Université de Montréal

Rôle d'Ankyrin-repeat and SOCS-Box protein 9 (ASB9) dans l'inhibition de PAR1 et la voie de signalisation MAPK dans l'ovaire bovin

PAR

DANIELA CAROLINA NARANJO GONZALEZ

Département de biomédecine vétérinaire

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire

en vue de l'obtention du grade de *Maîtrise ès sciences* (M.

Sc.) en sciences vétérinaires, option reproduction

Avril 2024

© Daniela Naranjo Gonzalez, 2024

Université de Montréal

Département de biomédecine vétérinaire, Faculté de médecine vétérinaire

---

Ce mémoire

Rôle d'Ankyrin-repeat and SOCS-Box protein 9 (ASB9) dans l'inhibition de PAR1 et la voie de signalisation MAPK dans l'ovaire bovin

Présenté par

Daniela Naranjo Gonzalez

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Imourana Alassane-Kpembi

Président-rapporteur

Kalidou Ndiaye

Directeur de recherche

Guillaume St-Jean

Membre du jury

Résumé

Les protéines *Ankyrin-repeat and SOCS-box* (ASB), incluant ASB9, sont membres des ubiquitine ligases E3 et régulent la prolifération cellulaire, la différenciation, la carcinogenèse et le cycle cellulaire dans divers types de cellules, y compris les cellules de granulosa (GC). Nous avons précédemment identifié ASB9 comme un gène induit par l' hormone lutéinisante et la gonadotrophine chorionique humaine (LH/hCG) dans les GC des follicules ovulatoires bovins. Nos résultats antérieurs ont également permis d'identifier des protéines partenaires cibles d'ASB9 dans les GC dont *protease-activated receptor 1* (PAR1). Cependant, les rôles exacts d'ASB9 dans l'activité des GC et son impact sur diverses voies de signalisation doivent être pleinement étudiés. Dans ce projet, nous avions pour objectif d'étudier les mécanismes d'action d'ASB9 dans les GC et de déterminer si l'induction d'ASB9 par la LH/hCG est nécessaire pour la régulation de gènes cibles tels que PAR1 et des voies de signalisation impliquées dans la fonction et l'activité des GC. Des GC en culture ont été traitées avec différentes doses de FSH, LH et thrombine. Les analyses RT-qPCR ont montré que la thrombine augmentait l'expression de *PAR1* dans les GC ($P<0.05$) alors que la FSH n'avait aucun effet sur *PAR1*. Le traitement avec la LH a réduit de manière significative *PAR1* ($P<0.05$), même en présence de thrombine, démontrant une régulation négative de *PAR1* par la LH, possiblement via une induction concomitante d'ASB9 par la LH. Les résultats de Western blot montrent que l'expression d'ASB9 dans les GC *in vitro* est augmentée 12 heures après le traitement avec LH ($P<0.05$). De plus, le profil de phosphorylation de MAPK3/1 (ERK1/2) dans les GC traitées avec la thrombine suggère un contrôle médié par PAR1, tandis que la présence d'ASB9 dans les GC semble avoir un effet négatif sur la voie MAPK. Enfin, la thrombine pourrait bloquer très tôt (dans 1 heure de traitement) l'effet négatif d'ASB9 sur *PAR1* alors que cette protéase ne semble pas affecter l'effet d'ASB9 à 6 et 12 heures de traitement. Les tests de prolifération ont montré qu'ASB9 régulait négativement le nombre des GC ainsi que le marqueur de prolifération *CCND2*, tandis que le marqueur d'apoptose *BAX2* était augmenté avec le traitement avec la LH. Ensemble, ces données démontrent le mode d'action et les effets fonctionnels d'ASB9 sur la régulation de PAR1 avec des conséquences sur la prolifération, la différenciation et l'activité stéroïdogène des GC, suggérant un rôle crucial d'ASB9 dans le processus ovulatoire chez l'espèce bovine.

Mots clés : Fertilité, Ovaire, Bovine, Cellules de la granulosa, Cycle cellulaire, Prolifération, MAPK, Apoptose, ASB9, PAR1.

Abstract

The Ankyrin-repeat and SOCS-box protein (ASB) family, including ASB9, is part of the E3 ubiquitin ligases and regulates cell proliferation, differentiation, carcinogenesis, and cell cycle in various cell types including granulosa cells (GC). We previously identified ASB9 as an LH/hCG-induced gene in GC of bovine ovulatory follicles. We also reported ASB9 target binding partners in GC such as protease-activated receptor 1 (PAR1). However, the exact roles of ASB9 in GC activity and its impact in various signaling pathways need to be fully investigated. In this project, we aimed to study the mechanisms of action of ASB9 in GC and determine whether ASB9 induction by LH/hCG is necessary for the regulation of target genes such as PAR1, and signaling pathways involved in GC function and activity. Cultured GC were treated with different doses of FSH, LH and Thrombin. RT-qPCR analyzes showed that thrombin increased *PAR1* expression in GC ($P<0.05$) while FSH had no effect on PAR1. Treatment with LH reduced significantly *PAR1* ($P<0.05$), even in the presence of thrombin, demonstrating downregulation of PAR1 by LH, possibly via a concomitant induction of ASB9 by LH. Western blot results show that ASB9 expression in GC *in vitro* is increased 12 hours after treatment with LH ($P<0.05$). Furthermore, the phosphorylation profile of MAPK3/1 (ERK1/2) in thrombin-treated GC suggests a PAR1-mediated control while the presence of ASB9 in GC appears to have a negative effect on the MAPK pathway. Finally, thrombin could block the negative effect of ASB9 on PAR1 very early (within 1-hour treatment) while this protease does not seem to affect ASB9 effect at 6 and 12 hours of treatment. Proliferation assays showed that ASB9 negatively regulates GC number as well as proliferation marker *CCND2* while apoptosis marker *BAX2* was increased with LH treatment. Together, these data provide insights into the mode of action and functional effects of ASB9 on PAR1 regulation with consequences on GC proliferation, differentiation, and steroidogenic activity, suggesting a potent role of ASB09 in the ovulatory process in bovine species.

Key words: Fertility, Ovary, Bovine, Granulosa cells, Cell cycle, Proliferation, MAPK, Apoptosis, ASB9, PAR1.

Table des matières

Résumé 3

Abstract 4

Table des matières 5

Liste des figures 7

Liste des tableaux 8

Liste des sigles et abréviations 9

Remerciements 13

CHAPITRE 1 14

INTRODUCTION 14

1.1. Introduction 15

CHAPITRE 2 18

REVUE DE LA LITTÉRATURE 18

2.1. Ovaire et le développement folliculaire 19

2.2. Cycle œstral bovin 20

2.3. Hormones reproductives chez la vache 21

2.3.1. Hormone de libération des gonadotrophines (GnRH) 22

2.3.2. Hormones gonadotrophines 23

2.3.3. Hormone folliculo-stimulante (FSH) 24

2.3.4. Œstrogènes (œstradiol) 24

2.3.5. Hormone lutéinisante (LH) 24

2.3.6. Progestérone 25

2.4. Développement folliculaire bovin 26

2.5. Activation de la voie de signalisation MAPK (ERK1/2) 28

2.6. Ovulation et lutéinisation 29

2.7. Atrésie folliculaire 31

2.7.1. Apoptose des cellules de la granulosa 31

2.8. Protéases 33

2.9. Stéroïdogenèse 34

2.9.1. Voie tissulaire spécifique de la stéroïdogenèse - Stéroïdogenèse ovarienne 35

2.10. Famille de gènes ASB 38

2.10.1. Ankyrin-repeat and SOCS-box protein 9 (ASB9) 40
2.10.2. Processus d'ubiquitination 42
2.11. Récepteurs activés par les protéases 43
2.11.1. Protease-activated receptor-1 (PAR1) 44
2.11.2. Régulation de la signalisation de PAR1 par des modifications post-traductionnelles 47
2.11.3. Phosphorylation de PAR1 47
2.11.4. Ubiquitination de PAR1 49
2.11.5. Glycosylation de PAR1 50
CHAPITRE 3 52
Justification, hypothèses et objectifs 52
3.1. Justification, hypothèses et objectifs 53
3.1.1. Justification 53
3.1.2. Hypothèse 54
3.1.3. Objectifs 55
CHAPITRE 4 56
ARTICLE 56
CHAPITRE 5 91
DISCUSSION GÉNÉRALE, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 91
5.1. Discussion Générale 92
5.1.1. Synthèse et pertinence des résultats 94
5.2. Conclusions 96
5.3. Contribution à la recherche et perspectives 97
Références 99

Liste des figures

Figure 1. Développement folliculaire et ovulation 20
Figure 2. Contrôle hormonal de l'activité ovarienne et de l'axe hypothalamo-hypophysaire chez la vache 26
Figure 3. Dynamique folliculaire ovarienne pendant le cycle œstral bovin 27
Figure 4. Un bref schéma indiquant l'artresie folliculaire 32
Figure 5. Voies de biosynthèse des hormones stéroïdes dans l'ovaire 37
Figure 6. Signification physiologique et pathologique des protéines ASB 39
Figure 7. Structure d'ASB9 41
Figure 8. Processus de l'ubiquitination 43
Figure 9. Structure de PAR, Mechanisme d'activation et signalisation couplée aux protéines G induite par l'activation de PAR 45
Figure 10. Protéases qui clivent les PARs et leurs respectifs sites de clivage 46

Liste des tableaux

Table 1. Primers used for qPCR analysis of *Bos taurus* gene expression.....63

Liste des sigles et abréviations

17βHSD1: 17β-Hydroxysteroid dehydrogenase

aa: amino acids (acides aminés)

ACTH: Adrenocorticotropic Hormone

ADN: Deoxyribonucleic acid

AKT: Protein Kinase B

ANK: Ankyrin repeat

APAF1: Apoptotic protease activating factor1

APC: Actived protein C

AREG: Amphiregulin

ASB9: Ankyrin repeat Socs-box protein 9

BCL2: B-cell lymphoma 2

BMP: Bone morphogenetic proteins

BTC: Betacellulin

CAD: Caspase-Activated DNase

CAN: Copy Number Alteration

CCND: Cyclin-D

CCNE: Cyclin-E

CDKs: Cyclin-dependent kinases

CDK4/6: Cyclin-dependent kinase 4

CDK2: Cyclin-dependent kinase 2

CK: Creatin kinase

CL: Corpus luteum

CREB: cAMP response element-binding protein

CRL: Cullin-RING E3 ubiquitin

CYP19A1: Cytochrome P450, Family 19, Subfamily A, Polypeptide 1

CYP11A1: Cytochrome P450 Cholesterol Side-Chain Cleavage, Family 11, Subfamily A, Polypeptide 1

CYP17A1: cytochrome P450 17α-hydroxylase, Subfamily A, Polypeptide 1

CytoC: Cytochrome-C

DF: Dominant Follicle

DNA-PK: DNA-Dependent Protein Kinase

ECS: Elongin-Cullin-SOCS

EGF: Epidermal Growth Factor

ER: Endoplasmic Reticulum

ERK: Extracellular-Signal-Regulated Kinase

EREG: Early Growth Response 1

FasL: Fas ligand

FGF: Fibroblast growth factors

FSH: Follicle-Stimulating Hormone

FSHR: Follicle-Stimulating Hormone Receptor

FXa: Facteur Xa

GC: Granulosa cell

GDID4: Rho GDP dissociation inhibitor beta

GnRH: Gonadotropin-releasing hormone

GPCR: G protein-coupled receptors

GRB: Growth Factor Receptor-Bound Protein

hCG: Human Chorionic Gonadotropin

HIF1A: Hypoxia inducible factor 1 subunit alpha

HSD3B2; 3β-HSD: 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta (5)-delta (4)isomerase type II

IAP: Inhibitor of Apoptosis

ICAD: Inhibitor of CAD

IGF: Insulin-like Growth Factor

IMM: Interne mitochondria membrane

LH: Luteinizing Hormone

LHCGR: Luteinizing Hormone Receptor

MAPK: Mitogen-activated protein kinase 12

MAPK3/1: Mitogen-activated protein kinase 3

mRNA: Messenger RNA

OF: Ovulatory follicle

p38 /SAPK: mitogen-activated protein kinases

p450: Cytochromes P450

PAK1: p21-Activated Kinase- 1

PAR1: Protease Activate Receptor 1

PARP: Poly ADP-ribose Polymerase

pb: pair bases

PGF2α: Prostaglandin F2α

PI3K/AKT: Phosphatidylinositol 3-Kinase

PKA: Protein Kinase A

PKB: Protein Kinase B

PPI: Protein-Protein interactions

Rb: Retino Blastoma Tumor Suppressor Protein

RTK: Receptor tyrosine kinases

SMAC: Second Mitochondria-Derived Activator of Caspase

SOCS: Suppressor of cytokine signaling

StAR: Steroidogenic Acute Regulatory protein

TAOK: Thousand-and-one amino acid kinases

Tbid: Truncated BID

TNFα: Tumor necrosis factor alpha

TNFAIP6: Tumor Necrosis Factor-Inducible Gene 6 Protein

TSH: Thyroid-stimulating hormone

Remerciements

Cette réussite académique n'aurait pas été possible sans la confiance et les conseils de mon superviseur, le soutien inconditionnel de ma famille, l'amour de copain et la compagnie de mes amis universitaires.

Tout d'abord, je remercie mon encadrant, Kalidou Ndiaye, de m'avoir donné l'opportunité de me spécialiser dans son laboratoire et d'avoir eu confiance en mon potentiel. Je vous dédie cette recherche et vous remercie pour vos efforts, votre dévouement, votre persévérance, votre patience et votre motivation. Merci d'avoir ouvert les portes de l'ambition professionnelle et de la connaissance de la science de la reproduction, et aussi pour ces conseils pour devenir un meilleur être humain avec tolérance.

J'aimerais remercier les membres de mon comité conseil, les Dr. Imourana Alassane-Kpembi et Dre. Marjolaine Rousseau, pour leur soutien, leurs conseils et leur connaissance. Je tiens à remercier le Dr. Jacques Lussier pour son temps et ses suggestions utiles pour mon projet.

Ma plus chaleureuse et exceptionnelle gratitude va à mes parents Martha et Eduardo, pour l'amour inconditionnel qu'ils m'ont donné pendant cette étape, pour m'avoir appris à atteindre mes objectifs sans abandonner, surtout pour leur effort émotionnel pour accepter que je vole à la recherche de mon avenir. À ma sœur Alejandra et à mon frère Christian, pour m'avoir donné la force et la foi pour croire en ce qui semblait impossible à réaliser, et pour me laisser savoir que vous êtes toujours fiers de moi. À ma nièce Paula et mon neveu Edu et tout le reste de ma famille qui, malgré la distance de milliers de kilomètres, ont toujours été mon soutien émotionnel. Je vous porte tous dans mon cœur, je vous aime !

Je tiens à remercier mon copain Francis, qui a été le gardien de mes émotions, de mes efforts, de ma persévérance, parce qu'il n'a jamais cessé de me dire que je suis une femme intelligente, indépendante, belle et capable de réaliser de grandes choses. Merci de me tenir la main et de me laisser être.

Un immense câlin de gratitude à mes amis universitaires, qui m'ont tous transmis leurs connaissances et conseils techniques, et qui ont également fait de ce temps académique un vent de plaisir et de compagnie.

Finalement, je remercie à mon Dieu, parce que sur le chemin de cette réalisation il m'a montré que ses temps sont parfaits, il suffit d'être patiente et de vivre chaque jour avec bonheur.

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1. Introduction

L'industrie laitière se classe au deuxième rang du secteur agricole canadien, en termes de revenus agricoles, juste derrière les viandes rouges. Le lait et les produits laitiers canadiens sont réputés pour leur variété, leur qualité exceptionnelle et leur excellence en plus d'être reconnus partout dans le monde. Cette réputation internationale est associée à un engagement inébranlable envers la santé, les soins et le bien-être des animaux (1). Ces performances sont possibles grâce à des résultats ciblés et des priorités de recherche en créant des stratégies et des outils pour améliorer parmi plusieurs facteurs, la génétique, les mécanismes moléculaires et les performances de reproduction (2). L'objectif qui correspond le plus avec notre projet est celui de mieux comprendre les mécanismes moléculaires pour améliorer et maintenir la fertilité bovine.

L'espèce bovine naît avec un nombre très variable de follicules et d'ovocytes morphologiquement sains, la réserve ovarienne, qui est déterminée pendant la gestation, diminue avec l'âge et n'est pas reconstituée après la naissance (3). La production de gamètes femelles, ou ovocytes, et la production des hormones stéroïdes, progestérone et œstrogènes, sont les principales fonctions de l'ovaire. Le cycle de développement des ovocytes chez l'espèce bovine est appelé cycle œstral. Au cours du cycle œstral, deux structures importantes sont présentes dans l'ovaire : le follicule et le corps jaune. Chacune de ces structures subit une phase de développement puis de régression au cours du cycle œstral. Le follicule primordial est la première étape de la folliculogenèse et est le premier follicule à se développer dans l'ovaire au stade fœtal de la vie. Sous l'influence de différentes hormones, le follicule primaire se développe à partir du follicule primordial. Le follicule primaire est un follicule actif avec le potentiel de devenir un ovocyte si le follicule termine sa phase de développement. Au cours du cycle œstral des vaches, deux à trois vagues de croissance folliculaire se produisent. Parmi une cohorte de follicules recrutés, l'un est sélectionné pour continuer sa croissance tandis que les autres subissent une atrésie et régressent (4, 5).

Les follicules primaires achèvent leur développement à travers une série d'étapes. De nombreuses couches de cellules (cellules de la granulosa) entourent l'ovocyte et le follicule devient un follicule antral ou follicule tertiaire. Une fois que les follicules ont atteint le stade antral sous l'effet de la FSH, les cellules de granulosa à l'intérieur des follicules commencent à produire des

œstrogènes. Les œstrogènes contribuent alors à la maturation continue des follicules antraux en favorisant la prolifération des cellules de granulosa et en stimulant la production de liquide folliculaire dans l'antrum. Après la phase de recrutement folliculaire, un seul follicule se développe, devient mature et est appelé follicule dominant (6-8). L 'ovulation est le processus par lequel un follicule ovarien libère un ovocyte. Les nombreuses activités entourant l'ovulation sont une interaction impressionnante de changements hormonaux, de changements dans les réseaux d'approvisionnement en sang et de mouvements contrôlés de l'ovocyte libéré dans l'oviducte (9). La cascade typique d'événements menant à l'ovulation commence avec au moins un gros follicule sur l'un des deux ovaires répondant à une poussée d'hormone lutéinisante (10) provenant de l'hypophyse. Suite à l'ovulation, les cellules restantes du follicule s'effondrent en plusieurs replis et se transforment en un corps jaune (11), qui va bientôt commencer à sécréter de la progestérone. Pendant ce temps, l'ovocyte se dirige vers l'oviducte où, s'il est fécondé par des spermatozoïdes viables, il deviendra un embryon puis migrera vers l'utérus pour poursuivre son développement jusqu'à la fin de la gestation (6, 8, 9). Cependant, le processus de développement folliculaire et d'ovulation implique un système complexe de voies et de mécanismes de signalisation qui n'est pas entièrement compris.

Au sein du follicule, les cellules de la granulosa (GC) jouent un rôle clé dans le système reproducteur féminin et sont un élément crucial dans les fonctions vitales du follicule. Elles contribuent à la synthèse des hormones stéroïdes, à la maturation de l'ovocyte et à la formation du corps jaune après l'ovulation (12, 13). Par conséquent, les GC constituent un modèle d'étude pertinent de l'expression et la régulation des gènes au cours de la folliculogenèse et de l'ovulation pour mieux comprendre les mécanismes impliqués dans ces processus fondamentaux.

Des études antérieures de notre laboratoire ont identifié l'*Ankyrin-repeat and SOCS-box protein 9* (ASB9) comme un gène différentiellement exprimé induit par la LH/hCG dans les cellules de granulosa des follicules ovulatoires bovins (13, 14). Les protéines ASB interagissent avec une grande variété de substrats cibles via des domaines de répétition Ankyrin. Ainsi, les protéines SOCS régulent le renouvellement des protéines en les ciblant pour la polyubiquitination et la dégradation médiée par le protéasome (15). De plus, nos études antérieures sur l'inhibition de l'expression d'ASB9 à l'aide de la technologie CRISPR/Cas9 a montré que l'inhibition d'ASB9 mène à l'augmentation de la prolifération des cellules de granulosa, démontrant l'importance d'ASB9 dans

la fonction ovarienne. Par ailleurs, nous avons identifié et confirmé des partenaires de liaison d'ASB9 incluant *protease-activated receptor* 1 (PAR1) suggérant un rôle important d'ASB9 sur le contrôle de la stabilité de protéines cibles dans l'ovaire (16).

PAR1 est un récepteur couplé aux protéines G (GPCR), qui nécessite un clivage protéolytique dans le domaine extracellulaire exposant un ligand attaché pour être activé. Le clivage entraîne la stimulation des protéines Gαq/11-, Gαi/o- et Gα12-13 qui, par la suite, activeront différentes voies de signalisation (17). L'activation de PAR1 induite par la thrombine peut déclencher un processus dépendant de la tyrosine kinase (PI3-Kinase) et les protéines PTX G pour activer la voie des *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), notamment MAPK3/1 (aussi appelé ERK1/2) (18). Les récepteurs activés par la protéase (PAR) sont des récepteurs qui pourraient êtredirectement stimulés par la thrombine. Dans le système de signalisation thrombine-THBD-APC (protéine C activée) -PAR1/4 qui se trouve dans différents tissus et médie les actions pléiotropes, y compris les activités anticoagulantes, anti-inflammatoires, cytoprotectrices et anti-apoptotiques, la thrombine stimule directement les PAR ou interagit avec la thrombomoduline (THBD) pour activer la protéine C liée à la membrane qui stimule les récepteurs PAR1 et PAR4. Après stimulation par LH/hCG il y a une expression ovarienne accrue des composants clés du système de signalisation thrombine-APC-PAR1/4, donc cette voie de signalisation pourrait permettre une lutéinisation optimale des follicules préovulatoires (19). Enfin, il est connu que la phosphorylation, l'ubiquitination et l'acquisition de B-arrestine font partie des mécanismes qui mettent fin au signal PAR1 (17, 20-22) bien que ces processus ne soient pas complètement compris.

