate were pooled for each time point, and experiments were performed on five independent pools of cells.

### *Analysis of medium and large follicles ex-vivo*

To correlate steroidogenic gene expression in cultured granulosa cells with that observed in cells from follicles growing in vivo, large (> 8 mm) and medium (5 – 8 mm) size follicles were dissected from ovaries collected at an abattoir. The number of granulosa cells in follicles of this size permits the

isolation of three subpopulations of cells from individual follicles. The follicles were aspirated and the follicular fluid was centrifuged to yield mostly cumulus and antral granulosa cells ("aspirated cells"), lightly adherent cells were isolated by rinsing the follicle wall with  $\alpha$ -MEM ("rinsed cells"), and the third cell population was isolated by gently scraping the follicle wall ("scraped cells"). The cell populations were collected by centrifugation and were frozen in Trizol (Gibco BRL) until RNA extraction. Only follicles whose granulosa cells contained P450arom mRNA detectable by Northern blotting were considered non-atretic [8] and included in the analysis. RNA was extracted according to the Trizol protocol, and analysed for steady-state P450arom, P450scc, 3 $\beta$ -HSD and 17 $\beta$ -HSD mRNA abundance.

#### *RNA extraction and Northern hybridization*

Total RNA and DNA from fresh and cultured cells were extracted by the standard Trizol procedure. Total DNA was quantified in duplicate by measuring fluorescence in the presence of bisbenzimidazole (Hoechst 33258) and compared to DNA from calf thymus (Sigma). The relative abundance of mRNA was determined by Northern hybridization. Electrophoresis of 5 to 15  $\mu$ g RNA was performed through a 1 % denaturing formaldehyde-agarose gel followed by overnight capillary transfer onto a nylon membrane (Hybond-N; Amersham, Oakville, ON, Canada). Membranes were UV cross-linked in a commercial UV chamber (Bio Rad, Mississauga, ON, Canada) and incubated

for 2 h in prehybridization solution containing 10% dextran sulfate, 5x saline-sodium phosphate-EDTA buffer (SSPE), 5x Denhardt's solution, 0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS) and herring sperm DNA (200 mg/ml).

The bovine P450<sub>arom</sub> cDNA probe was prepared in our laboratory, and encompasses the entire heme-binding and I-helix regions of the open reading frame, and hybridizes to 3 bands of follicular total RNA at 6.5, 3.4 and 1.8 kb [32]. The bovine P450<sub>scc</sub> cDNA was a gift from Dr M R Waterman (Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, TN), and is a 1.7 kb cDNA containing the complete coding sequence (John et al., 1984). The 1.5 kb bovine 3 $\beta$ -hydroxysteroid/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$  isomerase cDNA probe was generously provided by Dr F Labrie (CHUL Research Center, Laval University, Quebec, Canada; [33]. The bovine 17 $\beta$ -HSD type 1 cDNA was generated from bovine granulosa cell total RNA by RT-PCR (see below).

Probes were labeled with [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP by random primer extension using a kit from Boehringer Mannheim (Laval, QC, Canada) to a specific activity of 1-3 x 10<sup>9</sup> dpm/ $\mu$ g, and purified by centrifugation through a minicolumn using Wizard PCR Preps DNA purification system (Promega, Montréal, QC, Canada). Hybridization to the membranes was performed overnight at 65 °C. After hybridization, membranes were washed in 2 X SSPE-0.1 % SDS twice at room temperature (15 min each), and twice at 65 °C (15 min each). Membranes were then stripped and rehybridized to a labeled human 28 S ribosomal cDNA probe [34] for the standardization of RNA loading. The labeled membranes were either exposed to Kodak X-Omat film at -70 °C in

the presence of an intensifying screen and autoradiograms were scanned with a densitometer after 1 to 14 days exposure, or (for 3 $\beta$ - and 17 $\beta$ -HSD) were exposed to a Kodak phosphor screen for 3 days and digitalized with a phosphorimager (Molecular Dynamics Storm 840; Amersham Biosciences). Bands were quantified with NIH Image (autoradiograms) or ImageQuant software (Molecular Dynamics).

### *RT-PCR*

To generate the bovine 17 $\beta$ -HSD type 1 cDNA, primers were designed based on alignments of human and rat sequences. Reverse transcription was performed with 20  $\mu$ M oligo(dT) primer, 1  $\mu$ g granulosa cell total RNA and SuperScript II transcriptase (Gibco BRL Canada). Two primer pairs were successful in PCR. The same reverse primer was used (#1: 5' TCCGCCACCTCCTCAGGGTTCT 3') with one of two forward primers (#2: 5' ATGGCC-CGCACCGTGGTGCTCA 3'; #3: 5' TCCCAGAGCTTCAAAGTGTATGCCAC 3'). The resulting fragments (~714 and 670 bp, for primer pairs 1 and 2, respectively) were ligated with T4 DNA polymerase into pGEM-T Easy (Promega, Ottawa, ON, Canada). Ligation products were transformed into *E. coli* (XL1-Blue; Stratagene, La Jolla, CA) and sequenced by the Sequencing Service at Université Laval (QC, Canada). The overlapping sequences of the 2 amplified fragments were identical. The larger fragment (accession number AF265564), which corresponds to +23 to +691 of the published human sequence (X13440), was used as a DNA probe

and is 81, 75 and 74% homologous with the human, rat and mouse sequences, respectively.

The presence of 17 $\beta$ -HSD and StAR mRNA in cultured cells was measured by semiquantitative RT-PCR. Reverse transcription was performed as described above with 1  $\mu$ g total RNA. The primers for 17 $\beta$ -HSD were primers #1 and #2 above, those for bovine StAR [35] and bovine glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) [36] were as described. For 17 $\beta$ -HSD, cycling conditions were: denaturing at 94 °C for 3 min, followed by 35 cycles of 94 °C for 1 min, 59 °C for 1 min and 72 °C for 1 min. For StAR, cycling conditions were: denaturing at 94 °C for 3 min, followed by 24 or 28 cycles of 94 °C for 45 sec, 58 °C for 30 sec and 72 °C for 1 min. For GAPDH, cycling conditions were: denaturing at 94 °C for 3 min, followed by 23 cycles of 94 °C for 45 sec, 58 °C for 45 sec and 72 °C for 1 min. Amplification was performed within the linear range for each primer pair (see Results), and PCR products were visualised on agarose gels after staining with ethidium bromide and quantified with NIH Image software.

### *Steroid assays*

Estradiol was measured in conditioned medium in duplicate with the assay described by Bélanger [37], without solvent extraction. Intra- and inter-assay coefficients of variation were 7 and 11%, respectively. Progesterone was measured in duplicate as described [38] with mean intra- and inter-assay

coefficients of variation of 6 and 14%. The sensitivity of these assays was 4 and 15 pg/tube for estradiol and progesterone, respectively, equivalent to 20 and 78 pg/ $\mu$ g DNA (based on mean DNA content per well), respectively. Estrone was measured with an antibody that had 2% cross-reactivity with estradiol [39] and verified by us. The inter- and intra-assay CV were 7 and 10%, respectively, and the sensitivity was 8 pg/tube, equivalent to 40 pg/ $\mu$ g DNA.

### *Statistics*

The density of hybridization signals was corrected for loading efficiency using hybridization to 28 S ribosomal RNA. Steroid concentrations were corrected for cell number by expressing steroid mass per unit mass of DNA or per million cells plated (depending on experiment). Data were transformed to logarithms if they were not normally distributed (Shapiro-Wilk test). Analysis of variance (ANOVA) was used to test main effects of cell population, culture system and time of culture where appropriate. Culture replicate was included as a random variable in the F-test for the effect of experiment. Pearson correlation coefficients were calculated between steroid secretion and mRNA levels. Differences between groups were identified with the Tukey-Kramer HSD test. Analyses were performed with JMP<sup>®</sup> software (SAS Institute, Cary, NC). The data are presented as means  $\pm$  SEM.



## Results

Culture of antral and of basal granulosa cells from large follicles in two different media revealed that culture medium had a significant effect on estradiol and estrone production after two days of culture (Fig. 1). Whereas antral granulosa cells cultured in "Medium A" secreted about 4-fold more estradiol than did basal granulosa cells ( $P < 0.01$ ), no such difference was observed for cells cultured in "Medium B" ( $P > 0.05$ , Fig 1). Basal cells secreted more ( $P < 0.05$ ) estradiol in "Medium B" than they did in "Medium A". Progesterone secretion was not significantly affected by cell population or medium (Fig. 1;  $P > 0.05$ ).

When granulosa cells from small, less differentiated follicles were cultured under conditions which promote long-term estradiol synthesis, there were no differences in steroid secretion or mRNA levels between antral and basal cells at any time during culture (Fig. 2). There were significant increases in estradiol ( $P < 0.001$ ) and progesterone ( $P < 0.05$ ) accumulation with time in culture, but estrone accumulation did not change significantly (Fig. 2). There were significant increases in P450arom ( $P < 0.001$ ) and 3 $\beta$ -HSD ( $P < 0.05$ ) mRNA levels during culture, whereas P450scc mRNA increased modestly ( $P = 0.06$ ; Fig. 2). Messenger RNA for 17 $\beta$ -HSD was not detectable by Northern blotting, but semiquantitative PCR showed a significant increase with time in culture ( $P < 0.01$ , Fig 3). Messenger RNA for StAR was not detectable by Northern blotting, but was detectable by RT-PCR. Amplification for 24 cycles resulted in detectable cDNA products from RNA samples of

corpus luteum but not of cultured granulosa cells. Increasing cycle number to 28 allowed detection of StAR in granulosa cell RNA, although the StAR products from corpora lutea were no longer amplified in a linear manner (Fig 4). StAR mRNA abundance did not change significantly with time in culture.

Estradiol secretion was correlated with P450arom ( $r=0.55$ ,  $P<0.01$ ) and  $17\beta$ -HSD ( $r=0.49$ ,  $P<0.05$ ) mRNA levels. Progesterone secretion was correlated with  $3\beta$ -HSD ( $r=0.74$ ,  $P<0.001$ ) but not with P450scc or StAR ( $r=0.05$ ) mRNA levels.

Results of Northern analysis using total RNA extracted from 'aspirated', 'rinsed' and 'scraped' granulosa cells of individual large ( $\geq 8\text{mm}$ ) and medium (5-8mm) follicles are shown in Fig. 5. There were no differences in P450arom, P450scc,  $3\beta$ -HSD or  $17\beta$ -HSD mRNA levels between cell populations ( $P>0.05$ ). Specific mRNAs for P450arom and P450scc were detected in both medium and large follicles. Transcripts for  $3\beta$ -HSD were detectable in large follicles only, and transcripts for  $17\beta$ -HSD were detected in large follicles and very weakly in some medium follicles (Fig. 5); there were too few samples for a meaningful analysis of  $17\beta$ -HSD in medium follicles.

To determine if  $17\beta$ -HSD expression is regulated in vitro, we measured the effects of FSH and of androgen on estradiol secretion and  $17\beta$ -HSD mRNA abundance. Culture with DHT resulted in very low estradiol secretion compared to androstenedione- or testosterone-treated cells, and P450arom and  $17\beta$ -HSD mRNA levels were not different between treatments (Table 1).

There was a significant stimulation of  $17\beta$ -HSD and P450arom mRNA abundance by FSH (Fig 6).

## Discussion

Granulosa cells in small follicles (< 6 mm) are not fully differentiated; small follicles contain low concentrations of estradiol [7] and P450arom mRNA is not readily detectable by in situ hybridization [8, 12]. As small follicles grow in vivo (to 6-8 mm), differentiation of granulosa cells is noted by a dramatic increase in P450arom mRNA abundance and a progressive increase in P450scc mRNA content [8, 12]. This pattern of P450arom and P450scc expression is similar to that observed *in vitro* [30, present study], indicating that this culture system is a good model for studying estradiol synthesis during this critical point in follicle development. However, granulosa cells express other proteins important for steroidogenesis, and we report here the expression patterns of  $3\beta$ -HSD,  $17\beta$ -HSD and StAR mRNA in bovine granulosa cells in vitro. The data suggest that the culture model described supports granulosa cells in a non-luteinizing state under which P450arom,  $3\beta$ -HSD and  $17\beta$ -HSD mRNA abundance increase as cells differentiate.

Ruminants may synthesize estradiol from testosterone with the enzyme P450arom, or from androstenedione via estrone or testosterone [5], in which case both P450arom and  $17\beta$ -HSD type 1 are required enzymes [40]. Despite

the essential role  $17\beta$ -HSD plays in estradiol synthesis, little is known about the expression of this enzyme in ruminant ovaries. We measured  $17\beta$ -HSD type 1, as it is the predominant form in the ovary [40]. Human  $17\beta$ -HSD type 1 shows approximately 20% sequence homology with other  $17\beta$ -HSDs, and a search of Genbank found no matching homology between the bovine sequence reported here and  $17\beta$ -HSD types other than type 1; therefore, we are confident that we are measuring authentic  $17\beta$ -HSD type 1. We have shown for the first time that granulosa cells from large estrogenic follicles contained readily detectable  $17\beta$ -HSD type 1 mRNA, whereas expression was low to undetectable (by Northern hybridization) in medium sized follicles. This suggests that  $17\beta$ -HSD expression commences (or at least increases dramatically) at the onset of follicle dominance, as suggested for  $3\beta$ -HSD expression [15, present study]. These data are in contrast to data from in vivo studies of diethylstilbestrol (DES)-primed immature rats, in which  $17\beta$ -HSD type 1 appeared to be constitutively expressed in follicles at all stages of development [41]. In cultured cells,  $17\beta$ -HSD expression was low after 2 days, and increased thereafter in a manner similar to P450arom expression. This, and the good correlation between estradiol secretion and  $17\beta$ -HSD, suggests that the developmental regulation of  $17\beta$ -HSD mRNA is logically coordinated with that of P450arom at this stage of follicle development in cattle [42].

The regulation of  $17\beta$ -HSD has been examined in rats and humans. In rats, FSH stimulated  $17\beta$ -HSD type 1 activity and expression from granulosa cells

of DES-primed immature animals [42, 43], whereas FSH did not affect 17 $\beta$ -HSD protein or activity in cultured human granulosa-lutein cells [44]. In the present study, FSH is clearly necessary for the expression of both P450arom and 17 $\beta$ -HSD type 1, and there is a significant dose-response increase in 17 $\beta$ -HSD mRNA in response to FSH. The reason for the differing results between these studies is difficult to identify as there are many variables to consider. It is noteworthy, however, that in the studies cited above estradiol secretion from the primed rat granulosa or the human granulosa-lutein cells decreases with time of culture, suggesting that these are not good models for growing estrogenic follicles.

The responses of P450arom and of 17 $\beta$ -HSD type 1 mRNA to FSH were different. P450arom mRNA levels reached near maximum at 1 ng/ml FSH, and higher concentrations of FSH did not further increase P450arom mRNA abundance. This has previously been observed in bovine granulosa cells in vitro [30]. In contrast, 17 $\beta$ -HSD type 1 mRNA levels were maximum at the highest dose of FSH given, which is consistent with the linear increase in 17 $\beta$ -HSD type 1 activity induced by FSH in rats [42]

As 17 $\beta$ -HSD type 1 is not necessary for estradiol synthesis from testosterone, we hypothesized that cells cultured with testosterone alone would not express 17 $\beta$ -HSD. This hypothesis was not supported, as there were no differences in 17 $\beta$ -HSD (or P450arom) expression between cells cultured with androstenedione, testosterone or DHT. Therefore we conclude that 17 $\beta$ -HSD

is regulated primarily by FSH, and is not induced by specific androgen availability to granulosa cells.

Aside from estrogens, bovine granulosa cells in serum-free medium secrete considerable amounts of progesterone, typically 100-fold greater than that of estradiol [29, 30]. As high levels of progesterone secretion are associated with luteinization [45], it is important to determine if luteinization occurred in cultured cells. During 6 days of culture, there was a marked increase in  $3\beta$ -HSD mRNA abundance, but only a small increase in P450<sub>scc</sub> mRNA abundance. This pattern is entirely consistent with changes that occur in healthy growing follicles in vivo [8, 15, present data], notably the apparent onset of  $3\beta$ -HSD gene expression once follicles reach a certain stage of growth and differentiation [15], and are not necessarily indicative of luteinization. Follicles less than 8 mm diameter did not contain  $3\beta$ -HSD mRNA as detected by Northern hybridization, in agreement with [15], but in contrast to the study of [13] in which  $3\beta$ -HSD mRNA was detected in follicles of 7 mm diameter. In the latter study,  $3\beta$ -HSD mRNA was measured by quantitative RT-PCR, which may account for the difference between studies. We have found that progesterone secretion is not always correlated with P450<sub>scc</sub> mRNA abundance [30, 31; present study), which may be explained at least in part by the significant correlation between progesterone and  $3\beta$ -HSD mRNA levels observed here. Thus, an important finding of the present study is that  $3\beta$ -HSD may be a more important regulator of progesterone

secretion than P450scc in bovine granulosa cells at this stage of development.

A further, better indicator of luteinization is the expression of StAR. This protein is rate-limiting protein for steroidogenesis [19], and is abundantly expressed in ruminant corpora lutea [46, 47] and granulosa-derived luteal cells in vitro [35] but not in granulosa cells of growing follicles [17, 18]. In the present study, StAR mRNA was detected by PCR in cultured cells at low and unchanging levels. Although we did not directly compare StAR mRNA abundance in luteal and granulosa cells, the increased number of amplification cycles required to detect StAR mRNA in cultured granulosa cells makes it clear that levels are substantially lower than those in corpora lutea. As there was no increase in StAR mRNA during the course of culture, during which time mRNA for P450arom, 3 $\beta$ -HSD and 17 $\beta$ -HSD increased, we conclude that granulosa cells do not luteinize under the present culture conditions. The amount of StAR mRNA, and presumably protein, present in the cells may permit continual transfer of low levels of cholesterol into mitochondria, explaining the ability of non-luteinized granulosa cells to secrete progesterone. We suggest that the amounts of progesterone secreted in the present study are normal for non-luteinized cells; when cells are cultured in the presence of serum, progesterone accumulation in medium is typically 10-fold higher than that reported here (unpublished).

Messenger RNA levels may not necessarily be a good reflection of protein synthesis or enzyme activity. However, estradiol accumulation in culture media was consistently correlated with aromatase activity in the present cell

culture system [48], so we cautiously presume that steroid accumulation is a good measure of steroidogenesis. The high degree of correlation between estradiol accumulation and both P450arom and 17 $\beta$ -HSD mRNA levels, and between progesterone and 3 $\beta$ -HSD mRNA level suggests that in this cell model mRNA abundance is a reasonable indication of enzyme synthesis/activity.

It has been reported that bovine antral granulosa cells secrete more estradiol than do basal cells *in vitro* [22, 26, 27]. In agreement with these data, we found similar differences between antral and basal cells when cultured under the conditions previously reported. However, in these cultures estradiol secretion declined after 2 days in culture. When antral and basal cells from the same pool of large follicles were cultured under conditions that favour estradiol secretion [28], we observed no differences in steroid secretion between cell subpopulations. Thus the apparent difference in steroidogenic ability of antral and basal cells previously reported may be an effect of cell culture conditions rather than an inherent difference between the cell types. Although immunohistochemical studies have shown differences in steroidogenic enzyme levels between basal and antral cells in rodents, pigs and humans [49-52], the situation is less clear for cattle. *In situ* hybridization studies in cattle have not specifically examined differences between granulosa cell populations for steroidogenic enzyme genes, and none appear evident [8, 12, 15]. Northern analysis of subpopulations of freshly harvested granulosa cells did not reveal any spatial differences in steroidogenic enzyme



mRNA abundance (present study). Collectively, our data do not support the existence of functional differences between antral and basal bovine granulosa cells, at least in terms of steroidogenesis.

In summary, we have demonstrated that a culture system for bovine granulosa cells that maintains long-term estradiol secretion is a useful model for studying differentiation of 'follicular' granulosa cells in vitro. The cells differentiate in vitro, as evidenced by significant increases in abundance of mRNA encoding P450arom, 17 $\beta$ -HSD and 3 $\beta$ -HSD. Importantly, these cells do not luteinize, as there are no increases in StAR or P450scc mRNA levels. We suggest that the FSH-dependent expression of 17 $\beta$ -HSD may be just as important as that of P450arom for the control of estradiol biosynthesis in bovine follicles, and that 3 $\beta$ -HSD is an important regulator of progesterone biosynthesis in differentiating estrogenic granulosa cells.

### **Acknowledgments**

We thank Mélanie Hamel and Mingju Cao for technical assistance, Drs A.K. Goff, G.M. Cooke and A. Bélanger for steroid antibodies, Dr M.R. Waterman for the bovine P450scc cDNA, Dr F. Labrie for the bovine 3 $\beta$ -HSD cDNA, and Dr A.F. Parlow and the NIDDK National Hormone and Peptide Program for providing bovine FSH. This work was supported by NSERC Canada, and J. M. Silva was supported by CONACYT, Mexico.

**Table I.** Effect of different androgens on mean  $\pm$  SEM estradiol secretion and on P450arom and 17 $\beta$ -HSD mRNA levels in granulosa cells from small follicles (<5mm) cultured under non-luteinizing conditions for 6 days.

Androgen supplied <sup>2</sup>	Estradiol (ng/ug prot)	mRNA abundance <sup>1</sup>	
		P450arom	17 $\beta$ -HSD
Androstenedione	3.2 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	0.55 $\pm$ 0.17	1.24 $\pm$ 0.13
Testosterone	7.2 $\pm$ 1.5 <sup>b</sup>	0.62 $\pm$ 0.11	0.98 $\pm$ 0.11
Dihydrotestosterone	0.4 $\pm$ 0.1 <sup>c</sup>	0.48 $\pm$ 0.16	0.91 $\pm$ 0.13

<sup>1</sup> Arbitrary units.

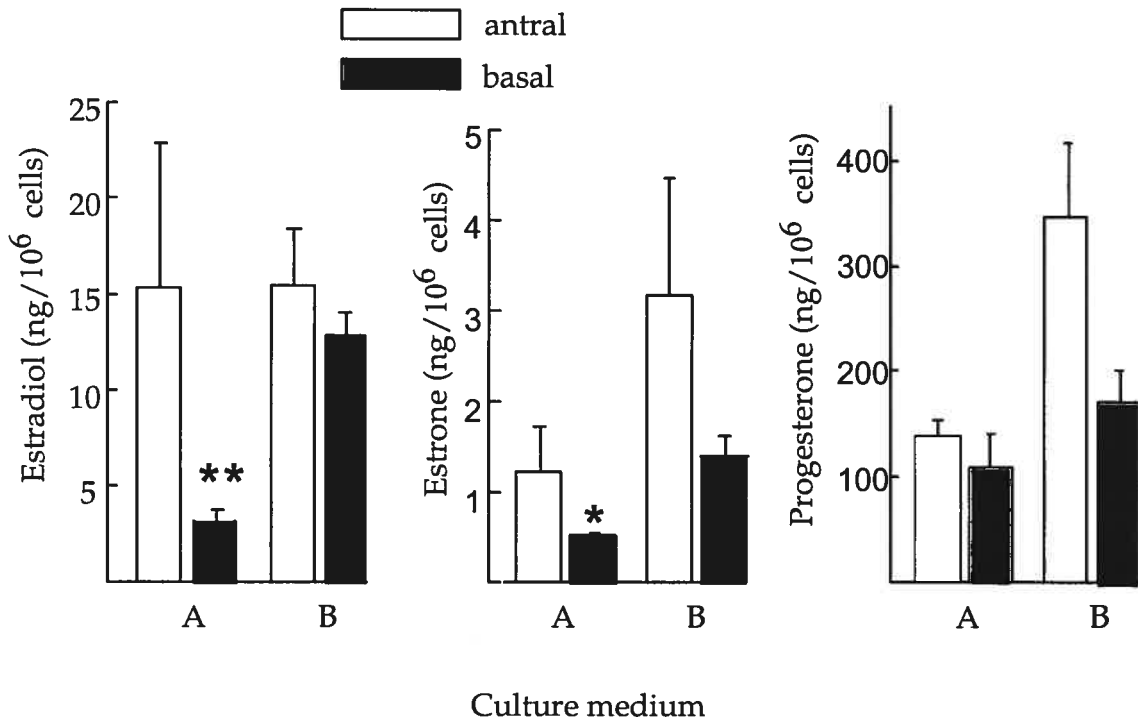
<sup>2</sup> All steroids supplied at 1  $\mu$ M.

<sup>a,b,c</sup> Values are significantly different (P<0.05).

**Figure 1** Steroid secretion from bovine antral and basal granulosa cells after two days of culture in different serum-free media. In Medium A, estradiol secretion decreases in long-term culture (4 days; Rouillier et al., 1996), and in Medium B estradiol secretion increases in long-term culture (Campbell et al., 1996). Cells were collected from large follicles (>8mm). Data are least-squares means ( $\pm$  SEM), and were obtained from 4 replicate experiments.