Bien que les études antérieures aient généré des résultats significatifs sur le rôle d'ASB9 dans la fonction des cellules de granulosa et la possibilité de régulation de protéines cibles telle que PAR1, le mode d'action d'ASB9 et les mécanismes de régulation de PAR1 lors du développement folliculaire et dans les cellules de granulosa restent à être clarifiés. Ce projet visait donc à investiguer les effets et mécanismes d'action d'ASB9 incluant ses effets sur les voies de signalisation activées par PAR1 dans l'ovaire de l'espèce bovine. Notre compréhension du développement folliculaire et de l'ovulation sera considérablement améliorée grâce aux données recueillies. Les mécanismes moléculaires impliqués dans le développement folliculairepermettront d'identifier les causes potentielles de la diminution de la fertilité des vaches laitières, qui implique souvent l'ovaire, en examinant ces mécanismes moléculaires.

CHAPITRE 2

REVUE DE LA LITTÉRATURE

2.1. Ovaire et le développement folliculaire

L'ovaire est un petit organe de forme ovale renfermant des cellules somatiques (cellules de la granulosa, de la thèque et du stroma) et des cellules germinales (ovocytes) qui coopèrent pour former un follicule mature dominant à partir duquel, selon le stade du cycle œstral, un ovocyte sera libéré suite à l'ovulation pour une fécondation potentielle (9). Les fonctions ovariennes (croissance folliculaire, ovulation, lutéinisation et lutéolyse) sont contrôlées par les hormones endocrines de l'hypothalamus (hormone de libération des gonadotrophines), de l'hypophyse antérieure (hormone folliculo-stimulante et l'hormone lutéinisante), des ovaires (progestérone, œstradiol et inhibines) et de l'utérus (prostaglandine $F_{2\alpha}$). Ces hormones fonctionnent à travers un système de rétroaction positive et négative pour contrôler le cycle œstral du bétail (23-25).

Un ovocyte est une cellule germinale qui se développe en plusieurs étapes à l'intérieur du follicule ovarien. Les cellules germinales immatures ou les follicules primaires qui ont été arrêtés lors de la prophase I de la méiose sont appelés follicules primordiaux (26). Grâce à un processus connu sous le nom de folliculogenèse, l'initiation de la pubescence favorise la progression des follicules primordiaux en follicules primaires. Les cellules de la granulosa forment une seule couche autour des ovocytes dans les follicules primaires. Le follicule primaire devient un follicule secondaire lorsque la couche de cellules thécales se forme à côté des cellules de la granulosa. La formation d'un antre - une cavité remplie de liquide - marque un follicule mature (de Graaf). Le follicule de Graaf ou antral commence la méiose II juste avant l'ovulation et s'arrête à la métaphase II. L'ovocyte doit être fécondé pour que ce processus soit terminé (24, 27).

L'ovocyte en développement est immédiatement encerclé par les cellules de la granulosa. Avant le pic de l'hormone lutéinisante (*Luteinizing Hormone,* LH), les cellules de la granulosa répondent à la sécrétion de l'hormone folliculostimulante (*Follicle-Stimulating Hormone*, FSH) en convertissant les androgènes en œstrogènes. Les cellules de la thèque qui sont contrôlées par la LH, entourant les cellules de la granulosa et fournissent les androgènes nécessaires aux cellules de la granulosa. Les cellules de la granulosa et de la thèque passent par une transition réceptrice connue sous le nom de "lutéinisation" après le pic de LH (24, 28). Après l'ovulation, les cellules de la granulosa et les cellules de la thèque, lutéinisées, forment le corps jaune qui est principalement chargé de produire la progestérone (24, 29, 30).

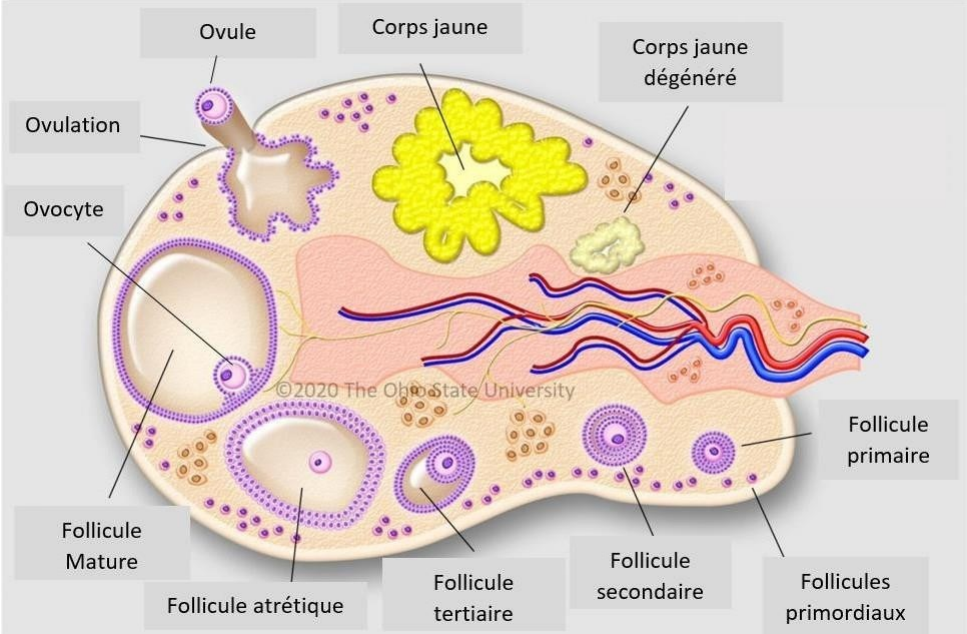


Figure 1. *Développement folliculaire et ovulation.*

Modifié de Jennings et Premanandan, 2017 (31). Au cours du développement folliculaire, les follicules primordiaux subissent plusieurs changements critiques. Ils deviennent d'abord des follicules primaires puis secondaires. Ensuite, les follicules deviennent antraux. Pendant la phase antrale, les niveaux d'hormone folliculostimulante (FSH) dans le sang affectent plusieurs follicules ; Après la phase de recrutement folliculaire, un follicule continue à se développer et devient le follicule dominant. En fonction de la période du cycle œstral, le follicule dominant continue de se développer pour devenir un follicule ovulatoire à partir duquel l'ovocyte est libéré pendant l'ovulation.

2.2. Cycle œstral bovin

Le cycle œstral chez les vaches peut être défini comme la période entre une chaleur et une autre. Sa durée moyenne est de 21 jours, cependant il peut durer entre 17 et 24 jours. Chaque cycle consiste en une phase lutéale plus longue (jours 1 à 17), au cours de laquelle la progestérone influence le cycle, et une phase folliculaire plus courte (jours 18 à 21), au cours de laquelle les œstrogènes influencent le cycle (9, 25).

La phase ou la période du cycle pendant laquelle la vache accepte l'accouplement est appelée œstrus, qui dure de 12 à 18 heures. La fonction des ovaires détermine chaque phase du cycle. Les follicules ovariens se développent avant le proestrus, ce qui provoque la libération de l'hormone féminine (œstrogène). L'ovocyte ou gamète femelle qui est libéré lors de l'ovulation reste dans l'ampoule ("ampulla") de la trompe de Fallope, jusqu'à ce qu'une fécondation se produise (32). Au site de l'ovulation dans l'ovaire, une structure appelée corps jaune se forme qui, quatre à cinq jours après les chaleurs, commence à produire une autre hormone appelée progestérone. Contrairement aux œstrogènes, la progestérone est l'hormone responsable du maintien de la gestation et maintient l'animal en diestrus. Si l'animal est en chaleur mais que l'union des gamètes (ovocyte et spermatozoïde) ne se produit pas, l'utérus envoie un signal à l'ovaire au jour 16 ou 17 du cycle œstral, qui détruit le corps jaune présent, faisant chuter les niveaux de progestérone et commençant la croissance de nouveaux follicules avec libération d'œstrogènes et manifestations de nouvelle chaleur. La prostaglandine $F_{2\alpha}$, l'hormone responsable de la destruction du corps jaune (lutéolyse), est libérée par l'utérus, sauf en cas de gestation, ce qui maintient le corps jaune gestationnel (9, 33).

2.3. Hormones reproductives chez la vache

L'hypothalamus et l'adénohypophyse régulent l'activité des gonades de la vache. L'hormone de libération des gonadotrophines (*Gonadotropin-releasing hormone,* GnRH), qui est sécrétée par l'hypothalamus à la base du cerveau,stimule la production et la libération de FSH et de LH par l'hypophyse antérieure. Ces hormones ont les effets suivants sur l'ovaire : la FSH favorise le développement des follicules dans l'ovaire et la LH agità la dernière étape du développement folliculaire (stade de follicule dominant) et déclenche l'ovulation. La majorité de la production ovarienne d'œstrogènes, en particulier d'œstradiol, se produit dans ce follicule dominant avant l'ovulation. En travaillant sur le système nerveux central, l'œstradiol est responsable de l'expression de l'activité sexuelle chez les femelles *(Figure 2)*. En conséquence, l'animal présente le comportement typique de la chaleur et signale que la vache est prête à concevoir (34, 35).

Lorsque les concentrations d'estradiol sont élevées, l'hypothalamus et l'hypophyse sont

stimulés, ce qui augmente les niveaux de GnRH. Cependant, la stimulation de la production de LH est beaucoup plus importante, car en même temps, une hormone appelée inhibine, qui est sécrétée par les cellules de la granulosa du follicule en croissance, inhibe la FSH sans modifier la LH. Le pic de LH, qui entraînera la rupture du follicule et l'ovulation subséquente, est ainsi favorisé par les œstrogènes avec l'aide de l'inhibine (35, 36). Les œstrogènes affectent également l'utérus, produisant des modifications comprennent notamment l'épaississement de la muqueuse utérine pour préparer l'implantation de l'embryon, ainsi que des modifications dans le col de l'utérus et le mucus cervical pour faciliter le passage des spermatozoïdes (37).

Après l'ovulation, les capillaires de l'ancien emplacement du follicule ont éclaté, permettant aux restes remplis de sang de former un caillot appelé corps hémorragique. Ce caillot se transforme en corps jaune sous l'action de l'hormone LH, et il est chargé de produire de la progestérone. Cette hormone inhibe la libération de GnRH,qui abaisse les taux de FSH et de LH et arrête les ovulations ultérieures. La progestérone a donc un effet rétroactif négatif sur l'hypothalamus (35, 38). De plus, la progestérone affecte la muqueuse utérine, la préparant à recevoir un embryon, à le soutenir et à le nourrir tout au long des premiers jours de gestation (34, 37).

L'utérus libère de la prostaglandine $F_{2\alpha}$ si la vache n'est pas gestante au jour 17 après les chaleurs et s'il n'y a pas de reconnaissance embryonnaire maternelle. La lutéolyse, ou régression ou destruction du corps jaune, est une conséquence de cette hormone. Les niveaux de progestérone chutent à cause du corps albicans, un corps blanc non fonctionnel. Cela met fin à la rétroaction négative de la progestérone sur l'hypothalamus, permettant à nouveau la libération de GnRH. Par conséquent, la production des hormones LH et FSH est réactivée, favorisant l'expansion folliculaire, l'ovulation et le début d'un nouveau cycle (35, 38).

2.3.1. Hormone de libération des gonadotrophines (GnRH)

La GnRH est une hormone peptidique tropique fabriquée et sécrétée par l'hypothalamus. Après avoir traversé le système sanguin porte hypophysaire sur son chemin de l'hypothalamus à l'hypophyse, la GnRH se fixe à son récepteur couplé à la protéine G à la surface des cellules

gonadotropes. À la suite de cette interaction, du calcium intracellulaire est libéré, activant des médiateurs dans la voie de signalisation des protéines kinases activées par les mitogènes (*Mitogen-activated protein kinase*, MAPK), ce qui conduit à la libération de FSH et de LH (39).

La sécrétion de FSH est causée par des impulsions de GnRH à basse fréquence, tandis que la sécrétion de LH est causée par des impulsions à haute fréquence. Les cellules de granulosa stimulent leur propre production d'œstrogènes pendant la phase folliculaire du cycle utérin en raison de la libération d'œstrogènes, ce qui augmente les niveaux d'œstrogènes dans le sang. Cette élévation est transmise à l'hypothalamus et contribue à augmenter la fréquence des impulsions de GnRH. Finalement, cela stimule la poussée de LH, ce qui provoque la rupture du follicule et la libération d'un ovocyte et lutéinise les cellules de la granulosa, permettant à la progestérone d'être synthétisée à la place de l'œstrogène. Enfin, la lente fréquence de pulsation de la libération de GnRH causée par les faibles niveaux de LH après la poussée, reprend la production de FSH (40, 41).

2.3.2. Hormones gonadotrophines

Les hormones gonadotrophines sont des hormones peptidiques qui régulent la fonction ovarienne et testiculaire et sont essentielles à la croissance, au développement sexuel et à la reproduction normaux. Elles se caractérisent par le fait d'être des glycoprotéines hétérodimériques avec des sous-unités alpha/bêta. Toutes les glycoprotéines, y compris l'hormone stimulant la thyroïde (*Thyroid-stimulating hormone,* TSH) et l'hCG (*Human Chorionic Gonadotropin*), partagent la sous-unité alpha. Le mécanisme qui déclenche le développement folliculaire, la rupture, la libération et la réception ou le décollement de l'endomètre dû à une absence de fécondation est causé par l'interaction entre les hormones FSH et LH. Les hormones gonadotrophines jouent un rôle crucial dans la régulation de la reproduction chez les vaches. Des dysfonctionnements dans la production ou la réponse à ces hormones peuvent entraîner diverses pathologies chez les vaches. Ces pathologies peuvent avoir un impact significatif sur la fertilité, la santé reproductive des vaches et d'autres problèmes à long terme incluant l'anovulation, l'aménorrhée, le Syndrome des ovaires kystiques (SOK), Syndrome de retard de croissance ovarienne (SCRO), dysfonctionnement ovarien, kyste lutéal, troubles du cycle œstral, entre autres (42-45).

2.3.3. Hormone folliculo-stimulante (FSH)

La FSH est une gonadotrophine produite et sécrétée parl'hypophyse antérieure en réponse à la GnRH pulsatile à basse fréquence. Avant l'ovulation, la FSH favorise le développement et la maturation des follicules immatures en follicules secondaires matures (de Graaf). Les cellules de la granulosa qui encerclent les follicules ovariens en croissance possèdent des récepteurs à la FSH (FSHR). Les cellules de la granulosa sont celles qui génèrent en premier l'œstrogène nécessaire pour la maturation du follicule dominant. Le pic de LH convertit les cellules de la granulosa en cellules sensibles à la LH en les lutéinisant après une augmentation prolongée des niveaux d'œstrogènes. Grâce à ce changement, les cellules de la granulosa peuvent désormais produire de la progestérone en réponse aux niveaux de LH (40, 41, 47, 48).

2.3.4. Œstrogènes (œstradiol)

Les œstrogènes sont des hormones stéroïdes qui sont responsables du développement et du contrôle du système reproducteur femelle. Les cellules de la granulosa du follicule en croissance libèrent des œstrogènes qui ont un effet rétroactif négatif sur la production de LH dans la première moitié du cycle œstral. Cependant, au fur et à mesure que les ovocytes mûrissent à l'intérieur de l'ovaire en préparation de l'ovulation, les niveaux d'œstrogènes atteignent un point crucial auquel ils commencent à exercer une rétroaction positive sur la production de LH, provoquant une pousséede LH par ses effets sur la fréquence des impulsions de GnRH (25).

2.3.5. Hormone lutéinisante (LH)

La LH est une gonadotrophine synthétisée et sécrétée par l'hypophyse antérieure en réponse à la libération de GnRH à haute fréquence. La LH stimule les cellules de la thèque et les cellules de la granulosa lutéinisées pour initier l'ovulation, préparer l'utérus pour l'implantation de l'ovocyte fécondé et induire l'ovaire à produire de la progestérone. La LH interagit avec les cellules de la thèque dans l'ovaire qui sont proches des cellules de la granulosa avant le pic de LH. Pour le développement des follicules, les cellules de la thèque produisent des androgènes, qui se transforment en œstrogène lors du processus d'aromatisation médié par l'aromatase P_{450}

En renforçant l'activité des enzymes protéolytiques qui affaiblissent la paroi ovarienne et permettent le perdre de l'ovocyte, le pic de LH génère les conditions d'éruption folliculaire. La thèque et les cellules de granulosa lutéinisées constituent les restes folliculaires après la libération de l'ovocyte (24, 49).

La LH est supposée d'agir sur les petites cellules thèque-interstitielles folliculaires, où elle favorise la fabrication de stéroïdes C19. L'augmentation de la quantité de récepteurs de LH et l'induction d'importantes protéines stéroïdogènes, notamment StAR (*steroidogenic acute regulatory protein*), CYP11A1, HSD3B2 et CYP17A1, sont deux effets supplémentaires du traitement à faible dose de LH (50-53).

2.3.6. Progestérone

La progestérone est une hormone stéroïde dont le rôle est de préparer l'endomètre à l'implantation de l'ovocyte fécondé dans l'utérus et de maintenir la gestation. Le corps jaune sécrète de la progestérone dans les premiers stades de la gestation si un ovocyte fécondé s'implante, jusqu'à ce que le placenta mûrisse et prenne en charge la production de progestérone pour le reste de la gestation (47, 54-56).

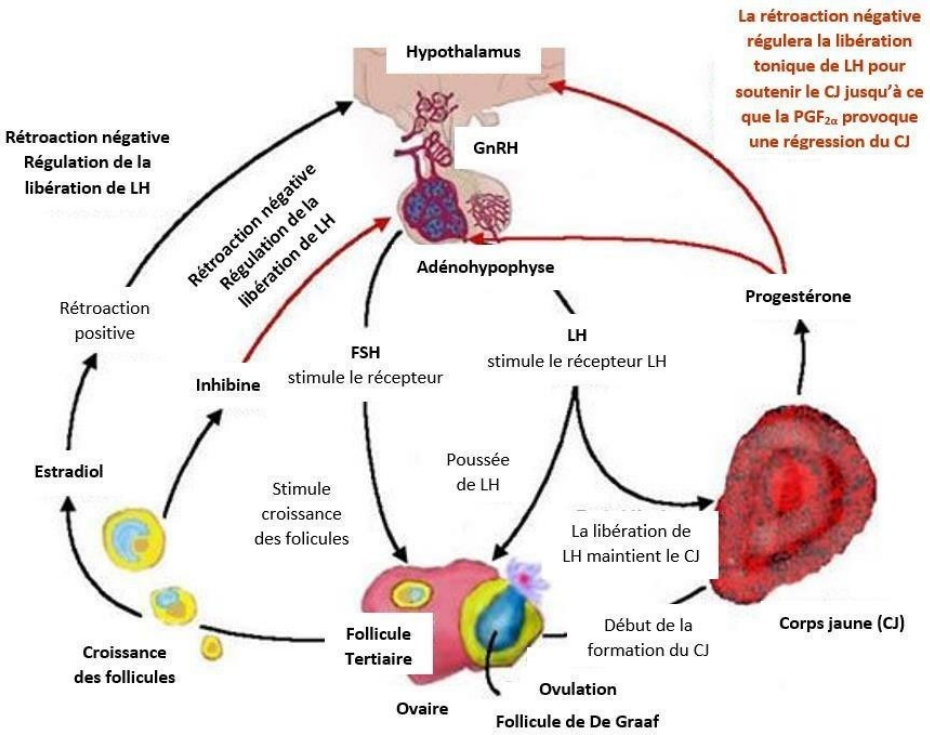


Figure 2. Contrôle hormonal de l'activité ovarienne et de l'axe hypothalamo-hypophysaire chez la vache

Modifié de The Veterinary Site, 2021 (57). Les vaches sont en chaleur dans un cycle soigneusement régulé, ce qui donne aux animaux des occasions répétées de devenir gestantes. Il est régulé par l'axe hypothalamo--hypophyse-gonadique (ovaire) produisant des hormones, GnRH, LH, FSH, Estradiol, Ocytocine, Progestérone et Prostaglandine F2α, qui dictent les événements de reproduction chez les bovins.

2.4. Développement folliculaire bovin

Le développement folliculaire chez les vaches pendant le cycle œstral se produit souvent selon un schéma à deux ou trois vagues. Les vaches présentant trois vagues ont un cycle œstral plus long que celles avec deux vagues car la phase lutéale dure plus longtemps dans la première vague (trois vagues). Le plus gros follicule de la deuxième vague atteint son diamètre maximal, est toujours vivant et se développe en un follicule ovulatoire si la fonction lutéale commence à se dégrader plus tôt. Par conséquent, la fertilité des vaches à deux vagues peut être inférieure à celle des vaches à trois vagues parce que leurs follicules sont plus gros et plus vieux au moment de l'ovulation. Indépendamment de l'espèce et du nombre de vagues, chaque vague comporte

Trois phases : recrutement, sélection et dominance *(Figure 3)* (25, 58).