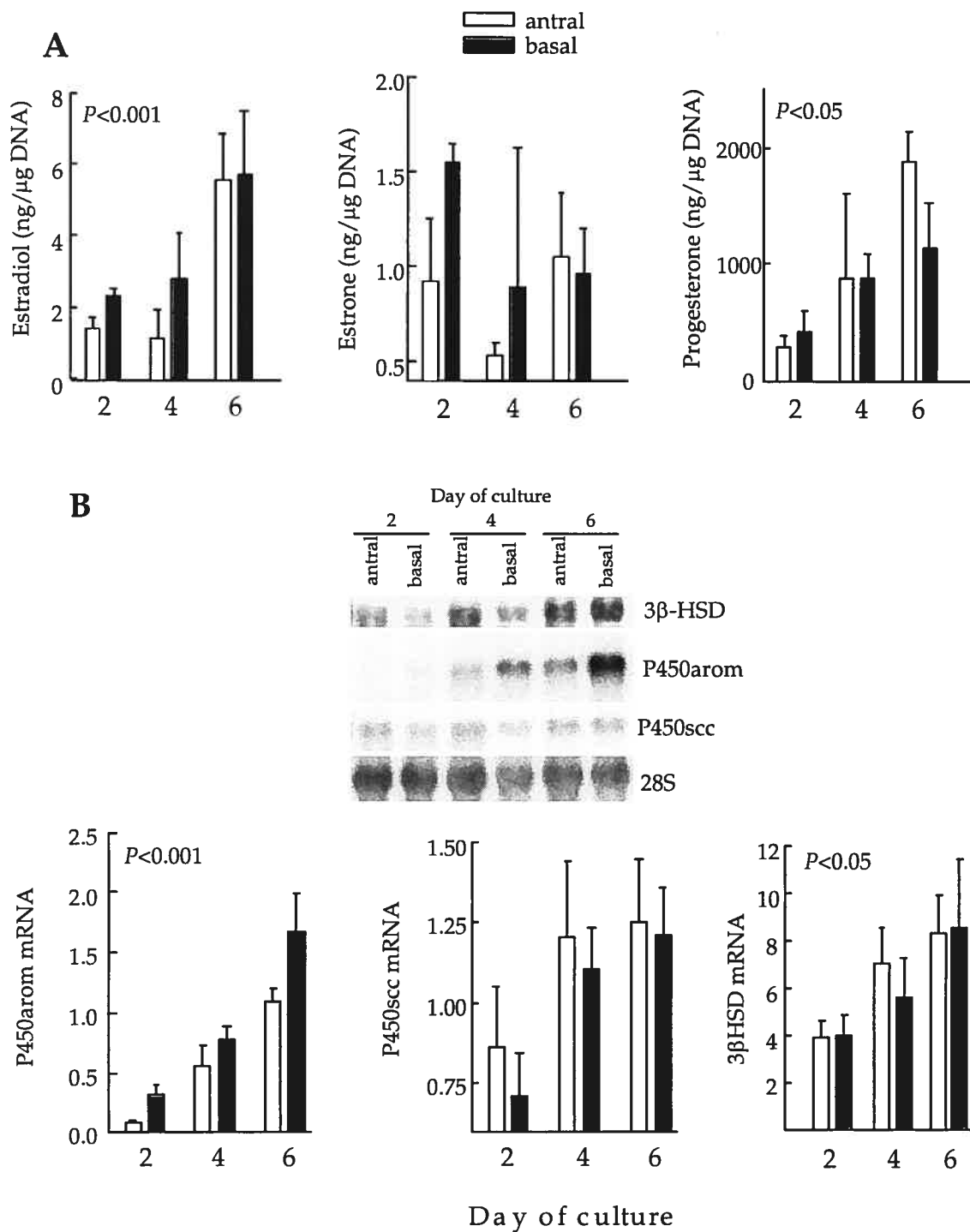
\* Significant difference between antral and basal granulosa cells ( $P < 0.01$ ).

Figure 1



**Figure 2** Steroid secretion (A) and expression of steroidogenic enzyme genes (B) during culture of basal and antral granulosa cells. Antral cells were obtained from small bovine follicles (<5mm) by rinsing the follicle wall after bissection, and basal cells by scraping the follicle wall. Cells were cultured for up to 6 days under conditions that promote long-term estradiol secretion (in Medium B). Data are means  $\pm$  SEM, derived from 5 independent replicate cultures. Steroid secretion is expressed relative to total DNA and mRNA is expressed relative to 28S ribosomal RNA. *P* values are given where there were significant effects of time in culture.

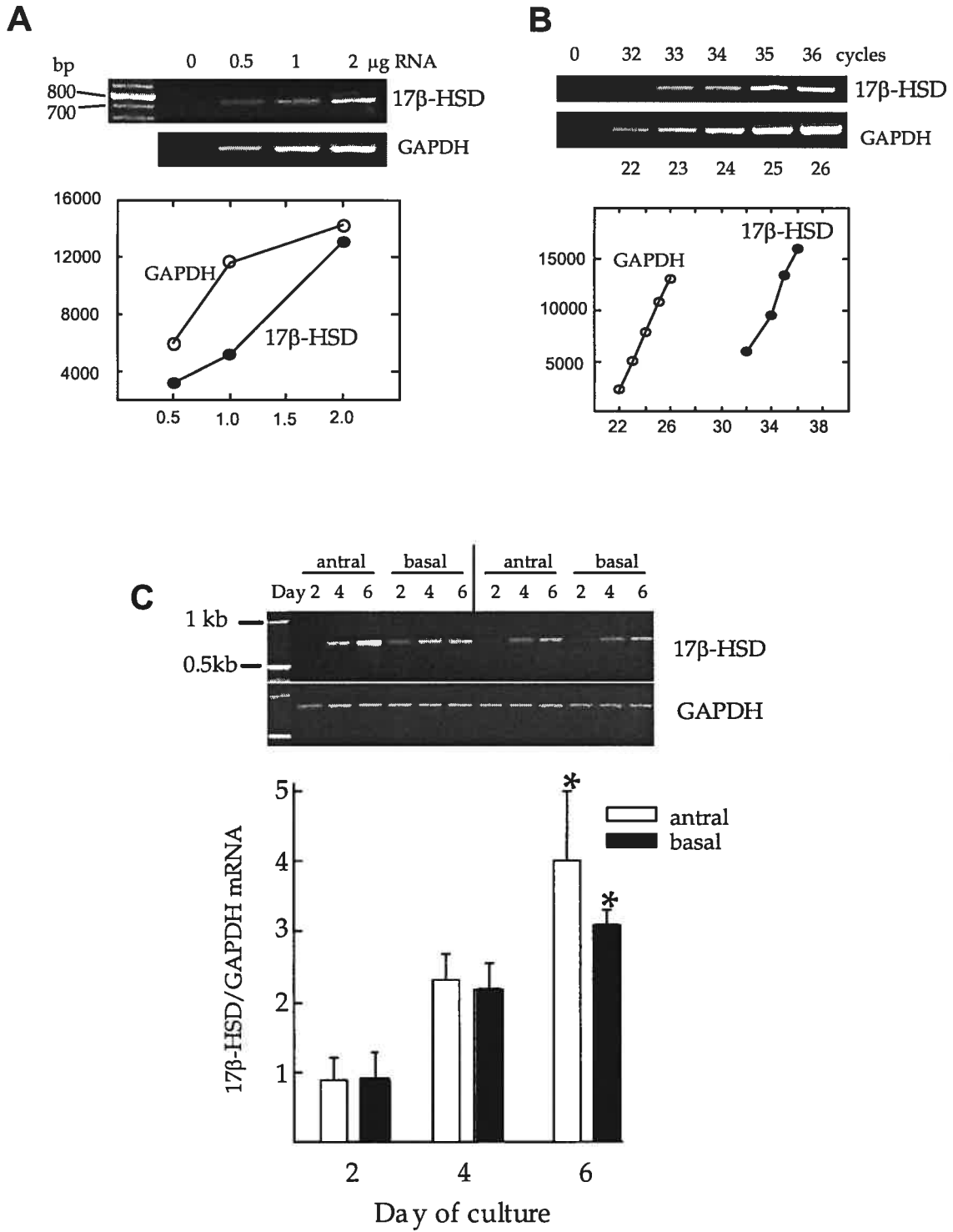
Figure 2



**Figure 3** Expression of 17 $\beta$ -HSD during culture of antral and basal granulosa cells measured by semiquantitative RT-PCR. (A) Titration of total RNA in the RT reaction, followed by amplification of cDNA for 23 (GAPDH) or 35 cycles (17 $\beta$ -HSD). (B) Effect of cycle number on RT-PCR of 1 $\mu$ g RNA. (C) Mean ( $\pm$  SEM; n=5) 17 $\beta$ -HSD mRNA levels relative to GAPDH mRNA in antral and basal cells during culture under conditions that promote long-term estradiol secretion. Antral cells were obtained from small bovine follicles (<5mm) by rinsing the follicle wall after bisection, and basal cells by scraping the follicle wall. The representative gel shows PCR products from two replicates.

\*significantly higher ( $P<0.01$ ) on day 6 than on day 2 for both antral and basal cells.

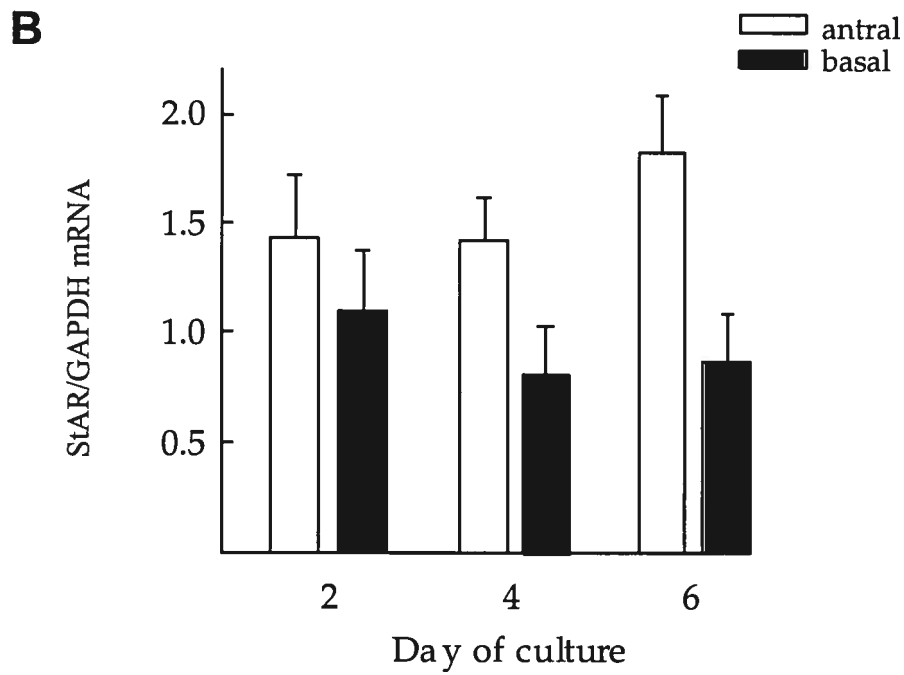
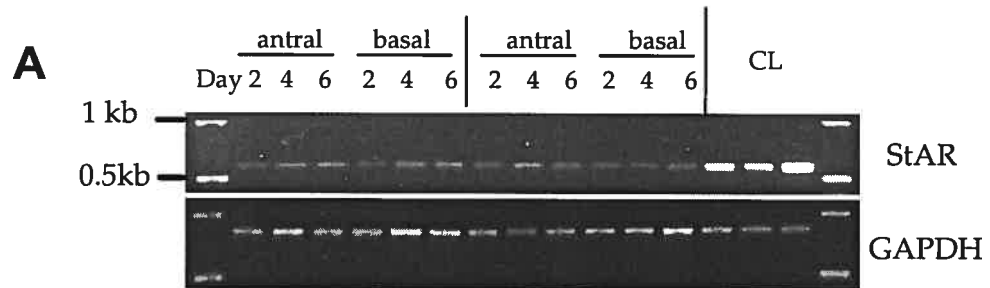
**Figure 3**





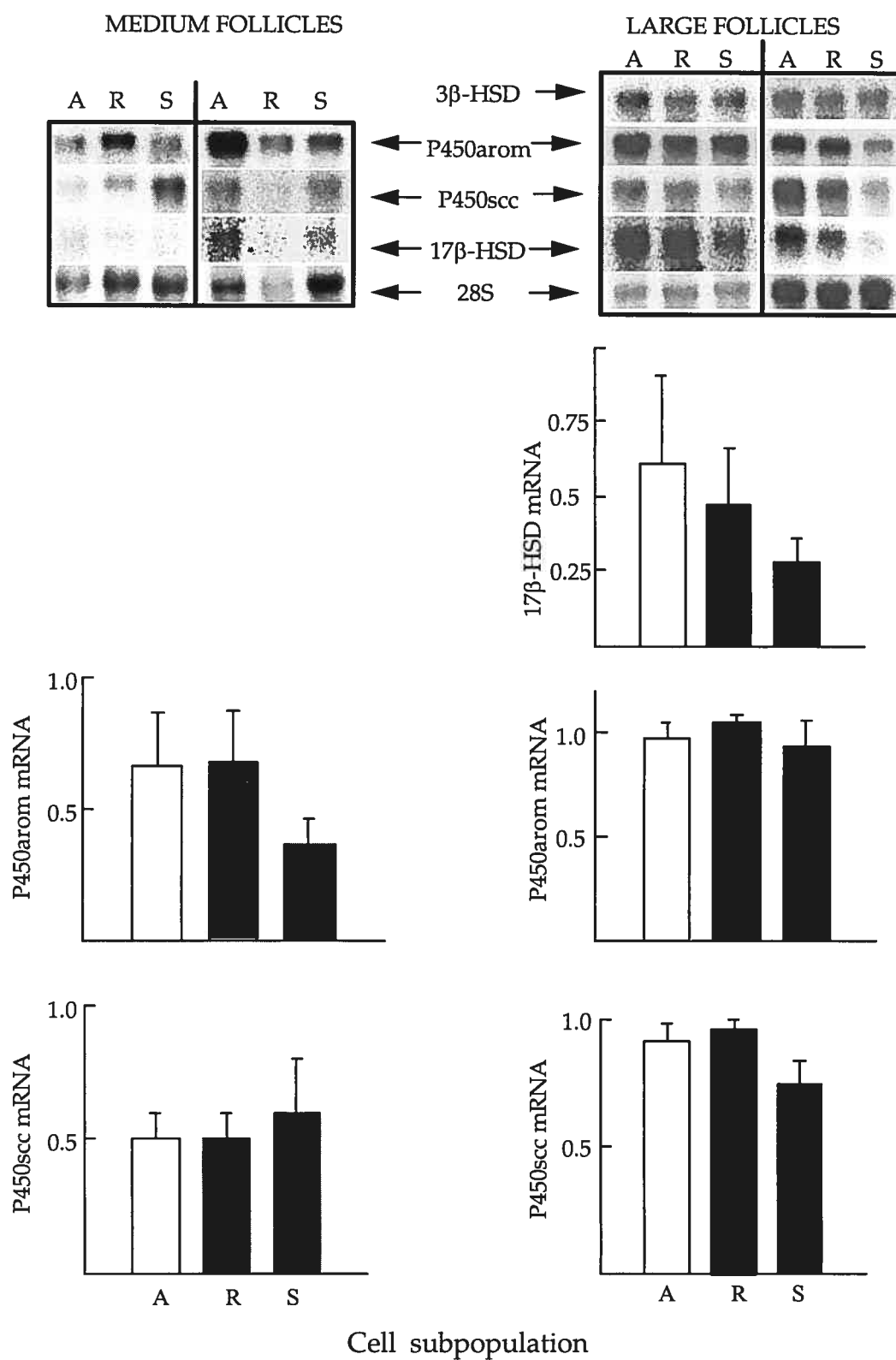
**Figure 4** Expression of StAR during culture of antral and basal granulosa cells measured by semiquantitative RT-PCR. (A) representative gel showing PCR products from two replicates, with samples from three corpora lutea (CL) as controls. (B) Mean ( $\pm$  SEM; n=3) StAR mRNA levels relative to GAPDH mRNA in antral and basal cells during culture under conditions that promote long-term estradiol secretion. Antral cells were obtained from small bovine follicles (<5mm) by rinsing the follicle wall after bisection, and basal cells by scraping the follicle wall.

Figure 4



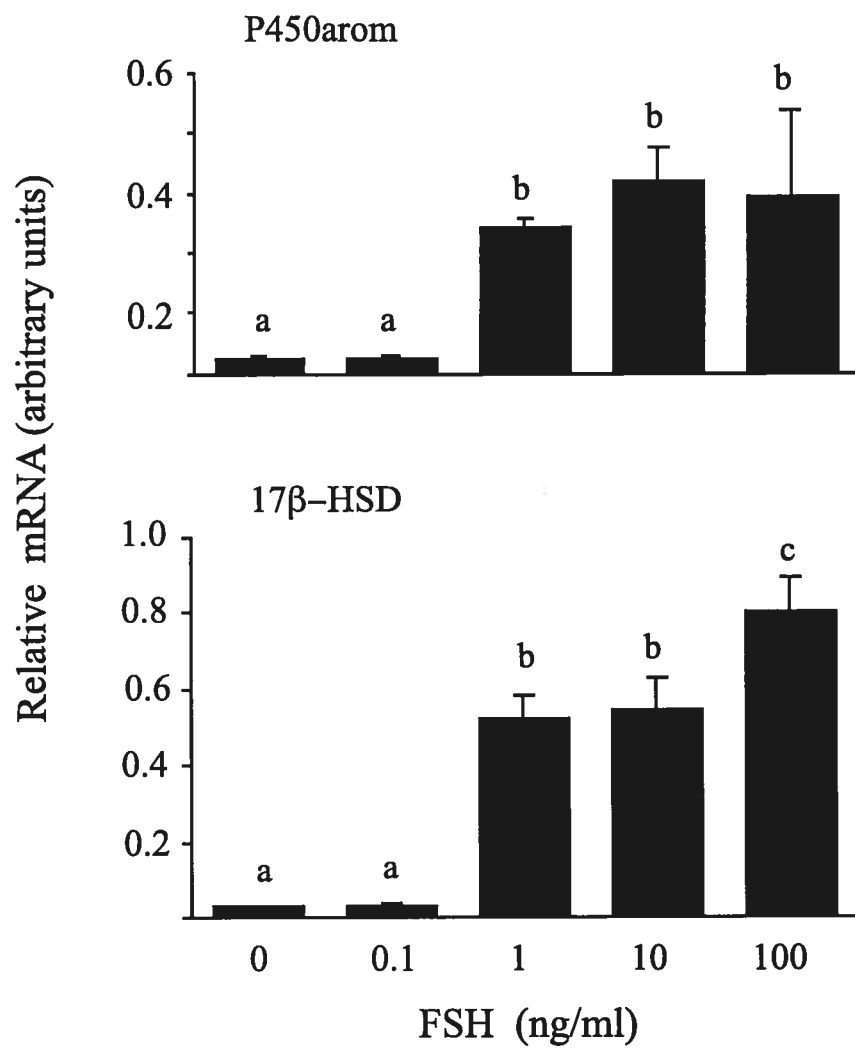
**Figure 5** Northern analysis of mRNA encoding P450arom, P450scc, 3 $\beta$ -HSD and 17 $\beta$ -HSD in granulosa cell subpopulations of individual medium (5-8mm) and large ( $\geq 8$  mm) bovine follicles. The follicles were aspirated and the follicular fluid was centrifuged to yield mostly cumulus and antral granulosa cells (A), lightly adherent cells were isolated by rinsing the follicle wall with  $\alpha$ -MEM (R), and the third cell population was isolated by gently scraping the follicle wall (S). Data are means ( $\pm$  SEM; n=6) of 6 follicles per size group, and are expressed relative to 28S ribosomal RNA. The representative Northern blot shows hybridization signals in the cell subpopulations for each of 4 follicles.

Figure 5



**Figure 6** Effect of FSH on P450arom and 17 $\beta$ -HSD mRNA abundance in granulosa cells in vitro measured by semiquantitative RT-PCR. Cells from small follicles (2-5 mm) were cultured for up to 6 days under conditions that promote long-term estradiol secretion, in the presence of the given doses of FSH. Data are means  $\pm$  SEM, derived from 3 independent replicate cultures. Bars with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

Figure 6



## References

1. Ginther OJ, Beg MA, Bergfelt DR, Donadeu FX, Kot K. Follicle selection in monovular species. *Biol Reprod* 2001; 65: 638-647.
2. Fortune JE, Rivera GM, Evans AC, Turzillo AM. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biol Reprod* 2001; 65: 648-654.
3. Irving-Rodgers HF, van Wezel IL, Mussard ML, Kinder JE, Rodgers RJ. Atresia revisited: two basic patterns of atresia of bovine antral follicles. *Reproduction* 2001; 122: 761-775.
4. Fortune JE. Bovine theca and granulosa cells interact to promote androgen production. *Biol Reprod* 1986; 35: 292-299.
5. Conley AJ, Bird IM. The role of cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the integration of gonadal and adrenal steroidogenesis via the delta 5 and delta 4 pathways of steroidogenesis in mammals. *Biol Reprod* 1997; 56: 789-799.
6. Simpson ER, Davis SR. Minireview: aromatase and the regulation of estrogen biosynthesis--some new perspectives. *Endocrinology* 2001; 142: 4589-4594.
7. Smith LC, Olivera-Angel M, Groome NP, Bhatia B, Price CA. Oocyte quality in small antral follicles in the presence or absence of a large dominant follicle in cattle. *J Reprod Fertil* 1996; 106: 193-199.
8. Bao B, Garverick HA, Smith GW, Smith MF, Salfen BE, Youngquist RS. 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* 1997; 56: 1158-1168.
9. Badinga L, Driancourt MA, Savio JD, Wolfenson D, Drost M, De La Sota RL, Thatcher WW. Endocrine and ovarian responses associated with the first-wave dominant follicle in cattle. *Biol Reprod* 1992; 47: 871-883.

10. Price CA, Carriere PD, Bhatia B, Groome NP. Comparison of hormonal and histological changes during follicular growth, as measured by ultrasonography, in cattle. *J Reprod Fertil* 1995; 103: 63-68.
11. Mihm M, Austin EJ, Good TE, Ireland JL, Knight PG, Roche JF, Ireland JJ. Identification of potential intrafollicular factors involved in selection of dominant follicles in heifers. *Biol Reprod* 2000; 63: 811-819.
12. Xu Z, Garverick HA, Smith GW, Smith MF, Hamilton SA, Youngquist RS. Expression of messenger ribonucleic acid encoding cytochrome P450 side-chain cleavage, cytochrome p450 17 alpha-hydroxylase, and cytochrome P450 aromatase in bovine follicles during the first follicular wave. *Endocrinology* 1995; 136: 981-989.
13. Beg MA, Bergfelt DR, Kot K, Wiltbank MC, Ginther OJ. Follicular-fluid factors and granulosa-cell gene expression associated with follicle deviation in cattle. *Biol Reprod* 2001; 64: 432-441.
14. Evans AC, Fortune JE. Selection of the dominant follicle in cattle occurs in the absence of differences in the expression of messenger ribonucleic acid for gonadotropin receptors. *Endocrinology* 1997; 138: 2963-2971.
15. Bao B, Garverick HA, Smith GW, Smith MF, Salfen BE, Youngquist RS. Expression of messenger ribonucleic acid (mRNA) encoding 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase delta4,delta5 isomerase (3beta-HSD) during recruitment and selection of bovine ovarian follicles: identification of dominant follicles by expression of 3beta-HSD mRNA within the granulosa cell layer. *Biol Reprod* 1997; 56: 1466-1473.
16. Carriere PD, Harvey D, Cooke GM. The role of pregnenolone-metabolizing enzymes in the regulation of oestradiol biosynthesis during development of the first wave dominant follicle in the cow. *J Endocrinol* 1996; 149: 233-242.
17. Soumano K, Price CA. Ovarian follicular steroidogenic acute regulatory protein, low-density lipoprotein receptor, and cytochrome P450 side-



- chain cleavage messenger ribonucleic acids in cattle undergoing superovulation. *Biol Reprod* 1997; 56: 516-522.
18. Bao B, Calder MD, Xie S, Smith MF, Salfen BE, Youngquist RS, Garverick HA. Expression of steroidogenic acute regulatory protein messenger ribonucleic acid is limited to theca of healthy bovine follicles collected during recruitment, selection, and dominance of follicles of the first follicular wave. *Biol Reprod* 1998; 59: 953-959.
  19. Stocco DM. StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. *Annu Rev Physiol* 2001; 63: 193-213.
  20. Henderson KM, Moon YS. Luteinization of bovine granulosa cells and corpus luteum formation associated with loss of androgen-aromatizing ability. *J Reprod Fertil* 1979; 56: 89-97.
  21. Skinner MK, Osteen KG. Developmental and hormonal regulation of bovine granulosa cell function in the preovulatory follicle. *Endocrinology* 1988; 123: 1668-1675.
  22. Roberts AJ, Echternkamp SE. In vitro production of estradiol by bovine granulosa cells: evaluation of culture condition, stage of follicular development, and location of cells within follicles. *Biol Reprod* 1994; 51: 273-282.
  23. Berndtson AK, Vincent SE, Fortune JE. Low and high concentrations of gonadotropins differentially regulate hormone production by theca interna and granulosa cells from bovine preovulatory follicles. *Biol Reprod* 1995; 52: 1334-1342.
  24. Berndtson AK, Weaver CJ, Fortune JE. Differential effects of oxytocin on steroid production by bovine granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 1996; 116: 191-198.
  25. Saumande J. Culture of bovine granulosa cells in a chemically defined serum-free medium: the effect of insulin and fibronectin on the response to FSH. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1991; 38: 189-196.
  26. Rouillier P, Matton P, Sirard MA, Guilbault LA. Follicle-stimulating hormone-induced estradiol and progesterone production by bovine

- antral and mural granulosa cells cultured in vitro in a completely defined medium. *J Anim Sci* 1996; 74: 3012-3019.
27. Rouillier P, Matton P, Dufour M, Sirard MA, Guilbault LA. Steroid production, cell proliferation, and apoptosis in cultured bovine antral and mural granulosa cells: development of an in vitro model to study estradiol production. *Mol Reprod Dev* 1998; 50: 170-177.
  28. Campbell BK, Scaramuzzi RJ, Webb R. Induction and maintenance of oestradiol and immunoreactive inhibin production with FSH by ovine granulosa cells cultured in serum-free media. *J Reprod Fertil* 1996; 106: 7-16.
  29. Gutierrez CG, Campbell BK, Webb R. Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle-stimulating hormone, and morphological characteristics. *Biol Reprod* 1997; 56: 608-616.
  30. Manuel Silva J, Price CA. Effect of follicle-stimulating hormone on steroid secretion and messenger ribonucleic acids encoding cytochromes P450 aromatase and cholesterol side-chain cleavage in bovine granulosa cells in vitro. *Biol Reprod* 2000; 62: 186-191.
  31. Silva JM, Price CA. Insulin and IGF-I are necessary for FSH-induced cytochrome P450 aromatase but not cytochrome P450 side-chain cleavage gene expression in oestrogenic bovine granulosa cells in vitro. *J Endocrinol* 2002; 174: 499-507.
  32. Soumano K, Silversides DW, Doize F, Price CA. Follicular 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and cytochromes P450 17 alpha-hydroxylase and aromatase messenger ribonucleic acids in cattle undergoing superovulation. *Biol Reprod* 1996; 55: 1419-1426.
  33. Zhao HF, Simard J, Labrie C, Breton N, Rhéaume E, Luu-The V, Labrie F. Molecular cloning, cDNA structure and predicted amino acid sequence of bovine 3 beta-hydroxy-5-ene steroid dehydrogenase/delta 5-delta 4 isomerase. *FEBS Lett* 1989; 259: 153-157.