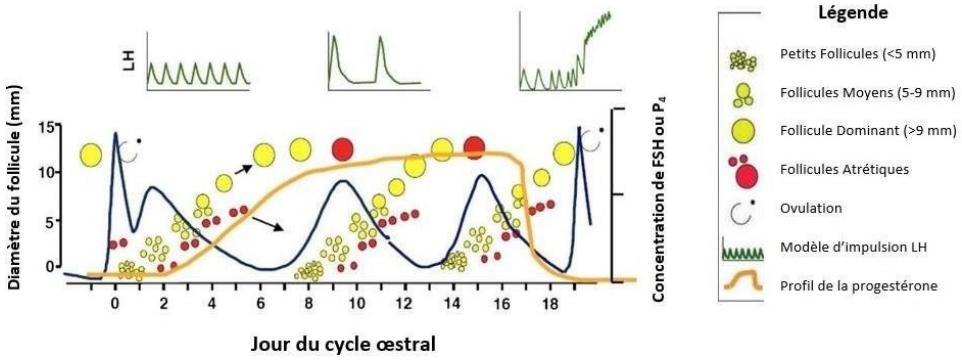


Figure 3. *Dynamique folliculaire ovarienne pendant le cycle œstral bovin*

Pris de Forde et al., 2011 (39). Au cours de chaque vague de développement des follicules, les phases de sélection, de dominance et de perte de dominance se produisent. Un des follicules de la deuxième vague atteint son diamètre maximal, devenant le follicule dominant ; les autres follicules dégénèrent par atrésie. Le follicule dominant s'atrophie également dans les phases lutéales précoce et moyenne, mais le follicule dominant ovule à la fin de la phase lutéale.

Il est essentiel de comprendre les mécanismes qui contrôlent la folliculogenèse au cours du cycle œstral afin d'améliorer la précision des mécanismes qui influencent l'ovulation. Au cours des dernières décennies, il y a eu des progrès dans la compréhension des processus physiologiques et des altérations liées à la formation et à la dégénérescence des follicules ovariens au cours du cycle œstral de divers animaux domestiques (58, 59).

Un environnement idéal pour la maturation des ovocytes et la préparation de la fécondation après l'ovulation est fourni par le processus complexe et dynamique du développement folliculaire ovarien, qui se caractérise par une forte prolifération et différenciation des cellules folliculaires. Le développement folliculaire comprend une variété d'interactions impliquant des hormones, des facteurs de croissance, des systèmes de communication cellulaire et des gènes ainsi que des signaux endocrines, paracrines et autocrines à l'intérieur de l'ovaire et un échange de signaux endocriniens entre les ovaires et l'hypophyse (58, 60, 61).

L'organogenèse normale nécessite le contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaire afin d'obtenir la taille, la forme et la fonction appropriées. La différenciation est généralement programmée pour coïncider avec la fin du cycle cellulaire pour l'homéostasie des tissus. Les kinases dépendantes des cyclines (*Cyclin-dependent kinases,* CDK), ainsi qu'un certain nombre d'autres protéines qui favorisent ou inhibent leur activité, contrôlent le cycle cellulaire. En conjonction avec CCND (*Cyclin-D*) et CCNE (*Cyclin-E*), CDK4/6 et CDK2 sont principalement responsables du contrôle de la progression de la phase G1 (62).

2.5. Activation de la voie de signalisation MAPK (ERK1/2)

Le point culminant de la folliculogenèse, chez les mammifères femelles qui suivent un cycle régulier, est une augmentation de la LH qui déclenche l'ovulation. La poussée de LH est un événement charnière qui déclenche plusieurs processus ovariens clés, notamment la maturation ovocytaire, l'expansion du cumulus, la rupture de la paroi folliculaire et la lutéinisation des cellules de granulosa murale et des cellules des thèques.

La LH induit rapidement la production de membres de la famille des ADAM (*A disintegrin and metalloproteinase*), qui cassent et libèrent des facteurs de croissance prédéfinis de type EGF (facteurs de croissance épidermiques) à partir de la surface des cellules de la granulosa murale. Lorsque la LH se lie à son récepteur couplé aux protéines G (*Luteinizing Hormone Receptor*, LHCGR), la concentration intracellulaire d'AMPc augmente, activant la PKA (*protein kinase A*) et le CREB (*cAMP response element-binding protein*). Les cellules ovocytaires et cumulus n'expriment pas la LHCGR, malgré le fait qu'elles réagissent au pic de LH (63). La transmission paracrine du signal LH est plutôt médiée par des membres importants de la famille des EGFs, en particulier l'amphiréguline (AREG) l'épiréguline (EREG) et la bêtacelluline (BTC), qui sont libérées par les GC muraux après une réaction d'activation de CREB dépendant de la PKA (12, 16).

Les modules de protéine kinase activée par les mitogènes (MAPK) contiennent trois protéines kinases activées séquentiellement, lesquelles jouent un rôle clé d'une série de voies de signalisation vitaux qui régulent essentiellement de nombreux processus cellulaires, notamment

l'inflammation, la réponse au stress cellulaire, la différenciation cellulaire, la division cellulaire, la prolifération cellulaire, le métabolisme, motricité et apoptose (64). Une fois activées, les MAPK phosphorylent une variété de cibles dans le cytosol et le noyau pour modifier la fonction des protéines et la production de gènes, ce qui déclenche alors la réponse biologique appropriée (65). Afin d'activer les gènes appropriés dans les cellules de mammifères, des signaux extracellulaires sont transmis dans le noyau par au moins trois modules de signalisation MAPKdifférents, ceux-ci comprennent les kinases régulées par un signal extracellulaire (ERK), les kinases Jun amino-terminales (JNK) et les protéines kinases activées par le stress (p38/SAPK) (66).

Les membres de la famille ERK ont un motif TEY dans la section d'activation et peuvent être séparés en deux types : les ERK conventionnels (ERK1 et ERK2), qui contiennent principalement un domaine kinase, et les plus grands ERK (ex. ERK5), qui contiennent une séquence considérablement plus longue. Afin de stimuler la croissance et la différenciation cellulaires, le module ERK1/2 conventionnel réagit principalement aux facteurs de croissance et aux mitogènes. Les récepteurs de surface cellulaire, y compris les intégrines, les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) et les récepteurs tyrosine kinases (RTK), ainsi que les petites GTPases Ras et Rap, sont des régulateurs importants en amont de ce module (66). Des protéines d'échafaudage spécifiques (ex. protéines ASB, *Ankyrin-repeat and SOCS-box protein*) qui fixent les kinases clés de chaque module MAPK ont été découvertes. En augmentant la concentration locale des composants, en fournissant une régulation spatio-temporelle de l'activation en cascade et/ou en localisant le module sur des sites ou des substrats cellulaires particuliers, ces échafaudages prennent en charge la signalisation MAPK (67).

2.6. Ovulation et lutéinisation

La libération d'un ovocyte à partir d'un follicule ovarien est connue sous le nom d'ovulation (œuf ou ovule AKA). L'ovulation se produit 28 - 32h après la fin de l'œstrus chez l'espèce bovine (68). Une combinaison remarquable de changements hormonaux, de modification des réseaux d'approvisionnement en sang et de mouvement contrôlé de l'ovocyte dans l'oviducte, ne sont que quelques-uns des processus complexes qui entourent l'événement de l'ovulation (69). L'afflux de

leucocytes dans le follicule ovulatoire et les altérations du profil d'expression des facteurs immunitaires dans les couches de tissu thécal et de granulosa ont été identifiés comme les caractéristiques de l'ovulation en tant qu'événement inflammatoire (69, 70). L'ovulation est suivie de saignements profonds et le follicule se remplit de sang, devenant ainsi un corps hémorragique. Lors de la formation du corps jaune (lutéinisation), une série de changements morphologiques et biochimiques se produisent qui permettent aux cellules folliculaires de se transformer en cellules lutéales, changements qui se terminent au septième jour par un corps jaune fonctionnel (71).

La lutéinisation est caractérisée par la prédominance du corps jaune. Le maintien du corps jaune, ainsi que la synthèse de progestérone, sont liés à l'hormone LH. D'autres hormones qui interviendraient dans la synthèse de la progestérone sont la FSH et la prostacycline (également appelée prostaglandine I2 ou PGI2). La FSH se fixerait sur des récepteurs situés dans le corps jaune et provoquerait une augmentation de la sécrétion de progestérone. Concernant la PGI2, en plus de stimuler les cellules lutéales à produire de la progestérone, elle augmenterait le flux sanguin au niveau ovarien avec l'effet positif que cela signifie sur la synthèse et la sécrétion de progestérone. Si l'ovule n'est pas fécondé, le corps jaune reste fonctionnel jusqu'au jour 15-20, après quoi il commence à régresser en préparation d'un nouveau cycle œstral (72, 73).

Lors de la formation du CL, les taux plasmatiques de progestérone chez l'espèce bovine augmentent progressivement. Les cellules lutéales peuvent survivre dans un environnement hormonal différent en exprimant certains gènes, comme une augmentation significative de l'expression du *CYP11A1*, une brève expression des récepteurs de la progestérone et une diminution significative des ARNm codant pour le *CYP19A1* et le *CYP17A1*. Ces gènes sont exprimés par les cellules en cours de lutéinisation. Ces modifications conduisent à un passage de la production d'œstrogènes dans le follicule pré ovulatoire à la synthèse de progestérone dans le corps jaune. Le corps jaune se développe en un tissu métaboliquement actif avec un taux de production de progestérone élevé tout au long de la gestation. Un nouveau cycle commence si l'ovocyte n'est pas fécondé, provoquant une régression du CL (16, 49, 74).

2.7. Atrésie folliculaire

L'atrésie est un processus apoptotique qui est régulé hormonalement et fortement dépendant de l'apoptose des cellules de la granulosa. La FSH, qui favorise la formation des follicules, inhibe l'atrésie folliculaire. Une fois qu'un follicule s'est développé, il libère des œstrogènes qui, à fortes doses, réduisent la libération de FSH. L'apoptose des cellules de la granulosa a été liée à cinq systèmes ligand-récepteur impliqués dans la mort cellulaire et est considérée comme la principale cause de l'atrésie folliculaire (75, 76).

2.7.1. Apoptose des cellules de la granulosa

Trois phénotypes d'atrésie du follicule ovarien qui impliquent tous la mort des cellules de granulosa peuvent être distingués, chacun avec un mécanisme unique d'apparition et de régulation. Les couches centrales des cellules de la granulosa sont affectées par la première condition, appelée "atrésie antrale", avec une apoptose avançant vers l'antre. La deuxième condition, connue sous le nom d'"atrésie basale", affecte les cellules de la granulosa dans les petits follicules antraux les plus proches de la lame basale. Les cellules commencent à produire de la progestérone et à se lutéiniser tôt, mais elles ne finissent pas la lutéinisation, ce qui entraîne la mort cellulaire. Le terme "apoptose de différenciation terminale" fait référence à un troisième type d'apoptose qui se produit dans les follicules pré ovulatoires et ressemble à l'excrétion des cellules épidermiques de la peau *(Figure 4)* (77, 78).

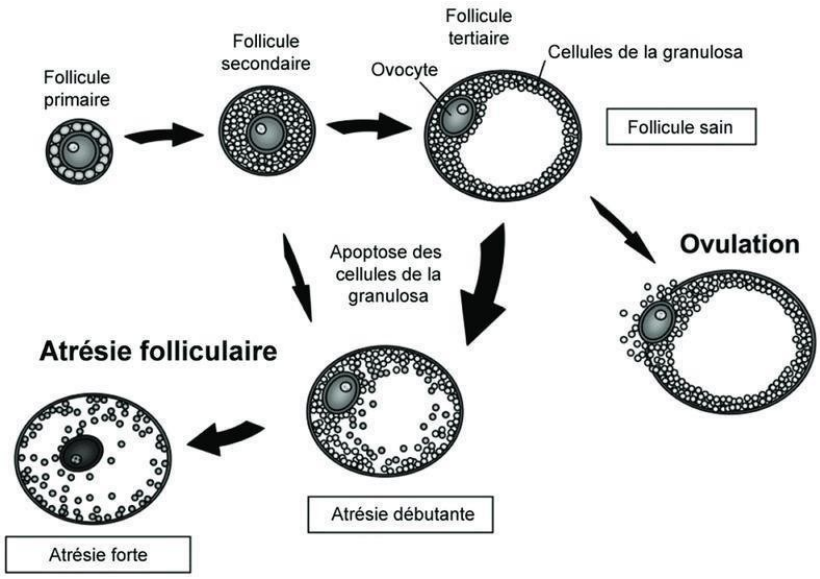


Figure 4. *Un bref schéma indiquant l'artresie folliculaire.*

Pris de Matsuda-Minehata et al., 2006 (79). L'atrésie est un processus dégénératif qui arrête la croissance du follicule. Elle est initialement caractérisée par l'apparition de corps picnotiques, qui résultent de la fragmentation et de la condensation de la chromatine dans les cellules de la granulosa. L'atrésie provoque le détachement de la couche de cellules de la granulosa et la séparation de la membrane basale ; les couches de granulosa et de thèque se fragmentent alors, ce qui entraîne une perte de vascularisation capillaire.

L'atrésie antrale est le principal mécanisme de mort cellulaire dans la membrane des cellules granulosa. L'apoptose antrale est caractérisée par la présence des corps apoptotiques et des bulles cytoplasmiques, tandis que les cellules apoptotiques au milieu ou à la base de la membrane de la granulosa sont fréquemment absorbées par des cellules de la granulosa saines à proximité et/ou des macrophages envahisseurs. L'apoptose est induite principalement par les hormones de croissance, les récepteurs de mort et les dommages cellulaires. L'apoptose peut survenir à n'importe quel stade du développement du follicule (55, 80, 81).

Dans les cellules de la granulosa, il existe trois voies de signalisation principales qui conduisent à l'apoptose. La première voie est médiée par des quantités élevées d'AMPc induits par le facteur de croissance via la granzyme B ; la seconde voie affecte la fonction mitochondriale via l'activation des membres de la famille Bcl2 (B-cell lymphoma 2), et la

troisième voie utilise le facteur de nécrose tumorale alpha (*Tumor Necrosis Factor alpha,* TNFα), le ligand Fas (FasL)-Fas, et d'autres récepteurs de mort, qui conduisent tous à la fragmentation de l'ADN induite par la caspase (82, 83). Même si la rupture de l'ADN et l'effondrement nucléaire ont déjà eu lieu, les gonadotrophines et la forskoline activent la granzyme B pour contourner les mitochondries dans l'ovaire afin de maintenir leur fonction dans les premières phases de l'apoptose (84, 85). Une multitude de stimuli extrinsèques, notamment des dommages à l'ADN et le stress oxydatif, qui activent des voies de signalisation spécifiques à p53 pour initier des mécanismes apoptotiques, peuvent également provoquer l'apoptose (84, 86).

De nombreux facteurs de croissance dont le facteur de croissance analogue à l'insuline (IGF), le facteur de croissance épidermique (EGF) et le facteur de croissance des fibroblastes (FGF), ainsi que les gonadotrophines (FSH et LH) jouent un rôle anti-apoptotique, ce qui produit un microenvironnement qui assure la survie (80, 82, 83). Au cours du processus de folliculogenèse, les cellules de la thèque et de la granulosa génèrent des hormones qui ont un impact anti-apoptotique spécifique au stade. La mort des cellules de la granulosa est supprimée par les voies de signalisation anti-apoptotique comme la protéine kinase B (AKT/PKB), ERK, l'EGF et les BMP (*Bone morphogenetic proteins*) pendant la phase proliférative de la folliculogenèse induite par les œstrogènes. L'œstrogène affecte le système de signalisation PI3K/AKT, qui favorise l'activité anti-apoptotique (87-90).

2.8. Protéases

Une cascade de cystéine protéases appelées caspases est déclenchée par la signalisation de l'apoptose. La décomposition de plusieurs protéines dans la cellule, le désassemblage cellulaire, la mort cellulaire et, enfin, la phagocytose et l'élimination des débris cellulaires sont les dernières étapes à partir de la surface cellulaire, soit à partir des mitochondries. Selon le déclencheur apoptotique, la cascade des caspases est activée par deux voies distinctes : l'une depuis la surface cellulaire et l'autre depuis les mitochondries. Les signaux pro-apoptotiques et les caspases initiatrices, y compris les caspases 8, 9, 10 et 12, ont une forte relation. FasL, TNFα, Granzyme B, GRB (*Growth Factor Receptor-Bound Protein*), les dommages à l'ADN, les

canaux Ca^{2+} (Calcium) et le stress ER (*Endoplasmic Reticulum*) sont quelques exemples de pro-stimuli apoptotiques (91).

Les caspases 8, 9, 10 et 12 clivent et activent les caspases effectrices en aval (y compris les caspases 3, 6 et 7). Afin de libérer le composant pro-apoptotique Cyto C (*Cytochrome-C*), essentiel à l'activation de la Pro-Caspase-9, le tBID (*Truncated BID*) rompt la membrane mitochondriale externe, l'espace intermembranaire libère Cyto C, qui se lie à APAF1 (*apoptotic protease activating factor-1*), puis attire la caspase-9 qui est capable d'activer protéolytiquement la caspase-3 (92) . Au cours de l'apoptose, les mitochondries sécrètent en outre SMAC (*Second Mitochondria-Derived Activator of Caspase) /*DIABLO, qui inhibe les protéines de la famille IAP (*Inhibitor of Apoptosis*) pour faciliter l'activation de la caspase. Le stress du réticulum endoplasmique déclenche l'activation de la caspase-12 médiée par le Ca^{2+} (93). Après l'activation, les caspases en aval cassent les protéines cytosquelettiques et nucléaires (structurelles, de signalisation ou kinases) telles que PARP (*Poly ADP-ribose Polymerase*), DNA-PK (*DNA-Dependent Protein Kinase*), Rb (*Retino Blastoma Tumor Suppressor Protein*), PAK1 (*p21-Activated Kinase- 1*), GDID4, Fodrin, Lamin-A. L'ICAD (*Inhibitor of CAD*) est décomposé par la caspase 3 pour libérer la CAD (*Caspase-Activated DNase*) qui fragment l'ADN (94).

2.9. Stéroïdogenèse

La stéroïdogenèse est un processus par lequel le cholestérol est converti en hormones stéroïdes et implique des protéines de transport, des enzymes, des partenaires rédox et des cofacteurs. Bien que la stéroïdogenèse soit fréquemment discutée en termes de glandes particulières, elle est en réalité mieux comprise comme un processus unique qui se répète dans chaque glande avec des changements en fonction du type de cellule. La stéroïdogenèse est ainsi contrôlée par une régulation tissulaire spécifique de la transcription et une modification post-traductionnelle des enzymes et cofacteurs stéroïdogènes. Six enzymes différentes du cytochrome P_{450} et deux hydroxy stéroïdes déshydrogénases travaillent ensemble pour catalyser la fabrication de différentes hormones stéroïdes dans les tissus animaux (95-97).

Dans le cytoplasme des cellules somatiques, l'enzyme de clivage de la chaîne latérale du cytochrome P_{450} (P_{450scc} ; CYP11A1), un composant du système de clivage de la chaîne latérale du cholestérol trouvé du côté de la matrice de la membrane mitochondriale interne (IMM), est responsable de la première réaction, qui est la conversion du cholestérol en prégnénolone. L'internalisation du cholestérol par les mitochondries est l'étape limitante de la voie de stéroïdogenèse et est médiée par la protéine régulatrice aiguë stéroïdogénique (StAR) (72). Après avoir quitté les mitochondries, la prégnénolone est transformée en progestérone par l'enzyme 3-bêta-hydroxystéroïde déshydrogénase (3β-HSD) et autres stéroïdes dans la région microsomale de la cellule. De plus, en fonction de la variété d'enzymes stéroïdogènes présentes dans certaines cellules stéroïdogènes, les stéroïdes en aval peuvent réintégrer les mitochondries et être convertis en produit final. Les hormones trophiques hypophysaires, l'adrénocorticotrophine (ACTH), LH et FSH, contrôlent ces processus (11, 98).

2.9.1. Voie tissulaire spécifique de la stéroïdogenèse - Stéroïdogenèse ovarienne

La répartition des processus enzymatiques entre les cellules de la granulosa et de la thèque, qui entourent l'ovocyte et créent un follicule, rend la stéroïdogenèse ovarienne plus compliquée. Les schémas de stéroïdogenèse changent également tout au long du cycle, la progestérone étant générée dans la phase lutéale tandis que l'estradiol est le produit principal dans la phase folliculaire. Le fait que *CYP17A1* ne soit pas exprimé par les cellules de la granulosa est crucial pour la stéroïdogenèse ovarienne. En général, la LH influence l'initiation de la stéroïdogenèse dans les cellules de la granulosa en stimulant l'expression de *CYP11A1* vial'AMPc (99). La prégnénolone et la progestérone des cellules de la granulosa se diffusent dans les cellules de la thèque voisines, où *CYP17A1* et 3β-HSD2 peuvent réagir avec elles pour créer de l'androstènedione. La majorité de cette androstènedione retourne vers les cellules de la granulosa où elle est convertie en estrone puis en estradiol par *CYP19A1* et 17βHSD1, respectivement, sous l'influence de la FSH. De petites quantités de cette androstènedione sont libérées ou converties en testostérone, probablement par AKR1c3/17β-HSD5 (100). Comme pour les trois zones de la surrénale, l'expression spécifique d'enzymes dans les cellules stéroïdogènes particulières contrôle les schémas de stéroïdogenèse gonadique (72, 99, 101).

Toutes les enzymes, à l'exception de *CYP19A1*, présentent des niveaux élevés d'expression d'ARNm dans les cellules de granulosa au cours du développement folliculaire pré ovulatoire. L'expression de l'ARNm du *CYP17A1* dans les cellules de la thèque, de l'ARNm du *CYP19A1* dans les cellules de la granulosa et de l'ARNm du *CYP11A1* et de la *3β-HSD* dans les cellules de la granulosa et de la thèque diminuent toutes considérablement après la poussée pré ovulatoire de LH. L'expression dans les follicules pré ovulatoires de l'ARNm du *CYP11A1*, *3β-HSD* et du *CYP17A1* est généralement élevée dans les cellules thèques et dans les cellules de granulosa avant la poussée de LH et diminue dans tous les follicules pré ovulatoires après la poussée de LH, sauf l'ARNm du *CYP19A (101).* Ci-dessous, dans la *Figure 5,* nous pouvons visualiser ce qui a été expliqué.

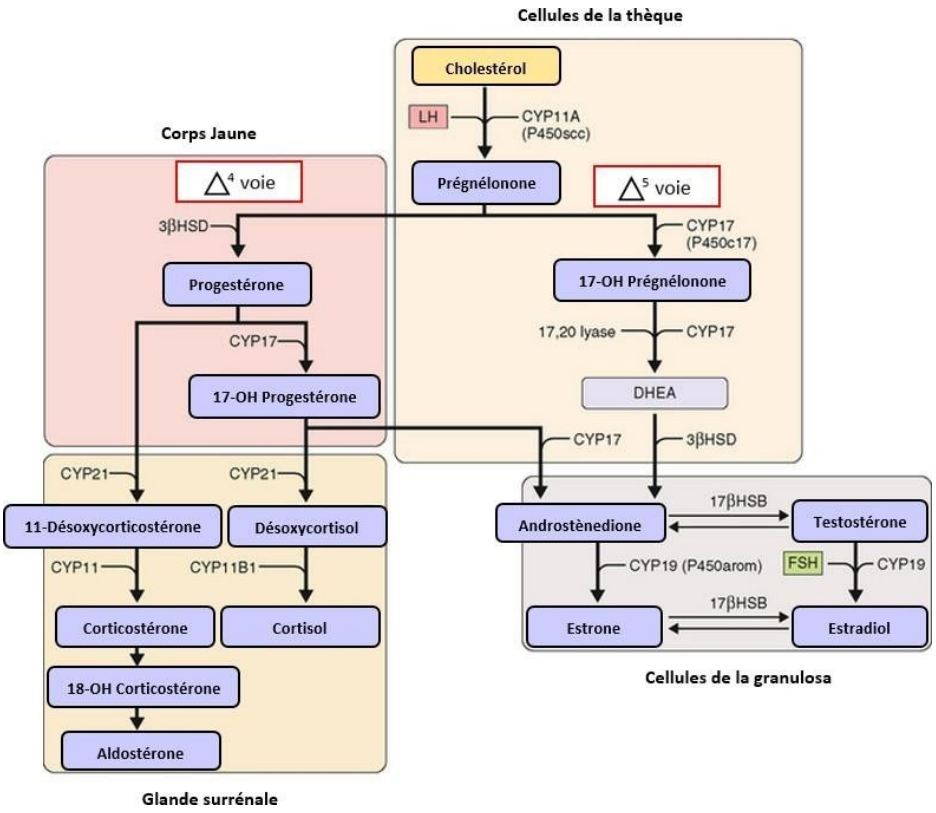


Figure 5. *Voies de biosynthèse des hormones stéroïdes dans l'ovaire.*

Modifié de Clinical Gate, 2015 (102) . La stéroïdogenèse, processus par lequel le cholestérol est converti en hormones stéroïdes, implique des protéines de transport, des enzymes, des partenaires rédox et des cofacteurs. " La voie Δ4 convertit la prégnénolone en progestérone et constitue la voie principale dans le corps jaune. La voie Δ5 convertit la prégnénolone en androgènes puis en œstrogènes et constitue la voie privilégiée dans les cellules thécales. L'androstènedione et la testostérone peuvent être converties en œstrogènes par le CYP19A. La conversion de la 17OH-progestérone en aldostérone et en cortisol est également illustrée par le CYP21 et le CYP11, qui se produisent exclusivement dans la glande surrénale. Les réactions irréversibles sont indiquées par une simple flèche et les réactions réversibles par des doubles flèches".

L'expression génique dans le follicule pré ovulatoire est altérée en raison de la poussée ovulatoire de LH. Alors que certains gènes sont activés ou augmentés en expression, l'expression de certains gènes est régulée négativement ou arrêtée. De nombreuses équipes de recherche se sont penchées sur les modifications de l'expression des gènes dans le follicule

dominant ou pré ovulatoire des espèces bovines pendant la période pré ovulatoire et après la libération de LH. Dans les études antérieures effectuées dans notre laboratoire, le gène Ankyrin-repeat et SOCS Box Protein 9 (ASB9) a été rapporté pour la première fois comme étant un gène induit par la LH/hCG dans les cellules de granulosa de toutes les espèces (13, 14). Ces études ont aussi établi qu'ASB9 pourrait être un régulateur de l'activité et de la fonction des cellules de granulosa en ciblant des protéines spécifiques qui possèdent la signalisation MAPK, limitant ainsi la prolifération des cellules de granulosa. Plus important encore, les résultats impliquent ASB9 dans la modulation de la voie MAPK3/1 (ERK1/2), probablement via différents gènes cibles dont PAR1 (*Protease Activated Recepteur* 1) (16).

2.10. Famille de gènes ASB

La famille de gènes de répétition d'ankyrine et de protéine à boîte SOCS est appelée famille de gènes ASB (*Ankyrin-repeat and SOCS-box protein*). Il y a 18 membres de cette famille et chacun est composé de deux motifs : une région de répétition ANK N-terminale qui participe dans les interactions protéine-protéine (29) et un domaine de boîte SOCS carboxy-terminal qui sert d'adaptateur et de lien pour la dégradation de protéines spécifiques (processus d'ubiquitination des protéines cibles pour la destruction médiée par le protéasome). La famille ASB est considérée importante pour diverses fonctions, notamment dans le contrôle du cycle cellulaire, l'initiation dela transcription, le transport des ions, la transduction du signal et le maintien de l'intégrité du cytosquelette. De nombreux processus et voies cellulaires impliquent des complexes ASB, néanmoins leurs interactions, leur assemblage et leurs rôles biologiques restent mal compris (103).

Dans les tissus des mammifères, la majorité des membres de la famille ASB sont largement exprimés. Certains gènes ASB codent pour des protéines dont la distribution est très variable et spécifique aux tissus. Ils peuvent être trouvés dans divers emplacements subcellulaires, notamment le noyau, le réticulum endoplasmique, la membrane plasmique et Golgi. En revanche, les modèles d'expression des gènes restants peuvent différer d'un tissu à de nombreux organes. Environ la moitié des gènes sont exprimés de manière constante dans les tissus adultes. Le seul membre de la famille ASB qui est exclusivement exprimé dans les

testicules et dont l'expression est limitée est ASB17. Les isoformes épissées différentiellement de certains gènes ASB peuvent afficher des emplacements subcellulaires distincts PPI. ASB6, 9, 10, 11 ont trois isoformes qui se localisent soit dans le noyau, le réticulum de Golgi, le réticulum endoplasmique ou les vésicules et cette localisation différentielle peut être responsable de l'atteinte de différentes fonctions. D'autres modifications post-traductionnelles, telles que la SUMOylation, la phosphorylation et l'ubiquitination, peuvent également varier en termes de sensibilité selon les isoformes et avoir un impact significatif sur la localisation subcellulaire et les niveaux d'expression des protéines (103).

Les protéines ASB contiennent des propriétés qui contribuent à un large processus cellulaire allant de la physiologie normale à la conditions pathologiques mentionnées ci-dessous *(Figure 6).*

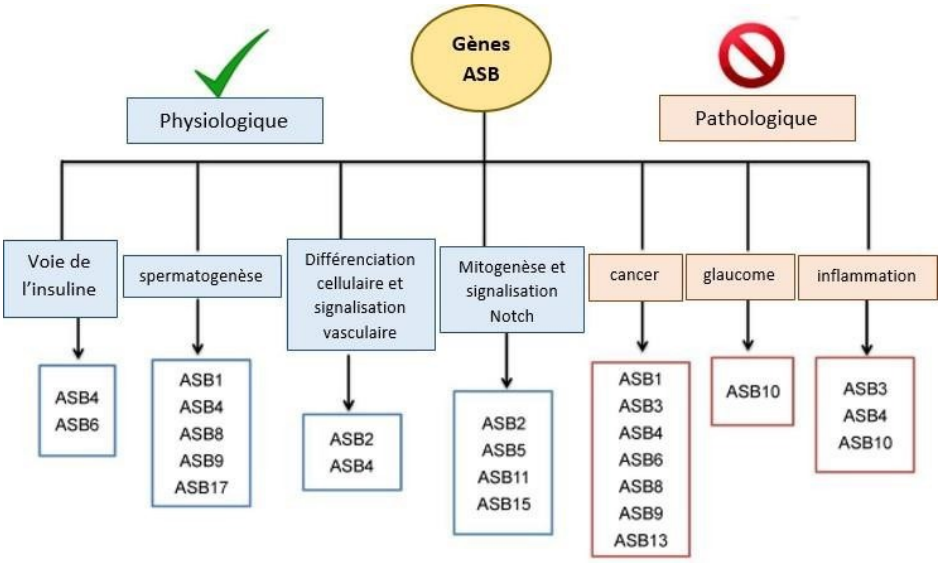


Figure 6. *Signification physiologique et pathologique des protéines ASB.*

Modifié de Anasa, Ravanan et Talwar, 2018 (103). Les gènes ASB sont des protéines multifonctionnelles qui comportent des caractéristiques de conséquences à la fois physiologiques et pathologiques. Effets positifs ou convenables marqués avec un check , effets négatifs ou à être évités marqués d'un symbole bloquant.

Récemment, un groupe de chercheurs a effectué une analyse fonctionnelle des voies de liaison et d'action entre les 18 gènes de la famille d'ASB. Dans l'ensemble, il semble que la plupart

des gènes ASB étaient positivement corrélés les uns aux autres et présentaient une forte association. Parallèlement, ils ont examiné les voies traditionnelles des gènes ASB pour en savoir plus sur la fonction des gènes ASB dans la carcinogenèse. L'enquête a révélé que 10 gènes ASB inhibent ou activent les voies de signalisation. Ces voies de signalisation comprennent l'apoptose, le cycle cellulaire, la réponse aux dommages de l'ADN, la transition épithéliale-mésenchymateuse (EMT), le récepteur des œstrogènes (AR, ER), PI3K/AKT, RAS/MAPK, RTK et TSC/mTOR pendant la formation de cancers. Parmi eux, ces gènes, notamment ASB2, ASB16, ASB12 et ASB1, ont des effets inhibiteurs significatifs sur l'apoptose et peuvent favoriser vigoureusement l'activation de l'EMT (104).

2.10.1. Ankyrin-repeat and SOCS-box protein 9 (ASB9)

ASB9 est un membre de cette importante famille de protéines contenant des boîtes SOCS (ASB). Il s'agit d'une ubiquitine ligase E3 et joue un rôle essentiel dans l'ubiquitination des protéines. Les membres de cette famille peuvent interagir avec le complexe adaptateur elongin BC via leur domaine de boîte SOCS et s'associer avec les protéines *cullin* et *ring box* pour former des complexes E3 ubiquitine ligase (CRL) *(Figure 7)* (15). La protéine ASB9 est formée de 297 acides aminés et traduite à partir d'un ARNm de 1593 paires de bases (15) (98). L'ARNm *ASB9* est transcrit à partir d'un gène situé sur le chromosome X chez l'espèce bovine et contient huit exons. ASB9 est exprimé de manière différentielle dans les follicules ovulatoires par rapport aux autres stades de développement folliculaire (13, 14). De plus, et en lien avec la reproduction, l'ASB9 est exprimé dans les reins et les testicules. Les spermatocytes et les spermatides pachytènes présentaient du mAsb-9 alors qu'aucune expression n'était observée dans les spermatogonies et les spermatozoïdes générés. ASB9 pourrait être une cible utile pour les études sur le développement des cellules germinales mâles au cours de la spermatogenèse, ce qui en fait un marqueur spécifique de la spermatogenèse (103, 106).

Chez l'espèce bovine, l'expression d'ASB9 est induite par la poussée d'hormone lutéinisante ou l'injection d'hCG dans les cellules de la granulosa ovarienne tout en étant régulée négativement dans les follicules dominants en croissance. Les interactions d'ASB9 et des partenaires de liaison dans les cellules de granulosa ont été antérieurement rapportées et incluent

PAR1, TAOK1 (*Thousand-and-one amino acid kinases 1*) et TNFAIP6/TSG6 (107). De plus, ASB9 pourrait agir comme un régulateur de l'activité et de la fonction des cellules de granulosa en modulant la signalisation MAPK probablement par l'intermédiaire de partenaires de liaison spécifiques tels que ceux mentionnés ci-dessus (14, 16, 108). Ses deux domaines lui permettent de jouer un rôle important dans le renouvellement des protéines par la dégradation médiée par le protéasome, et d'être engagé dans un certain nombre de processus, notamment le contrôle du cycle cellulaire, la différenciation, la carcinogenèse et la prolifération (16, 109).

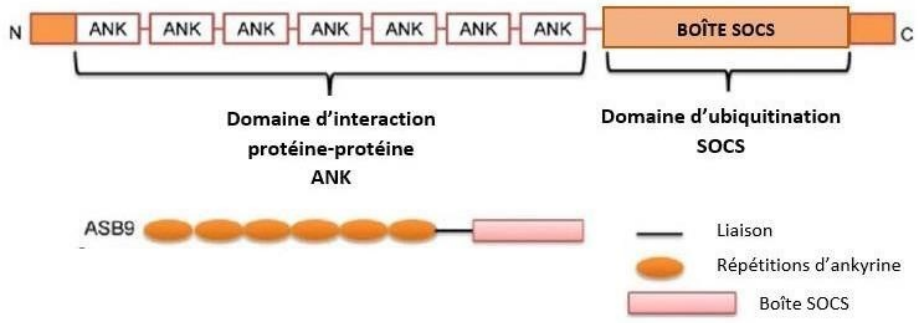


Figure 7. *Structure d'ASB9.*

Modifié de Anasa, Ravanan & Talwar, 2018 (103). La protéine ASB9 est constituée d'une boîte SOCS (suppressor of cytokine signaling box) située dans la partie C-terminale et de six répétitions d'ankyrine (35), qui se trouvent dans la partie N-terminale de la protéine. Avec ces deux domaines, SOCS box et ANK, ASB9 pourrait fonctionner comme un composant spécifique de reconnaissance du substrat des ligases d'ubiquitine E3 et interagir avec les protéines dans le processus d'ubiquitination et de dégradation protéasomale.

Les ligases Cullin-RING E3 (CRL), qui forment un complexe multiprotéique étendu, sont le type de ligases E3 le plus répandu. La boîte *suppressor of cytokine signaling* (SOCS) contenue dans la protéine ASB9 forme le domaine de reconnaissance du substrat dans une ligase E3 de type boîte Elongin-Cullin-SOCS (ECS) et est inclus dans l'un de ces CRL. En ciblant la créatine kinase (46), le substrat de la protéine E3 ligase, pour la dégradation médiée par l'ubiquitine, ASB9 interagit directement avec elle ; catégorisant ASB9 comme une protéine d'ubiquitination (110, 111).

2.10.2. Processus d'ubiquitination

La procédure biologique connue sous le nom d'ubiquitination implique le marquage des protéines avec l'ubiquitine. Il se produit de manière intracellulaire et contrôle une vaste gamme de fonctions biologiques. La voie ubiquitine-protéasome est le plus souvent utilisée pour dégrader les protéines une fois qu'elles ont été ubiquitinées, mais cette voie peut également être utilisée pour modifier la façon dont les protéines interagissent les unes avec les autres et pour contrôler les concentrations cellulaires de protéines nécessaires à la fonction cellulaire, telles que les protéines de signalisation et les enzymes métaboliques (112, 113).

Une modification post-traductionnelle connue sous le nom d'ubiquitination se produit lorsque la protéine ubiquitine est jointe à une protéine substrat. L'enzyme d'activation de l'ubiquitine (E1), l'enzyme de conjugaison de l'ubiquitine (E2) et la ligase de la protéine ubiquitine (E3) sont les trois enzymes impliquées dans le processus en trois étapes *(Figure 8)*. La mono-ubiquitination, le processus par lequel une molécule d'ubiquitine est liée à une protéine, est le résultat de cette série d'événements. La poly ubiquitination se produit lorsque des molécules supplémentaires sont jointes à l'un des sept résidus de lysine ou à l'extrémité N-terminale de la molécule d'ubiquitine pour créer des chaînes d'ubiquitine. En agissant comme signal de reconnaissance du protéasome 26S, la poly ubiquitination déclenche alors le début de la protéolyse du substrat (113-115).

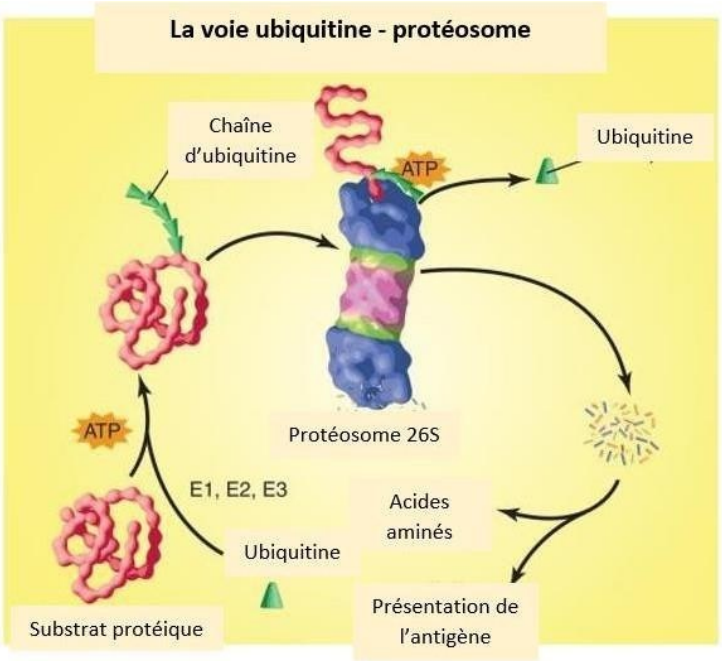


Figure 8. *Processus de l'ubiquitination.*

Modifié de Lecker, Goldberg et Mitch, 2006 (116). L'enzyme activant l'ubiquitine (E1), l'enzyme de conjugaison de l'ubiquitine (E2) et l'ubiquitine-protéine ligase (E3) sont trois enzymes impliquées dans le processus en trois étapes. L'ubiquitine est activée par E1 et transférée à une enzyme E2 et finalement conjuguée aux protéines substrats par une ligase E3 spécifique. La poly ubiquitination déclenche la protéolyse du substrat.

2.11. Récepteurs activés par les protéases

Les récepteurs activés par la protéase sont caractérisés par leur capacité à canaliser les réponses cellulaires sur la protéolyse du récepteur par les protéases plasmatiques et sont susceptibles d'adopter un spectre de conformations structurelles différents lors de la protéolyse des récepteurs, ce qui détermine l'étendue et la direction de leur activité de signalisation (117).

Le récepteur activé par la protéase 1 (PAR1) favorise l'agrégation rapide des plaquettes, a été identifié pour la première fois comme le récepteur de la thrombine sur les plaquettes (118, 119). Rapidement, trois autres membres de la famille PAR (PAR2, PAR3 et PAR4) ont été identifiés, et tous les récepteurs avaient une séquence et une homologie structurelle (118, 120).

Le mécanisme d'activation de tous les PAR est conservé, et l'exposition de leur exo domaine extracellulaire N-terminal aux protéases favorise une protéolyse limitée à des sites spécifiques aux protéases. Chaque événement de clivage expose une séquence d'acides aminés connue sous le nom de « ligand attaché », qui se réassocie au corps principal du récepteur pour provoquer un réarrangement structurel et l'activation du récepteur. Selon des recherches récentes, la majorité des PAR sont protéolysés par diverses protéases (17). La régulation des événements de signalisation cellulaire par les PAR varie selon les espèces et les tissus, avec des niveaux d'expression différents, des activités de clivage des protéases, une dimérisation avec d'autres récepteurs, une compartimentation, *trafficking*, des modifications post-traductionnelles et une co-localisation avec des co-récepteurs (17).

2.11.1. Protease-activated receptor-1 (PAR1)

PAR1 est un récepteur couplé aux protéines G (*G protein-coupled receptors*, *GPCR*), composé decinq domaines : N-terminal extracellulaire, boucle extracellulaire, 7 domaines hydrophobes transmembranaires, boucle intracellulaire et C-terminal intracellulaire *(Figure 8).* Son activation nécessite un clivage protéolytique dans le domaine extracellulaire exposant un ligand attaché. Ce clivage se lie au même récepteur stimulant les protéines Gαq/11-, Gαi/o- et Gα12-13 *(Figure 9)* (17, 121).