34. Gonzalez IL, Gorski JL, Campen TJ, Dorney DJ, Erickson JM, Sylvester JE, Schmickel RD. Variation among human 28S ribosomal RNA genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82: 7666-7670.
35. Mamluk R, Greber Y, Meidan R. Hormonal regulation of messenger ribonucleic acid expression for steroidogenic factor-1, steroidogenic acute regulatory protein, and cytochrome P450 side-chain cleavage in bovine luteal cells. *Biol Reprod* 1999; 60: 628-634.
36. Tsai SJ, Wiltbank MC, Bodensteiner KJ. Distinct mechanisms regulate induction of messenger ribonucleic acid for prostaglandin (PG) G/H synthase-2, PGE (EP3) receptor, and PGF2 alpha receptor in bovine preovulatory follicles. *Endocrinology* 1996; 137: 3348-3355.
37. Bélanger A, Couture J, Caron S, Roy R. Determination of nonconjugated and conjugated steroid levels in plasma and prostate after separation on C-18 columns. *Ann N Y Acad Sci* 1990; 595: 251-259.
38. Lafrance M, Goff AK. Effect of pregnancy on oxytocin-induced release of prostaglandin F2 alpha in heifers. *Biol Reprod* 1985; 33: 1113-1119.
39. Robertson HA, Dwyer RJ, King GJ. Effect of oestrogen antisera early in gestation on pregnancy maintenance in the pig. *J Reprod Fertil* 1980; 58: 115-120.
40. Luu-The V. Analysis and characteristics of multiple types of human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2001; 76: 143-151.
41. Akinola LA, Poutanen M, Vihko R, Vihko P. Expression of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and type 2, P450 aromatase, and 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase enzymes in immature, mature, and pregnant rats. *Endocrinology* 1997; 138: 2886-2892.
42. Kaminski T, Akinola L, Poutanen M, Vihko R, Vihko P. Growth factors and phorbol-12-myristate-13-acetate modulate the follicle-stimulating hormone- and cyclic adenosine-3',5'-monophosphate-dependent

- regulation of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression in rat granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 1997; 136: 47-56.
43. Ghersevich S, Poutanen M, Tapanainen J, Vihko R. Hormonal regulation of rat 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in cultured rat granulosa cells: effects of recombinant follicle-stimulating hormone, estrogens, androgens, and epidermal growth factor. *Endocrinology* 1994; 135: 1963-1971.
  44. Ghersevich SA, Poutanen MH, Martikainen HK, Vihko RK. Expression of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in human granulosa cells: correlation with follicular size, cytochrome P450 aromatase activity and oestradiol production. *J Endocrinol* 1994; 143: 139-150.
  45. Smith MF, McIntush EW, Smith GW. Mechanisms associated with corpus luteum development. *J Anim Sci* 1994; 72: 1857-1872.
  46. Juengel JL, Meberg BM, Turzillo AM, Nett TM, Niswender GD. Hormonal regulation of messenger ribonucleic acid encoding steroidogenic acute regulatory protein in ovine corpora lutea. *Endocrinology* 1995; 136: 5423-5429.
  47. Hartung S, Rust W, Balvers M, Ivell R. Molecular cloning and in vivo expression of the bovine steroidogenic acute regulatory protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 215: 646-653.
  48. Bhatia B, Price CA. Insulin alters the effects of follicle stimulating hormone on aromatase in bovine granulosa cells in vitro. *Steroids* 2001; 66: 511-519.
  49. Zoller LC, Weisz J. A quantitative cytochemical study of glucose-6-phosphate dehydrogenase and delta 5-3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in the membrana granulosa of the ovulable type of follicle of the rat. *Histochemistry* 1979; 62: 125-135.
  50. Inkster SE, Brodie AM. Expression of aromatase cytochrome P-450 in premenopausal and postmenopausal human ovaries: an immunocytochemical study. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 73: 717-726.

51. Lautincik J, Kolodzieyski L, Elias V, Hyttel P, Osawa Y, Sirotkin A. Immunocytochemical localization of aromatase in the ovary of superovulated cattle, pigs and sheep. *Acta Vet Scand* 1994; 35: 185-191.
52. Turner KJ, Macpherson S, Millar MR, McNeilly AS, Williams K, Cranfield M, Groome NP, Sharpe RM, Fraser HM, Saunders PT. Development and validation of a new monoclonal antibody to mammalian aromatase. *J Endocrinol* 2002; 172: 21-30.

## Article 2

**Stability of cytochrome P450 aromatase mRNA in non-luteinizing bovine  
granulosa cells in vitro.**

M. Sahmi, E.S. Nicola, and C.A. Price\*

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

\*Correspondence Fax: 450-778-8103

Email: [christopher.price@umontreal.ca](mailto:christopher.price@umontreal.ca)

Key words: aromatase mRNA stability, half-life, granulosa cells.

Short title: aromatase mRNA half-life in bovine granulosa cells

## Résumé

L'expression de l'ARNm, protéine et activité de l'aromatase dans l'ovaire est régulée différemment durant la croissance folliculaire et la lutéinisation. La FSH et l'insuline jouent un rôle important dans la stimulation de l'activité et de l'ARNm P450arom dans les cellules de granulosa bovine non-lutéinisées. Un effet inhibiteur de la LH a aussi été observé au niveau des cellules de granulosa bovine in vitro après réduction des concentrations d'insuline et d'IGF1. Cependant la demi-vie de l'ARNm P450arom n'est pas connue. L'objectif de cette étude était de déterminer la demi-vie de l'ARNm P450arom dans les cellules de granulosa non-lutéinisées et de déterminer si la demi-vie est régulée. La demi-vie de l'ARNm P450arom des cellules stimulées à la FSH, obtenue après blocage de l'activité transcriptionnelle soit par le 5,6-dichloro-1- $\beta$ -D-ribofuranosylbenzimidazole (DRB 20  $\mu$ g/ml) ou l'actinomycine D (Act D 5  $\mu$ g/ml), était estimée à  $3.1 \pm 0.5$  et  $2.6 \pm 0.2$  h respectivement. Par ailleurs, la demi-vie de l'ARNm P450scc dans les même échantillons était de 14 h. l'analyse de la demi-vie de l'activité enzymatique de P450arom était de 6 h. Le traitement des cellules avec de l'insuline ou du dibutyryl-AMPc (db-AMPc) prolonge légèrement la demi-vie. Le traitement avec l'inhibiteur des MAPK (PD98059) augmentait les concentrations d'ARNm P450arom mais n'avait pas d'effet sur la stabilité de l'ARNm. Tandis que le traitement à la cycloheximide (CHX), un inhibiteur de la synthèse protéique, stabilise l'ARNm. On a conclu que la demi-vie de l'ARNm



P450arom est très courte pour une enzyme stéroïdogénique et cette demi-vie est régulée. Cette régulation pourrait impliquer quelques protéines trans-régulatrices dans la mesure où la cycloheximide prolonge la demi-vie et stabilise l'ARNm P450arom.

### **Abstract**

Expression of aromatase mRNA, protein and activity in the ovary is differentially regulated during follicular growth and luteinization. FSH and insulin play an important role in stimulating aromatase activity and P450 arom mRNA in non-luteinizing bovine granulosa cells, also an inhibitory effect has already been described for bovine granulosa cells following reduction in insulin and IGF-1 concentration in vitro. However the half-life of P450arom mRNA is not known. The aim of this study is to determine the P450arom mRNA half-life in non-luteinizing bovine granulosa cells and to determine if mRNA stability is regulated. The half-life of P450 arom mRNA measured following addition of transcriptional inhibitors as 5,6-dichloro-1- $\beta$ -D-ribofuranosylbenzimidazole (DRB 20 $\mu$ g/ml) or actinomycin D (ActD 5 $\mu$ g/ml) in FSH-stimulated cells was estimated to be  $3.1 \pm 0.5$  and  $2.6 \pm 0.2$  h respectively, whereas the half-life for P450 scc mRNA in these same samples was 14 h. The half-life for aromatase enzyme activity was 6 h. Addition of insulin or dibutyryl-cAMP (db-cAMP) prolong lightly the half-life, PD98059 an inhibitor of MAPK increased steady state levels of P450 arom mRNA but had

no effect on the stability of the mRNA whereas cycloheximide (CHX) an inhibitor of protein synthesis, stabilized the mRNA. We conclude that the half-life of the P450arom mRNA is very short for a steroidogenic enzyme and this half-life is regulated. This regulation may require some trans-acting proteins as CHX prolongs the half-life and stabilizes P450arom mRNA.

## **Introduction**

Ovarian follicle growth in cattle and sheep occurs in 'waves', during which a single potentially ovulatory follicle arises [1, 2]. Studies of follicular steroidogenesis have indicated that granulosa cells undergo sequential changes in steroidogenic capability as the dominant follicle emerges and grows. Steroidogenesis in granulosa cells in cattle is dependent on thecal androgen secretion, as bovine granulosa cells do not express the enzymes necessary for the conversion of progestins into androgens [3]. Androstenedione is a preferred substrate for ruminant granulosa cells, and is converted to estrone by cytochrome P450 aromatase (P450arom) [4], which is then converted to estradiol by 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type I (17 $\beta$ -HSD) [5]. Testosterone can also be used as a substrate, and is converted directly to estradiol by P450arom.

Small follicles contain low concentrations of estradiol [6] and little if any P450arom [7]. As follicles grow to the selection stage (6-8 mm in cattle), there are marked increases in estradiol content [8-10] and P450arom mRNA

abundance [3, 7], and dominant follicles secrete more estradiol than subordinate follicles [10, 11] and express greater levels of P450arom [12].

Estradiol secretion is essential for normal reproduction, not only for the development of secondary sexual characteristics but also follicle development [13, 14]. Estrogen is necessary for the induction of LH receptors on granulosa cells [15], and as a consequence aromatase knock-out mice do not ovulate [16]. Estradiol may be necessary for follicle growth in cattle in vivo [17]. It is thus important to understand fully the regulation of P450arom expression and activity. Several cell models have been used to study factors involved in the regulation of P450arom. It is well known that FSH is a primary stimulator of granulosa P450arom expression in rodents, humans and cattle [18-21]. It is also clear that insulin and/or insulin-like growth factor-1 (IGF-1) play important roles in stimulating aromatase activity and P450arom mRNA levels in non-luteinizing bovine granulosa cells [22, 23].

P450arom gene expression can also be inhibited. The most marked example of this is the rapid decline in granulosa cell estradiol secretion and P450arom protein and mRNA levels that follows the LH surge in cattle, which occur over a period of several hours [24-26]. A similar effect of LH has also been observed in rat granulosa cells in vitro [27]. A rapid decrease of P450arom mRNA levels has been described for bovine granulosa cells following a reduction in insulin and IGF-1 concentrations in vitro [23]. Collectively, the above studies have suggested that under certain circumstances P450arom mRNA and protein levels can decline by over 50% within 6-8 hours. This is inconsistent with the reported half-life of

approximately 12 hours reported for P450arom mRNA in human granulosa [28] and placental choriocarcinoma cells [29]. The half-life of bovine P450arom mRNA is not known.

The objectives of the present study were to determine the half-life of P450arom mRNA in non-luteinizing bovine granulosa cells in vitro, and to determine if mRNA stability is regulated. Based on the high homology between bovine and human aromatase [30], we tested the hypothesis that the stability of bovine P450arom mRNA is similar to that of the human, and that aromatase activity is destabilized by the withdrawal of gonadotropic support.

## **Materials and Methods**

### *Cell culture*

The cell culture system was based on that described previously [31], and used in our laboratory [23]. All materials were obtained from Invitrogen Life Technologies (Burlington, ON, Canada) unless otherwise stated.

Briefly, bovine ovaries were collected at a local abattoir and transported to the laboratory at 35°C in PBS containing penicillin (100 IU/ml), streptomycin (100 µg/ml) and fungizone (1 µg/ml). On arrival at the laboratory, the ovaries were rinsed in ethanol then in PBS (with antibiotics). Follicles were dissected free of surrounding tissue, and small follicles (2-5 mm diameter) were bisected in  $\alpha$ MEM at 37°C. Granulosa cells were recovered by passing the follicle walls repeatedly through a 1 ml disposable

pipette. Cells were washed 3 times in  $\alpha$ MEM containing penicillin (100 IU/ml) and streptomycin (100  $\mu$ g/ml), then resuspended in culture medium. Cell viability was estimated at 30-40% by Trypan blue exclusion.

Cells were seeded into 24-well tissue culture plates (Falcon; Becton Dickinson and Company, New Jersey) at a density of  $10^6$  viable cells in 1 ml of  $\alpha$ -MEM with L-glutamine containing sodium bicarbonate (10 mM), Hepes (20 mM), protease-free BSA (0.1 %; Sigma Chemical Co), sodium selenite (4 ng/ml), transferrin (2.5  $\mu$ g/ml), androstenedione ( $10^{-7}$  M; Sigma), human recombinant IGF-1 (10 ng/ml), insulin (10 ng/ml except where stated otherwise), non-essential amino acid mix (1.1 mM), penicillin (100 IU/ml) and streptomycin (100  $\mu$ g/ml). Cells were stimulated with FSH and/or insulin as described below. Cultures were maintained at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>, 95% air for 6 days, with 700  $\mu$ l medium being replaced every 2 days.

In order to induce P450<sub>arom</sub> gene expression and estradiol secretion, cells in most experiments were stimulated with either FSH (AFP-5332B; 1 ng/ml) or insulin (100 ng/ml). These doses of FSH and of insulin (in the absence of FSH) stimulate P450<sub>arom</sub> mRNA levels and estradiol production without affecting P450<sub>scc</sub> or progesterone production [23]. In other experiments, cells were incubated with dibutyryl-cAMP (dbcAMP) (300  $\mu$ M; Sigma), the translation inhibitor cycloheximide (CHX; 20  $\mu$ g/ml) or the specific MAP kinase inhibitor PD-98059 (50  $\mu$ M; Sigma) to measure the effects of these treatments on P450<sub>arom</sub> mRNA stability.

### *Aromatase activity assay*

Stability of aromatase activity was measured by replacing the culture medium on day 6 with medium containing CHX (20  $\mu\text{g/ml}$ ) or medium devoid of FSH. Samples were then collected at 4, 8, 12, 26 and 52 h after treatment. Control samples received normal medium without CHX and were collected at 4 and 52 h. Aromatase activity was measured by the tritiated water assay as validated in this cell culture system [40]. Briefly, 2-3 pmol ( $1\beta$ - $^3\text{H}$ )androstenedione were added to each well 6 h before each sample collection time. At each time point, media were collected and frozen before assay, and total cell protein harvested by incubating cells with 200  $\mu\text{l}$  1M NaOH for 4 h. The extract was neutralized with 200  $\mu\text{l}$  of 1M HCl, and cell protein quantified with the Bradford protein assay (BioRad, Mississauga, ON, Canada). The spent media were extracted twice with 2x volume chloroform, and the amount of tritiated water in the aqueous phase was determined by liquid scintillation counting. The data were corrected for cell number (total protein) and expressed relative to the 4-h control.

### *P450arom mRNA stability assay*

Stability of P450arom mRNA was measured after the addition of transcriptional inhibitors actinomycin D (ActD; 5  $\mu\text{g/ml}$ ; Sigma) or 5,6-dichloro-1- $\beta$ -D-ribofuranosylbenzimidazole (DRB; 75  $\mu\text{g/ml}$ ; Sigma). Cultures were terminated at the time points given in Results by the removal of medium and

addition of 150  $\mu$ l Trizol/well. The plates were then frozen until RNA extraction. For cells stimulated with FSH, insulin or dbcAMP, ActD or DRB were added on day 6 of culture. In some experiments, the cells were pretreated with CHX (20  $\mu$ g/ml) for 4 h or with PD-98059 for 48 h before the addition of DRB.

#### *RNA extraction and Northern hybridization*

Total RNA from fresh and cultured cells was extracted by the standard Trizol procedure. The relative abundance of mRNA was determined in some experiments by Northern hybridization. Electrophoresis of 15  $\mu$ g RNA was performed through a 1 % denaturing formaldehyde-agarose gel followed by overnight capillary transfer onto a nylon membrane (Hybond-N; Amersham, Oakville, ON, Canada). Membranes were UV cross-linked in a commercial UV chamber (Bio Rad, Mississauga, ON, Canada) and incubated for 2 h in prehybridization solution containing 10% dextran sulfate, 5-strength saline-sodium phosphate-EDTE buffer (SSPE), 5-strength Denhardt's solution, 0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS) and herring sperm DNA (200 mg/ml).

The bovine P450<sub>arom</sub> cDNA probe was prepared in our laboratory, and encompasses the entire heme-binding and I-helix regions of the open reading frame [32]. The bovine P450<sub>scc</sub> cDNA was a gift from Dr M R Waterman (Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, TN), and is a 1.7 kb cDNA containing the complete coding sequence [33]. Probes were labeled with [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP by random primer extension using a kit from

Boehringer Mannheim (Laval, QC, Canada) to a specific activity of  $1-3 \times 10^9$  dpm/ $\mu$ g, and purified by centrifugation through a minicolumn using Wizard PCR Preps DNA purification system (Promega, Montréal, QC, Canada). Hybridization to the membranes was performed over-night at 65 °C. After hybridization, membranes were washed in 2 X SSPE-0.1 % SDS twice at room temperature (15 min each), and twice at 65 °C (15 min each). Membranes were then stripped and rehybridized to a labeled human 28 S ribosomal cDNA probe [34] for the standardization of RNA loading. The labeled membranes were either exposed to Kodak X-Omat film at -70 °C in the presence of an intensifying screen and autoradiograms were scanned with a densitometer after 1 to 14 days exposure, or were exposed to a Kodak phosphor screen for 3 days and digitalized with a phosphorimager (Molecular Dynamics Storm 840; Amersham Biosciences). Bands were quantified with NIH Image (autoradiograms) or ImageQuant software (Molecular Dynamics).

### *RT-PCR*

Measuring mRNA half-life by Northern blot in bovine granulosa cells in culture requires a large number of cells. Therefore we measured P450arom mRNA half-life also by semiquantitative RT-PCR. Reverse transcription was performed with 1  $\mu$ g total RNA and OmniScript reverse transcriptase. The primers for P450arom were 5'-CTGAAGCAACAGGAGTCCTAAATGTACA-3' (sense) and 5'-GGACTAGTAATGAGGGGCCCAATTCCCAGA-3' (antisense). The housekeeping gene used was histone H2a (primers given in Robert



2002). Cycling conditions for aromatase were denaturing at 94 °C for 3 min, followed by 27 cycles of 94 °C for 45 sec, 60 °C for 30 sec and 72 °C for 1 min. Cycling conditions for histone H2a were denaturing at 94 °C for 3 min, followed by 30 cycles of 94 °C for 30 sec, 55 °C for 45 sec and 72 °C for 1 min. Amplification was performed within the linear range for each primer pair, and PCR products were visualised on agarose gels after staining with ethidium bromide and quantified with NIH Image software. The fidelity of PCR was tested by analyzing selected samples by both Northern and PCR.

### *Statistics*

The density of Northern hybridization signals was corrected for loading efficiency using hybridization to 28s ribosomal RNA, and PCR data are expressed as the ratio between P450arom and histone H2a cDNA amplified. Data were expressed relative to control (without inhibitor) samples. Half-lives of mRNA and enzyme activity were determined from semilog plots of mRNA/activity and time. Analysis of variance (ANOVA) was used to test effects of treatments on half-life. Culture replicate was included as a random variable in the F-test for the effect of experiment. Differences between groups were identified with the Tukey-Kramer HSD test. Analyses were performed with JMP<sup>®</sup> software (SAS Institute, Cary, NC). The data are presented as means  $\pm$  SEM.

## Results

In the first experiment, we measured by Northern blot P450arom mRNA decay over 24 h following DRB or ActD inhibition of transcription in the presence of FSH. The mean half-life was  $3.1 \pm 0.5$  h and  $2.6 \pm 0.2$  h for DRB and ActD, respectively (Fig 1). There was no difference between these two inhibitors. The half-life of P450scc mRNA in the same samples was approximately 14 h (Fig 1). Analysis of the data by RT-PCR provided the same estimate of P450arom decay as Northern blot (Fig 1 insert).

To ascertain the impact of rapid loss of P450arom mRNA levels on estradiol synthetic ability of granulosa cells, we blocked translation with CHX and measured the rate of decay of aromatase activity with the tritiated water method. The half-life of activity following the addition of CHX or the withdrawal of gonadotropin support (FSH) was 7-8 h (Fig 2), with no significant difference between treatments.

To determine if P450arom mRNA stability is regulated, we cultured cells under different conditions known to induce/increase steady state P450arom mRNA levels. Cells were cultured with 1 ng FSH, FSH plus PD-98059, FSH plus CHX, 100 ng insulin (without FSH) or 300  $\mu$ M dbcAMP, and mRNA decay was determined following the addition of DRB. The addition of PD-98059 to FSH-stimulated cells increased steady-state levels of P450arom mRNA compared to FSH alone, but had no effect on mRNA stability (Fig 3). The addition of CHX did not have an effect on steady-state level but significantly stabilized mRNA P450arom (Fig 3).

Insulin and dbcAMP resulted in half-lives slightly longer than that observed with FSH ( $P > 0.05$ ).

## Discussion

Relatively little is known about the post-transcriptional control of steroidogenic enzyme gene activity. We have previously observed a rapid (within 6 h) reduction in P450arom mRNA levels in bovine granulosa cells following the withdrawal of gonadotopic support [23], and hypothesized that this was caused by a destabilization of the mRNA. In the first experiments reported here, we determined that the half-life of P450arom mRNA in FSH-stimulated cells was to our surprise approximately 3h, far shorter than expected. This is in complete contrast with studies of human granulosa cancer cells [28] and placental choriocarcinoma cells [29], for which P450arom mRNA half-life was estimated at between 13 and 16 h. These long estimates for P450arom half-life may be restricted to cancer cells however, as studies with rat [27] and rabbit [35] granulosa cells have reported half-lives of between 4 and 7 h.

For the short half-life of P450arom to be physiologically relevant, it must be reflected by rapid changes in estradiol synthesis/secretion. We tested this by either withdrawing gonadotropic support (FSH) from the culture medium or adding the translation inhibitor CHX. In both cases, aromatase

activity was reduced to 50% of control levels by 7-8 h. This suggests that a component of the aromatase enzyme complex is labile, probably P450arom as 24 h of treatment with CHX reduced aromatase protein levels in a human choriocarcinoma cell line [36]. Considering the stability of P450arom mRNA and activity in a sequential manner, it is reasonable to propose that once a signal to turn off P450arom gene expression is received, a significant decrease in estradiol output would be observed after 10-11 h. This is consistent with plasma and follicular fluid measurements of estradiol following the LH surge in cattle [24-26], although significant changes to androgen precursor supply to the granulosa cell layer also contributes to the post-LH decline of estradiol secretion in vivo [25, 26].

These studies also provide valuable new information about the post-transcriptional regulation of P450arom. The translation inhibitor CHX stabilized P450arom mRNA, as has been demonstrated in granulosa cells from immature estrogen-treated rats [27]. These data thus support the hypothesis that a labile protein is required to ensure the rapid degradation of bovine as well as rat [27] granulosa cell P450arom mRNA. Insulin and dbcAMP stimulated P450arom mRNA abundance as expected from previous studies [20], and do so primarily at the level of transcription as P450 arom mRNA is not detectable in the absence of these stimulators [20]. The half-life of insulin- and dbcAMP-induced P450 mRNA was longer than that stimulated by FSH, but shorter than that in the presence of CHX. These results suggest that insulin and dbcAMP also control P450arom mRNA at a post-

transcriptional level, likely through reduced expression of the putative protein that degrades P450arom.

The addition of the MAP kinase inhibitor PD-98059 to FSH-stimulated cells increased steady-state P450arom mRNA abundance compared to FSH alone, as we have previously noted in these cells (Silva JM & Price CA, unpublished). The action of PD-98059 is clearly at the transcriptional level, as it had no effect on mRNA stability. Why a MAPK inhibitor stimulates P450arom expression is unclear. This suggests, however, that a MAPK activator is present in the cultures, either supplied in the medium or produced by the cells.

Under the present conditions, P450arom mRNA was most rapidly degraded when the cells were stimulated by FSH. This implies that FSH either stimulates or cannot down-regulate the expression of the protein(s) involved in mRNA degradation. That the FSH and dbcAMP treatments given in the present study have different effects on mRNA half-life is interesting, as the actions of FSH are mainly mediated by cAMP and PKA, and to a lesser extent cAMP-dependent activation of protein kinase B and phosphatidylinositol 3-kinase pathways [37]. The different effects of FSH and dbcAMP indirectly suggest FSH action through a cAMP-independent pathway.

The mRNA encoding P450scc is considered to be fairly stable, as no significant decline was observed over 6 h in JEG-3 cytotrophoblast cells [38], and the present data show that this mRNA is quite stable in primary culture of

bovine granulosa cells (half-life approx 14 h). This is somewhat longer than the 6-8 h half-life reported for mouse MA-10 Leydig tumor cells [39].