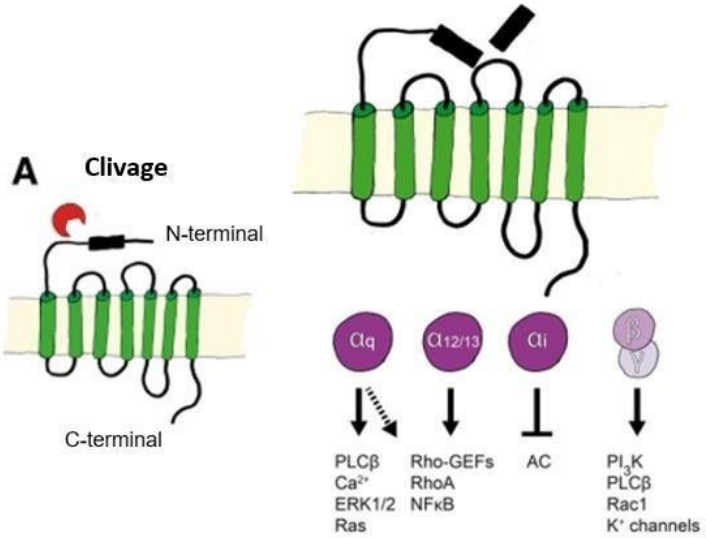
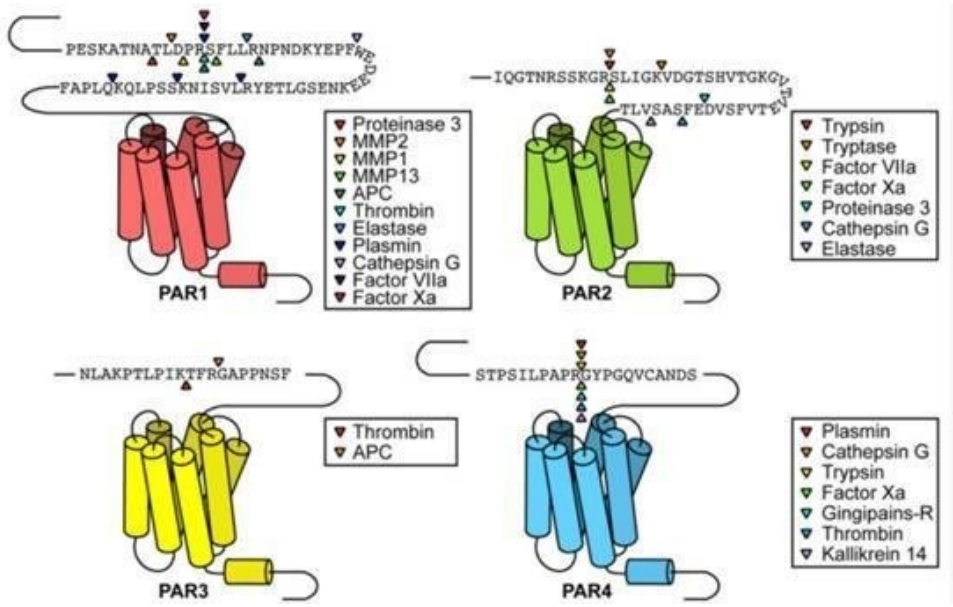


Figure 9. *Structure de PAR, Mechanisme d'activation et signalisation couplée aux protéines G induite par l'activation de PAR*

Pris et modifié de Heuberger & Schuepbach, 2019 (17). La protéine PAR1 est composée de cinq domaines : N-terminal extracellulaire, boucle extracellulaire, 7 domaines hydrophobes transmembranaires, boucle intracellulaire et C-terminal intracellulaire. Le clivage protéolytique dans le domaine extracellulaire est un des mécanismes, parmi 5 autres : une dimérisation avec d'autres récepteurs, une compartimentation, trafficking, des modifications post-traductionnelles et une co-localisation avec des co-récepteurs, nécessaires pour son activation. Le clivage protéolytique se lie au même récepteur stimulant les protéines Gαq/11-, Gαi/o- et Gα12-13.

Les sérines protéases telles que la thrombine, la plasmine, la protéine C activée (APC), le facteur Xa (FXa) et le facteur VIIa sont des activateurs endogènes de PAR1 (17, 121). Les sérines protéases peuvent également activer d'autres membres de la famille PAR, tels que PAR3 et PAR4 qui sont principalement activés par la thrombine, tandis que PAR2 est considéré comme récepteur de la trypsine et de la tryptase mastocytaire (122). De plus, PAR1 peut être activé par diverses métalloprotéases matricielles, par protéolyse sur des sites non canoniques, trans activée par des partenaires homo- ou hétérodimères, ou activée par des ligands synthétiques solubles correspondant à des séquences N-terminales clivées, comme le peptide TFLLR-NH2 (17, 121). Dans la *Figure 9* nous pouvons trouver certaines des protéases les plus courantes qui clivent les PAR et leurs respectifs sites de clivage.


PESKATNATLDPRSFLLRNPNDKYEPFWEDEEKNESGAETFRPSFSSLEAQLNRMLDNDRDLMLSPDWRAYTDPAENEDKFYCVLDHYGVPLQKQLPSSKNISVLRYETLGSENKEEDRLTTFFKVFIPVVCLVVVCLLGMIVYQIKSFTSQIRSRKEHTNSQKTTIMLKKVVSVFKNPGLIEQGSSIFSWAAHTQTSGIDRGQHVLEYKLVQVEEFECQPVMVDTSTEIPKPDPSSKDCCFFTCKPKTKKNRVCRNLQIADSERTPMLLNVSSSVHTPLLMSSSTYSTTETMTSTVTTTGMASSSS

signalisation. PAR1 s'accumule ou s'intériorise rapidement à la surface cellulaire en fonction du clivage protéolytique (125). PAR1 activé est internalisé via des mécanismes dépendants de la clathrine et de la dynamine et est trié des premiers endosomes aux lysosomes pour être dégradé (17). Bien que les mécanismes qui mettent fin au signal PAR1 ne soient pas complètement compris, il est connu que ces processus impliquent la phosphorylation, l'ubiquitination et l'acquisition de la B-arrestine (17, 20-22).

2.11.2. Régulation de la signalisation de PAR1 par des modifications post-traductionnelles

2.11.3. Phosphorylation de PAR1

La phosphorylation des GPCR est principalement, mais pas exclusivement, médiée par les GRK. Les récepteurs kinases couplées aux protéines G (GPCRK, GRK) sont une famille de protéines kinases au sein du groupe de kinases AGC (protéine kinase A, protéine kinase G, protéine kinase C). Comme toutes les AGC kinases, les GRK utilisent l'ATP pour ajouter du phosphate aux résidus sérine et thréonine à des emplacements spécifiques des protéines cibles. Dans les systèmes mammifères, il existe actuellement sept GRK connus (GRK1-7) (126, 127). Dans une première étude utilisant des cellules endothéliales humaines exprimant PAR1 endogène (ces cellules expriment de manière endogène uniquement GRK 2, 5 et 6), la surexpression de GRK5, et non de GRK3 ou GRK6, a entraîné une augmentation de la phosphorylation de PAR1 et un blocage partiel de l'augmentation de la stimulation par la thrombine dans la perméabilité de la barrière endothéliale (125, 128, 129). De plus, dans une autre étude pionnière portant sur des ovocytes de Xenopus, la surexpression de GRK3, auparavant connue sous le nom de BARK2, a pu réduire considérablement la mobilisation dépendante de Gαq, stimulée par PAR1, du Ca2+ intracellulaire (20, 125).

La phosphorylation de PAR1 se produit sur plusieurs sites Ser/Thr dans la région de la queue C et la mutation de tous les sites Ser/Thr en Ala (alanine) dans le domaine de la queue C a entraîné une perte de phosphorylation et des défauts de signalisation et d'internalisation des récepteurs. Dans les fibroblastes de rat, la phosphorylation de PAR1 régule de manière

différentielle l'association avec les adaptateurs de clathrine qui facilitent l'internalisation du récepteur par rapport au découplage de la signalisation de la protéine G (21). De plus, dans une recherche menée sur les cellules endothéliales (CE), il a été démontré que la phosphorégulation des CE induite par la thrombine est médiée exclusivement par PAR1, et que la thrombine et le peptide ligand captif de la thrombine induisent une phosphorégulation similaire et que seul le clivage canonique de PAR1 par la thrombine génère un ligand captif qui induit puissamment un effet précoce de la signalisation de phosphorylation (105).

Les arrestines sont une petite famille de protéines importantes pour réguler la transduction du signal au niveau des récepteurs couplés aux protéines G. Les arrestines présentent généralement une redondance fonctionnelle pour la plupart des GPCR. Cependant, PAR1 est clairement régulé par des isoformes d'arrestines non visuelles (130). Le PAR1 activé est rapidement phosphorylé et désensibilisé principalement par l'arrestine-2 et non par l'arrestine-1. Dans une étude sur les fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) provenant de souris knock-out d'arrestine-2 et -3, il a été démontré que la perte d'arrestine-2 provoquait une augmentation marquée de la signalisation PAR1 activée, par rapport aux MEF de type sauvage, mais cette internalisation médiée par la clathrine et la dégradation lysosomale de PAR1 sont restées intactes. De plus, un mutant PAR1 déficient en phosphorylation a conservé la capacité de recruter l'arrestine-2, démontrant que non seulement les isoformes de l'arrestine se lient différentiellement à PAR1, mais également que la phosphorylation est indispensable à ce processus. Ces données ont laissé une première déclaration selon laquelle l'arrestine ne régule pas l'internalisation de PAR1 et que la phosphorylation n'est pas nécessaire pour que l'arrestine se lie à PAR (131).

Plus récemment, dans une autre étude, l'activation de PAR1 médiée par la thrombine dans les fibroblastes de souris déficients en β-arrestine 1 est prolongée et l'arrêt du signal retardé par rapport aux cellules de type sauvage, mettant en évidence le rôle important de la β-arrestine 1 dans la désensibilisation de PAR1 après la protéolyse de PAR1 par la thrombine. PAR1 clivé par la thrombine est ensuite dirigé vers les lysosomes pour être dégradé une fois qu'il est incapable de répondre à une activation protéolytique ultérieure (118). Finalement, il existe des données d'une autre étude qui mentionnent que l'arrestine-3 contrôle le *trafficking*

endolysosomal des protéines de la membrane plasmique, y compris PAR1, supprimant ainsi la migration, l'invasion et les métastases des cellules invasives du cancer du sein in vitro et in vivo (132).

2.11.4. Ubiquitination de PAR1

Les premières investigations sur la régulation du signal PAR1 ont conduit à la découverte que PAR1 n'est pas recyclé de l'endosome après la stimulation d'un agoniste, conformément au modèle canonique de *trafficking* des GPCR. Une fois que l'endocytose de PAR1 est effectuée, ce dernier est acheminée directement de l'endosome au lysosome où il est dégradé, un processus connu sous le nom de régulation négative. De plus, il est présumé que la queue C de chaque GPCR dicte son destin au cours du *trafficking* (133).

PAR1 est inhabituel dans le domaine des GPCR dans la mesure où l'ubiquitination basale du récepteur code pour la rétention du récepteur à la surface cellulaire. L'ubiquitination des résidus lysine dans le motif de liaison de la tyrosine AP-2 de la queue C empêche la liaison de l'AP-2 et entrave par conséquent l'internalisation constitutive. Ce mode de rétention de PAR1 est jusqu'à présent unique parmi les GPCR et devrait jouer un rôle important dans la resensibilisation des récepteurs. Ainsi, bien que l'ubiquitination ne soit pas essentielle à la régulation de l'internalisation de PAR1, elle peut moduler les protéines adaptatrices de la clathrine utilisées pour médier l'internalisation de PAR1 (125, 133). Après l'activation, les GPCR sont internalisés dans l'endosome, où le récepteur est déphosphorylé avant d'être recyclé vers la membrane plasmique, ce processus est appelé désensibilisation. La désensibilisation est un processus physiologique important qui permet aux cellules de récupérer rapidement des réponses appropriées après une stimulation agoniste répétitive. En raison de l'activation protéolytique irréversible des PAR, une désensibilisation rapide nécessite une stratégie différente. PAR1 repose sur un pool endosomal de récepteurs constitutivement recyclés qui est continuellement internalisé et renvoyé à la membrane plasmique. Comme décrit ci-dessus, le recyclage constitutif de PAR1 semble être au moins en partie régulé par l'ubiquitination (7, 134).

2.11.5. Glycosylation de PAR1

La glycosylation liée à la N-terminal est un processus complexe dans lequel un oligosaccharide est attaché au résidu asparagine (Asn) d'une protéine de traduction de la molécule porteuse dolichol et est ensuite modifié par des glycosyltransférases et des glycosidases qui produisent par la suite une vaste gamme de structures de glycane possibles (135). Environ 90 % de tous les GPCR examinés sont glycosylés sur leurs domaines extracellulaires au niveau des sites consensus conservés Asn-X-Ser/Thr (où X = tout acide aminé à l'exception de la proline) (125). La glycosylation se produise le plus souvent à l'extrémité N-terminale et moins fréquemment sur d'autres domaines des GPCR. Contrairement à d'autres modifications post-traductionnelles, la glycosylation est stable et importante pour la maturation et le repliement correct des protéines nouvellement synthétisées, y compris les GPCR (135, 136).

PAR1 contient le plus grand nombre de sites consensus de glycosylation liés au N-terminale parmi les quatre PAR, avec trois sites résidant à l'extrémité N-terminale et deux situés dans la deuxième boucle extracellulaire (135). Des études antérieures ont démontré que PAR1 est glycosylé de manière variable, provoquant la migration du récepteur sous forme d'espèces multiples (125, 137). Plusieurs études ont démontré que la glycosylation N-terminale est nécessaire pour l'expression de PAR1 à la surface cellulaire. Alternativement, l'absence de glycosylation de PAR1 peut permettre une plus grande flexibilité du domaine ECL2 et une stabilisation de la conformation du récepteur actif en favorisant un amarrage plus efficace de la protéine G (138, 139).

Dans une étude utilisant un modèle de cellules HeLa, le mutant PAR1 déficient en glycosylation au niveau d'ECL2 a favorisé le couplage à la signalisation PI médiée par G_q par rapport à l'activation de RhoA induite par $G_{12/13}$, à l'opposé du récepteur WT glycosylé (139). Curieusement, PAR1 WT et le mutant étaient tout aussi efficaces pour le couplage à Gi et à la β-arrestine-1. La glycosylation liée au N-terminale de PAR1 au niveau d'ECL_2 a également amélioré la formation de fibres de stress induite par RhoA induite par la thrombine et atténué la prolifération cellulaire dans les fibroblastes, ce qui est cohérent avec un couplage préférentiel aux protéines $G_{12/13}$ par rapport aux protéines G_q. Ces études sont les premières à montrer que

la glycosylation liée au N-terminale des GPCR est essentielle à la spécificité du couplage de la protéine G (140).

Bien que PAR1 ait été largement étudié pour son rôle dans la coagulation, l'hémostase, la cicatrisation des plaies et l'inflammation, il existe également des preuves qui soutiennent son rôle dans l'activité cérébrale, la mitogenèse, la croissance tumorale, prolifération cellulaire, l'angiogenèse, entre autres (141-143).

Pour trouver des explications potentielles à la diminution de la fertilité chez l'espèce bovine, il est nécessaire d'étudier en profondeur les mécanismes moléculaires sous-jacents aux différents stades du développement folliculaire, en particulier ceux impliquant le follicule ovulatoire et le processus d'ovulation.

CHAPITRE 3

Justification, hypothèses et objectifs

3.1. Justification, hypothèses et objectifs

3.1.1. Justification

Le succès de la production des vaches laitieres dépend fortement de la fertilité, mais il est prouvé que l'efficacité de la reproduction des vaches a décliné à l'échelle mondiale au cours des 50 dernières années (même si une certaine stabilisation et amélioration a été rapportée ces dernières années (10, 144). Augmenter la fertilité des vaches est une approche permettant de répondre à la demande de lait et de produits laitiers alors que la population continue d'augmenter. Ceci peut être accompli en utilisant la sélection génétique pour cibler des taureaux plus fertiles, augmentant ainsi les taux de réussite de la reproduction et réduisant le besoin de génisses de remplacement. Toutefois, en raison de la forte pression de sélection exercée sur les qualités de productivité au cours des dernières décennies, la fertilité des vaches a chuté. L'influence pléiotropique des gènes et des mécanismes biologiques sous-jacents à la fertilité et à la production, comme la prolifération cellulaire et le métabolisme de conservation de l'énergie, est l'une des causes de cette baisse de la fertilité. Pour éviter ces conséquences défavorables de la sélection, des études plus approfondies sur la biologie fonctionnelle associée aux caractéristiques reproductives des vaches sont nécessaires (2, 73).

La recherche sur les mécanismes du développement folliculaire et de l'ovulation est menée à la fois *in vivo* et *in vitro* depuis des décennies. Ces travaux ont mis en évidence des voies de signalisation complexes et un large éventail de gènes qui sont régulés de manière variable pour

permettre la libération efficace d'un ovocyte fécondable et compétent. La dynamique folliculaire chez la vache permet le déclenchement de processus tels que la puberté, le cycle œstral, qui vont permettre la conception, la poursuite de la gestation, le vêlage et la production de lait comme phases de la vie reproductive de la vache. Pour cette raison, il est essentiel de comprendre les mécanismes impliqués dans le développement du follicule pré ovulatoire, les changements qu'il subit pendant l'ovulation et la lutéinisation vue que ces processus affectent la qualité de l'ovocyte produit, le développement embryonnaire précoce et la formation d'un corps jaune fonctionnel pour garantir la gestation.

L'étude de ces processus enrichira notre compréhension des mécanismes de l'ovulation et nous permettra d'inverser la baisse de la fertilité et de l'infertilité chez le bétail. Une efficacité de reproduction élevée est une condition préalable au succès économique du marché laitier bovin au Canada.

3.1.2. Hypothèse

Nos études antérieures ont démontré l'induction de la protéine ASB9 dans les cellules de granulosa de follicules ovulatoires 24 heures après l'injection d'hCG ou le pic endogène de LH (13, 14, 16). De plus, notre étude récente sur l'inhibition de l'expression d'ASB9 à l'aide de la technologie CRISPR/Cas9 a montré que l'inhibition d'ASB9 a augmenté la prolifération des cellules de granulosa, démontrant l'importance d'ASB9 dans les cellules granulosa du follicule ovulatoire (16). Nos études ont également identifié des partenaires de liaison potentiels d'ASB9 dans les cellules de granulosa, tels que TNFAIP6, TAOK1, PAR1 et HIF1A. En dehors de ces études, aucune autre ne montre le mode d'action, la fonction et l'impact d'ASB9 sur les partenaires de liaison, en particulier avec PAR1, au cours du développement folliculaire et l'activité des cellules de granulosa bovines. Par conséquent, pour ce projet, nous avons émis l'hypothèse qu'ASB9 inhiberait la voie de signalisation MAPK dans les cellules de granulosa de follicules ovulatoires en ciblant des protéines spécifiques telle que PAR1, ce qui conduirait à un contrôle de l'activité des cellules de granulosa (blocage de la prolifération et à l'initiation de la différenciation des cellules).

3.1.3. Objectifs

Les objectifs de ce projet étaient donc les suivants :

1) analyser la régulation de PAR1 lors du développement folliculaire et dans les cellules de granulosa en culture traitées avec LH ou FSH ;

2) étudier le rôle d'ASB9 dans la régulation de protéines cibles (PAR1) en surexprimant ASB9 dans les cellules de granulosa ;

3) analyser l'effet d'ASB9 sur les voies de signalisation activées par PAR1 (MAPK) ;

4) analyser les effets d'ASB9 sur l'activité des cellules de granulosa (prolifération, apoptose, différentiation et stéroïdogenèse).

CHAPITRE 4

ARTICLE

This manuscript is submitted to the **Scientific Reports**
(under review)

Submission number: 51f5840e-1715-427d-9378-a242cc8220c3

Role of Ankyrin-repeat and SOCS-Box Protein 9 (ASB9) in PAR1 Inhibition and the MAPK Signaling Pathway in the Bovine Ovary

Daniela Naranjo Gonzalez[1,2] and Kalidou Ndiaye[1,2]

[1] Centre de Recherche en Reproduction et Fertilité, CRRF, Département de Biomédecine Vétérinaire, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada

[2] Département de Biomédecine Vétérinaire, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada

Corresponding author's name and email address: Kalidou Ndiaye: Centre de Recherche en Reproduction et Fertilité (CRRF), Département de Biomédecine Vétérinaire, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada;

E-mail: k.ndiaye@umontreal.ca; Tel. (450) 773-8521, ext. 8287.

Abstract

Members of the Ankyrin-repeat and SOCS-box protein (ASB) family, which are E3 ubiquitin ligases, regulate cell proliferation, differentiation, carcinogenesis, and the cell cycle in various cell types, including granulosa cells (GCs). We previously identified ASB9 as an LH/hCG-induced gene in GCs of bovine ovulatory follicles. We also reported that the target binding partners of ASB9 include protease-activated receptor 1 (PAR1). However, the exact roles of ASB9 in GC activity and its impact on various signaling pathways need to be fully investigated. In this project, we aimed to study the mechanisms of action of ASB9 in GC and to determine whether ASB9 induction by LH/hCG is necessary for the regulation of target genes such as PAR1 and signaling pathways involved in GC function and activity. Cultured GCs were treated with different doses of FSH, LH and thrombin. RT–qPCR analyses revealed that thrombin increased *PAR1* expression in GCs ($p<0.05$), while FSH had no effect on *PAR1*. Treatment with LH significantly reduced *PAR1* ($p<0.05$), even in the presence of thrombin, demonstrating the downregulation of *PAR1* by LH, possibly via the concomitant induction of ASB9 by LH. Western blot results showed that ASB9 expression in GCs *in vitro* increased 12 hours after treatment with LH ($p<0.05$). Furthermore, the phosphorylation profile of MAPK3/1 (ERK1/2) in thrombin-treated GCs suggested PAR1-mediated control, while the presence of ASB9 in GCs appeared to have a negative effect on the MAPK pathway. Finally, thrombin blocked the negative effect of ASB9 on PAR1 very early (within 1 hour of treatment), while thrombin did not affect ASB9 at 6 and 12 hours of treatment. Proliferation assays showed that ASB9 negatively regulates GC number as well as the proliferation marker *CCND2,* while the apoptosis marker *BAX2* increased with LH treatment. Together, these data provide evidence of the mode of action of ASB9 and its potent functional effects on PAR1 regulation, GC proliferation and differentiation, as well as the ovulatory process in bovine species.

Keywords: Fertility, Ovary, Bovine, Granulosa cells, Cell cycle, Proliferation, MAPK, Apoptosis, ASB9, PAR1.