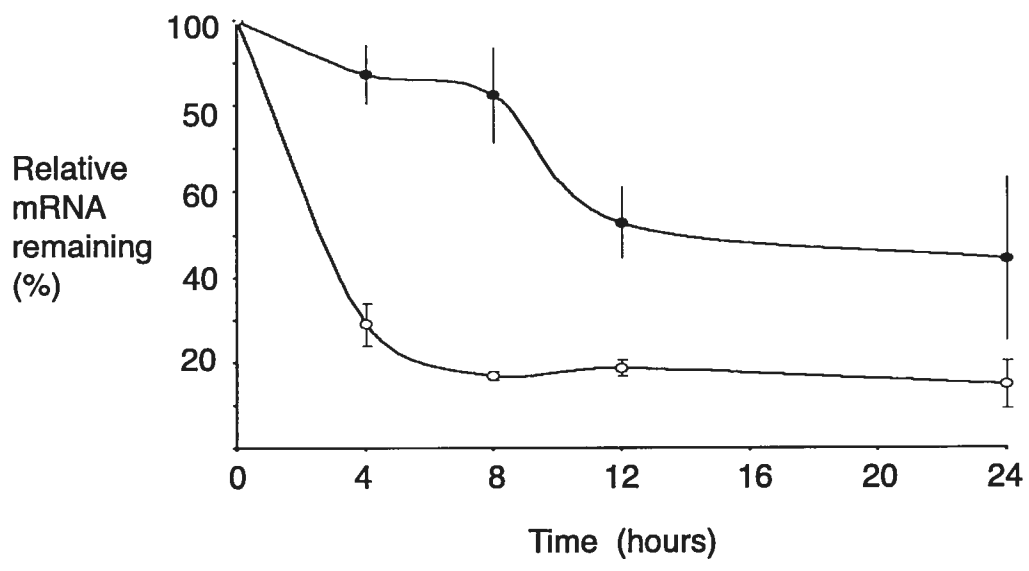
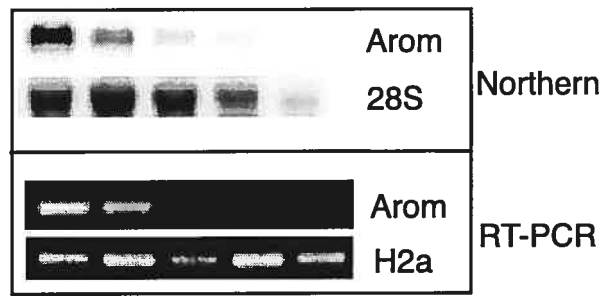
In summary, the present data demonstrate that bovine P450arom mRNA abundance is regulated at least in part at a post-transcriptional level. The short-life of this mRNA contributes to the rapid decrease in P450arom message and activity following the LH surge in cattle, and may also contribute to the process of follicle selection/deviation. Messenger RNA is least stable under FSH stimulation, and partly stabilized with supra-physiological concentrations of insulin and by extension of IGF-1. We propose that as small growing follicles are stimulated by FSH early in the follicle wave [1, 2] there is stimulation of highly labile P450arom mRNA. As follicle deviation approaches, P450arom mRNA levels decline in subordinate follicles as FSH concentrations decrease, whereas in future-dominant follicles there is an increase in free IGF I concentrations, which allows expression of a more stable P450arom mRNA, increased estradiol secretion and continued growth to the preovulatory stage.

### **Acknowledgments**

We thank Mélanie Hamel and Lynda Jourdain for technical assistance, Dr M.R. Waterman for the bovine P450scc cDNA, and Dr A.F. Parlow and the NIDDK National Hormone and Peptide Program for providing bovine FSH. This work was supported by NSERC Canada

**Figure 1** Relative abundance of mRNA encoding cytochromes P450scc (●) and P450 aromatase (○) following treatment with the transcription inhibitor DRB. Target gene mRNA levels were measured by Northern blot, calculated relative to 28S ribosomal RNA, and are expressed as a percentage of control cultures (no DRB). Data are least-squares means ( $\pm$  SEM) obtained from 3 replicate experiments.

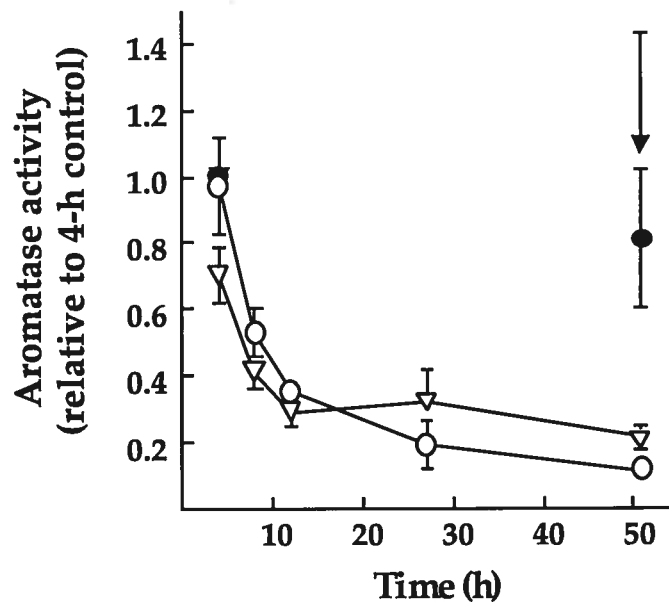
Figure 1





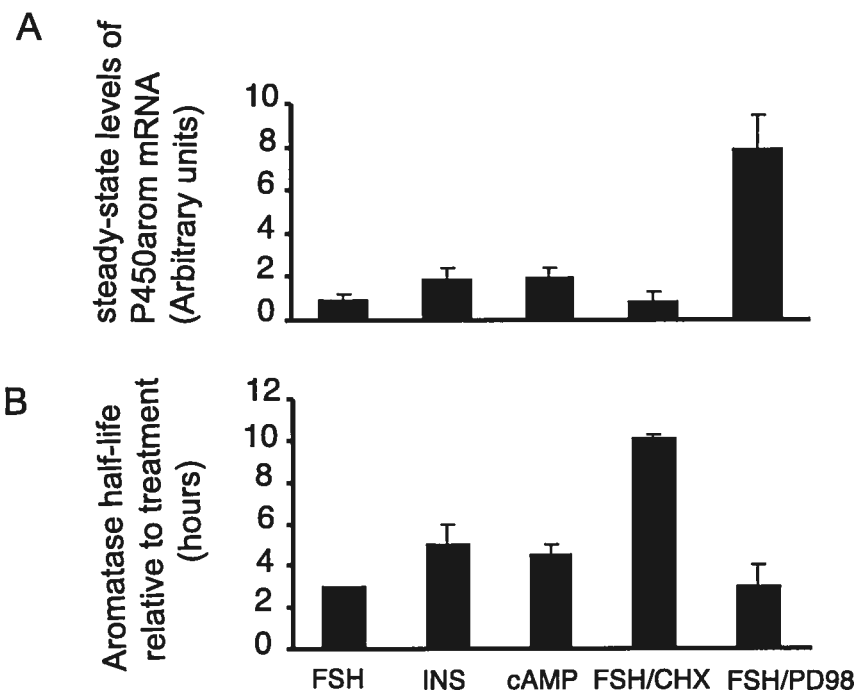
**Figure 2** Aromatase activity in bovine granulosa cells following withdrawal of FSH (○) or addition of cycloheximide (▽). Cells were cultured with FSH (1 ng/ml), insulin (10 ng/ml) and IGF-1 (10 ng/ml), and on day 6, medium was replaced with medium containing cycloheximide (20 µg/ml) or medium devoid of FSH. Control cultures were measured at 4 and 52 h (solid symbols). Aromatase activity was estimated with the tritiated water assay (see Materials and Methods). Data were corrected for total cell protein and then expressed relative to the 4 h control cultures. Data are means ± SEM of 3 replicate experiments. Some error bars have been omitted for clarity.

Figure 2



**Figure 3** Steady-state levels of mRNA encoding cytochrome P450arom (Panel A) and its half-life (Panel B) following addition of FSH (1 ng/ml); Insulin (100 ng/ml); cAMP (300  $\mu$ M); CHX (20  $\mu$ g/ml) and PD98059 (50  $\mu$ M). PD98059 was added at day 4 of culture and CHX was added 4 h before DRB transcription inhibition. The mRNA level were measured by RT-PCR and corrected for histone.

Figure 3



## References

1. Ginther OJ, Beg MA, Bergfelt DR, Donadeu FX, Kot K. Follicle selection in monovular species. *Biol Reprod* 2001; 65: 638-647.
2. Fortune JE, Rivera GM, Evans AC, Turzillo AM. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biol Reprod* 2001; 65: 648-654.
3. Xu Z, Garverick HA, Smith GW, Smith MF, Hamilton SA, Youngquist RS. Expression of messenger ribonucleic acid encoding cytochrome P450 side-chain cleavage, cytochrome p450 17 alpha-hydroxylase, and cytochrome P450 aromatase in bovine follicles during the first follicular wave. *Endocrinology* 1995; 136: 981-989.
4. Simpson ER, Davis SR. Minireview: aromatase and the regulation of estrogen biosynthesis--some new perspectives. *Endocrinology* 2001; 142: 4589-4594.
5. Luu-The V. Analysis and characteristics of multiple types of human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2001; 76: 143-151.
6. Smith LC, Olivera-Angel M, Groome NP, Bhatia B, Price CA. Oocyte quality in small antral follicles in the presence or absence of a large dominant follicle in cattle. *J Reprod Fertil* 1996; 106: 193-199.
7. Bao B, Garverick HA, Smith GW, Smith MF, Salfen BE, Youngquist RS. 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* 1997; 56: 1158-1168.
8. Badinga L, Driancourt MA, Savio JD, Wolfenson D, Drost M, De La Sota RL, Thatcher WW. Endocrine and ovarian responses associated with the first-wave dominant follicle in cattle. *Biol Reprod* 1992; 47: 871-883.

9. Price CA, Carriere PD, Bhatia B, Groome NP. Comparison of hormonal and histological changes during follicular growth, as measured by ultrasonography, in cattle. *J Reprod Fertil* 1995; 103: 63-68.
10. Mihm M, Austin EJ, Good TE, Ireland JL, Knight PG, Roche JF, Ireland JJ. Identification of potential intrafollicular factors involved in selection of dominant follicles in heifers. *Biol Reprod* 2000; 63: 811-819.
11. Beg MA, Bergfelt DR, Kot K, Wiltbank MC, Ginther OJ. Follicular-fluid factors and granulosa-cell gene expression associated with follicle deviation in cattle. *Biol Reprod* 2001; 64: 432-441.
12. Evans AC, Fortune JE. Selection of the dominant follicle in cattle occurs in the absence of differences in the expression of messenger ribonucleic acid for gonadotropin receptors. *Endocrinology* 1997; 138: 2963-2971.
13. Drummond AE, Findlay JK. The role of estrogen in folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 1999; 151: 57-64.
14. Rosenfeld CS, Wagner JS, Roberts RM, Lubahn DB. Intraovarian actions of oestrogen. *Reproduction* 2001; 122: 215-226.
15. Knecht M, Brodie AM, Catt KJ. Aromatase inhibitors prevent granulosa cell differentiation: an obligatory role for estrogens in luteinizing hormone receptor expression. *Endocrinology* 1985; 117: 1156-1161.
16. Fisher CR, Graves KH, Parlow AF, Simpson ER. Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the cyp19 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 6965-6970.
17. Beg MA, Meira C, Bergfelt DR, Ginther OJ. Role of oestradiol in growth of follicles and follicle deviation in heifers. *Reproduction* 2003; 125: 847-854.
18. Fitzpatrick SL, Richards JS. Regulation of cytochrome P450 aromatase messenger ribonucleic acid and activity by steroids and gonadotropins in rat granulosa cells. *Endocrinology* 1991; 129: 1452-1462.

19. Steinkampf MP, Mendelson CR, Simpson ER. Regulation by follicle-stimulating hormone of the synthesis of aromatase cytochrome P-450 in human granulosa cells. *Mol Endocrinol* 1987; 1: 465-471.
20. Manuel Silva J, Price CA. Effect of follicle-stimulating hormone on steroid secretion and messenger ribonucleic acids encoding cytochromes P450 aromatase and cholesterol side-chain cleavage in bovine granulosa cells in vitro. *Biol Reprod* 2000; 62: 186-191.
21. Garverick HA, Baxter G, Gong J, Armstrong DG, Campbell BK, Gutierrez CG, Webb R. Regulation of expression of ovarian mRNA encoding steroidogenic enzymes and gonadotrophin receptors by FSH and GH in hypogonadotrophic cattle. *Reproduction* 2002; 123: 651-661.
22. Spicer LJ, Chamberlain CS, Maciel SM. Influence of gonadotropins on insulin- and insulin-like growth factor-I (IGF-I)-induced steroid production by bovine granulosa cells. *Domest Anim Endocrinol* 2002; 22: 237-254.
23. Silva JM, Price CA. Insulin and IGF-I are necessary for FSH-induced cytochrome P450 aromatase but not cytochrome P450 side-chain cleavage gene expression in oestrogenic bovine granulosa cells in vitro. *J Endocrinol* 2002; 174: 499-507.
24. Laurincik J, Kolodzieyski L, Hyttel P, Osawa Y, Niemann H, Schmoll F, Brem G, Schellander K. Granulosa-cumulus-corona expansion and aromatase localization in preovulatory follicles in superovulated heifers. *Acta Vet Scand* 1996; 37: 99-107.
25. Voss AK, Fortune JE. Levels of messenger ribonucleic acid for cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase and P450 aromatase in preovulatory bovine follicles decrease after the luteinizing hormone surge. *Endocrinology* 1993; 132: 2239-2245.
26. Komar CM, Berndtson AK, Evans AC, Fortune JE. Decline in circulating estradiol during the periovulatory period is correlated with decreases in estradiol and androgen, and in messenger RNA for p450

- aromatase and p450 17alpha-hydroxylase, in bovine preovulatory follicles. *Biol Reprod* 2001; 64: 1797-1805.
27. Fitzpatrick SL, Carlone DL, Robker RL, Richards JS. Expression of aromatase in the ovary: down-regulation of mRNA by the ovulatory luteinizing hormone surge. *Steroids* 1997; 62: 197-206.
  28. Mu YM, Yanase T, Nishi Y, Takayanagi R, Goto K, Nawata H. Combined treatment with specific ligands for PPARgamma:RXR nuclear receptor system markedly inhibits the expression of cytochrome P450arom in human granulosa cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 181: 239-248.
  29. Wang J, Chen S. Induction of aromatase gene expression in human placental choriocarcinoma (JAR) cells by phorbol esters. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1218: 48-54.
  30. Conley A, Hinshelwood M. Mammalian aromatases. *Reproduction* 2001; 121: 685-695.
  31. Gutierrez CG, Campbell BK, Webb R. Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle-stimulating hormone, and morphological characteristics. *Biol Reprod* 1997; 56: 608-616.
  32. Soumano K, Silversides DW, Doize F, Price CA. Follicular 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and cytochromes P450 17 alpha-hydroxylase and aromatase messenger ribonucleic acids in cattle undergoing superovulation. *Biol Reprod* 1996; 55: 1419-1426.
  33. John ME, John MC, Ashley P, MacDonald RJ, Simpson ER, Waterman MR. Identification and characterization of cDNA clones specific for cholesterol side-chain cleavage cytochrome P-450. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; 81: 5628-5632.
  34. Gonzalez IL, Gorski JL, Campen TJ, Dorney DJ, Erickson JM, Sylvester JE, Schmickel RD. Variation among human 28S ribosomal RNA genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82: 7666-7670.



35. Hanoux V, Bouraima H, Mitre H, Feral C, Benhaim A. Differential regulation of two 3' end variants of P450 aromatase transcripts and of a new truncated aromatase protein in rabbit preovulatory granulosa cells. *Endocrinology* 2003; 144: 4790-4798.
36. Harada N, Honda SI, Hatano O. Aromatase inhibitors and enzyme stability. *Endocr Relat Cancer* 1999; 6: 211-218.
37. Richards JS. New signaling pathways for hormones and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate action in endocrine cells. *Mol Endocrinol* 2001; 15: 209-218.
38. Brentano ST, Miller WL. Regulation of human cytochrome P450<sub>scc</sub> and adrenodoxin messenger ribonucleic acids in JEG-3 cytotrophoblast cells. *Endocrinology* 1992; 131: 3010-3018.
39. Hum DW, Staels B, Black SM, Miller WL. Basal transcriptional activity and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate responsiveness of the human cytochrome P450<sub>scc</sub> promoter transfected into MA-10 Leydig cells. *Endocrinology* 1993; 132: 546-552.
40. Bathia B, Price CA. Insulin alters the effects of follicle stimulating hormone on aromatase in bovine granulosa cells in vitro. *Steroids* 2001; 66: 511-519.

**Article 3**

**Posttranscriptional regulation of bovine cytochrome P450 aromatase messenger RNA by the 3'-untranslated region.**

M. Sahmi<sup>1</sup>, N. Gévry<sup>2</sup>, E.S. Nicola and C.A. Price\*

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

\*Correspondence Fax: 450-778-8103

Email: [christopher.price@umontreal.ca](mailto:christopher.price@umontreal.ca)

<sup>1</sup> Present address:

<sup>2</sup> Present address:

Key words: aromatase, mRNA stability, half-life, granulosa cells, 3'-UTR

Short title: P450 aromatase 3'-UTR

## Résumé

Le cytochrome P450aromatase (P450arom) est l'enzyme stéroïdogénique clé de la synthèse d'oestradiol dans les cellules de granulosa. Comparé aux autres espèces, l'ARNm P450arom bovin possède une longue région 3'-non traduite (3'-UTR) de 3.5 kb, l'analyse de cette séquence montre la présence de multiples motifs AUUUA, un élément connu pour affecter la stabilité de l'ARNm pour d'autres systèmes. Les objectifs de cette étude étaient d'explorer le rôle potentiel de la région 3'-UTR et l'implication possible de certaines protéines *trans*-régulatrices dans la régulation de la stabilité de l'ARNm P450arom. Les études de transfections des cellules de granulosa primaires, en utilisant un vecteur contenant le fragment 3'-UTR pleine longueur (FL), réduit significativement l'activité de la luciférase jusqu'à environ 90 %. Quand la 3'-UTR a été subdivisée en fragments A, B et C, juste le fragment A avait réduit significativement l'activité de la luciférase. La subdivision davantage du fragment A en 3 fragments DE, D et E résultent en la réduction de l'activité de la luciférase jusqu'à 80%, 40% et 60% respectivement, ce qui suggère que le fragment DE contient la région inhibitrice du fragment A. Les expériences de fixations croisées aux UV ont révélé qu'au moins une protéine de 66 kDa se lie spécifiquement à l'UTR (FL). Les expériences de compétitions avec de l'ARN non marqué et avec de petits fragments, A, B, C, DE, D et E avaient montré que les séquences FL, A et DE à 2 fois plus de sonde non marquée déplaçaient significativement la liaison, ce qui n'est pas le cas pour la séquence B et C où la compétition n'est

observée qu'avec 10 fois plus. On conclut que la région spécifique de la 3'-UTR de l'ARNm P450arom a un effet significatif sur l'expression du gène rapporteur probablement par interaction avec une protéine *trans*-régulatrice et au moins une protéine des cellules de granulosa lie spécifiquement la 3'-UTR de P450arom.

### **Abstract**

Cytochrome P450 aromatase (P450 arom) is a key steroidogenic enzyme for estrogen synthesis in granulosa cells. Compared to other species, bovine P450 arom mRNA possesses a long 3'- untranslated region (3'-UTR) of 3.5 kb. Analysis of this sequence shows a presence of multiple AUUUA motifs, an element known to affect the stability of mRNA for other systems. The objectives of the study is to explore the potential role of the 3'-UTR and possible involvement of *trans*-acting factors in the regulation of the stability of P450 arom mRNA. In vitro transfection studies of primary bovine granulosa cells using vector containing the full length 3'-UTR (FL) reduced significantly luciferase activity by approximately 90 %. When the arom 3'-UTR was subdivided into fragments A, B and C, only fragment A significantly reduced luciferase activity. Further subdivision of fragment A into 3 fragments DE; D and E resulted in reduced luciferase activity by 80 %, 40 % and 60 %, respectively suggesting that the fragment DE contains the putative inhibitory region in fragment A. UV crosslinking experiment revealed that at least one protein of 66 kDa binds specifically the (FL) UTR. Competition experiments

with unlabeled RNA of (FL) and smaller fragments A, B, C, DE, D, E showed that sequence FL, A and DE significantly reduced riboprobe binding at two fold molar excess, whereas sequence B and C competed at 10 fold molar excess but not at two fold.

We conclude that the specific region of the 3'-UTR of bovine P450 arom mRNA had significant effect on reporter gene expression probably by interaction with a *trans*-acting factor protein and at least one protein of granulosa cells binds specifically to P450 arom 3'-UTR.

## INTRODUCTION

Growth and regression of bovine ovarian follicles occurs in 'waves', during which a single potentially ovulatory follicle predominates in the ovary [1, 2]. One of the major characteristics of growing and potentially ovulatory follicles is the higher estradiol content within the follicle compared to regressing and atretic follicles. In cattle, estradiol is synthesized in granulosa cells from thecal androgens by the enzyme cytochrome P450 aromatase (P450arom). Estradiol is important for follicle development and ovulation, as P450arom knock-out mice do not ovulate [3]. The local actions of estradiol include induction of LH receptors on granulosa cells [4]. Recently, it has been shown that estradiol may be necessary for follicle growth in cattle in vivo [5],

Levels of mRNA encoding P450arom are upregulated in rodent, human and bovine granulosa cells by FSH [6-9] and insulin/insulin-like growth factor-1 (IGF1) [10-15]. In contrast, LH has been shown to downregulate P450arom

mRNA levels in rats and cattle [16-18]. How much of the control of P450arom mRNA abundance is exerted at the transcriptional compared with the post-transcriptional level is not clear. The half-life of P450arom mRNA in bovine, rabbit and rat granulosa cells is between 3 and 7 hours [16, 19], whereas it is 12 h in a human granulosa cell line [20]. The translation inhibitor cycloheximide stabilized P450arom mRNA in rat [16] and bovine [see article 2] granulosa cells, suggesting potential post-transcriptional regulation of this mRNA.

Although the regulation of mRNA stability is complex, the 3'-untranslated region (3'-UTR) of many mRNAs plays an important role in mRNA degradation [21]. This includes the estrogen receptor and luteinizing hormone receptor, cyclooxygenase-2 and interleukin-10 mRNAs [22-25]. AU rich sequences within the 3'-UTR are main determinants of mRNA stability, particularly AUUUA-motifs [21]. AU-rich elements interact with specific RNA binding proteins in *trans* to stabilize or destabilize mRNA. Other determinants of mRNA stability include *cis*-acting stem-loop structures in the RNA, as well as elements in the coding region and 5'-UTR [21].

Interestingly, the mRNA encoding bovine P450arom is approximately 3 kb larger than that encoding rat or human P450arom [26], and the difference lies in part due a very long 3'-UTR in the bovine message. In light of the observed post-transcriptional regulation of P450arom mRNA by CHX, the objectives of the present study were to determine if the bovine P450arom 3'-UTR plays a role in controlling mRNA levels, and whether this is mediated through labile *trans*-acting protein(s).

## MATERIALS AND METHODS

### *Plasmids and in vitro RNA synthesis*

A region of the 3'-UTR of the bovine P450arom mRNA extending from +35 to +3363 nt beyond the coding region of exon 10 was amplified by PCR from granulosa cell total RNA. The sense (S1: 5'-TCCCCGCGGTCAACAGAACTCCACATGGGAA-3'; AS1: 5'-TCCCCGCGGCTCCCTTTTGAACCTCCCTC-3'; *Sac II* restriction sites underlined) and antisense primers were designed from the published bovine sequence (Z32741). Reverse transcription was performed with SUPERScript II (Invitrogen) following the procedure recommended by the manufacturer for transcripts with high GC content, and PCR was performed with ELONGASE (Invitrogen) for 35 cycles of 94 °C for 30 sec, 56 °C for 30 sec and 68 °C for 4 min. The resulting 3329 bp cDNA was designated the full length 3'-UTR (FL), and contains all the AUUUA and AUUUUA motifs found within the 3'-UTR. The cDNA was ligated into pGEM-T Easy vector (Promega Corp., Nepean, Ontario, Canada) and sequenced to verify identity. Smaller fragments of the FL 3'-UTR were generated by overnight digestion at 37 °C of the FL vector with *Xba* I, *Hind* III and *Bst*X1 (Amersham Biosciences, Montreal QC), giving fragments A, B and C, respectively (Fig 1). The digested plasmids were purified on QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) and used for RNA synthesis.



A 1079 bp downstream fragment of the 3'-UTR (designated 'DE') was amplified with primers S2 (5'-CCGCGGTGGGGACTACAACATC-3') and AS2 (5'-ACTAGTATTCCTGCTTCTCCTTTAC-3'). Two other primers were used to amplify smaller fragments within DE of 483 bp ('D') using sense primer S2 and antisense primer AS3 (5'-ACTAGTCCTTAGAGTTTGAACCCACTG-3'), and 596 bp ('E') with sense primer S3 (5'-CCGCGGTCACCATTCTTCCCTCTTCT-3') and antisense primer AS2. Primer positions are indicated in Fig 1. PCR was performed with Taq RNA polymerase (Amersham Biosciences) at 57 °C for 35 cycles. Each of the resulting PCR products was ligated into pGEM-T Easy vector (Promega Corp., Nepean, Ontario, Canada) and sequenced to verify identity.

For riboprobe generation, the pGEM-T Easy plasmid containing the FL 3'-UTR cDNA was linearized with *Sa*I and transcribed to RNA with T7 RNA polymerase (Riboprobe In Vitro Transcription System; Promega) in the presence of  $\alpha$ P<sup>32</sup>-UTP (800ci/mmol; Perkin-Elmer). The reaction mixture was incubated at 37°C for 2 h, incubated with 2 U DNase (RQ1 DNase; Promega)(20 min at 37 °C) then purified with RNAeasy mini kit (Qiagen).

Unlabeled 'competitor' RNA was produced by in vitro transcription from the above plasmids in the presence of 'cold' UTP. Competitor RNA from the coding regions of P450arom and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was also produced from cDNA amplified from granulosa cell total RNA. The sense and antisense primers for GAPDH were 5'-TGTTCCAGTATGATTCCACC-3' and 5'-TCCACCACCCTGTTGCTG-3', respectively [27]. PCR was performed with Taq RNA polymerase for 30 cycles

of 95°C for 30 sec, 56 °C for 30 sec and 72 °C for 1 min, and resulting cDNA was cloned into pGEM-T Easy and transcribed in vitro as described above. A 640 bp region of P450arom was transcribed from an insert in Bluescript KS plasmid [26]. The riboprobe and all competitor RNAs were analysed in 1% RNAse-free agarose gels to verify integrity and size. Concentrations were measured by absorbance at 260 nm.

### *Construction of reporter gene vectors*

In order to determine the effect of 3'-sequences on luciferase gene expression, we inserted the 3'-UTR sequences between the luciferase coding region and the poly(A) site of the pGL3 Promoter Vector (Promega). At this location there is a Xba I insertion site, which we mutated as Xba I cleaves the FL 3'-UTR at three sites. The mutation involved replacing the Xba I insertion site with Sac II and Spe I insertion sites (for directed cloning). The sense and antisense primers for the Sac II site were 5'-AGATCGCCGTGTAATCCGCGGGTCTCGGGGCGGCCGGCCGCTTC-3' and 5'-GAAGCGGCCGGCCGCCCGACCCGCGGATTACACGGCGATCT-3', respectively, with Sac II restriction sites underlined. PCR was performed with 20 ng pGL3 Promoter Vector, 125 ng of each of the primers, 10mM dNTPs and 2.5 U Pfu DNA polymerase (Stratagene, La Jolla, CA) in a volume of 50 µl for 18 cycles of 95°C for 30 sec, 52°C for 1 min and 68°C for 10 min. The reaction mixture was then digested for 2 h with Dpn1 (New England Biolabs,

Mississauga, ON) to eliminate methylated template DNA, and the amplified DNA was transformed into *E. coli* (XL1-Blue; Stratagene). Verification of the plasmids was performed by digestion with Sac II. The Spe I insertion site was then added under the same conditions with sense and antisense primers 5'-GTCGGGGCGGCCGGCACTAGTGAGCAGACATGATAAG-3' and 5'-CTTATCATGTCTGCTCACTAGTGCCGGCCGCCCGAC-3', respectively, with Spe I restriction sites underlined.

The pGEM-T Easy vectors containing fragments FL, DE, D and E were linearized with Pvu I, and the inserts excised by digestion with Spe I and Sac II. The cDNA fragments were gel-purified and ligated into the mutated pGL3 Promoter Vector for transfection studies. Reporter genes containing fragments A, B and C were obtained by digesting the pGL3-Promoter plasmid containing FL with Xba I, Hind III and BstX 1, respectively. The digested plasmids were blunt-ended with Klenow DNA polymerase and religated with T4 ligase. All the plasmids for transfection were prepared using the Plasmid Midi Kit (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada).

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

All culture materials were obtained from Invitrogen Life Technologies (Burlington, ON, Canada) unless otherwise stated. Bovine ovaries were collected at a local abattoir and transported to the laboratory at 35°C in PBS containing penicillin (100 IU/ml), streptomycin (100 µg/ml) and fungizone (1 µg/ml). Granulosa cells were aspirated from follicles 2-5 mm diameter into  $\alpha$ -

MEM medium containing penicillin (100 IU/ml), streptomycin (100  $\mu\text{g/ml}$ ) and fungizone (1  $\mu\text{g/ml}$ ). Cells were washed 2 times in  $\alpha$ -MEM containing antibiotics, then resuspended in culture medium. Cell viability was estimated at 40% by Trypan blue exclusion.

Cells were seeded into 24-well tissue culture plates (Falcon; Becton Dickinson and Company, New Jersey) at a density of  $1\text{-}210^5$  viable cells in 300  $\mu\text{l}$  of  $\alpha$ -MEM with L-glutamine containing transferrin (5  $\mu\text{g/ml}$ ), insulin (1  $\mu\text{g/ml}$ ), non-essential amino acid mix, 2% FBS, penicillin (100 IU/ml) and streptomycin (100  $\mu\text{g/ml}$ ). Cultures were maintained at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>, 95% air for 5 days, with medium being replaced every 2 days. Transfections were performed on day 4 of the culture, at approximately 70 % confluency. The pGL3 Promoter vector (90 fmol) and *Renilla* luciferase vector pRL-SV40 (10 fmol) were incubated with 2  $\mu\text{g}$  of Lipofectamine 2000 (Invitrogen Life Technologies) in a volume of 40  $\mu\text{l}$  for 30 min at room temperature. The vector-Lipofectamine mix was added to each well and incubated for 3 h at 37°C, after which the complex was removed by washing twice with fresh medium and the cells cultured for a further 36 h. At the end of the culture period, cell lysates were prepared by adding 100  $\mu\text{l/well}$  Passive Lysis Buffer (Promega), and firefly and *Renilla* luciferase activities were determined with the Dual-Luciferase Reporter Assay system (Promega). Experiments were performed on 3 - 5 independent cell cultures.

### *Protein extraction and UV crosslinking*

Total cell protein was extracted from bovine granulosa cells, corpus luteum, muscle, pancreas, kidney, liver and bladder by homogenizing tissues with a Polytron in Lysis Buffer (10 mM Hepes, pH 7.6 containing 40 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT, 5% glycerol, 0.5% Nonidet P40, 0.5 mM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) and 8 µg/ml leupeptin). Cytoplasmic protein extracts were clarified by centrifugation at 3000 g at 4°C for 10 min, and the supernatants were stored at -84°C.

Protein concentrations were measured with the Bradford protein assay (BioRad, Mississauga, ON, Canada). Protein (20 µg) was incubated with the P<sup>32</sup>-labeled FL 3'-UTR riboprobe (2 - 4 x10<sup>6</sup> cpm) in the presence of 0.5 mg/ml heparan sulfate, 14 U of RNase inhibitor (RNAguard, Amersham Bioscience) and 2 µg of tRNA (Sigma) in a total volume of 20 µl at room temperature for 40 min. In competition experiments, different non-radioactive RNAs were added to the protein sample 5 min before the addition of the radiolabeled probe. The RNA-protein complexes were cross-linked on ice by exposure to UV light at 999 mJ for 15 min in a GSGenelinker (BioRad), followed by incubation with 10 U RNase One Ribonuclease (Promega). The UV cross-linked products were separated on a 10% SDS-polyacrylamide gel and detected by autoradiography using Kodak phosphor screen and digitalized with a phosphorimager (Molecular Dynamics Storm 840; Amersham Biosciences). Competitor experiments were performed on 3 - 5 independent samples of granulosa cell protein extract.

### *Statistics*

Data were expressed relative to control samples. Analysis of variance (ANOVA) was used to test effects of constructs/competitors on luciferase activity/riboprobe binding. Culture replicate was included as a random variable in the F-test for the effect of experiment. Differences between groups were identified with the Tukey-Kramer HSD test. Analyses were performed with JMP<sup>®</sup> software (SAS Institute, Cary, NC). The data are presented as means  $\pm$  SEM.

## **RESULTS**

Examination of the published sequence of the bovine P450arom 3'-UTR showed the presence of four AUUUUA motifs, nine AUUUA motifs and 15 AUUA motifs. The distribution of the AUUUUA and AUUUA elements are shown in Fig 1. A cluster of three AUUUA and one AUUUUA elements occurs between +1196 and +1255 (relative to the start of the 3'-UTR sequence), otherwise the AU-rich elements are widely distributed. On the basis of this distribution, we used restriction digestion of a plasmid containing the full-length 3'-UTR to produce constructs containing progressively fewer AUUUUA elements (fragments A, B & C). The lengths and number of AUUUA and AUUUUA motifs within these fragments are given in Fig 1.

The effect of these constructs on luciferase activity was assessed by transiently transfecting primary bovine granulosa cells. The full length 3'-UTR

(FL) and construct A inhibited luciferase activity by approximately 90%, whereas transfection with construct C did not cause a significant reduction in luciferase activity (Fig 2).

UV-crosslinking experiments were then performed to determine if the inhibition of luciferase activity observed with constructs FL and A is associated with a *trans*-acting protein. The full-length riboprobe formed a RNA:protein complex with cell extracts from bovine granulosa cells, but not with extracts from corpora lutea, lung, liver, kidney, pancreas or bladder (Fig 3). A 10-fold molar excess of unlabeled RNA from the coding region of P450arom or GADPH did not compete with the riboprobe for binding to cell protein, whereas as little as 2-fold excess of unlabeled FL 3'-UTR RNA significantly decreased riboprobe binding to protein (Fig 4). Competition experiments with unlabeled RNA corresponding to constructs A, B and C showed that sequence A significantly reduced riboprobe binding at 2-fold excess, whereas sequences B and C competed at 10-fold but not 2-fold molar excess (Fig 5).

To define more clearly the region of the 3'-UTR that binds to cell protein and inhibits luciferase activity, we used PCR to generate constructs that lie within the inhibitory region (fragment A) of the 3'-UTR. Fragment DE contains the putative inhibitory region in fragment A but not the region in C that failed to inhibit luciferase activity. The shorter fragment E contains the cluster of three AUUUA and one AUUUUA motifs, whereas fragment D does not. Transfection experiments demonstrated that the construct DE inhibited luciferase activity approximately 80%, not significantly different from the 90% inhibition observed with construct A (Fig 6). Construct D inhibited luciferase activity by 40%

( $P < 0.05$ ), but this was significantly less inhibition than observed with the entire region DE. Construct E inhibited luciferase activity by 60%, which was not significantly different from the inhibition caused by fragment DE (Fig 6).

UV crosslinking analysis demonstrated that fragment DE displaced protein binding to the full-length riboprobe in a similar manner to fragment A (Fig 7), whereas fragments D and E displaced binding but to a lesser extent than fragment DE.

## DISCUSSION

The mRNA of bovine P450arom gene is characterized by a short half-life and a long 3'-UTR. Stimulation of granulosa cells with different hormones alters the stability of the mRNA, suggesting that posttranscriptional regulation of this gene product may play an important physiological role in the ovary and perhaps in other estrogen-secreting tissues. Employing transfection and UV-crosslinking studies, we demonstrate here that the P450arom 3'-UTR has a major impact on luciferase activity, and that this effect is associated with the formation of a cell-specific RNA:protein complex.

We inserted the bovine 3'-UTR of P450arom into the SV40-driven pGL3-Promoter reporter vector between the coding region of the luciferase gene and the poly(A) signal. This in effect gives the luciferase gene an exogenous 3'-UTR, and changes in luciferase activity can be interpreted as changes in posttranscriptional processing of luciferase [22-25]. Insertion of the full-length P450arom 3'-UTR reduced luciferase activity by 90%, suggesting



that this 3'-UTR does affect posttranscriptional processing of the preceding coding region.

We determined approximately which region of the 3'-UTR is involved in mRNA regulation by transfecting granulosa cells with various fragments of the P450arom 3'-UTR. The regulatory region lies between +623 and +1740 of the 3'-UTR, as insertion of the proximal 1.71 kb (construct A) inhibited luciferase activity to the same extent as the full-length 3'-UTR, whereas the proximal 0.59 kb (construct C) did not affect luciferase activity. This was verified by transfecting with a fragment spanning +592 to +1714 (fragment DE). This region contains two AUUUUA motifs and a cluster of three AUUUA motifs immediately downstream of one AUUUUA element. When cells were transfected with sub-fragments of DE containing a single AUUUUA each, luciferase was inhibited most strongly by the region spanning +1099 to +1714 and encompassing the AUUUA cluster. However, the region spanning +592 to +1070 also exhibited albeit weaker inhibitory activity. Collectively, these data suggest that a strong regulatory element lies between +1099 and +1714 of the 3'-UTR, possibly associated with an AU-rich region. There is weaker inhibitory activity slightly upstream from this region, and it is possible that the two regions act in concert to exert full posttranscriptional control over P450arom mRNA.

RNA sequences may act through *cis*- or *trans*-acting factors to influence gene expression, and for this reason we sought to determine if the P450arom 3'-UTR contains protein binding sites. UV crosslinking analyses were used to identify protein binding and gain insight to the approximate size

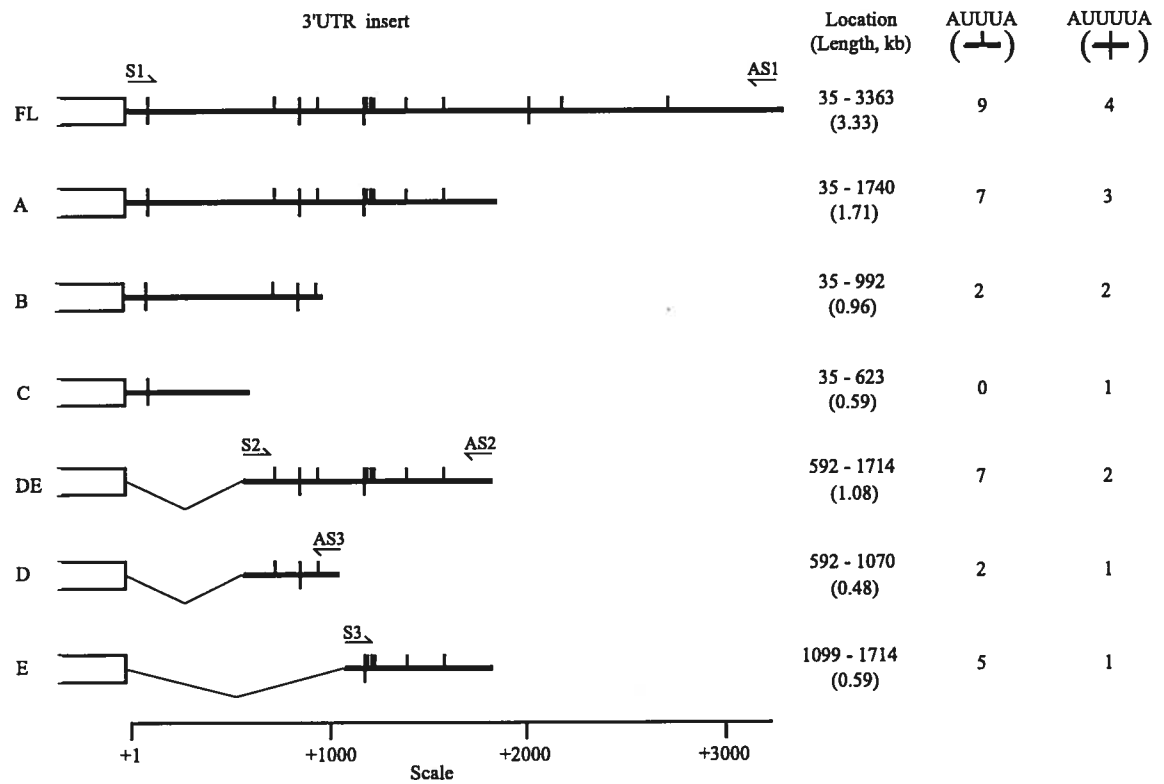
of the putative binding protein(s). The full-length riboprobe bound to a protein of approximately 66 kDa. The most exciting finding however is that this binding activity was not observed in corpora lutea or in any other tissue examined. This sets this protein apart from the traditional RNA binding proteins involved in RNA stability, such as AUF1, which are expressed in many cell types [28]. In addition, AUF1 is smaller (45 kDa and less, depending on isoform) than the protein observed here. It is unlikely that we are detecting a complex of proteins or several proteins binding to multiple binding sites, as UV crosslinking involves RNase digestion of crosslinked RNA:protein complex and denaturing electrophoresis. Only protein subunits directly bound to the labeled RNA are detected [29].

Competition experiments demonstrated that the RNA:protein binding observed in granulosa cells is specific for the P450arom 3'-UTR, and only for those fragments of the 3'-UTR that inhibited luciferase activity in transfection experiments. This indicates that the protein binding to the 3'-UTR destabilizes the upstream mRNA. This is supported by the action of CHX, which stabilizes P450arom mRNA half-life in rat and bovine granulosa cells [16]; [see article 2]. The identity of the protein is unknown, and attempts to purify it from granulosa cells have been unsuccessful.

In summary, this present study clearly demonstrates the role of 3'-UTR of bovine P450arom mRNA. Despite the control at the transcriptional level, this study highlights another level of control. This posttranscriptional level of regulation requires a specific sequence in the UTR may be through specific proteins.

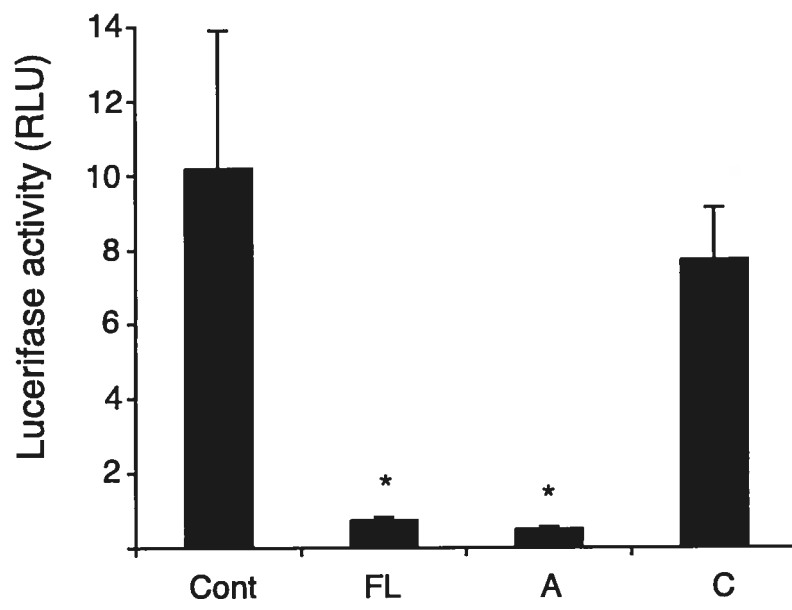
**Figure 1.** Design of bovine P450arom 3'-UTR fragments used for constructing luciferase reporter plasmids and for in vitro transcription. Open-ended boxes represent vector sequence. Vertical dashes represent AUUUA and AUUUUA motifs. Fragments FL, DE, D and E were produced by PCR from granulosa cell RNA, with the position of the primers shown (arrows). Fragments A, B and C were produced by restriction digestion of pGEM-T Easy plasmid containing fragment FL. Location of the sequences is relative to the start of the 3'-UTR of the bovine sequence (Z32741).

Figure 1



**Figure 2.** Location of potential RNA destabilizing activity in the P450arom mRNA 3'-UTR. Granulosa cells were transfected with pGL3-Promoter vector as control (Cont), or with pGL3-promoter containing cDNA corresponding to full-length (FL) or shorter sequences (A, C; Fig 1) of the 3'-UTR of P450arom mRNA. Data are mean  $\pm$  SEM relative light units (RLU), expressed relative to *Renilla* luciferase to correct for transfection efficiency. Experiments were performed with three independent cell cultures. Asterisks denote means significantly different from Control ( $P < 0.001$ ).

Figure 2



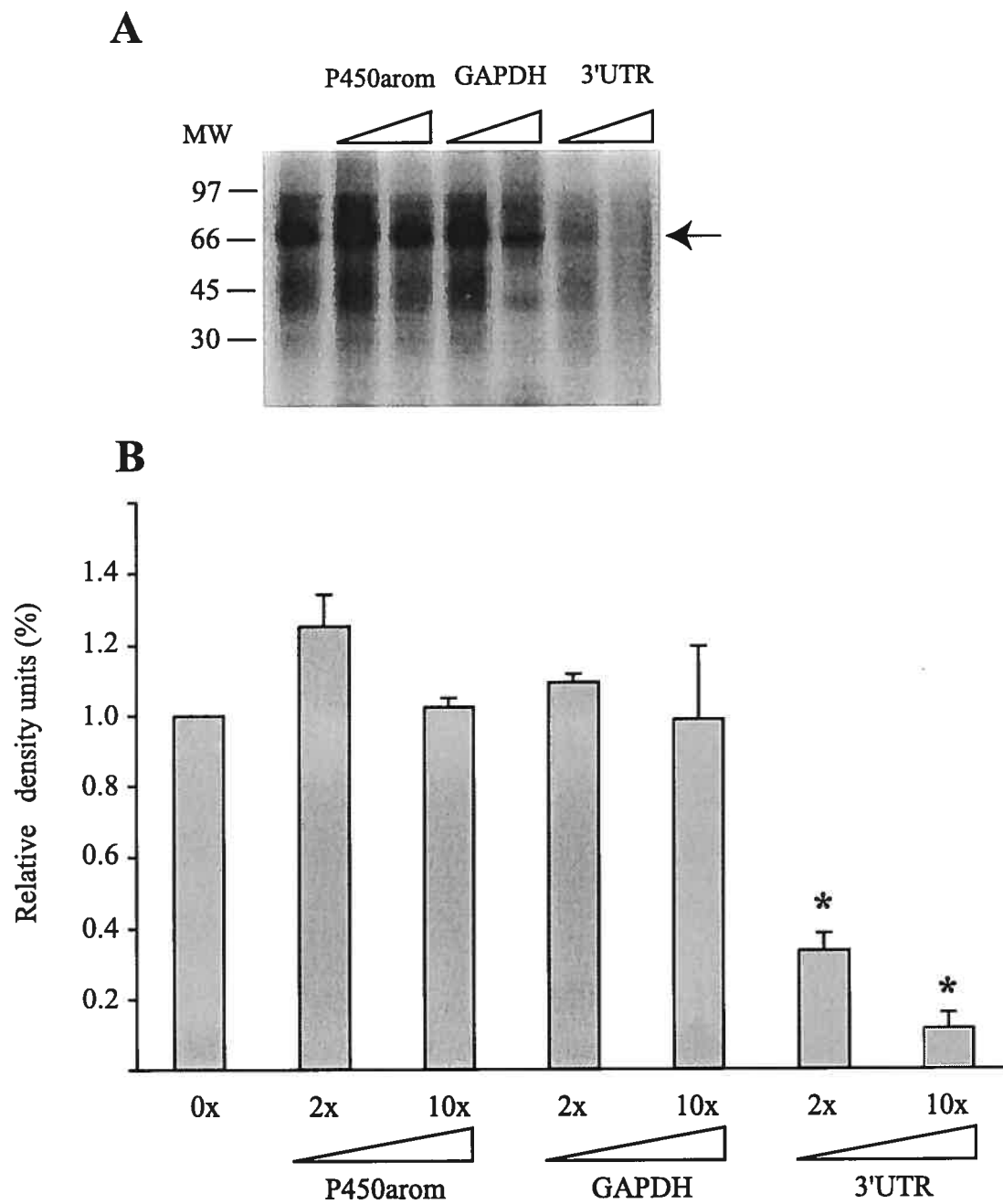
**Figure 3.** Radiolabeled full-length P450arom 3'-UTR RNA binding to protein extracts (20  $\mu$ g) from bovine tissues. The riboprobe bound to a protein of approximately 66 kDa (arrow) in fresh granulosa cells (GC) and in luteinized granulosa cells after 4 days of culture with 2% serum (LGC). No specific binding was observed in corpora lutea (CL) or the other tissues examined.





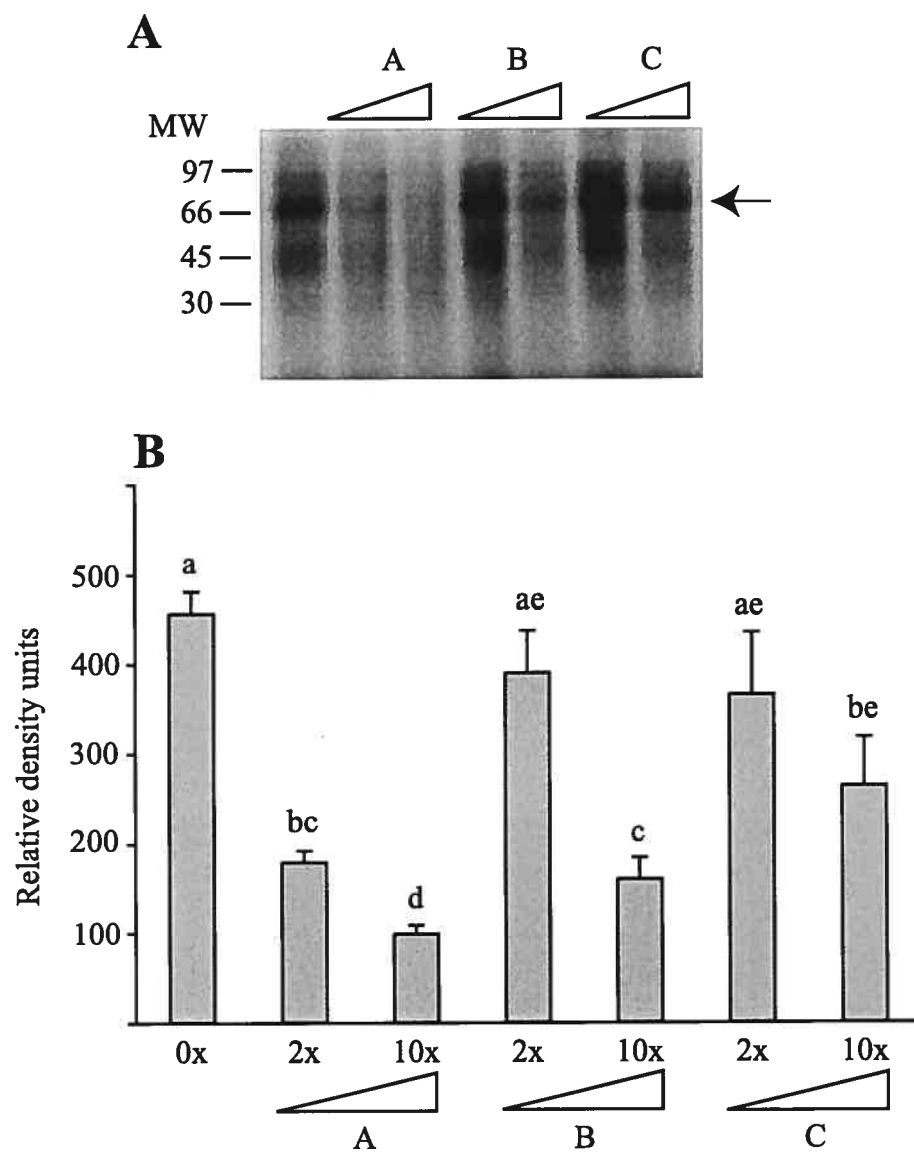
**Figure 4.** Specificity of protein binding to RNA in bovine granulosa cells. Total protein extracts (20  $\mu$ g) from granulosa cells of small follicles (2-6 mm) were UV cross-linked to radiolabeled P450arom 3'-UTR riboprobe in the presence of molar excess (0-10x) of unlabeled RNA from P450arom or GADPH coding regions, or P450arom 3'-UTR. A) A representative gel showing the position of the specific band (arrow). B) Mean  $\pm$  SEM band intensity of RNA:protein complexes expressed relative to riboprobe binding in the absence of competitor (control). Experiments were performed on three independent protein extracts. Asterisks indicate bars significantly different from control ( $P < 0.05$ ).