Background

The physiological trigger that promotes ovulation and luteinization of preovulatory follicles is the surge of gonadotropins (LH/FSH). Specific biochemical and molecular alterations in follicular cell function characterize these two processes (1). When the last dominant follicle in a cow undergoes differentiation during the normal estrous cycle, the pituitary gland releases more estradiol, which raises preovulatory luteinizing hormone (2). Briefly, ovarian preovulatory follicles are stimulated by LH to initiate a series of signaling events that eventually disrupt the ovarian follicle wall and release an oocyte into the oviduct for fertilization (3-5). However, for this cascade to occur, some early signaling pathways are triggered, such as mitogen-activated protein kinase 3/1 (MAPK3/1), also known as ERK1/2, and AKT signaling, which in turn stimulates the expression of genes essential for cumulus expansion, oocyte maturation, ovulation and luteinization (6-8). For instance, the LH-mediated surge in intracellular signaling consequently causes the rapid downregulation or silencing of genes in GCs that regulate the growth of a bovine dominant follicle, while LH/hCG stimulates an array of genes involved in ovulation and luteinization, as demonstrated in a variety of species, including rodents and bovine species.

Data from various laboratories have identified genes that are induced in granulosa cells of bovine ovulatory follicles in response to LH surge or hCG injection, such as Ankyrin repeats and suppressor of cytokine signaling (SOCS)-box protein 9 (ASB9) (9-12). ASB9 is a member of the ASB family and is differentially expressed in ovulatory follicles compared to other stages of

follicular development (10, 12). The SOCS box protein superfamily includes 18 protein members that make up the ankyrin repeat and SOCS box containing (ASB) family. These proteins interact with Cul5-Rbx2 to form E3 ubiquitin ligases (E3), which play significant roles through ubiquitination-mediated pathways (13-15). However, ASB members interact with a wide range of target substrates, so they have a variety of other functions, including regulation of the cell cycle, carcinogenesis, proliferation and apoptosis (16, 17).

To better understand the role of ASB9 in granulosa cells, we sought to confirm that ASB9 controls granulosa cell function by altering target genes. ASB9 modulates binding partners such as protease-activated receptor 1 (PAR1) to inhibit GC proliferation. ASB9 alters MAPK signaling by modulating binding partners such as PAR1. PAR1 is a seven transmembrane domain G protein-coupled receptor (GPCR) and is uniquely activated by N-terminal proteolytic cleavage (18). Cleavage of the N-terminus unmasks a tethered ligand that binds to the receptor and triggers intracellular signaling (19, 20). The activation of PAR1 by thrombin has been shown to lead to the activation of the MAPK3/1 signaling pathway, resulting in increased proliferation, while the inhibition of PAR1 and MAPK3/1 activation inhibits cell proliferation and migration (21).

Our most recent study showed that ASB9 is a regulator of granulosa cell (GC) activity and function (12). The current study aimed to investigate the role of ASB9 induction in GC. More specifically, we used *in vivo* and *in vitro* bovine granulosa cell models to analyze the regulation of PAR1 and investigate the effects of ASB9 on PAR1-activated signaling pathways (MAPKs) and overall granulosa cell activity.

Methods

Cell Culture

For the *in vitro* model, bovine ovaries were obtained from the slaughterhouse, irrespective of the stage of the estrous cycle, and granulosa cells (GCs) were collected from medium and large follicles (follicle size ≥ 6 mm). GC from six to eight follicles were collected by aspiration, pooled, and washed by centrifugation at 2 500xg for 8 min. Cell viability was estimated with 0.4% Trypan blue stain, and cells were seeded at a density of 1×10^6 and cultured in 24-well plates (n = 3 independent experiments) to analyze gene and protein expression following various treatments.

Serum-free culture. Cultures were performed in serum-free McCoy's 5A medium supplemented with L-glutamine (2 mM), insulin (10 ng/ml), nonessential amino acids (1 mM), bovine serum albumin (BSA; 0.1%), sodium selenite (4 ng/mL), transferrin (5 µg/mL), androstenedione (100 nM), penicillin (100 IU), and streptomycin (0.1 mg/ml). The cells were incubated at 37°C in a humidified 5% CO_2 atmosphere for 6 days. The medium was replaced every 48 h with fresh medium. Treatments were performed to analyze the effects of FSH, LH and thrombin on ASB9 and PAR1 expression in GC. The treatments consisted of the addition of exact amounts of FSH (1 ng/mL), LH (10 ng/mL) and thrombin (10 mg/mL) in separate experiments and for different durations (15 min, 30 min, 1 h, 6 h and 12 h), followed by analyses of the target proteins ASB9 and PAR1.

Serum-based culture. Cultures were performed in McCoy's 5A medium containing L-glutamine (2 mM) supplemented with fetal calf serum (2%), insulin (10 ng/ml), nonessential amino

acids (1 mM), sodium selenite (4 ng/mL), transferrin (5 µg/mL), androstenedione (100 nM), penicillin (100 IU), streptomycin (0.1 mg/ml) and follicle-stimulating hormone (FSH; 1 ng/ml). FSH was added to the culture medium to induce LH receptor expression prior to treating the cells with LH. The cells were incubated at 37°C in a humidified 5% CO_2 atmosphere for 48 h. The medium was then replaced with serum-free McCoy's medium without FSH for 18 h, after which LH or thrombin was added without any changes to the medium. Treatments were performed to analyze the LH-induced effects and thrombin-induced effects on ASB9 and PAR1 expression in GC. The treatments consisted of the addition of exact amounts of LH (10 ng/mL) and thrombin (10 mg/mL) in separate experiments and for different durations (15 min, 30 min, 1 h, 6 h and 12 h), followed by analyses of the target proteins ASB9 and PAR1, respectively.

RNA preparation and RT–qPCR analyses

Total RNA was extracted from bovine GCs of *in vitro* samples using the TRIzol Plus RNA Purification Kit (Invitrogen) and quantified by absorbance at 260 nm using a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). Reverse transcription was performed using SMART Scribe Reverse Transcriptase (Takara Bio). cDNA levels were analyzed by RT-qPCR using SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad) following the manufacturer's instructions. Common thermal cycling parameters were used to amplify each transcript. RT-qPCR data were analyzed using the Livak ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) method (22) with *RPL19* used as a housekeeping gene (23). Bovine-specific primer sequences for *ASB9*, *PAR1*, *TNFAIP6*, *AREG*, *RPL19*, *StAR*, *CYP11A1* and *CYP19A1* were used, as presented in *Table 1.*

Table 1. Primers used for qPCR analysis of *Bos taurus* gene expression.

Gene name	Primer sequences (5`- 3`)[a]	Accession #	AS (bp)
AREG	Fwd: CTTTCGTCTCTGCCATGACCTT; Rv: CGTTCTTCAGCGACACCTTCA	NM_001099092.1	192
ASB9	Fwd: TCACTGCAGATCGTGTGTCTC; Rv: TCTTAGCAGCTTCGTGGATGG	AY438595	165
BAX	Fwd: TGTCGCCCTTTTCTACTTTGC; Rv: CAAAGATGGTCACTGTCTGCC	NM_173894	200
CCND2	Fwd: GGGCAAGTTGAAATGGAACCT; Rv: TGGCAAACTTGAAGTCAGTGG	NM_001076372	155
CYP11A1	Fwd: GTGCAAGTGGCCATCTATGCC; Rv: GTGTCCACGTCACCGATATGC	NM_174305.1	161
CYP19A1	Fwd: ATCTGTGCTGATTCCATCACCAAG; Rv: GAAGGAGAGCTTGCCATGCATC	NM_176644.2	167
PAR1	Fwd: GCCTGGCTGACTGTCTTTATC; Rv: AGCACACACACGAAGAGTACG	NM_001103097	170
RPL19	Fwd:GACCAATGAAATCGCCAATGC; Rv: ACCTATACCCATATGCCTGCC	NM_001040516	154
StAR	Fwd: GGAAAAGACACGGTCATCACT; Rv: AGTTTGGTCCTTGAGGGACTT	NM_174189.3	177
TNFAIP6	Fwd: CTCCAGGCTTCCCAAATGAGT; Rv: GCTGGGTCATCTTCAAGGTCA	NM_001007813	118

Abbreviations: AS, amplicon size (base pairs); Fwd, forward primer; quantitative reverse transcription polymerase chain reaction; Rv, reverse primer. [a]All primers were designed and validated by the authors. Each primer was used at a final concentration of 600 nM.

Western blot analyses

Granulosa cells from *in vitro* samples were obtained as described above, and the cells were lysed with M-PER buffer (Thermo Fisher Scientific) supplemented with complete protease inhibitors (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's protocol. Protein concentrations were determined using a Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). Western blot analyses were performed as previously described (12). Samples (6 µg of total protein per line)

were resolved on Novex WedgeWell 4-20% Tris-glycine mini-gels (Invitrogen) and electrophoretically transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (PVDF; Bio-Rad) in a Bio-Rad Wet Blot Transfer Machine. After transfer, the membranes were incubated with blocking buffer (5% nonfat dry milk in TTBS (10 mM Tris-HCL, 150 mM NaCl, and 0.1% Tween-20; pH 7.5)) for 2 h. The membranes were then incubated overnight at 4°C with specific primary antibodies against ASB9 (Abcam; 1 ng/mL), MAPK3/1 and p-MAPK3/1 (both from Cell Signaling; 1:1000), and PAR1 (Invitrogen; 0.5 mg/mL). Immunoreactive proteins were visualized by incubation with a goat anti-rabbit secondary antibody coupled with HRP (Cell Signaling; 1:1000) for anti-ASB9, anti-MAPK3/1 and anti-p-MAPK3/1 and a rabbit-anti-goat IgG (H+L) secondary antibody (Invitrogen; 1:1000) for anti-PAR1 for 2 h at room temperature. Revelation was performed using the SuperSignal West Atto Ultimate Sensitivity Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific). β-actin was used as a reference protein with anti-β-actin antibodies (ACTB; Santa Cruz; 200 µg/ml; 1:2000). Semiquantitative analysis was performed using NIH ImageJ software.

Functional analyses

The pQE system (Qiagen) was used for the cloning of ASB9 and generation of the pQE-ASB9 plasmid construct for ASB9 overexpression in GC (10). GC cells were collected from the ovaries of the slaughterhouse and cultured in 12-well plates at a density of 1×10^6 cells/well in McCoy's 5A medium as described above (n = 2 independent experiments with triplicate wells for each treatment). GC cells were transfected with the pQE-ASB9 construct using Xfect Transfection Reagent (Takara Bio) according to the manufacturer's protocol. Nanoparticle complexes from the Xfect transfection kit were applied to GC and incubated for 9 h at 37°C, after which they were

removed and replaced with serum-free McCoy's medium without supplementation for 24 h. Treatments were added without medium change. The treatments consisted of the addition of exact amounts of LH (10 ng/mL) and thrombin (10 mg/mL) in separate experiments and for different durations (15 min, 30 min, 1 h, 6 h and 12 h). The cells were collected for protein extraction and western blot analyses. The effects of ASB9 overexpression were assessed by analyzing the expression of ASB9 and protease activate receptor 1 (PAR1). The MAPK pathway was also verified by analyzing the phosphorylation levels of MAPK3/1 (ERK1/2).

Proliferation and caspase 3/7 activity assays

Granulosa cells were plated in 96-well plates ($1x10^4$ cells per well) in McCoy's medium and then treated with LH (10 ng/mL) or thrombin (10 mg/mL). Cell number was measured using CellTiter Proliferation and Viability Assays (Promega). Then, 20 µl of MTS assay reagent was added to each well, and the plates were incubated at 37°C for 2 h. The absorbance at 490 nm was read in a SpectraMax luminometer plate reader (Molecular Devices). For caspase 3/7 activity, GCs were also cultured in 96-well plates ($1x10^4$ cells per well) and treated with LH or thrombin. Caspase 3/7 activity was determined using a luminescent assay (Caspase-Glo 3/7 Assay; Promega Corp.). Caspase-Glo 3/7 reagent (100 µl) was added to the culture plate, and the cells in the culture medium were incubated at room temperature for 1 h before the luminescence of each well was measured at 490 nm in a SpectraMax luminometer plate reader (Molecular Devices).

Statistical analysis

The statistical analyses for all *in vitro* experiments were performed using Prism software 10 for macOS (GraphPad Software Inc.). Samples or treatments were compared using one-way

analysis of variance (24). When ANOVA indicated a significant difference (25), the Tukey-Kramer test was used for multiple comparisons of individual means among treatments and times. The data are presented as the means ± SEMs, and variables whose p value was <0.05 are represented by an asterisk (*) or with different letters. RT-qPCR data are presented as normalized amounts of the respective genes relative to $2^{-\Delta\Delta Ct}$ using *RPL19* as a housekeeping gene.

Results

ASB9 and PAR1 expression are differentially regulated by gonadotropins (LH and FSH) and thrombin.

We previously performed CRISPR/Cas9-mediated knockdown of ASB9 in GC to verify the effects of ASB9 silencing on target binding partners (12). The data showed that ASB9 influences the MAPK3/1 pathway in granulosa cells by presumably interacting with PAR1 on LH-regulated ovulatory genes. In the present study, we sought to investigate the mechanism of action and function of ASB9 in bovine GCs, as well as the impact of PAR1 on granulosa cell activity. First, we used an *in vitro* model of GCs collected from follicles. Total RNA was extracted from cultured GCs after FSH, LH and thrombin treatments (15 min and 1 h). The ASB9 and PAR1 levels in the samples were analyzed by quantitative RT-qPCR using the specific primers listed in *Table 1*.

PAR1 induction in GCs *in vitro* was significantly greater following treatment with thrombin for 1 h (Figure 1A, p<0.05), whereas FSH had no effect on *PAR1* expression. However, the combination of FSH and thrombin resulted in a much greater increase in *PAR1* expression than

thrombin alone (p<0.05). In contrast, *PAR1* was significantly reduced with LH treatment (1 h), even in the presence of thrombin (Figure 1B, p<0.05), suggesting negative regulation of *PAR1* by LH, possibly via ASB9. The results also showed that *ASB9* expression decreased significantly in the presence of thrombin, while LH induced *ASB9* expression (Figure 1C and D, p<0.05).

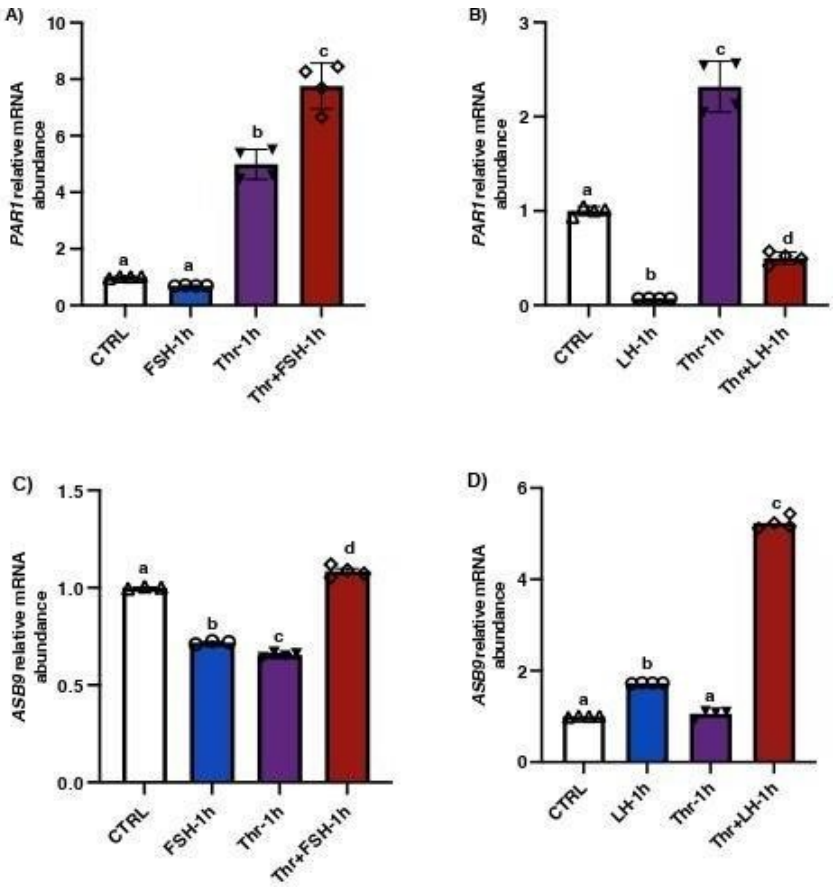


Figure 1. *PAR1* and *ASB9* regulation in granulosa cells (GCs) after FSH, LH and thrombin treatments. (A and B) RT–qPCR analyses of *in vitro* samples indicated greater expression of *PAR1* mRNA in thrombin-treated cells, while treatment with LH significantly decreased *PAR1* expression (b, c, p<0.05). *PAR1* mRNA expression increased in cells treated with the combination of FSH and thrombin (b, c, p<0.05). (C and D) RT–qPCR analyses of *in vitro* samples showed

greater expression of *ASB9* mRNA in cells treated with LH than in cells subjected to other treatments ($p<0.05$). *ASB9* mRNA expression decreased in the presence of thrombin or FSH, although the combination of FSH and thrombin resulted in stronger *ASB9* expression thantreatment with FSH or thrombin alone (d, $p<0.05$). CTRL, control; FSH, follicle-stimulating hormone; LH, luteinizing hormone; Thr, thrombin. Time: 1 h, 1 h; 15 min, 15 min. n = 4 repetitionsfor each sample. *$p<0.05$. ANOVA, Tukey-Kramer multiple comparison.

ASB9 effects on target binding partners

To better understand the mechanism of action and function of ASB9 in bovine GCs and its effects on PAR1, we performed a second experiment using the same *in vitro* model of GCs collected from medium and large follicles (follicle size ≥ 6 mm). Total RNA was extracted from collected GCs after LH and thrombin treatments (15 min, 1 h, 6 h and 12 h). The ASB9 and PAR1 expression in the samples was analyzed by RT-qPCR. In addition to mRNA expression analyses, total protein extracts were analyzed by western blot using anti-ASB9 antibodies to verify ASB9 regulation *in vitro* following treatment with LH. Western blot results revealed that ASB9 protein expression in GCs *in vitro* increased 12 h after treatment with LH (Figure 2A, $p<0.05$), confirming previously reported results from our laboratory using an *in vivo* model (12). Basal ASB9 expression also increased over time since there was more protein in the control at 12 h than in the control at 30 minutes. However, the effect of LH induction in combination with thrombin more than doubled the amount of the ASB9 protein in GCs (Figure 2A, $p<0.05$). On the other hand, the qPCR results indicated greater expression of *PAR1* in cells treated with thrombin, while treatment with LH significantly decreased the expression of PAR1 at 6 h and 12 h, even in the presence of

thrombin (Figure 2D and E, $p<0.05$). This suggests that while thrombin seems to counter the negative effects of ASB9 on *PAR1* early on (1 h), thrombin does not affect ASB9 at 12 h when LH-induced ASB9 expression is increased.

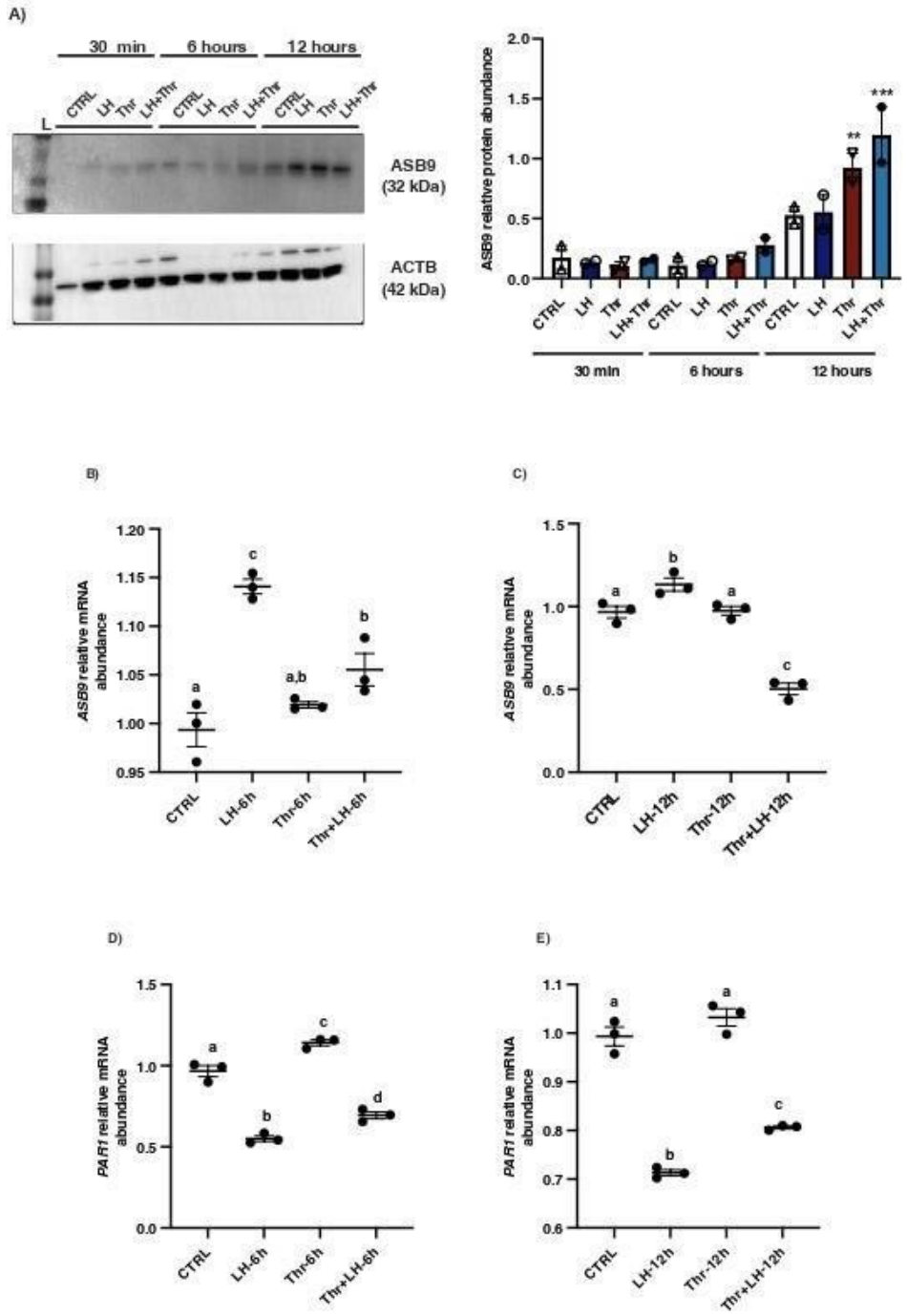


Figure 2. *ASB9* and *PAR1* regulation in granulosa cells (GCs) after LH and thrombin treatments. (A) Western blot analyses of *in vitro* samples revealed stronger ASB9 induction at 12 h post-LH treatment than at 30 min and 6 h post-LH treatment. The combination of LH and thrombin after 12 h significantly increased ASB9 expression compared to that in the separate treatments ($p<0.05$). Beta-actin was used as a control. RT–qPCR analyses of *in vitro* samples showed increased *ASB9* mRNA expression in cells treated with LH at 6 h and 12 h (B and C). In contrast, thrombin treatment significantly decreased *ASB*9 expression at 6 h ($p<0.05$), but thrombin had no effect on *ASB*9 expression at 12 h ($p<0.05$). Moreover, the results indicated greater expression of *PAR*1 mRNA in cells treated with thrombin, while LH treatment significantly decreased *PAR1* expression at both 6 h ($p<0.05$) and 12 h ($p<0.05$) (D and E). *In vitro* samples for RT–qPCR: CTRL, control; LH, luteinizing hormone; Thr, thrombin; ACTB, β-actin; h, hours; n = 3 repetitions for each sample. Different letters denote significant differences among samples ($p<0.05$). ANOVA, Tukey-Kramer multiple comparison.