Figure 4



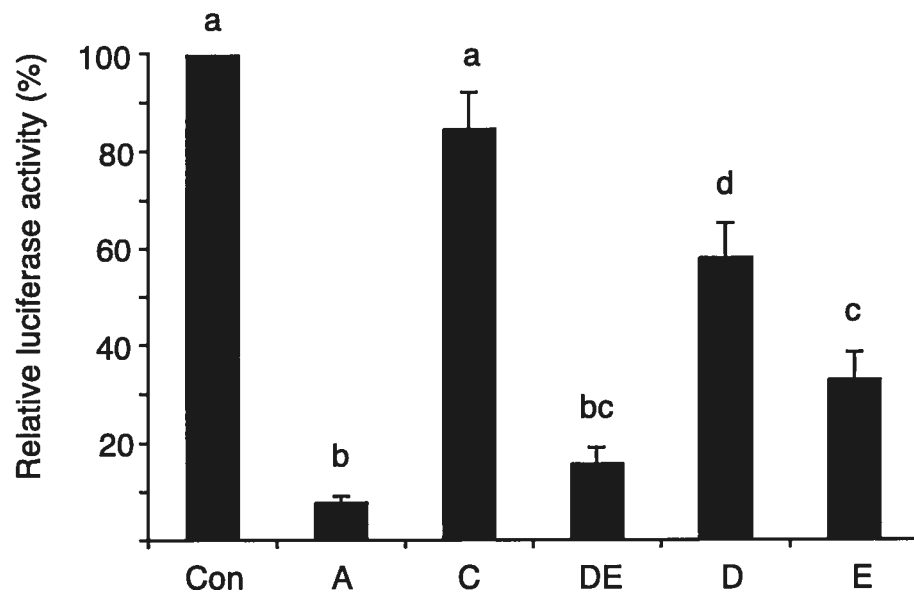
**Figure 5.** Competition analysis of fragments of RNA within the bovine P450arom 3'-UTR binding to granulosa cell protein. Total protein extracts (20  $\mu$ g) from granulosa cells of small follicles (2-6 mm) were UV cross-linked to radiolabeled P450arom 3'-UTR riboprobe in the presence of molar excess (0-10x) of unlabeled P450arom 3'-UTR RNA fragments of progressively smaller size (fragments A, B and C in Fig 1). A) Representative gel showing the position of the specific band (arrow). B) Mean  $\pm$  SEM band intensity of RNA:protein complexes expressed relative to riboprobe binding in the absence of competitor (control). Experiments were performed on three independent protein extracts. Bars with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ).

Figure 5



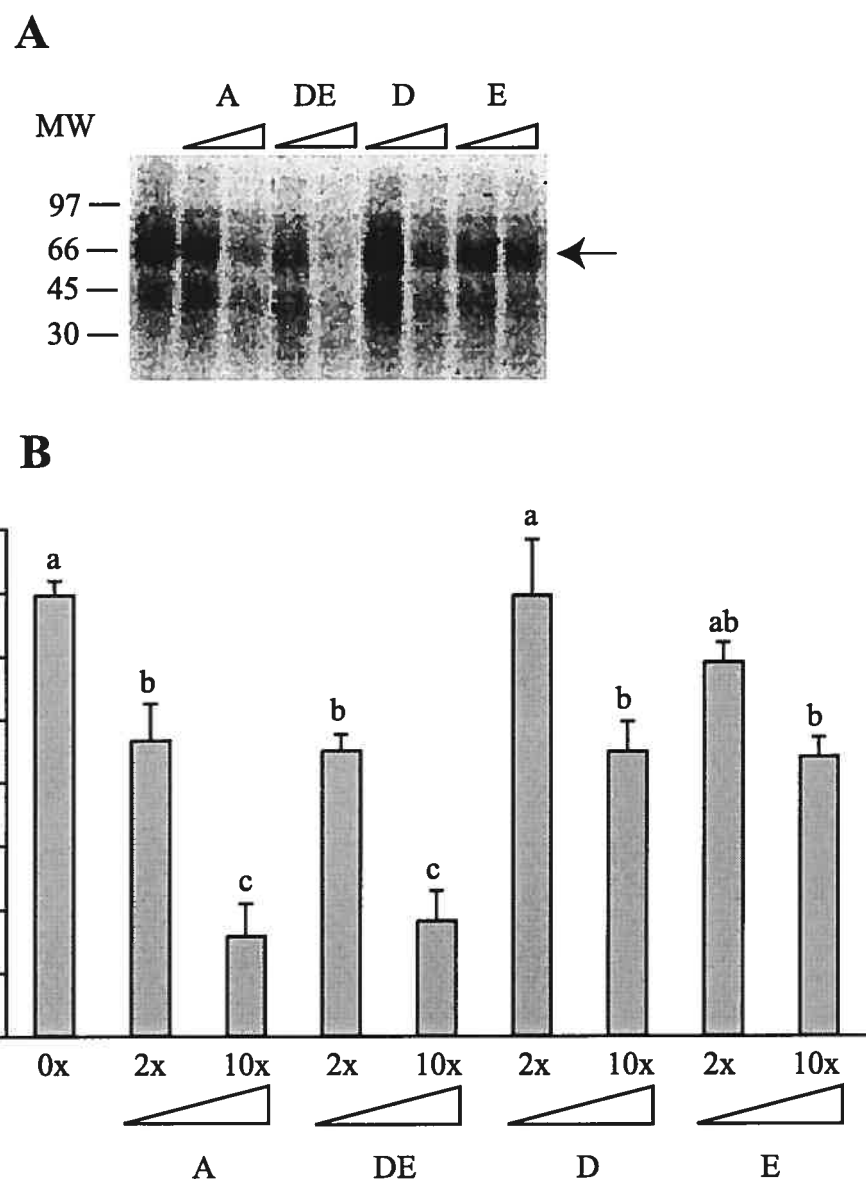
**Figure 6.** Luciferase activity in granulosa cells transfected with sequences within the 3'-UTR of bovine P450arom mRNA. Granulosa cells were transfected with pGL3-Promoter vector as control (Cont), or with pGL3-promoter containing cDNA corresponding to sequences (A, C, DE, D, E; Fig 1) of the 3'-UTR of P450arom mRNA. Data are mean  $\pm$  SEM luciferase activity expressed relative to Control plasmid, after correction of transfection efficiency (*Renilla* luciferase). Experiments were performed with five independent cell cultures. Asterisks denote means significantly different from Control ( $P < 0.001$ ).

Figure 6



**Figure 7.** Location of protein binding region within the 3'-UTR of bovine P450 $\alpha$ rom mRNA. Total protein extracts (20  $\mu$ g) from granulosa cells of small follicles (2-6 mm) were UV cross-linked to radiolabeled P450 $\alpha$ rom 3'-UTR riboprobe in the presence of molar excess (0-10x) of unlabeled P450 $\alpha$ rom 3'-UTR RNA fragments (DE, D, E in Fig 1). These fragments are nested within the sequence shown to bind to protein in Fig 5. A) Representative gel showing the position of the specific band (arrow). B) Mean  $\pm$  SEM band intensity of RNA:protein complexes expressed relative to riboprobe binding in the absence of competitor (control). Experiments were performed on three independent protein extracts. Bars with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ).

Figure 7





## References

1. Ginther OJ, Beg MA, Bergfelt DR, Donadeu FX, Kot K. Follicle selection in monovular species. *Biol Reprod* 2001; 65: 638-647.
2. Fortune JE, Rivera GM, Evans AC, Turzillo AM. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biol Reprod* 2001; 65: 648-654.
3. Fisher CR, Graves KH, Parlow AF, Simpson ER. Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the *cyp19* gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 6965-6970.
4. Rosenfeld CS, Wagner JS, Roberts RM, Lubahn DB. Intraovarian actions of oestrogen. *Reproduction* 2001; 122: 215-226.
5. Beg MA, Meira C, Bergfelt DR, Ginther OJ. Role of oestradiol in growth of follicles and follicle deviation in heifers. *Reproduction* 2003; 125: 847-854.
6. Fitzpatrick SL, Richards JS. Regulation of cytochrome P450 aromatase messenger ribonucleic acid and activity by steroids and gonadotropins in rat granulosa cells. *Endocrinology* 1991; 129: 1452-1462.
7. Steinkampf MP, Mendelson CR, Simpson ER. Regulation by follicle-stimulating hormone of the synthesis of aromatase cytochrome P-450 in human granulosa cells. *Mol Endocrinol* 1987; 1: 465-471.
8. Manuel Silva J, Price CA. Effect of follicle-stimulating hormone on steroid secretion and messenger ribonucleic acids encoding cytochromes P450 aromatase and cholesterol side-chain cleavage in bovine granulosa cells in vitro. *Biol Reprod* 2000; 62: 186-191.
9. Garverick HA, Baxter G, Gong J, Armstrong DG, Campbell BK, Gutierrez CG, Webb R. Regulation of expression of ovarian mRNA encoding steroidogenic enzymes and gonadotrophin receptors by FSH and GH in hypogonadotrophic cattle. *Reproduction* 2002; 123: 651-661.
10. Spicer LJ, Chamberlain CS, Maciel SM. Influence of gonadotropins on insulin- and insulin-like growth factor-I (IGF-I)-induced steroid

production by bovine granulosa cells. *Domest Anim Endocrinol* 2002; 22: 237-254.

11. Silva JM, Price CA. Insulin and IGF-I are necessary for FSH-induced cytochrome P450 aromatase but not cytochrome P450 side-chain cleavage gene expression in oestrogenic bovine granulosa cells in vitro. *J Endocrinol* 2002; 174: 499-507.
12. Willis D, Mason H, Gilling-Smith C, Franks S. Modulation by insulin of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone actions in human granulosa cells of normal and polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 302-309.
13. Andreani CL, Pierro E, Lanzone A, Lazzarin N, Capitanio G, Giannini P, Mancuso S. Effect of gonadotropins, insulin and IGF I on granulosa luteal cells from polycystic ovaries. *Mol Cell Endocrinol* 1994; 106: 91-97.
14. Poretsky L, Glover B, Laumas V, Kalin M, Dunaif A. The effects of experimental hyperinsulinemia on steroid secretion, ovarian [125I]insulin binding, and ovarian [125I]insulin-like growth-factor I binding in the rat. *Endocrinology* 1988; 122: 581-585.
15. Dunaif A, Graf M. Insulin administration alters gonadal steroid metabolism independent of changes in gonadotropin secretion in insulin-resistant women with the polycystic ovary syndrome. *J Clin Invest* 1989; 83: 23-29.
16. Fitzpatrick SL, Carlone DL, Robker RL, Richards JS. Expression of aromatase in the ovary: down-regulation of mRNA by the ovulatory luteinizing hormone surge. *Steroids* 1997; 62: 197-206.
17. Voss AK, Fortune JE. Levels of messenger ribonucleic acid for cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase and P450 aromatase in preovulatory bovine follicles decrease after the luteinizing hormone surge. *Endocrinology* 1993; 132: 2239-2245.
18. Komar CM, Berndtson AK, Evans AC, Fortune JE. Decline in circulating estradiol during the periovulatory period is correlated with decreases in estradiol and androgen, and in messenger RNA for p450 aromatase

and p450 17 $\alpha$ -hydroxylase, in bovine preovulatory follicles. *Biol Reprod* 2001; 64: 1797-1805.

19. Hanoux V, Bouraima H, Mittre H, Feral C, Benhaim A. Differential regulation of two 3' end variants of P450 aromatase transcripts and of a new truncated aromatase protein in rabbit preovulatory granulosa cells. *Endocrinology* 2003; 144: 4790-4798.
20. Mu YM, Yanase T, Nishi Y, Takayanagi R, Goto K, Nawata H. Combined treatment with specific ligands for PPAR $\gamma$ :RXR nuclear receptor system markedly inhibits the expression of cytochrome P450arom in human granulosa cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 181: 239-248.
21. Guhaniyogi J, Brewer G. Regulation of mRNA stability in mammalian cells. *Gene* 2001; 265: 11-23.
22. Kenealy MR, Flouriot G, Sonntag-Buck V, Dandekar T, Brand H, Gannon F. The 3'-untranslated region of the human estrogen receptor alpha gene mediates rapid messenger ribonucleic acid turnover. *Endocrinology* 2000; 141: 2805-2813.
23. Nair AK, Menon KM. Regulatory role of the 3' untranslated region of luteinizing hormone receptor: effect on mRNA stability. *FEBS Lett* 2000; 471: 39-44.
24. Cok SJ, Morrison AR. The 3'-untranslated region of murine cyclooxygenase-2 contains multiple regulatory elements that alter message stability and translational efficiency. *J Biol Chem* 2001; 276: 23179-23185.
25. Powell MJ, Thompson SA, Tone Y, Waldmann H, Tone M. Posttranscriptional regulation of IL-10 gene expression through sequences in the 3'-untranslated region. *J Immunol* 2000; 165: 292-296.
26. Soumano K, Silversides DW, Doize F, Price CA. Follicular 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and cytochromes P450 17 alpha-hydroxylase and aromatase messenger ribonucleic acids in cattle undergoing superovulation. *Biol Reprod* 1996; 55: 1419-1426.

27. Tsai SJ, Wiltbank MC. Quantification of mRNA using competitive RT-PCR with standard-curve methodology. *Biotechniques* 1996; 21: 862-866.
28. Bevilacqua A, Ceriani MC, Capaccioli S, Nicolini A. Post-transcriptional regulation of gene expression by degradation of messenger RNAs. *J Cell Physiol* 2003; 195: 356-372.
29. Wilson GM, Brewer G. Identification and characterization of proteins binding A + U-rich elements. *Methods* 1999; 17: 74-83.

## DISCUSSION GÉNÉRALE

Le développement folliculaire chez la vache est caractérisé par une cascade d'évènements à travers lesquels les cellules de granulosa se différencient principalement en augmentant leur capacité à sécréter de l'œstradiol. L'œstradiol est le principal stéroïde sécrété par le follicule avant la lutéinisation (Bigelow et Fortune, 1998). L'œstradiol de même que l'expression du gène P450arom représentent les caractéristiques fondamentales d'un follicule en santé. Ces caractéristiques sont vite perdues après induction de la lutéinisation par le pic de la LH et les cellules de granulosa vont sécréter beaucoup plus de progestérone (Voss et coll., 1993b). Les cellules de granulosa de petits follicules ne sont pas entièrement différenciés, dans ces follicules, l'expression de l'ARNm codant pour P450arom est indétectable (Xu et coll., 1995; Bao et coll., 1997a) et la sécrétion d'œstradiol est très faible (Smith et coll., 1996). Au fur et à mesure que le follicule se développe, les cellules de granulosa se différencient et cette différenciation est caractérisée par une importante augmentation de l'expression de P450arom de même qu'une augmentation progressive de P450scc (Xu et coll., 1995; Bao et coll., 1997a). Le même patron d'expression a été observé in vitro avec les cellules de granulosa mises en culture en absence du sérum dans les conditions qui favorisent la sécrétion d'œstradiol (Silva et Price, 2000).

Afin de mieux caractériser ces conditions de culture, nous avons entrepris d'analyser l'expression de l'ARNm codant pour d'autres enzymes

stéroïdogéniques telles que  $3\beta$ -HSD,  $17\beta$ -HSD et StAR qui sont toutes aussi importantes pour la stéroïdogénèse. Les résultats de notre étude démontrent clairement que le modèle de culture que nous avons adopté favorise la différenciation des cellules de granulosa qui se traduit par une augmentation de l'abondance de l'ARNm P450arom,  $3\beta$ -HSD et  $17\beta$ -HSD.

P450arom et/ou  $17\beta$ -HSD de type 1 sont deux enzymes indispensables pour la synthèse d'œstradiol (Conley et Bird, 1997; Luu-The, 2001). En effet, dépendamment du substrat utilisé, les cellules de granulosa sont capables de synthétiser de l'œstradiol à partir de la testostérone grâce à l'enzyme P450arom, mais aussi à partir de l'androstènedione via l'œstrone ou la testostérone grâce aux deux enzymes P450arom et  $17\beta$ -HSD, il semblerait que les cellules n'ont pas de préférence quant au substrat utilisé dans la mesure où aucune différence n'a été observée dans l'expression de P450arom et  $17\beta$ -HSD par rapport à la testostérone, androstènedione ou DHT.

Nous avons démontré que la  $17\beta$ -HSD de type 1 est plus abondante au niveau des gros follicules alors qu'elle est faible et parfois indétectable sur les follicules moyens, ce qui suggère que l'expression de  $17\beta$ -HSD soit beaucoup plus importante vers le stade de dominance folliculaire contrairement à ce qui est observé chez la souris où la  $17\beta$ -HSD de type 1 est exprimée de façon constitutive tout au long du développement folliculaire (Akinola et coll., 1997).

Au niveau des cellules de granulosa en culture, la FSH induit l'expression de  $17\beta$ -HSD, les niveaux sont très faibles au jour 2 de la culture

et augmentent significativement avec le temps de façon analogue à l'aromatase. Par contre, la stimulation de la  $17\beta$ -HSD par la FSH est linéaire similaire à ce qui est observé chez le rat (Kaminsky et coll., 1997). Le maximum de stimulation étant atteint à 100 ng/ml ce qui n'est pas le cas pour l'aromatase où le maximum est atteint avec à 1 ng/ml (Silva et Price 2000).

L'analyse de l'expression de  $3\beta$ -HSD démontre une importante corrélation avec la synthèse de progestérone, ce qui indique que  $3\beta$ -HSD pourrait jouer un rôle très important dans la régulation de la sécrétion de progestérone. La possibilité que les cellules de granulosa se lutéinisent en culture vu l'importance des niveaux de progestérone produite par rapport à l'oestradiol a été écartée par l'analyse par RT-PCR de StAR, une protéine limitante pour la stéroïdogénèse (Stocco, 2001) qui démontre que les niveaux sont très faibles et restent stables tout au long de la culture.

Certaines études d'immunohistochimie effectuées chez le rat, le porc et l'humain (Zoller et Weisz, 1979; Inkester et Brodie, 1991, Lautincik et coll., 1994 et Turner et coll., 2002) ont observé une différence entre les sous populations de cellules alors que chez la vache, ce n'est pas aussi évident (Bao et coll., 1997; Xu et coll., 1995; Evans et Fortune, 1997). Certaines études réalisées in vitro ont observé une différence (Roberts et Echterkamp, 1994; Rouiller et coll., 1996, 1998); cependant dans ces conditions, la sécrétion d'oestradiol chute après 2 jours de culture. Nos résultats ont clairement démontré qu'il n'y a pas de différence entre les sous populations (antrales et basales) de cellules de granulosa ni au niveau des cellules en culture ni au niveau des cellules de follicules frais et que les conditions de

cultures affectent significativement la capacité des cellules à sécréter des stéroïdes. C'est pourquoi, on pense que ce modèle est idéal pour l'étude de la différenciation cellulaire et la stéroïdogénèse au niveaux des cellules de granulosa.

L'œstradiol joue un rôle important dans la reproduction, en général particulièrement dans la croissance folliculaire chez la vache (Beg et coll., 2003). L'œstradiol induit l'expression des récepteurs à la LH sur les cellules de granulosa (Knecht et Brodie, 1985). L'expression de P450arom au niveau des cellules de granulosa est différentiellement régulée durant la croissance folliculaire et la lutéinisation. P450arom est principalement stimulée par la FSH, l'insuline et/ou IGF I (Spicer et coll., 2002; Silva et Price 2002). L'expression de P450arom peut être également inhibée par la LH, ce qui se traduit par la chute de l'œstradiol observée juste après le pic ovulatoire de la LH (Laurinciket coll., 1996; Voss et Fortune, 1993; Komar et coll., 2001). Le même patron a été observé in vitro suite au retrait des gonadotrophines (Silva et Price, 2002), cependant ni la demi-vie de l'ARNm ni celle de l'activité enzymatique ne sont connues. La demi-vie de l'ARNm P450arom au niveau des cellules de granulosa stimulées à la FSH est relativement courte comparée à celle rapportée chez l'humain, 3 h vs 13 et 16 h (Mu et coll., 2001; Wang et Chen, 1995). L'ajout de CHX, un inhibiteur de la synthèse protéique a augmenté la stabilité de l'ARNm P450arom avec une demi-vie de 10 h, en accord avec les études réalisées chez le rat (Fitzpatrick et coll., 1997) suggérant l'implication de protéines dans le processus de dégradation rapide de l'ARNm. L'insuline et l'AMPc stimulent l'abondance de l'ARNm



P450arom principalement en agissant sur la machinerie transcriptionnelle (Silva et Price, 2000). La demi-vie de l'ARNm P450arom est plus longue lorsque stimulée par l'insuline ou l'AMPc que lorsque stimulée avec la FSH. Ceci suggère que l'insuline et l'AMPc ont également un rôle à jouer sur la stabilité de l'ARNm. L'ajout d'un inhibiteur des MAP kinase, le PD98059 augmente significativement l'abondance de l'ARNm P450arom comparé à la FSH, mais ne semble pas avoir d'effet sur la stabilité. Le fait que la demi-vie est plus longue avec l'AMPc comparée à la FSH est très intéressant sachant que la FSH utilise principalement l'AMPc et la voie des protéines kinases A (PKA) comme médiateur dans la signalisation intra-cellulaire (Richards, 2001). Nos résultats suggèrent que la FSH agit indépendamment de l'AMPc.

La régulation de la stabilité de l'ARNm est très complexe. La région 3'-UTR a été impliquée dans la dégradation de nombreux ARNm dont le récepteur de l'œstradiol, le récepteur de la LH, la cyclooxygénase 2 et l'interleukin 10 (Kenealy et coll., 2000; Naire et Menon, 2000; Cok et Morrison, 2001; Powell et coll., 2000). L'ARNm P450arom est caractérisé par une longue région 3'-UTR avec la présence de nombreux motifs AUUUA qui sont des éléments déterminants de la stabilité de l'ARNm (Guhaniyogi et Brewer, 2001). Dans cette étude, nous avons utilisé l'approche de transfections cellulaires pour vérifier l'impact de la 3'-UTR sur l'activité de la luciférase. Les résultats démontrent clairement que la 3'-UTR P450arom a un effet drastique sur la stabilité en réduisant l'activité de la luciférase jusqu'à 90%. Plusieurs transfections ont été réalisées avec différents fragments de l'UTR afin de déterminer la région contenant l'élément régulateur. La région entre +1099 et

+1714 comprenant 3 motifs AUUUA affecte considérablement l'activité de la luciférase alors que les autres fragments n'affectent que faiblement l'activité de la luciférase.

Les séquences régulatrices de l'UTR peuvent agir en cis ou alors recruter d'autres facteurs trans-régulateurs (Bevilacqua et coll., 2003). C'est pourquoi nous avons entrepris d'examiner la possibilité de l'existence de sites de liaisons potentiels sur la 3'-UTR P450arom. Les analyses par fixation croisée aux UV nous ont permis d'identifier une protéine de 66 kDa qui est spécifique aux cellules de granulosa dans la mesure où on a pas détecté de liaison avec les autres types cellulaires dont le corps jaune.

Les expériences utilisant des fragments compétiteurs ont clairement démontré que le complexe ARN-Protéine est spécifique à la région 3'-UTR plus spécifiquement aux fragments qui ont affecté l'activité de la luciférase ce qui suggère que la liaison de la protéine à la région 3'-UTR déstabilise l'ARNm P450arom.

## **DIRECTIONS FUTURES**

Nous avons démontré par la présente étude que l'ARNm P450arom peut être régulée au moins en partie au niveau post-transcriptionnel. La régulation implique la région riche en A et U de 3'-UTR et possiblement une protéine *trans*-régulatrice; la prochaine étape sera donc d'identifier et de caractériser la protéine, identifier très précisément son site de liaison sur la région 3'-UTR et

explorer son mécanisme d'action et les conditions qui influencent leurs liaisons comme l'AMPc, le phorbol ester ainsi que le calcium.

Nous avons démontré que le PD98059, un inhibiteur des MAPK augmente l'abondance de l'ARNm P450arom probablement en stimulant la machinerie transcriptionnelle ou alors en inhibant la protéine qui freine la transcription. Il serait donc très intéressant de comprendre le mécanisme de régulation en examinant l'effet du PD98059 sur l'activité transcriptionnelle d'un gène rapporteur.

Par ailleurs, nous avons démontré que les cellules de granulosa dans certaines conditions peuvent se différencier in vitro. Cette différenciation se traduit entre autres par l'expression de l'ARNm codant pour 17 $\beta$ -HSD et P450arom. La réponse à la FSH est linéaire pour 17 $\beta$ -HSD alors qu'elle est biphasique pour P450arom, il serait donc intéressant d'examiner le mécanisme de régulation de 17 $\beta$ -HSD, la voie de signalisation intracellulaire, explorer l'effet de différents hormones Insuline et / IGF1 et évaluer la stabilité ARNm 17 $\beta$ -HSD.

## CONCLUSION GÉNÉRALE

Nous avons démontré par la présente étude que les conditions de culture affectent considérablement la capacité des cellules de granulosa à se différencier in vitro. Les cellules de granulosa mises en culture dans des conditions qui favorisent la sécrétion d'œstradiol se différencient, cette différenciation se traduit par une augmentation de l'expression de l'ARNm codant pour les enzymes stéroïdogéniques P450arom, 17 $\beta$ -HSD et 3 $\beta$ -HSD. L'expression de l'ARNm 17 $\beta$ -HSD de type 1 est régulée principalement par la FSH, elle est très faible au jour 2 de la culture et augmente significativement avec le temps en parfaite corrélation avec l'accumulation de l'œstradiol dans le milieu. De plus l'expression de 17 $\beta$ -HSD de type 1 est plus importante au niveau des gros follicules, faible et parfois indétectable dans les follicules moyens. Dans ces conditions de culture, les cellules utilisent aussi bien l'androstènedione que la testostérone et le DHT comme substrat pour la synthèse d'œstradiol.

L'expression de l'ARNm codant pour StAR et P450scc restent stables tout au long de la culture, ce qui indique que les cellules ne se lutéinisent pas.

L'expression de l'ARNm 3 $\beta$ -HSD joue un rôle très important dans la régulation de biosynthèse de progestérone.

La demi-vie de l'ARNm P450arom est très courte (3 h), ce qui contribue à la chute rapide du messager et de l'activité observée chez la vache, juste après le pic de la LH et aussi probablement au processus de sélection du

follicule dominant. La régulation a lieu au moins en partie au niveau post-transcriptionnel impliquant des séquences spécifiques de la région 3'-UTR de l'ARNm P450arom et des protéines spécifiques.

## BIBLIOGRAPHIE

**Adams, G. P.** 1999. Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. *J Reprod Fertil Suppl*, 54: 17-32.

**Adams, G. P., Matteri, R. L., Kastelic, J. P., Ko, J. C., & Ginther, O. J.** 1992. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J Reprod Fertil*, 94(1): 177-188.

**Adashi, E. Y.** 1992. Intraovarian peptides. Stimulators and inhibitors of follicular growth and differentiation. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 21(1): 1-17.

**Adashi, E. Y.** 1994. Endocrinology of the ovary. *Hum Reprod*, 9(5): 815-827.

**Adashi, E. Y., Resnick, C. E., Hernandez, E. R., May, J. V., Knecht, M., Svoboda, M. E., & Van Wyk, J. J.** 1988. Insulin-like growth factor-I as an amplifier of follicle-stimulating hormone action: studies on mechanism(s) and site(s) of action in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*, 122(4): 1583-1591.

**Adashi, E. Y., Resnick, C. E., Payne, D. W., Rosenfeld, R. G., Matsumoto, T., Hunter, M. K., Gargosky, S. E., Zhou, J., & Bondy, C. A.** 1997. The mouse intraovarian insulin-like growth factor I system: departures from the rat paradigm. *Endocrinology*, 138(9): 3881-3890.

**Arau, Y., Kuri Yama R., Kayama F. & Kato S.** 2000. A nuclear matrix-associated factor, SAF-B, interacts with specific isoforms of AUF1/hnRNP D. *Arch Biochem Biophys*, 380: 228-236.

**Armstrong, D. G., Baxter, G., Gutierrez, C. G., Hogg, C. O., Glazyrin, A. L., Campbell, B. K., Bramley, T. A., & 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(4): 2146-2154.

**Armstrong, D. G., Gutierrez, C. G., Baxter, G., Glazyrin, A. L., Mann, G. E., Woad, K. J., Hogg, C. O., & Webb, R.** 2000. Expression of mRNA encoding IGF-I, IGF-II and type 1 IGF receptor in bovine ovarian follicles. *J Endocrinol*, 165(1): 101-113.

**Armstrong, D. G., & Webb, R.** 1997. Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins. *Rev Reprod*, 2(3): 139-146.

**Badinga, L., Driancourt, M. A., Savio, J. D., Wolfenson, D., Drost, M., De La Sota, R. L., & Thatcher, W. W.** 1992. Endocrine and ovarian responses associated with the first-wave dominant follicle in cattle. *Biol Reprod*, 47(5): 871-883.

**Baird, A., & Hsueh, A. J.** 1986. Fibroblast growth factor as an intraovarian hormone: differential regulation of steroidogenesis by an angiogenic factor. *Regul Pept*, 16(3-4): 243-250.

**Balasubramanian K., Lavoie HA., Garmey JC., Stocco DM. and Veldhuis JD.** (1997) Regulation of porcine granulosa cell steroidogenic acute regulatory protein (StAR) by insulin-like growth factor I: synergism with follicle-stimulating hormone of protein kinase A agonist. *Endocrinology*, 138: 433-439

**Bao, B., Calder, M. D., Xie, S., Smith, M. F., Salfen, B. E., Youngquist, R. S., & Garverick, H. A.** 1998a. Expression of steroidogenic acute regulatory protein messenger ribonucleic acid is limited to theca of healthy bovine follicles collected during recruitment, selection, and dominance of follicles of the first follicular wave. *Biol Reprod*, 59(4): 953-959.

**Bao, B., & Garverick, H. A.** 1998b. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. *J Anim Sci*, 76(7): 1903-1921.

**Bao, B., Garverick, H. A., Smith, G. W., Smith, M. F., Salfen, B. E., & Youngquist, R. S.** 1997a. 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(5): 1158-1168.

**Bao, B., Garverick, H. A., Smith, G. W., Smith, M. F., Salfen, B. E., & Youngquist, R. S.** 1997b. Expression of messenger ribonucleic acid (mRNA) encoding 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase delta4,delta5 isomerase (3beta-HSD) during recruitment and selection of bovine ovarian follicles: identification of dominant follicles by expression of 3beta-HSD mRNA within the granulosa cell layer. *Biol Reprod*, 56(6): 1466-1473.

**Bao, B., Thomas, M. G., Griffith, M. K., Burghardt, R. C., & Williams, G. L.** 1995. Steroidogenic activity, insulin-like growth factor-I production, and proliferation of granulosa and theca cells obtained from dominant preovulatory and nonovulatory follicles during the bovine estrous cycle: effects of low-density and high-density lipoproteins. *Biol Reprod*, 53(6): 1271-1279.

**Beg, M. A., Bergfelt, D. R., Kot, K., Wiltbank, M. C., & Ginther, O. J.** 2001. Follicular-fluid factors and granulosa-cell gene expression associated with follicle deviation in cattle. *Biol Reprod*, 64(2): 432-441.

**Beg, M. A., Meira, C., Bergfelt, D. R., & Ginther, O. J.** 2003. Role of oestradiol in growth of follicles and follicle deviation in heifers. *Reproduction*, 125(6): 847-854.

**Bergfelt DR. and Ginther OJ.** (1996) Ovarian, uterine and embryo dynamics in horses versus ponies. *Journal of Equine Veterinary Science*, 16: 66-72.



**Berndtson, A. K., Vincent, S. E., & Fortune, J. E.** 1995. Low and high concentrations of gonadotropins differentially regulate hormone production by theca interna and granulosa cells from bovine preovulatory follicles. *Biol Reprod*, 52(6): 1334-1342.

**Bevilacqua, A., Ceriani, M. C., Capaccioli, S., & Nicolin, A.** 2003. Post-transcriptional regulation of gene expression by degradation of messenger RNAs. *J Cell Physiol*, 195(3): 356-372.

**Bo, G. A., Baruselli, P. S., & Martinez, M. F.** 2003. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Anim Reprod Sci*, 78(3-4): 307-326.

**Braw-Tal R. and yossefi S.** (1997) Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *J. Reprod. Fertil.* 109 165-171.

**Britt K. L., Drummond A. E., Cox VA., Dyson M. & Wreford N. G.** 2000. An age-related ovarian phenotype in mice with targeted disruption of the Cyp 19 (aromatase) gene. *Endocrinology*, 141: 2614-2623.

**Brown TR.** (1999) Steroid hormones, overview. *Encyclopedia of Reproduction*. 4 Knobil E. et Neill JD. California. Academic Press. 634-644.

**Byskov AG.**(1978) The anatomy and ultrastructure of the rete system in the fetal mouse ovary. *Biol. Reprod*, 19: 720-35.

**Byskov AG. and Lintern-Moore S.** (1973) Follicle formation in the immature mouse ovary : the role of the rete ovarii. *Journal of anatomy*, 43: 207-17.

**Buccione R., Schroeder AC. and Eppig JJ.** (1990) Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biol. Reprod*, 43: 543-47.

**Campbell BK., Scaramuzzi RJ and Webb R.** (1995) Control of antral follicle development and selection in sheep and cattle. *J Reprod Fertil Suppl*, 49: 335-350

**Campbell BK., Souza C, Gong J, Webb R, Kendall N, Marsters P, Robinson G, Mitchell A, Telfer EE & Baird DT.** (2003) Domestic ruminants as models for the elucidation of the mechanisms controlling ovarian follicle development in humans. *Reprod Suppl*, 61: 429-443.

**Chen CY., Shyu AB.** (1995). Au-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends biochem sci*, 20: 465-470.

**Cok SJ, Morrison AR.** (2001). The 3'-untranslated region of murine cyclooxygenase-2 contains multiple regulatory elements that alter message stability and translational efficiency. *J Biol Chem*, 276: 23179-23185.

**Conley AJ. and Bird IM.** (1997) The role of cytochrome P450 17 $\alpha$ -hydroxylase and 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in the integration of gonadal and adrenal steroidogenesis via the  $\Delta$ 5 and  $\Delta$ 4 pathways of steroidogenesis in mammals. *Biol Reprod*, 56 789-799

**Conley A, and Hinshelwood M.** (2001). Mammalian aromatases. *Reprod*, 121: 685-695.

**Conley A, Corbin J, Smith T, Hinshelwood M, Liu Z & Simpson E,** 1997a. Porcine aromatases: studies on tissue-specific, functionally distinct isozymes from a single gene? *J Steroid Biochem Mol Biol*, 61: 407-413.

**Corbin CJ, Khalil MW & Conley AJ,** 1995. Functional ovarian and placental isoforms of porcine aromatase. *Mol Cell Endocrinol*, 113: 29-37.

**DeMaria CT. & Brewer G.** 1996. AUF1 binding affinity to AU-rich elements correlates with rapid mRNA degradation. *J Biol Chem*, 271: 12179-12184.

**Doody KJ, Lorence MC, Mason JI & Simpson ER, 1990.** Expression of messenger ribonucleic acid species encoding steroidogenic enzymes in human follicles and corpora lutea throughout the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*, 70: 1041-1045.

**Driancourt MA.** (2001) Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*, 55: 1211-1239.

**Driancourt MA., Paris A. and Debrauwer L.** (1996) Aromatase activity of ovine follicular walls: technical validation and physiological control. *Reprod Fertil Dev*, 8: 875-884.

**Dyce, J., George, M., Goodall, H., & Fleming, T. P.** 1987. Do trophectoderm and inner cell mass cells in the mouse blastocyst maintain discrete lineages? *Development*, 100(4): 685-698.

**De Loos F., Kastrop P., Van Maurik P., Van Beneden TH. And Kruip TAM.** (1991) Heterologous cell contacts and metabolic coupling in bovine cumulus oocyte complexes. *Mol. Reprod. Dev*, 28: 255-259.

**Echternkamp, S. E., Spicer, L. J., Klindt, J., Vernon, R. K., Yen, J. T., & Buonomo, F. C.** 1994. Administration of porcine somatotropin by a sustained-release implant: effect on follicular growth, concentrations of steroids and insulin-like growth factor I, and insulin-like growth factor binding protein activity in follicular fluid of control, lean, and obese gilts. *J Anim Sci*, 72(9): 2431-2440.

**Eimerl S. and Orly J.** (2002) Regulation of steroidogenic genes by insulin-like Growth factor-1 and follicle-stimulating hormone: differential responses of cytochrome P450 side-chain cleavage, steroidogenic acute regulatory protein, and 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase in rat granulosa cells. *Biol. Reprod*, 67: 900-910

**Eppig, J. J., & Downs, S. M.** 1984. Chemical signals that regulate mammalian oocyte maturation. *Biol Reprod*, 30(1): 1-11.

**Erickson, B. H.** 1966. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *J Anim Sci*, 25(3): 800-805.

**Espey, L. L.** 1994. Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. *Biol Reprod*, 50(2): 233-238.

**Evans, A. C., Adams, G. P., & Rawlings, N. C.** 1994. Endocrine and ovarian follicular changes leading up to the first ovulation in prepubertal heifers. *J Reprod Fertil*, 100(1): 187-194.

**Evans, A. C., & Fortune, J. E.** 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(7): 2963-2971.

**Fair, T., Hyttel, P., & Greve, T.** 1995. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol Reprod Dev*, 42(4): 437-442.

**Fisher, C. R., Graves, K. H., Parlow, A. F., & Simpson, E. R.** 1998. Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the cyp19 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(12): 6965-6970.

**Fitzpatrick, S. L., Carlone, D. L., Robker, R. L., & Richards, J. S.** 1997. Expression of aromatase in the ovary: down-regulation of mRNA by the ovulatory luteinizing hormone surge. *Steroids*, 62(1): 197-206.

**Fitzpatrick, S. L., & Richards, J. S.** 1991. Regulation of cytochrome P450 aromatase messenger ribonucleic acid and activity by steroids and gonadotropins in rat granulosa cells. *Endocrinology*, 129(3): 1452-1462.

**Fortune, J. E. 1986.** Bovine theca and granulosa cells interact to promote androgen production. *Biol Reprod*, 35(2): 292-299.

**Fortune, J. E. 1994.** Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod*, 50(2): 225-232.

**Fortune, J. E., & Hansel, W. 1985.** Concentrations of steroids and gonadotropins in follicular fluid from normal heifers and heifers primed for superovulation. *Biol Reprod*, 32(5): 1069-1079.

**Fortune JE., Sirois J. and Quirk SM. (1988)** The growth and differentiation of ovarian follicles during the bovine estrous cycle. *Theriogenology*, 29: 95-109.

**Fortune, J. E., Rivera, G. M., Evans, A. C., & Turzillo, A. M. 2001.** Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biol Reprod*, 65(3): 648-654.

**Furbass, R., Kalbe, C., & Vanselow, J. 1997.** Tissue-specific expression of the bovine aromatase-encoding gene uses multiple transcriptional start sites and alternative first exons. *Endocrinology*, 138(7): 2813-2819.

**Furbass, R., & Vanselow, J. 1995.** An aromatase pseudogene is transcribed in the bovine placenta. *Gene*, 154(2): 287-291.

**Garverick, H. A., Baxter, G., Gong, J., Armstrong, D. G., Campbell, B. K., Gutierrez, C. G., & Webb, R. 2002.** Regulation of expression of ovarian mRNA encoding steroidogenic enzymes and gonadotrophin receptors by FSH and GH in hypogonadotrophic cattle. *Reproduction*, 123(5): 651-661.

Geisthovel, F., Moretti-Rojas, I., Asch, R. H., & Rojas, F. J. 1989. Expression of insulin-like growth factor-II (IGF-II) messenger ribonucleic acid (mRNA), but not IGF-I mRNA, in human preovulatory granulosa cells. *Hum Reprod*, 4(8): 899-902.

Gibbons, J. R., Wiltbank, M. C., & Ginther, O. J. 1999. Relationship between follicular development and the decline in the follicle-stimulating hormone surge in heifers. *Biol Reprod*, 60(1): 72-77.

Ginther, O. J. 2000. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Anim Reprod Sci*, 60-61: 61-79.

Ginther, O. J., Beg, M. A., Bergfelt, D. R., Donadeu, F. X., & Kot, K. 2001. Follicle selection in monovular species. *Biol Reprod*, 65(3): 638-647.

Ginther, O. J., Bergfelt, D. R., Kulick, L. J., & Kot, K. 2000a. Selection of the dominant follicle in cattle: role of estradiol. *Biol Reprod*, 63(2): 383-389.

Ginther, O. J., Bergfelt, D. R., Kulick, L. J., & Kot, K. 2000b. Selection of the dominant follicle in cattle: role of two-way functional coupling between follicle-stimulating hormone and the follicles. *Biol Reprod*, 62(4): 920-927.

Ginther, O. J., Knopf, L., & Kastelic, J. P. 1989c. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. *J Reprod Fertil*, 87(1): 223-230.

Ginther OJ., Kastelic JP. and Knopf L. (1989a) Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. *Anim Reprod Sci*, 20: 187-200.

Ginther, O. J., Wiltbank, M. C., Fricke, P. M., Gibbons, J. R., & Kot, K. 1996. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol Reprod*, 55(6): 1187-1194.

**Giudice, L. C.** 2001. Insulin-like growth factor family in Graafian follicle development and function. *J Soc Gynecol Investig*, 8(1 Suppl Proceedings): S26-29.

**Giudice, L. C., Conover, C. A., Bale, L., Faessen, G. H., Ilg, K., Sun, I., Imani, B., Suen, L. F., Irwin, J. C., Christiansen, M., Overgaard, M. T., & Oxvig, C.** 2002. Identification and regulation of the IGFBP-4 protease and its physiological inhibitor in human trophoblasts and endometrial stroma: evidence for paracrine regulation of IGF-II bioavailability in the placental bed during human implantation. *J Clin Endocrinol Metab*, 87(5): 2359-2366.

**Glister, C., Tannetta, D. S., Groome, N. P., & Knight, P. G.** 2001. Interactions between follicle-stimulating hormone and growth factors in modulating secretion of steroids and inhibin-related peptides by nonluteinized bovine granulosa cells. *Biol Reprod*, 65(4): 1020-1028.

**Guhaniyogi J, Brewer G.** 2001. Regulation of mRNA stability in mammalian cells. *Gene*, 265: 11-23.

**Goldammer, T., Guerin, G., Brunner, R. M., Vanselow, J., Furbass, R., & Schwerin, M.** 1994. Chromosomal mapping of the bovine aromatase gene (CYP19) and an aromatase pseudogene to chromosome 10 and syntenic group U5. *Mamm Genome*, 5(12): 822-823.

**Goldenberg, R. L., Vaitukaitis, J. L., & Ross, G. T.** 1972. Estrogen and follicle stimulation hormone interactions on follicle growth in rats. *Endocrinology*, 90(6): 1492-1498.

**Gordon I.** (1994) Laboratory production of cattle embryos. *Wallingford, UK: CAB International.*

**Gordon I. and Lu KH.** (1990) Production of embryos in vitro and its impact on livestock production. *Theriogenology*, 33: 77-87.

**Gore-Langton, R. E., & Daniel, S. A.** 1990. Follicle-stimulating hormone and estradiol regulate antrum-like reorganization of granulosa cells in rat preantral follicle cultures. *Biol Reprod*, 43(1): 65-72.

**Gore-Langton RE. and Armstrong DT.** (1994) Follicular steroidogenesis and its control. *The physiology of reproduction. 1. Knobil E. New York. Raven Press.* 571-628.

**Gougeon, A.** 1996. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev*, 17(2): 121-155.

**Gwynne JT and Strauss JFd.** (1982) The role of lipoproteins in steroidogenesis and cholesterol metabolism in steroidogenic glands. *Endocr Rev*, 3: 299-329.

**Gutierrez, C. G., Campbell, B. K., & Webb, R.** 1997. Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle-stimulating hormone, and morphological characteristics. *Biol Reprod*, 56(3): 608-616.

**Gutierrez, C. G., Ralph, J. H., Telfer, E. E., Wilmut, I., & Webb, R.** 2000. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture in vitro. *Biol Reprod*, 62(5): 1322-1328.

**Hamilton, B. J., Nagy, E., Malter, J. S., Arrick, B. A., & Rigby, W. F.** 1993. Association of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 and C proteins with reiterated AUUUA sequences. *J Biol Chem*, 268(12): 8881-8887.

**Hanoux, V., Bouraima, H., Mittre, H., Feral, C., & Benhaim, A.** 2003. Differential regulation of two 3' end variants of P450 aromatase transcripts and of a new truncated



aromatase protein in rabbit preovulatory granulosa cells. *Endocrinology*, 144(11): 4790-4798.

Harada, N., Sasano, H., Murakami, H., Ohkuma, T., Nagura, H., & Takagi, Y. 1999. Localized expression of aromatase in human vascular tissues. *Circ Res*, 84(11): 1285-1291.

Harada, N., Yamada, K., Saito, K., Kibe, N., Dohmae, S., & Takagi, Y. 1990. Structural characterization of the human estrogen synthetase (aromatase) gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 166(1): 365-372.

Hartung S., Rust W., Balvers M. and Ivell R. (1995) Molecular cloning and in vivo expression of the bovine steroidogenic acute regulatory protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 215: 646-653.

Henics, T., Nagy, E., Oh, H. J., Csermely, P., von Gabain, A., & Subject, J. R. 1999. Mammalian Hsp70 and Hsp110 proteins bind to RNA motifs involved in mRNA stability. *J Biol Chem*, 274(24): 17318-17324.

Hickey, G. J., Chen, S. A., Besman, M. J., Shively, J. E., Hall, P. F., Gaddy-Kurten, D., & Richards, J. S. 1988. Hormonal regulation, tissue distribution, and content of aromatase cytochrome P450 messenger ribonucleic acid and enzyme in rat ovarian follicles and corpora lutea: relationship to estradiol biosynthesis. *Endocrinology*, 122(4): 1426-1436.

Hickey, G. J., Krasnow, J. S., Beattie, W. G., & Richards, J. S. 1990. Aromatase cytochrome P450 in rat ovarian granulosa cells before and after luteinization: adenosine 3',5'-monophosphate-dependent and independent regulation. Cloning and sequencing of rat aromatase cDNA and 5' genomic DNA. *Mol Endocrinol*, 4(1): 3-12.

**Hinshelwood MM.** (1999) Steroidogenesis, overview *Encyclopedia of Reproduction*, 4. *Knobil E. and Neil JD. California Academic Press.* 644-653.

**Hinshelwood MM, Michael MD & Simpson ER,** 1997. The 5'-flanking region of the ovarian promoter of the bovine CYP19 gene contains a deletion in a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-like responsive sequence. *Endocrinology*, 138: 3704-3710.

**Hinshelwood, M. M., Corbin, C. J., Tsang, P. C., & Simpson, E. R.** 1993. Isolation and characterization of a complementary deoxyribonucleic acid insert encoding bovine aromatase cytochrome P450. *Endocrinology*, 133(5): 1971-1977.

**Hinshelwood, M. M., Liu, Z., Conley, A. J., & Simpson, E. R.** 1995. Demonstration of tissue-specific promoters in nonprimate species that express aromatase P450 in placentae. *Biol Reprod*, 53(5): 1151-1159.

**Honda, S., Harada, N., Ito, S., Takagi, Y., & Maeda, S.** 1998. Disruption of sexual behavior in male aromatase-deficient mice lacking exons 1 and 2 of the cyp19 gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 252(2): 445-449.

**Honda, S., Harada, N., & Takagi, Y.** 1994. Novel exon 1 of the aromatase gene specific for aromatase transcripts in human brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 198(3): 1153-1160.

**Honda, S., Harada, N., & Takagi, Y.** 1996. The alternative exons 1 of the mouse aromatase cytochrome P-450 gene. *Biochim Biophys Acta*, 1305(3): 145-150.

**Huet, C., Monget, P., Pisselet, C., Hennequet, C., Locatelli, A., & Monniaux, D.** 1998. Chronology of events accompanying follicular atresia in hypophysectomized ewes. Changes in levels of steroidogenic enzymes, connexin 43, insulin-like growth factor II/mannose 6 phosphate receptor, extracellular matrix components, and matrix metalloproteinases. *Biol Reprod*, 58(1): 175-185.

Huet, C., Monget, P., Pisselet, C., & Monniaux, D. 1997. Changes in extracellular matrix components and steroidogenic enzymes during growth and atresia of antral ovarian follicles in the sheep. *Biol Reprod*, 56(4): 1025-1034.

Hwa, V., Oh, Y., & Rosenfeld, R. G. 1999. Insulin-like growth factor binding proteins: a proposed superfamily. *Acta Paediatr Suppl*, 88(428): 37-45.

Hyttel P., Fair T., Callesen H. and Greve T. (1997) Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*, 47: 23-32.

Inkster, S. E., & Brodie, A. M. 1991. Expression of aromatase cytochrome P-450 in premenopausal and postmenopausal human ovaries: an immunocytochemical study. *J Clin Endocrinol Metab*, 73(4): 717-726.

Ireland, J. J., & Roche, J. F. 1982. Effect of progesterone on basal LH and episodic LH and FSH secretion in heifers. *J Reprod Fertil*, 64(2): 295-302.

Ireland, J. J., & Roche, J. F. 1983. Growth and differentiation of large antral follicles after spontaneous luteolysis in heifers: changes in concentration of hormones in follicular fluid and specific binding of gonadotropins to follicles. *J Anim Sci*, 57(1): 157-167.

Juengel, J. L., Meberg, B. M., Turzillo, A. M., Nett, T. M., & Niswender, G. D. 1995. Hormonal regulation of messenger ribonucleic acid encoding steroidogenic acute regulatory protein in ovine corpora lutea. *Endocrinology*, 136(12): 5423-5429.

Kamat, A., Graves, K. H., Smith, M. E., Richardson, J. A., & Mendelson, C. R. 1999. A 500-bp region, approximately 40 kb upstream of the human CYP19 (aromatase) gene, mediates placenta-specific expression in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(8): 4575-4580.

**Kastellic KP., Knopf L. and Ginther OJ.** (1990) Effect of day of prostaglandin F-2 alpha treatment on selection and development of the ovulatory follicle in heifers. *Anim Reprod Sci*, 23: 169-180.

**Kenealy, M. R., Flouriot, G., Sonntag-Buck, V., Dandekar, T., Brand, H., & Gannon, F.** 2000. The 3'-untranslated region of the human estrogen receptor alpha gene mediates rapid messenger ribonucleic acid turnover. *Endocrinology*, 141(8): 2805-2813.

**Komar, C. M., Berndtson, A. K., Evans, A. C., & Fortune, J. E.** 2001. Decline in circulating estradiol during the periovulatory period is correlated with decreases in estradiol and androgen, and in messenger RNA for p450 aromatase and p450 17alpha-hydroxylase, in bovine preovulatory follicles. *Biol Reprod*, 64(6): 1797-1805.

**Kulick, L. J., Kot, K., Wiltbank, M. C., & Ginther, O. J.** 1999. Follicular and hormonal dynamics during the first follicular wave in heifers. *Theriogenology*, 52(5): 913-921.

**Lala DS, Rice DA & Parker KL,** 1992. Steroidogenic factor I, a key regulator of steroidogenic enzyme expression, is the mouse homolog of fushi tarazu-factor I. *Mol Endocrinol*, 6: 1249-1258.

**Laurincik, J., Kolodzieyski, L., Hyttel, P., Osawa, Y., Niemann, H., Schmoll, F., Brem, G., & Schellander, K.** 1996. Granulosa-cumulus-corona expansion and aromatase localization in preovulatory follicles in superovulated heifers. *Acta Vet Scand*, 37(1): 99-107.

**Lautincik, J., Kolodzieyski, L., Elias, V., Hyttel, P., Osawa, Y., & Sirotkin, A.** 1994. Immunocytochemical localization of aromatase in the ovary of superovulated cattle, pigs and sheep. *Acta Vet Scand*, 35(2): 185-191.

**Lucy, M. C.** 2000. Regulation of ovarian follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle. *J Dairy Sci*, 83(7): 1635-1647.

**Lucy, M. C., Savio, J. D., Badinga, L., De La Sota, R. L., & Thatcher, W. W.** 1992. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *J Anim Sci*, 70(11): 3615-3626.

**Lussier, J. G., Matton, P., & Dufour, J. J.** 1987. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *J Reprod Fertil*, 81(2): 301-307.

**Lussier, J. G., Matton, P., Guilbault, L. A., Grasso, F., Mapletoft, R. J., & Carruthers, T. D.** 1994. Ovarian follicular development and endocrine responses in follicular-fluid-treated and hemi-ovariectomized heifers. *J Reprod Fertil*, 102(1): 95-105.

**Luu-The, V.** 2001. Analysis and characteristics of multiple types of human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 76(1-5): 143-151.

**Mahendroo, M. S., Mendelson, C. R., & Simpson, E. R.** 1993. Tissue-specific and hormonally controlled alternative promoters regulate aromatase cytochrome P450 gene expression in human adipose tissue. *J Biol Chem*, 268(26): 19463-19470.

**Mahtani, K. R., Brook, M., Dean, J. L., Sully, G., Saklatvala, J., & Clark, A. R.** 2001. Mitogen-activated protein kinase p38 controls the expression and posttranslational modification of tristetraprolin, a regulator of tumor necrosis factor alpha mRNA stability. *Mol Cell Biol*, 21(19): 6461-6469.

**Malassine, A., Besse, C., Roche, A., Alsat, E., Rebourcet, R., Mondon, F., & Cedard, L.** 1987. Ultrastructural visualization of the internalization of low density lipoprotein by human placental cells. *Histochemistry*, 87(5): 457-464.