Regulation of PAR1 during follicular development in GC

Total protein extracts were analyzed by western blot using anti-PAR1 antibodies. The results revealed no change in the amount of PAR1 at 15 min, 30 min or 1 h (Figure 3A). Despite the absence of a change in protein expression, thrombin could stimulate PAR1 expression in GCs, as shown by the qPCR analysis, and *PAR1* mRNA expression increased significantly in thrombin-treated GCs at 15 min (Figure 3B).

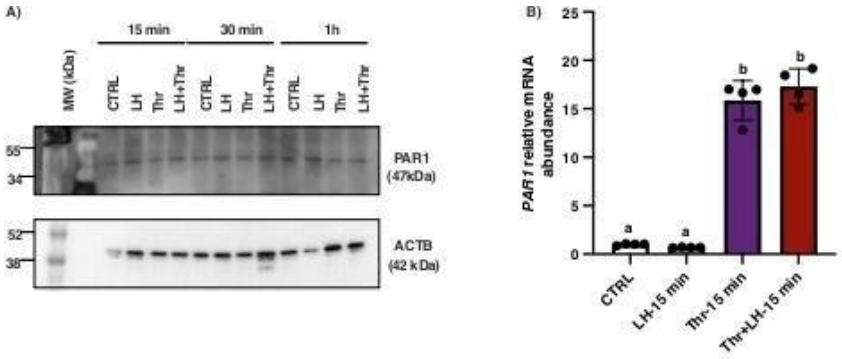


Figure 3. PAR1 protein expression and regulation in bovine granulosa cells post-LH and thrombin treatments. Western blot analyses of *in vitro* samples showed that PAR1 expression remained unchanged. *In vitro* samples: CTRL, control; LH, luteinizing hormone; Thr, thrombin; min, minutes. n = 3 repetitions for each sample.

Thrombin treatment increased MAPK3/1 (ERK1/2) phosphorylation in GC, possibly through PAR1

To analyze the regulation of MAPK phosphorylation by PAR1 in GC, we investigated PAR1 induction using *in vitro* GC culture at different times after LH and thrombin treatment (15 minutes, 30 minutes and 1 hour; n = 3 for each time point). Total protein extracts were analyzed by western blot using tMAPK3/1 and pMAPK3/1 antibodies, and the ratio of pMAPK3/1 to tMAPK3/1 and the ratio of tMAPK3/1 to β-actin were analyzed and compared among the various treatments and times. Western blot analyses revealed a relative increase in the level of MAPK3/1 phosphorylation in GCs very early following treatment with thrombin (Figure 4A, B). This relative increase in MAPK3/1 phosphorylation is likely modulated by an increase in PAR1 in response to thrombin treatment.

Furthermore, we analyzed MAPK phosphorylation in cultured GCs in response to LH treatment. Analyses revealed that pMAPK3/1 significantly increased at 30 min, while total MAPK3/1 significantly decreased at the same time and at 1 h post-LH treatment (Figure 4). These data are also consistent with previously published data using *in vitro* samples following treatment with LH at different times (15 min, 30 min, 1 h, and 12 h) in ASB9-inhibited GCs (12).

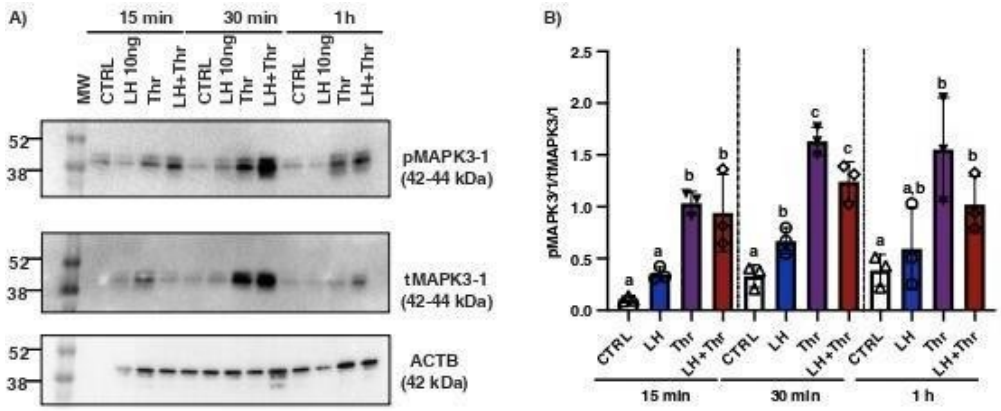


Figure 4. MAPK3/1 protein expression and regulation in bovine granulosa cells post-LH and thrombin treatments. Western blot analyses using *in vitro* samples showed an increase in MAPK3/1 phosphorylation in GCs treated with thrombin. CTRL, control; LH, luteinizing hormone; Thr, thrombin; ACTB, β-actin; min, minutes; n = 3 repetitions for each sample. Different letters denote significant differences among samples ($p<0.05$). ANOVA, Tukey-Kramer multiple comparison.

ASB9 affects proliferation, differentiation and apoptosis of GC cells in vitro

To analyze the effects of ASB9 on GC activity, we tested the expression of the steroidogenic enzymes *StAR*, *CYP19A1*, and *CYP11A1* and the LH-response genes *AREG* and *TNFAIP6 by RT-qPCR*. The mRNA levels of *CYP19A1* and *StAR* in GCs *in vitro* increased 12 h

after LH treatment (Figure 5F and J, $p<0.05$), while the expression of *CYP11A1* decreased at 6 h (Figure 5G, $p<0.05$). The expression of *AREG* and *TNFAIP6*, two LH response genes, increased after 6 h and 12 h of LH treatment (Figure 5A, B, C and D, $p<0.05$).

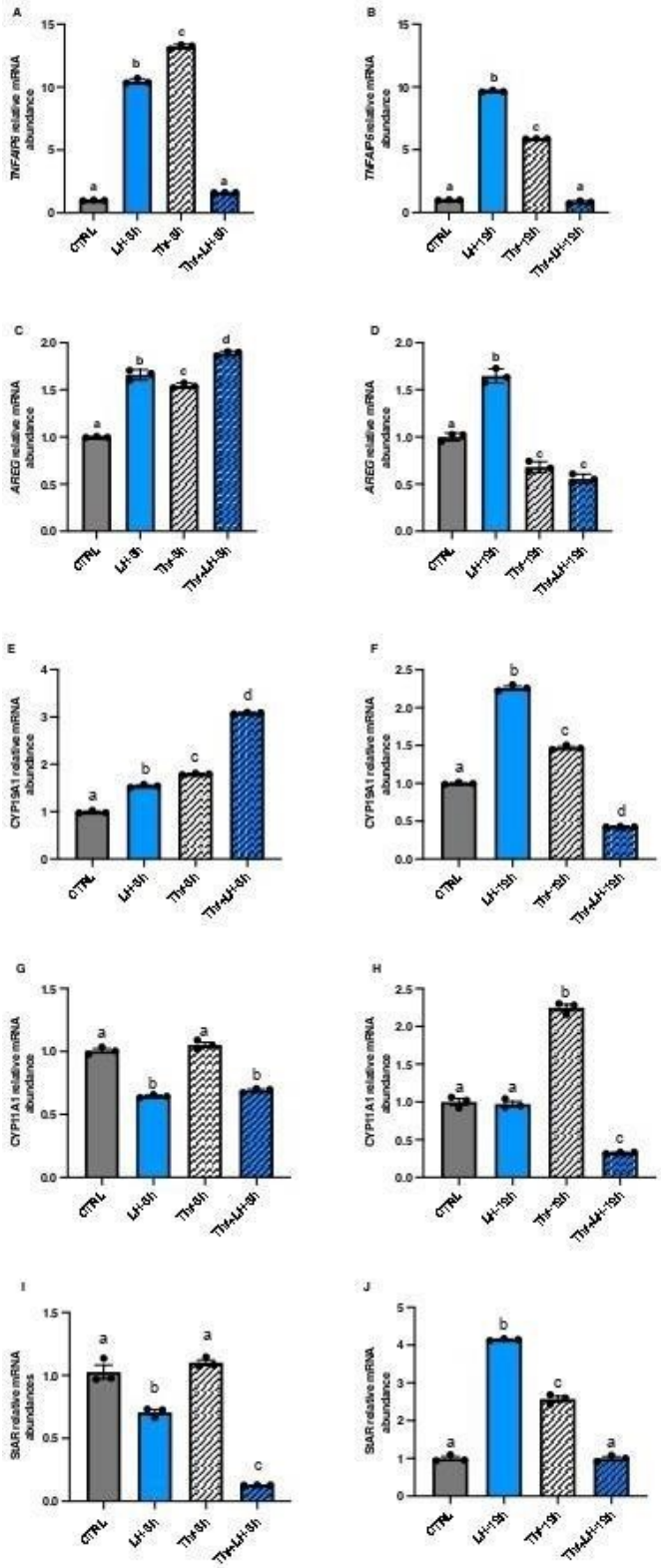

A
TNFAIP6 relative mRNA abundance
B
TNFAIP6 relative mRNA abundance
C
AREG relative mRNA abundance
D
AREG relative mRNA abundance
E
CYP19A1 relative mRNA abundance
F
CYP19A1 relative mRNA abundance
G
CYP11A1 relative mRNA abundance
H
CYP11A1 relative mRNA abundance
I
StAR relative mRNA abundances
J
StAR relative mRNA abundance
CTRL
LH-5h
TNF-5h
TNF+LH-5h
LH-15h
TNF-15h
TNF+LH-15h

Figure 5. Expression and regulation of the steroidogenesis markers *TNFAIP6* and *AREG* in GCs after LH and thrombin treatments. RT–qPCR analyses of *in vitro* samples revealed that *CYP11A1* mRNA expression (G and H) increased in the presence of LH or thrombin at 6 and 12 h but decreased in the presence of LH combined with thrombin at 12 h ($p<0.05$). *StAR* mRNA expression (I and J) decreased in cells treated with LH at 6 h but increased in cells treated with LH or thrombin at 12 h. Combined treatment with LH + thrombin reduced *StAR* expression at 6 and 12 h ($p<0.05$). The results showed greater expression of *TNFAIP*6 (A and B) and *AREG* (C and D) mRNAs and LH response genes in cells treated with LH at 6 and 12 h, while thrombin decreased their expression at 12 h ($p<0.05$). *CYP19A1* mRNA expression was reduced when cells were treated with LH at 6 and 12 h and increased in the presence of thrombin at 6 and 12 h ($p<0.05$). CTRL, control; LH, luteinizing hormone; Thr, thrombin; n = 3 repetitions for each sample. Different letters denote significant differences among samples ($p<0.05$). ANOVA, Tukey-Kramer multiple comparison.

We previously carried out yeast two-hybrid screening to identify ASB9 interactions in granulosa cells (10). Furthermore, experiments were conducted to analyze the effects of ASB9 on GC proliferation and apoptosis. Proliferation tests showed that following ASB9 overexpression, the number of GCs decreased (Figure 6A, $p<0.05$); however, ASB9 activity was unaffected by thrombin. After 6 h, treatment with LH significantly increased the expression of the proliferation marker *CCND2*, whereas at 12 h, *CCND2* expression was reduced (Figure 6B, $p<0.05$). This result was in contrast with thrombin treatment, which increased *CCND2* at both 6 and 12 hours (Figure 6C, $p<0.05$). On the other hand, the effects of LH on ASB9-mediated GC cell apoptosis were demonstrated, as *BAX2* expression increased (Figure 6D, $p<0.05$) but then decreased following

thrombin treatment (Figure 6E, $p<0.05$) at 12 h. However, the caspase 3/7 assay results did not significantly differ among the treatments.

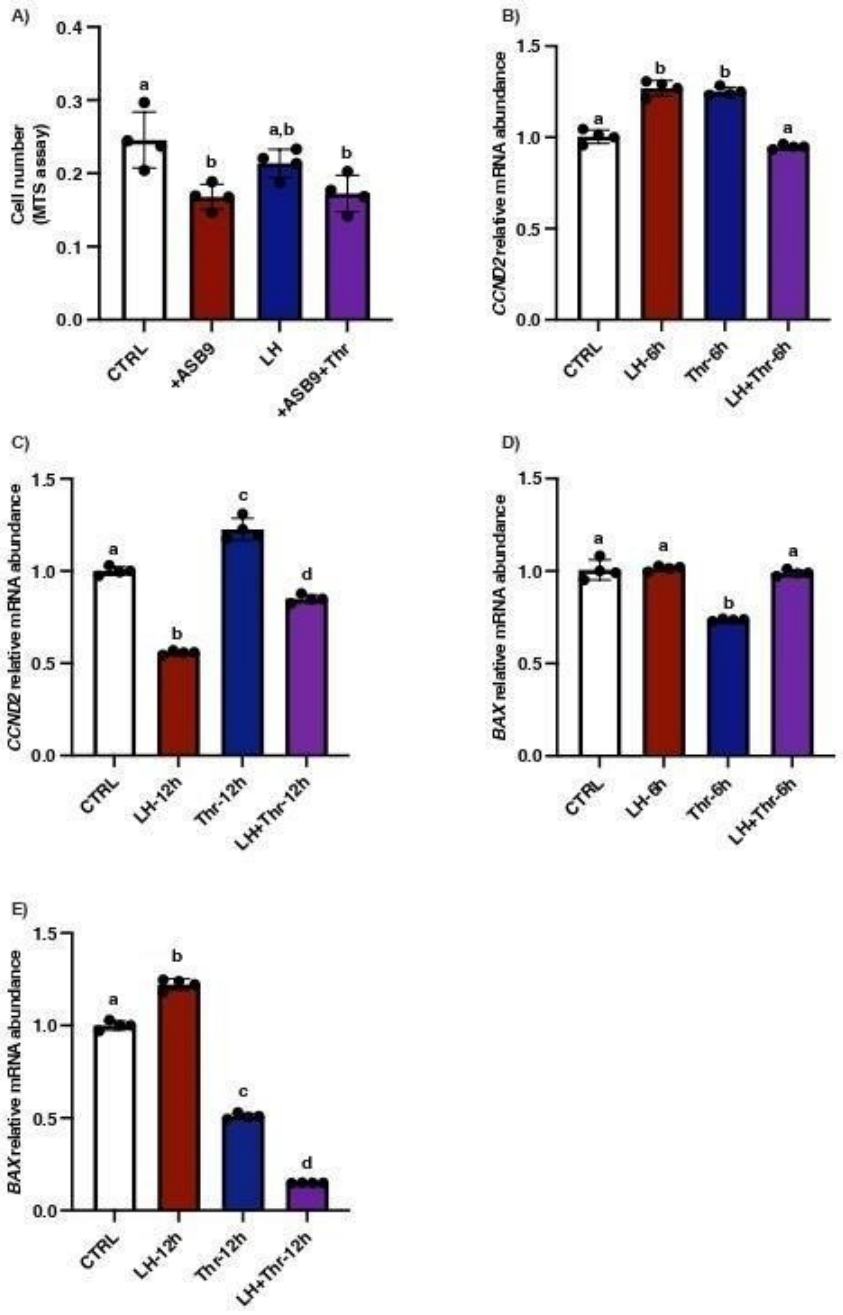


Figure 6. Effects of ASB9 overexpression and LH and thrombin treatments on granulosa cell (GC) proliferation and apoptosis. (A) Proliferation assay (MTS assay) analysis showed that the

number of GCs decreased following ASB9 overexpression, while the presence of thrombin did not affect the effect of ASB9 ($p<0.05$). (B and C) RT–qPCR analyses showed that treatment with LH resulted in a significant decrease in *CCND2* mRNA expression after 12 h ($p<0.05$), while treatment with thrombin for 6 h or 12 h resulted in an increase in *CCND2* ($p<0.05$). (D and E) RT–qPCR analyses of *in vitro* samples showed that *BAX2* expression was reduced after thrombin treatment (c, d, $p<0.05$) and increased in the presence of LH at 12 hours (b, $p<0.05$). CTRL, control; LH, luteinizing hormone; Thr, thrombin; +ASB9, ASB9 overexpression; n = 4 repetitions for each sample. Different letters denote significant differences ($p<0.05$). ANOVA, Tukey-Kramer multiple comparison.

The current data are consistent with previously reported data and support the hypothesis that ASB9 inhibits the MAPK signaling pathway in granulosa cells of ovulatory follicles by targeting specific proteins, such as PAR1, which blocks proliferation and the initiation of GC differentiation (Figure 7).

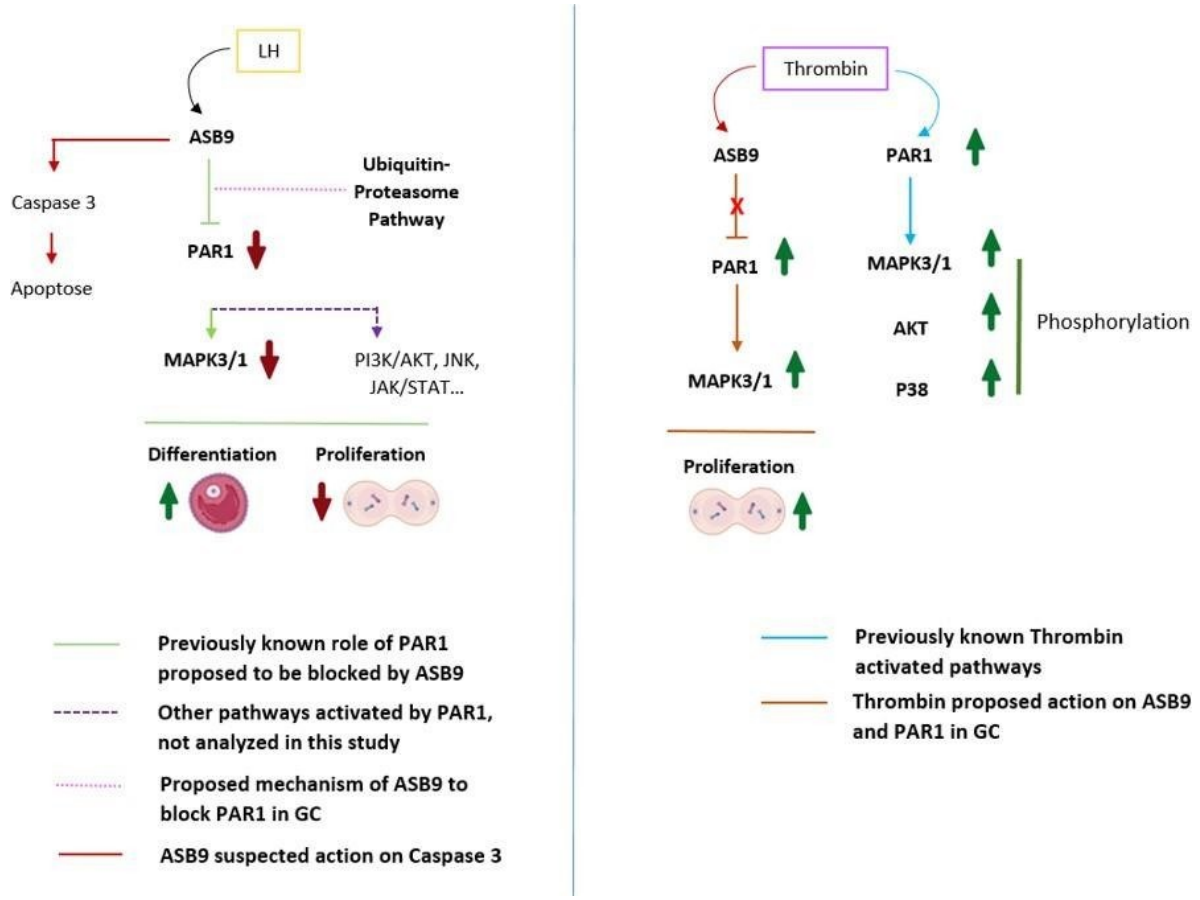


Figure 7. Proposed mechanism of action of ASB9 in GC on PAR1-induced cell proliferation. Induction of PAR1, which couples to G proteins, activates different intracellular signaling pathways, including the MAPK3/1 pathway, leading to cell proliferation. Following induction by LH/hCG, ASB9 binds to and inhibits PAR1, likely through the ubiquitin proteasome pathway of protein degradation, resulting in the inhibition of the PAR1-activated MAPK pathway and the reduction/blockade of granulosa cell proliferation. Granulosa cells expressing ASB9 after LH induction stop proliferating and instead move toward differentiation, which was also evidenced by a decrease in CCDN2 expression. Additionally, we suspect that ASB9 may contribute to cell death by upregulating the expression of proapoptotic markers, as evidenced by the data demonstrating increased BAX expression. Thrombin stimulation of PAR1 leads to the activation of different

signaling pathways, such as the MAPK3/1, AKT and P38 pathways. In granulosa cells, thrombin could block the negative action of ASB9, enabling increased proliferation/survival of granulosa cells through PAR1 and MAPK3/1 activation. PAR-1, protease-activated receptor-1; MAPK3/1, mitogen-activated protein kinase 3/1 (ERK1/2); JNK, c-Jun N-terminal kinase; JAK, Janus activated kinase; STAT, signal transducer and activator of transcription. AKT, protein kinase B; P38, p38 mitogen-activated protein kinase; GC, granulosa cell.