**Mamluk, R., Greber, Y., & Meidan, R.** 1999. Hormonal regulation of messenger ribonucleic acid expression for steroidogenic factor-1, steroidogenic acute regulatory

protein, and cytochrome P450 side-chain cleavage in bovine luteal cells. *Biol Reprod*, 60(3): 628-634.

**Manuel Silva, J., & Price, C. A.** 2000. Effect of follicle-stimulating hormone on steroid secretion and messenger ribonucleic acids encoding cytochromes P450 aromatase and cholesterol side-chain cleavage in bovine granulosa cells in vitro. *Biol Reprod*, 62(1): 186-191.

**Marshall, D. E., Dumasia, M. C., Wooding, P., Gower, D. B., & Houghton, E.** 1996. Studies into aromatase activity associated with fetal allantochorionic and maternal endometrial tissues of equine placenta. Identification of metabolites by gas chromatography mass spectrometry. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 59(3-4): 281-296.

**Mazerbourg, S., Overgaard, M. T., Oxvig, C., Christiansen, M., Conover, C. A., Laurendeau, I., Vidaud, M., Tosser-Klopp, G., Zapf, J., & Monget, P.** 2001. Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) in ovine, bovine, porcine, and equine ovarian follicles: involvement in IGF binding protein-4 proteolytic degradation and mRNA expression during follicular development. *Endocrinology*, 142(12): 5243-5253.

**Mazerbourg, S., Zapf, J., Bar, R. S., Brigstock, D. R., & Monget, P.** 2000. Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-4 proteolytic degradation in bovine, equine, and porcine preovulatory follicles: regulation by IGFs and heparin-binding domain-containing peptides. *Biol Reprod*, 63(2): 390-400.

**McGee, E. A., & Hsueh, A. J.** 2000. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev*, 21(2): 200-214.

**McNatty, K. P., Heath, D. A., Henderson, K. M., Lun, S., Hurst, P. R., Ellis, L. M., Montgomery, G. W., Morrison, L., & Thurley, D. C.** 1984. Some aspects of thecal and granulosa cell function during follicular development in the bovine ovary. *J Reprod Fertil*, 72(1): 39-53.

**Means, G. D., Kilgore, M. W., Mahendroo, M. S., Mendelson, C. R., & Simpson, E. R.** 1991. Tissue-specific promoters regulate aromatase cytochrome P450 gene expression in human ovary and fetal tissues. *Mol Endocrinol*, 5(12): 2005-2013.

**Means, G. D., Mahendroo, M. S., Corbin, C. J., Mathis, J. M., Powell, F. E., Mendelson, C. R., & Simpson, E. R.** 1989. Structural analysis of the gene encoding human aromatase cytochrome P-450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *J Biol Chem*, 264(32): 19385-19391.

**Mendelson CR & Simpson ER,** 1987. Regulation of estrogen biosynthesis by human adipose cells in vitro. *Mol Cell Endocrinol*, 52: 169-176.

**Mihm, M., Austin, E. J., Good, T. E., Ireland, J. L., Knight, P. G., Roche, J. F., & Ireland, J. J.** 2000. Identification of potential intrafollicular factors involved in selection of dominant follicles in heifers. *Biol Reprod*, 63(3): 811-819.

**Mihm, M., Good, T. E., Ireland, J. L., Ireland, J. J., Knight, P. G., & Roche, J. F.** 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(6): 1328-1337.

**Monget, P., Fabre, S., Mulsant, P., Lecerf, F., Elsen, J. M., Mazerbourg, S., Pisselet, C., & Monniaux, D.** 2002. Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. *Domest Anim Endocrinol*, 23(1-2): 139-154.

**Monniaux, D., Huet, C., Besnard, N., Clement, F., Bosc, M., Pisselet, C., Monget, P., & Mariana, J. C.** 1997. Follicular growth and ovarian dynamics in mammals. *J Reprod Fertil Suppl*, 51: 3-23.

**Monniaux, D., Huet, C., Pisselet, C., Mandon-Pepin, B., & Monget, P.** 1998. [Mechanism, regulation, and manipulations of follicular atresia]. *Contracept Fertil Sex*, 26(7-8): 528-535.

**Moor, R. M.** 1977. Sites of steroid production in ovine graafian follicles in culture. *J Endocrinol*, 73(1): 143-150.

**Mu, Y. M., Yanase, T., Nishi, Y., Takayanagi, R., Goto, K., & Nawata, H.** 2001. Combined treatment with specific ligands for PPARgamma:RXR nuclear receptor system markedly inhibits the expression of cytochrome P450arom in human granulosa cancer cells. *Mol Cell Endocrinol*, 181(1-2): 239-248..

**Nair, A. P., Hahn, S., Banholzer, R., Hirsch, H. H., & Moroni, C.** 1994. Cyclosporin A inhibits growth of autocrine tumour cell lines by destabilizing interleukin-3 mRNA. *Nature*, 369(6477): 239-242.

**Nair AK, Menon KM.**2000. Regulatory role of the 3' untranslated region of luteinizing hormone receptor: effect on mRNA stability. *FEBS Lett*, 471: 39-44.

**Okuda, K., Uenoyama, Y., Berisha, B., Lange, I. G., Taniguchi, H., Kobayashi, S., Miyamoto, A., & Schams, D.** 2001. Estradiol-17beta is produced in bovine corpus luteum. *Biol Reprod*, 65(6): 1634-1639.

**Overgaard, M. T., Boldt, H. B., Laursen, L. S., Sottrup-Jensen, L., Conover, C. A., & Oxvig, C.** 2001. Pregnancy-associated plasma protein-A2 (PAPP-A2), a novel insulin-like growth factor-binding protein-5 proteinase. *J Biol Chem*, 276(24): 21849-21853.

**Paavola, L. G., Strauss, J. F., 3rd, Boyd, C. O., & Nestler, J. E.** 1985. Uptake of gold- and [3H]cholesteryl linoleate-labeled human low density lipoprotein by cultured rat granulosa cells: cellular mechanisms involved in lipoprotein metabolism and their importance to steroidogenesis. *J Cell Biol*, 100(4): 1235-1247.



Picton, H. M. 2001. Activation of follicle development: the primordial follicle. *Theriogenology*, 55(6): 1193-1210.

Powell, M. J., Thompson, S. A., Tone, Y., Waldmann, H., & Tone, M. 2000. Posttranscriptional regulation of IL-10 gene expression through sequences in the 3'-untranslated region. *J Immunol*, 165(1): 292-296.

Price, C. A. 1991. The control of FSH secretion in the larger domestic species. *J Endocrinol*, 131(2): 177-184.

Price, C. A., Carriere, P. D., Bhatia, B., & Groome, N. P. 1995. Comparison of hormonal and histological changes during follicular growth, as measured by ultrasonography, in cattle. *J Reprod Fertil*, 103(1): 63-68.

Price, C. A., Salah, N., & Groome, N. P. 1995. Plasma concentrations of dimeric inhibin and oestradiol in heifers undergoing superovulation with eCG or FSH. *J Reprod Fertil Suppl*, 49: 507-510.

Rajakoski, E. 1960. The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special reference to seasonal, cyclical, and left-right variations. *Acta Endocrinol (Copenh), Suppl* 52: 1-68.

Richards, J. S., Hickey, G. J., Chen, S. A., Shively, J. E., Hall, P. F., Gaddy-Kurten, D., & Kurten, R. 1987. Hormonal regulation of estradiol biosynthesis, aromatase activity, and aromatase mRNA in rat ovarian follicles and corpora lutea. *Steroids*, 50(4-6): 393-409.

Richards, J. S., & Kersey, K. A. 1979. Changes in theca and granulosa cell function in antral follicles developing during pregnancy in the rat: gonadotropin receptors, cyclic AMP and estradiol-17 beta. *Biol Reprod*, 21(5): 1185-1201.

**Rivera, G. M., & Fortune, J. E.** 2001. Development of codominant follicles in cattle is associated with a follicle-stimulating hormone-dependent insulin-like growth factor binding protein-4 protease. *Biol Reprod*, 65(1): 112-118.

**Roberts, A. J., & Echtenkamp, S. E.** 1994. In vitro production of estradiol by bovine granulosa cells: evaluation of culture condition, stage of follicular development, and location of cells within follicles. *Biol Reprod*, 51(2): 273-282.

**Robertson K. M., O'Donnell L., Jones M. E., Meachem S. J., Boon W. C., Fisher C. R., Graves K. H., Mclachlann R. I. & Simpson E.R.** 1999. Impairment of spermatogenesis in mice lacking a functional aromatase (cyp 19) gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 7986-7991.

**Roche F. J.** 1996. Control and regulation of folliculogenesis - a symposium in perspective. *Rev reprod*, 1: 19-27.

**Rodgers, R. J., van Wezel, I. L., Irving-Rodgers, H. F., Lavranos, T. C., Irvine, C. M., & Krupa, M.** 1999. Roles of extracellular matrix in follicular development. *J Reprod Fertil Suppl*, 54: 343-352.

**Roselli C. E & Resko J. A.** 1993. Aromatase activity in the rat brain: Ormonal regulation and sex differences. *J Steroid Biochem and Mol Biol* , 44: 499-508.

**Rosenfeld, S. C., Wagner, S. J., Roberts, M. R & Lubahn, B. D.** (2001). Intraovarian actions of oestrogen. *Reprod*, 122: 215-226.

**Ross, J.** 1995. mRNA stability in mammalian cells. *Microbiol Rev*, 59(3): 423-450.

**Rouillier, P., Matton, P., Dufour, M., Sirard, M. A., & Guilbault, L. A.** 1998. Steroid production, cell proliferation, and apoptosis in cultured bovine antral and mural

granulosa cells: development of an in vitro model to study estradiol production. *Mol Reprod Dev*, 50(2): 170-177.

**Rouillier, P., Matton, P., Sirard, M. A., & Guilbault, L. A.** 1996. Follicle-stimulating hormone-induced estradiol and progesterone production by bovine antral and mural granulosa cells cultured in vitro in a completely defined medium. *J Anim Sci*, 74(12): 3012-3019.

**Russe, I.** 1983. Oogenesis in cattle and sheep. *Bibl Anat*, 24: 77-92.

**Sasano, H., & Harada, N.** 1998. Intratumoral aromatase in human breast, endometrial, and ovarian malignancies. *Endocr Rev*, 19(5): 593-607.

**Sasano, H., Okamoto, M., Mason, J. I., Simpson, E. R., Mendelson, C. R., Sasano, N., & Silverberg, S. G.** 1989. Immunolocalization of aromatase, 17 alpha-hydroxylase and side-chain-cleavage cytochromes P-450 in the human ovary. *J Reprod Fertil*, 85(1): 163-169.

**Saumande, J.** 1991. Culture of bovine granulosa cells in a chemically defined serum-free medium: the effect of insulin and fibronectin on the response to FSH. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 38(2): 189-196.

**Savio, J. D., Keenan, L., Boland, M. P., & Roche, J. F.** 1988. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. *J Reprod Fertil*, 83(2): 663-671.

**Schiavone N., Rosini p., Quattrone A., Donnini M., Lapucci A., Citti L., Bevilacqua A., Nicolin A. & Capaccioli S.** 2000. A conserved AU-rich element in the 3' untranslated region of bcl-2 mRNA is endowed with a destabilizing function that is involved in bcl-2 down-regulation during apoptosis. *FASEB J*, 14: 174-184.

**Schomberg, D. W., Couse, J. F., Mukherjee, A., Lubahn, D. B., Sar, M., Mayo, K. E., & Korach, K. S.** 1999. Targeted disruption of the estrogen receptor-alpha gene in female mice: characterization of ovarian responses and phenotype in the adult. *Endocrinology*, 140(6): 2733-2744.

**Sekar, N., Lavoie, H. A., & Veldhuis, J. D.** 2000. Concerted regulation of steroidogenic acute regulatory gene expression by luteinizing hormone and insulin (or insulin-like growth factor I) in primary cultures of porcine granulosa-luteal cells. *Endocrinology*, 141(11): 3983-3992.

**Shen P, Campagnoni CW, Kampf K, Schlinger BA, Arnold AP & Campagnoni AT,** 1994. Isolation and characterization of a zebra finch aromatase cDNA: in situ hybridization reveals high aromatase expression in brain. *Brain Res Mol Brain Res*, 24 227-237.

**Silva, J. M., & Price, C. A.** 2002. Insulin and IGF-I are necessary for FSH-induced cytochrome P450 aromatase but not cytochrome P450 side-chain cleavage gene expression in oestrogenic bovine granulosa cells in vitro. *J Endocrinol*, 174(3): 499-507.

**Simpson, E. R.** 2000. Role of aromatase in sex steroid action. *J Mol Endocrinol*, 25(2): 149-156.

**Simpson, E. R., & Davis, S. R.** 2001. Minireview: aromatase and the regulation of estrogen biosynthesis--some new perspectives. *Endocrinology*, 142(11): 4589-4594.

**Simpson ER, Zhao Y, Agarwal VR, Michael MD, Bulun SE, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S, Sun T, Fisher CR, Qin K & Mendelson CR,** 1997. Aromatase expression in health and disease. *Recent Prog Horm Res* 52 185-213; discussion 213-184.

Simpson, E. R., Mahendroo, M. S., Means, G. D., Kilgore, M. W., Hinshelwood, M. M., Graham-Lorence, S., Amarneh, B., Ito, Y., Fisher, C. R., Michael, M. D., & et al. 1994. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr Rev*, 15(3): 342-355.

Sirois, J., & Fortune, J. E. 1988. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol Reprod*, 39(2): 308-317.

Smith, M. F., McIntush, E. W., & Smith, G. W. 1994. Mechanisms associated with corpus luteum development. *J Anim Sci*, 72(7): 1857-1872.

Soumano, K., & Price, C. A. 1997. Ovarian follicular steroidogenic acute regulatory protein, low-density lipoprotein receptor, and cytochrome P450 side-chain cleavage messenger ribonucleic acids in cattle undergoing superovulation. *Biol Reprod*, 56(2): 516-522.

Soumano, K., Silversides, D. W., Doize, F., & Price, C. A. 1996. Follicular 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and cytochromes P450 17 alpha-hydroxylase and aromatase messenger ribonucleic acids in cattle undergoing superovulation. *Biol Reprod*, 55(6): 1419-1426.

Spears, N., Murray, A. A., Allison, V., Boland, N. I., & Gosden, R. G. 1998. Role of gonadotrophins and ovarian steroids in the development of mouse follicles in vitro. *J Reprod Fertil*, 113(1): 19-26.

Spicer, L. J., & Chamberlain, C. S. 2002. Estradiol and luteinizing hormone regulation of insulin-like growth factor binding protein production by bovine granulosa and thecal cells. *Endocrine*, 17(3): 161-168.

**Spicer, L. J., Chamberlain, C. S., & Maciel, S. M.** 2002. Influence of gonadotropins on insulin- and insulin-like growth factor-I (IGF-I)-induced steroid production by bovine granulosa cells. *Domest Anim Endocrinol*, 22(4): 237-254.

**Spicer, L. J., Chamberlain, C. S., & Morgan, G. L.** 2001. Proteolysis of insulin-like growth factor binding proteins during preovulatory follicular development in cattle. *Domest Anim Endocrinol*, 21(1): 1-15.

**Spicer, L. J., & Echternkamp, S. E.** 1995. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. *Domest Anim Endocrinol*, 12(3): 223-245.

**Spicer, L. J., & Stewart, R. E.** 1996. Interactions among basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor, insulin, and insulin-like growth factor-I (IGF-I) on cell numbers and steroidogenesis of bovine thecal cells: role of IGF-I receptors. *Biol Reprod*, 54(1): 255-263.

**Spicer, L. J., Stewart, R. E., Alvarez, P., Francisco, C. C., & Keefer, B. E.** 1997. Insulin-like growth factor-binding protein-2 and -3: their biological effects in bovine thecal cells. *Biol Reprod*, 56(6): 1458-1465.

**Steinkampf, M. P., Mendelson, C. R., & Simpson, E. R.** 1987. Regulation by follicle-stimulating hormone of the synthesis of aromatase cytochrome P-450 in human granulosa cells. *Mol Endocrinol*, 1(7): 465-471.

**Stewart, R. E., Spicer, L. J., Hamilton, T. D., Keefer, B. E., Dawson, L. J., Morgan, G. L., & Echternkamp, S. E.** 1996. Levels of insulin-like growth factor (IGF) binding proteins, luteinizing hormone and IGF-I receptors, and steroids in dominant follicles during the first follicular wave in cattle exhibiting regular estrous cycles. *Endocrinology*, 137(7): 2842-2850.

**Stocco, D. M.** 2000. The role of the StAR protein in steroidogenesis: challenges for the future. *J Endocrinol*, 164(3): 247-253.

**Stocco, D. M.** 2001. StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. *Annu Rev Physiol*, 63: 193-213.

**Stocco, D. M., & Clark, B. J.** 1996. Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. *Endocr Rev*, 17(3): 221-244.

**Stock, A. E., & Fortune, J. E.** 1993. Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. *Endocrinology*, 132(3): 1108-1114.

**Sunderland, S. J., Crowe, M. A., Boland, M. P., Roche, J. F., & Ireland, J. J.** 1994. Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of heifers. *J Reprod Fertil*, 101(3): 547-555.

**Suzuki, T., Sasano, H., Takaya, R., Fukaya, T., Yajima, A., & Nagura, H.** 1998. Cyclic changes of vasculature and vascular phenotypes in normal human ovaries. *Hum Reprod*, 13(4): 953-959.

**Swinney, D. C., Watson, D. M., & So, O. Y.** 1993. Accumulation of intermediates and isotopically sensitive enolization distinguish between aromatase (cytochrome P450 CYP19) from rat ovary and human placenta. *Arch Biochem Biophys*, 305(1): 61-67.

**Szollosi D.** (1991) Maturation de l'ovocyte. *Paris: Ministère de la recherche et de la technologie (DISTr)*

**Taylor CC. and Rajamahendran R.** (1991) Follicular dynamics, corpus luteum growth and regression in lactating dairy cattle. *Can. J. Anim. Sci*, 71: 61-68.

Tetsuka, M., Whitelaw, P. F., Bremner, W. J., Millar, M. R., Smyth, C. D., & Hillier, S. G. 1995. Developmental regulation of androgen receptor in rat ovary. *J Endocrinol*, 145(3): 535-543.

Thomas, F. H., Leask, R., Srsen, V., Riley, S. C., Spears, N., & Telfer, E. E. 2001. Effect of ascorbic acid on health and morphology of bovine preantral follicles during long-term culture. *Reproduction*, 122(3): 487-495.

Torney, A. H., Hodgson, Y. M., Forage, R., & de Kretser, D. M. 1989. Cellular localization of inhibin mRNA in the bovine ovary by in-situ hybridization. *J Reprod Fertil*, 86(1): 391-399.

Townson, D. H., Tsang, P. C., Butler, W. R., Frajblat, M., Griel, L. C., Jr., Johnson, C. J., Milvae, R. A., Niksic, G. M., & Pate, J. L. 2002. Relationship of fertility to ovarian follicular waves before breeding in dairy cows. *J Anim Sci*, 80(4): 1053-1058.

Tsafiriri, A., Dekel, N., & Bar-Ami, S. 1982. The role of oocyte maturation inhibitor in follicular regulation of oocyte maturation. *J Reprod Fertil*, 64(2): 541-551.

Turner, K. J., Macpherson, S., Millar, M. R., McNeilly, A. S., Williams, K., Cranfield, M., Groome, N. P., Sharpe, R. M., Fraser, H. M., & Saunders, P. T. 2002. Development and validation of a new monoclonal antibody to mammalian aromatase. *J Endocrinol*, 172(1): 21-30.

Ui, M., Shimonaka, M., Shimasaki, S., & Ling, N. 1989. An insulin-like growth factor-binding protein in ovarian follicular fluid blocks follicle-stimulating hormone-stimulated steroid production by ovarian granulosa cells. *Endocrinology*, 125(2): 912-916.

Urban, R. J., Garmey, J. C., Shupnik, M. A., & Veldhuis, J. D. 1990. Insulin-like growth factor type I increases concentrations of messenger ribonucleic acid encoding



cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage enzyme in primary cultures of porcine granulosa cells. *Endocrinology*, 127(5): 2481-2488.

**Van Den Hurk R., Bevers MM. And Beckers JF.** (1997) In vivo and in vitro development of preantral follicles. *Theriogenology*, 47: 73-82.

**van Hoof, A., Frischmeyer, P. A., Dietz, H. C., & Parker, R.** 2002. Exosome-mediated recognition and degradation of mRNAs lacking a termination codon. *Science*, 295(5563): 2262-2264.

**Van Voorhis BJ.** (1999a) Follicular development. *Encyclopedia of Reproduction*, 2. *Knobil E. and Neill JD. California. Academic Press.* 376-389.

**van Wezel, I. L., & Rodgers, R. J.** 1996. Morphological characterization of bovine primordial follicles and their environment in vivo. *Biol Reprod*, 55(5): 1003-1011.

**Vanselow, J., & Furbass, R.** 1995. Novel aromatase transcripts from bovine placenta contain repeated sequence motifs. *Gene*, 154(2): 281-286.

**Vanselow, J., Furbass, R., Zsolnai, A., Kalbe, C., Said, H. M., & Schwerin, M.** 2001. Expression of the aromatase cytochrome P450 encoding gene in cattle and sheep. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 79(1-5): 279-288.

**Vanselow, J., Zsolnai, A., Fesus, L., Furbass, R., & Schwerin, M.** 1999. Placenta-specific transcripts of the aromatase encoding gene include different untranslated first exons in sheep and cattle. *Eur J Biochem*, 265(1): 318-324.

**Vernon, R. K., & Spicer, L. J.** 1994. Effects of basic fibroblast growth factor and heparin on follicle-stimulating hormone-induced steroidogenesis by bovine granulosa cells. *J Anim Sci*, 72(10): 2696-2702.

**Voss, A. K., & Fortune, J. E.** 1993. Levels of messenger ribonucleic acid for cholesterol side-chain cleavage cytochrome P-450 and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in bovine preovulatory follicles decrease after the luteinizing hormone surge. *Endocrinology*, 132: 888-894.

**Walters, K. W., Corbin, C. J., Anderson, G. B., Roser, J. F., & Conley, A. J.** 2000. Tissue-specific localization of cytochrome P450 aromatase in the equine embryo by in situ hybridization and immunocytochemistry. *Biol Reprod*, 62(5): 1141-1145.

**Wang J, Chen S.** 1994. Induction of aromatase gene expression in human placental choriocarcinoma (JAR) cells by phorbol esters. *Biochim Biophys Acta* 1218: 48-54.

**Webb, R., Campbell, B. K., Garverick, H. A., Gong, J. G., Gutierrez, C. G., & Armstrong, D. G.** 1999. Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection. *J Reprod Fertil Suppl*, 54: 33-48.

**Webb, R., & England, B. G.** 1982. Identification of the ovulatory follicle in the ewe: associated changes in follicular size, thecal and granulosa cell luteinizing hormone receptors, antral fluid steroids, and circulating hormones during the preovulatory period. *Endocrinology*, 110(3): 873-881.

**Webb, R., Gong, J. G., Law, A. S., & Rusbridge, S. M.** 1992. Control of ovarian function in cattle. *J Reprod Fertil Suppl*, 45: 141-156.

**Webb, R., Nicholas, B., Gong, J. G., Campbell, B. K., Gutierrez, C. G., Garverick, H. A., & Armstrong, D. G.** 2003. Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. *Reprod Suppl*, 61: 71-90.

**Willis, D. S., Watson, H., Mason, H. D., Galea, R., Brincat, M., & Franks, S.** 1998. Premature response to luteinizing hormone of granulosa cells from anovulatory women

with polycystic ovary syndrome: relevance to mechanism of anovulation. *J Clin Endocrinol Metab*, 83(11): 3984-3991.

**Wilusz, C. J., Gao, M., Jones, C. L., Wilusz, J., & Peltz, S. W. 2001.** Poly(A)-binding proteins regulate both mRNA deadenylation and decapping in yeast cytoplasmic extracts. *Rna*, 7(10): 1416-1424.

**Xu, N., Chen, C. Y., & Shyu, A. B. 1997.** Modulation of the fate of cytoplasmic mRNA by AU-rich elements: key sequence features controlling mRNA deadenylation and decay. *Mol Cell Biol*, 17(8): 4611-4621.

**Xu, Z., Garverick, H. A., Smith, G. W., Smith, M. F., Hamilton, S. A., & Youngquist, R. S. 1995.** Expression of messenger ribonucleic acid encoding cytochrome P450 side-chain cleavage, cytochrome p450 17 alpha-hydroxylase, and cytochrome P450 aromatase in bovine follicles during the first follicular wave. *Endocrinology*, 136(3): 981-989.

**Xu N., Chen C.Y. & Shyu A. b. 2001.** Versatile role for hnRNP D isoforms in the differential regulation of cytoplasmic mRNA turnover. *Mol Cell Biol*, 21: 6960-6971.

**Yamada-Mouri N, Hirata S & Kato J, 1996.** Existence and expression of the untranslated first exon of aromatase mRNA in the rat brain. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 58: 163-166.

**Ying SY. And Zhang Z. (1999)** Ovarian Hormones. *Overview, Encyclopedia of Reproduction*, 3. *Knobil E. and Neill JD. California. Academic Press. 578-582.*

**Zamboni, L. 1974.** Fine morphology of the follicle wall and follicle cell-oocyte association. *Biol Reprod*, 10(2): 125-149.

**Zeitoun, K. M., & Bulun, S. E.** 1999. Aromatase: a key molecule in the pathophysiology of endometriosis and a therapeutic target. *Fertil Steril*, 72(6): 961-969.

**Zeleznik, A. J.** 2001. Modifications in gonadotropin signaling: a key to understanding cyclic ovarian function. *J Soc Gynecol Investig*, 8(1 Suppl Proceedings): S24-25.

**Zhao, Y., Nichols, J. E., Bulun, S. E., Mendelson, C. R., & Simpson, E. R.** 1995. Aromatase P450 gene expression in human adipose tissue. Role of a Jak/STAT pathway in regulation of the adipose-specific promoter. *J Biol Chem*, 270(27): 16449-16457.

**Zubiaga, A. M., Belasco, J. G., & Greenberg, M. E.** 1995. The nonamer UUAUUUAUU is the key AU-rich sequence motif that mediates mRNA degradation. *Mol Cell Biol*, 15(4): 2219-2230.