Discussion

In mammals, while the basal concentrations of FSH and LH are sufficient for the proliferation of follicular cells, preovulatory follicular maturation occurs under the influence of an increase in circulating LH (26). The preovulatory, pituitary LH surge activates a multistep process in the ovulatory follicle, stimulating a sequence of events, including cumulus cell expansion, terminal differentiation of granulosa cells (GC) into luteal cells, oocyte meiotic resumption, and follicle rupture (27, 28). Consequently, gonadotropin stimulation induces the differentiation of somatic cells in the ovary and regulates the expression of genes that impact follicle development and oocyte maturation (27, 29). Overall, during ovulation and oocyte maturation, LH activates a complex array of signaling cascades, including protein kinase A (PKA), protein kinase C (PKC), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), tyrosine kinase–mediated pathways and MAPK signaling pathways (29, 30). Coordination of these processes is necessary for the release of a mature, fertilizable oocyte and the formation of a corpus luteum, which can sustain the onset of pregnancy. These findings highlight the importance of carrying out gene functional studies during the later

stages of follicular development and ovulation to improve our understanding and coordination of ovarian activity.

We previously identified and reported that target genes, including ASB9, are downregulated in GCs of bovine ovulatory follicles following hCG/LH treatment (10, 12). The present study provides novel insight into the role of ASB9 in GC proliferation through the PAR1 and MAPK3/1 signaling pathways in GC using an *in vitro* model. We demonstrated that ASB9 protein expression in GCs increased 12 h after treatment with LH, mimicking and confirming previously reported results from our laboratory using an *in vivo* model (10, 12), which showed that ASB9 protein expression increased starting at 12 h, then increased at 18 h and reached the strongest induction in the ovulatory follicle at 24 h post-hCG injection. These data support the role of ASB9 in regulating the expression of downstream target genes and subsequent signaling pathways in the follicle prior to ovulation. Overexpression of ASB9 (LH-induced gene) led to a decrease in GC number. LH stimulation led to a decrease in the cell proliferation marker *CCDN2* (12 h after LH treatment), an increase in MAPK3/1 phosphorylation (30 min after LH treatment) and an increase in the abundance of the apoptosis marker *BAX*2 (12 h after LH treatment). These results are in line with previously reported data (10) and demonstrate that, by altering the expression of *CCND2*, ASB9 could have an effect on the G1 phase and the G1-S checkpoint of the cell cycle and seems to be associated with a reduction in GC proliferation. Research indicates that CCND2 is essential for ovarian folliculogenesis and plays a significant role in inducing the early-to-mid G1 phase transition (27). Conversely, the increase in *BAX2* expression in GCs following ASB9 induction with LH is consistent with the role of ASB9 as a brake on GC proliferation/cell cycle progression to initiate GC differentiation or control GC apoptosis. These observations could also suggest that ASB9 is involved in granulosa cell differentiation into luteal cells, similar to its perceived role in

mouse spermatogenesis, where overexpression of ASB9 in the spermatogonial stem cell (SSC) line significantly inhibited cell proliferation and increased apoptosis (31). Additionally, a recent study using porcine GCs showed that ASB9 inhibition increases GC number by regulating cell cycle-related genes, including *PCNA*, *CCND2*, and *CCNE2* (32).

Since our previous studies identified binding partners for ASB9 in GC, including PAR1 (9, 10, 12), we hypothesized that LH-induced ASB9 could regulate GC function by affecting MAPK3/1 signaling through PAR1 to block GC proliferation. PAR1 is a G protein-coupled receptor (GPCR) and is uniquely activated by N-terminal proteolytic cleavage (18). Cleavage of the N-terminus unmasks a tethered ligand that binds to the receptor and triggers intracellular signaling (33). The activation of PAR1 by thrombin has been shown to lead to the activation of the MAPK3/1 signaling pathway, resulting in increased proliferation, while the inhibition of PAR1and MAPK3/1 activation inhibits cell proliferation and migration (21). According to analyses of preovulatory DNA microarray data, LH/hCG can stimulate the thrombin-THBD-APC-PAR1/4 system in preovulatory follicles (34). The localization of prothrombin and PAR1 in GC suggests that these factors may be important mediators of cellular function in the ovarian follicle (35).

In this study, the data showed greater expression of *PAR1* in cultured granulosa cells treated with thrombin, while treatment with LH significantly decreased the expression of *PAR1* at both 6 h and 12 h, even in the presence of thrombin. This suggests that while thrombin seems to counter the negative effects of ASB9 on PAR1 early on (1 h), thrombin does not affect ASB9 at 12 h when LH-induced ASB9 expression is increased. This result supports our previous data from an *in vivo* model, which showed a reduction in *PAR1* expression in ovulatory follicles 24 h post hCG compared to day 5 dominant follicles (10). For a better understanding of PAR1 regulation, we administered thrombin to GCs in addition to LH and FSH. FSH had no effect on *PAR1*, thrombin

increased *PAR1* mRNA expression in GCs *in vitro*, and LH treatment decreased *PAR1*, even in the presence of thrombin, confirming that LH negatively regulates PAR1, potentially through ASB9 induction. ASB9 may have a negative effect on PAR1 through the well-known effect of ASB proteins, which regulate the turnover of a range of proteins by targeting them for polyubiquitination and subsequent proteasomal degradation (36).

Moreover, we analyzed MAPK3/1 phosphorylation in our *in vitro* model and detected a relative increase in MAPK3/1 phosphorylation in GCs very early following thrombin treatment. This relative increase in MAPK3/1 phosphorylation is likely modulated by an increase in PAR1 in response to thrombin treatment. Additionally, we examined the response of cultured GCs to LH treatment in terms of MAPK phosphorylation. The results of the analyses revealed that at 30 minutes, pMAPK3/1 significantly increased, while at the same time and one hour after LH treatment, total MAPK3/1 significantly decreased. These results align with our previously published data using *in vitro* samples following LH treatment at different times in ASB9-inhibited GC (12). The observations from *in vitro* experiments were comparable to the data in GC samples at 24 h post-hCG injection from an *in vivo* model demonstrating a significant reduction in pMAPK3/1 compared to tMAPK3/1 (12); moreover, ASB9 induction by LH was the strongest (10, 12).

LH-dependent phosphorylation and activation of MAPK3/1 have been demonstrated in granulosa cells of different species (30). Complex transcriptional regulation of target LH-induced genes is required for the control of GC growth and function via various signaling pathways. This regulation influences the optimal physiological status of the follicle before ovulation. The LH-induced MAPK3/1 pathway has been shown to be essential for ovulation (25). Inhibition of MAPK3/1 *in vivo* leads to an anovulatory phenotype with trapped oocytes and defective follicular

rupture (37). In mouse preovulatory follicles, LH stimulates the phosphorylation of MAPK3/1 within 30 minutes, and after two hours of stimulation, the phosphorylation levels increase. MAPK3/1 is first activated in mural granulosa cells and subsequently in cumulus cells over time (30, 38). Similarly, we provide insight into the potential role of PAR1 activation in cell proliferation through the MAPK3/1 signaling pathway. Moreover, it is known from the literature (39-42) that PAR1 dose-thrombin activation modulates cell survival through MAPK3/1 signaling pathway activation (43). Together, these findings suggest that LH-induced ASB9 is involved in regulating granulosa cell proliferation by affecting MAPK3/1 signaling through ASB9 binding partners such as PAR1. Two additional investigations that reported ASB9 involvement in cancer provided evidence of the detrimental effects of ASB9 on cell proliferation (44, 45). However, other research has demonstrated that thrombin-induced PAR1 activation in astrocytes triggers the MAPK3/1 signaling pathway, which in turn promotes the exponential growth of cells (46).

Conclusion

Collectively, the present results demonstrate that LH induces ASB9 in GC, which negatively modulates the ability of PAR1 to promote GC proliferation. The phosphorylation of MAPK3/1 in GCs treated with thrombin might be controlled by PAR1, whereas the induction of ASB9 by LH reduces MAPK phosphorylation. Our data also showed that thrombin could offset the negative effects of ASB9 but only for a short period of time prior to the maximum induction of ASB9 by LH. This study provides evidence that ASB9 plays a potent role in ovarian GC and is a central player in regulating granulosa cell proliferation and activity.

List of abbreviations

AKT, Protein Kinase B

APC, Actived protein C

AREG, Amphiregulin

ASB, Ankyrin repeat and SOCS-box protein

ASB9, Ankyrin repeat and SOCS-box protein 9

BAX2, Bcl-2 like protein 4

CCND2, Cyclin-D 2

CCNE2, Cyclin-E 2

Cul5-RBX2, Cullin-RING ligase 5 - RING protein RBX2

CYP11A1, Cytochrome P450 Cholesterol Side-Chain Cleavage, Family 11, Subfamily A, Polypeptide 1

CYP19A1, Cytochrome P450, Family 19, Subfamily A, Polypeptide 1

E3, Ubiqutin ligase

FSH, Follicle-Stimulating Hormone

GC, Granulosa Cell

GPCR, G protein-coupled receptors

hCG, Human Chorionic Gonadotropin

HRP, Horseradish peroxidase

LH, Luteinizing Hormone

MAPK, Mitogen-activated protein kinase / **ERK,** Extracellular signal-Regulated Kinase

PAR1, Protease Activate Receptor 1

PCNA, Proliferating cell nuclear antigen

RPL19, Ribosomal Protein L19

Declarations

Ethics approval

The Animal Ethics Committee of the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Montreal reviewed and approved all the experimental protocols, as the animals were cared for in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines.

Consent for publication

Not applicable

Availability of data and material

All the data generated or analyzed during this study are included in this published article.

Competing interest

The authors declare that they have no competing interests.

Funding

This study was supported by a Discovery Grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) (RGPIN#04516) to K. Ndiaye and by an Alliance Grant

from NSERC (#RN001413) to K. Ndiaye. The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Author contributions

Investigations, D.N.G. and K.N.; Visualization, D.N.G. and K.N.; Validation, D.N.G. and K.N.; Formal analysis, D.N.G. and K.N.; Writing-Original draft preparation, D.N.G.; Methodology, D.N.G. and K.N.; Conceptualization, K.N.; Resources, K.N.; Writing-Review and Editing, D.N.G. and K.N.; Supervision, K.N.; Project Administration, K.N.; Funding Acquisition, K.N. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Jacques G. Lussier for his suggestions and critical comments throughout the progress of this project.

References

1. Adams GP, Singh J. Ovarian Follicular and Luteal Dynamics in Cattle. Bovine Reproduction2021. p. 292-323.
2. Carvalho PD, Santos VG, Giordano JO, Wiltbank MC, Fricke PM. Development of fertility programs to achieve high 21-day pregnancy rates in high-producing dairy cows. Theriogenology. 2018;114:165-72.
3. Perry GA, Ketchum J, Quail L. Importance of preovulatory estradiol on uterine receptivity and luteal function. Animal Reproduction. 2023;20(2).
4. Selvaraju S, Binsila BK, Krishnappa B, Arangasamy A. Essential Roles of Metabolic Hormones on Gonadal Functions and Fertility of Livestock. Springer Nature Singapore; 2022. p. 69-82.
5. Thatcher W. A 100-Year Review: Historical development of female reproductive physiology in dairy cattle. Journal of Dairy Science. 2017;100(12):10272-91.
6. Fang L, Sun Y, Cheng J. The role of amphiregulin in ovarian function and disease. Cellular and Molecular Life Sciences. 2023;80(3).
7. Baddela V, Michaelis M, Sharma A, Plinski C, Viergutz T, Vanselow J. Estradiol production of granulosa cells is unaffected by the physiological mix of nonesterified fatty acids in follicular fluid. Journal of Biological Chemistry. 2022;298(10):102477.
8. Godin P, Tsoi M, Morin M, Gévry N, Boerboom D. The granulosa cell response to luteinizing hormone is partly mediated by YAP1-dependent induction of amphiregulin. Cell Communication and Signaling. 2022;20(1).
9. Lussier J, Diouf M, Lévesque V, Sirois J, Ndiaye K. Gene expression profiling of upregulated mRNAs in granulosa cells of bovine ovulatory follicles following stimulation with hCG. Reproductive Biology and Endocrinology. 2017;15(1).
10. Benoit G, Warma A, Lussier J, Ndiaye K. Gonadotropin regulation of ankyrin-repeat and SOCS-box protein 9 (ASB9) in ovarian follicles and identification of binding partners. PLOS ONE. 2019;14(2):e0212571.
11. Ndiaye K, Fayad T, Silversides DW, Sirois J, Lussier JG. Identification of downregulated messenger RNAs in bovine granulosa cells of dominant follicles following stimulation with human chorionic gonadotropin. Biol Reprod. 2005;73(2):324-33.

12. Nosratpour S, Ndiaye K. Ankyrin-repeat and SOCS box-containing protein 9 (ASB9) regulates ovarian granulosa cells function and MAPK signaling. Mol Reprod Dev. 2021;88(12):830-43.

13. Kohroki J, Nishiyama T, Nakamura T, Masuho Y. ASB proteins interact with Cullin5 and Rbx2 to form E3 ubiquitin ligase complexes. FEBS Letters. 2005;579(30):6796-802.

14. Kostrhon S, Prabu JR, Baek K, Horn-Ghetko D, Von Gronau S, Klügel M, et al. CUL5-ARIH2 E3-E3 ubiquitin ligase structure reveals cullin-specific NEDD8 activation. Nature Chemical Biology. 2021;17(10):1075-83.

15. Bano I, Soomro AS, Abbas SQ, Ahmadi A, Hassan SSU, Behl T, Bungau S. A Comprehensive Review of Biological Roles and Interactions of Cullin-5 Protein. ACS Omega. 2022;7(7):5615-24.

16. Anasa V, Ravanan P, Talwar P. Multifaceted roles of ASB proteins and its pathological significance. Frontiers in Biology. 2018;13(5):376-88.

17. Huang L, Yuan H, Shi S, Song X, Zhang L, Zhou X, et al. CLOCK inhibits the proliferation of porcine ovarian granulosa cells by targeting ASB9. Journal of Animal Science and Biotechnology. 2023;14(1).

18. Russo A, Soh UJK, Paing MM, Arora P, Trejo J. Caveolae are required for protease-selective signaling by protease-activated receptor–1. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2009;106(15):6393-7.

19. Heuberger D, Schuepbach R. Protease-activated receptors (PARs): mechanisms of action and potential therapeutic modulators in PAR-driven inflammatory diseases. Thrombosis Journal. 2019;17(1).

20. Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. Cell. 1991;64(6):1057-68.

21. Wang Q, Liu Q, Wang T, Yang H, Han Z, Zhang P. Endothelial cell protein C receptor promotes MGC803 gastric cancer cells proliferation and migration by activating ERK1/2. Medical Oncology. 2015;32(5).

22. Livak K, Schmittgen T. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2−ΔΔCT Method. Methods. 2001;25(4):402-8.

23. Crookenden MA, Walker CG, Kuhn-Sherlock B, Murray A, Dukkipati VSR, Heiser A, Roche JR. Technical note: Evaluation of endogenous control gene expression in bovine neutrophils

by reverse-transcription quantitative PCR using microfluidics gene expression arrays. J Dairy Sci. 2017;100(8):6763-71.

24. Sweett H, Fonseca PAS, Suárez-Vega A, Livernois A, Miglior F, Cánovas A. Genome-wide association study to identify genomic regions and positional candidate genes associated with male fertility in beef cattle. Scientific Reports. 2020;10(1).

25. Siddappa D, Beaulieu É, Gévry N, Roux PP, Bordignon V, Duggavathi R. Effect of the transient pharmacological inhibition of Mapk3/1 pathway on ovulation in mice. PLoS One. 2015;10(3):e0119387.

26. Gérard N, Robin E. Cellular and molecular mechanisms of the preovulatory follicle differenciation and ovulation: What do we know in the mare relative to other species. Theriogenology. 2019;130:163-76.

27. Duffy DM, Ko C, Jo M, Brannstrom M, Curry TEJ. Ovulation: Parallels With Inflammatory Processes. Endocrine Reviews. 2018;40(2):369-416.

28. Gershon E, Dekel N. Newly Identified Regulators of Ovarian Folliculogenesis and Ovulation. Int J Mol Sci. 2020;21(12).

29. Chakravarthi VP, Ratri A, Masumi S, Borosha S, Ghosh S, Christenson LK, et al. Granulosa cell genes that regulate ovarian follicle development beyond the antral stage: The role of estrogen receptor β. Mol Cell Endocrinol. 2021;528:111212.

30. Conti M, Hsieh M, Zamah AM, Oh JS. Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. Mol Cell Endocrinol. 2012;356(1-2):65-73.

31. Li N, Zhou Q, Yi Z, Zhang H, Zhou D. Ubiquitin protein E3 ligase ASB9 suppresses proliferation and promotes apoptosis in human spermatogonial stem cell line by inducing HIF1AN degradation. Biological Research. 2023;56(1):4.

32. Huang L, Yuan H, Shi S, Song X, Zhang L, Zhou X, et al. CLOCK inhibits the proliferation of porcine ovarian granulosa cells by targeting ASB9. Journal of Animal Science and Biotechnology. 2023;14(1):82.

33. . !!! INVALID CITATION !!! (17, 18).

34. Cheng Y, Kawamura K, Deguchi M, Takae S, Mulders SM, Hsueh AJW. Intraovarian Thrombin and Activated Protein C Signaling System Regulates Steroidogenesis during the Periovulatory Period. Molecular Endocrinology. 2012;26(2):331-40.

35. Roach LE, Petrik J, Plante L, LaMarre J, Gentry P. Thrombin Generation and Presence of Thrombin Receptor in Ovarian Follicles1. Biology of Reproduction. 2002;66(5):1350-8.

36. Liu P, Verhaar AP, Peppelenbosch MP. Signaling Size: Ankyrin and SOCS Box-Containing ASB E3 Ligases in Action. Trends Biochem Sci. 2019;44(1):64-74.

37. Schuermann Y, Rovani MT, Gasperin B, Ferreira R, Ferst J, Madogwe E, et al. ERK1/2-dependent gene expression in the bovine ovulating follicle. Sci Rep. 2018;8(1):16170.

38. Panigone S, Hsieh M, Fu M, Persani L, Conti M. Luteinizing hormone signaling in preovulatory follicles involves early activation of the epidermal growth factor receptor pathway. Mol Endocrinol. 2008;22(4):924-36.

39. Chalmers CJ, Balmanno K, Hadfield K, Ley R, Cook SJ. Thrombin inhibits Bim (Bcl-2-interacting mediator of cell death) expression and prevents serum-withdrawal-induced apoptosis via protease-activated receptor 1. Biochem J. 2003;375(Pt 1):99-109.

40. Donovan FM, Pike CJ, Cotman CW, Cunningham DD. Thrombin induces apoptosis in cultured neurons and astrocytes via a pathway requiring tyrosine kinase and RhoA activities. J Neurosci. 1997;17(14):5316-26.

41. Hirota Y, Osuga Y, Yoshino O, Koga K, Yano T, Hirata T, et al. Possible roles of thrombin-induced activation of protease-activated receptor 1 in human luteinized granulosa cells. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 2003;88 8:3952-7.

42. Zain J, Huang YQ, Feng X, Nierodzik ML, Li JJ, Karpatkin S. Concentration-dependent dual effect of thrombin on impaired growth/apoptosis or mitogenesis in tumor cells. Blood. 2000;95(10):3133-8.

43. Flynn AN, Buret AG. Proteinase-activated receptor 1 (PAR-1) and cell apoptosis. Apoptosis. 2004;9(6):729-37.

44. Tokuoka M, Miyoshi N, Hitora T, Mimori K, Tanaka F, Shibata K, et al. Clinical significance of ASB9 in human colorectal cancer. Int J Oncol. 2010;37(5):1105-11.

45. Uranbileg B, Enooku K, Soroida Y, Ohkawa R, Kudo Y, Nakagawa H, et al. High ubiquitous mitochondrial creatine kinase expression in hepatocellular carcinoma denotes a poor prognosis with highly malignant potential. Int J Cancer. 2014;134(9):2189-98.

46. Wang H, Ubl J, Stricker R, Reiser G. Thrombin (PAR-1)-induced proliferation in astrocytes via MAPK involves multiple signaling pathways. American Journal of Physiology-Cell Physiology. 2002;283(5):C1351-C64.

CHAPITRE 5

DISCUSSION GÉNÉRALE, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

5.1. Discussion Générale

Au cours des dernières décennies, il y a eu une baisse constante de la fertilité des vaches laitières, ce qui entraîne des pertes financières annuelles. Puisque l'ovaire joue un rôle essentiel dans la régulation de la reproduction chez les femelles, son étude a une importance particulière. La poursuite des recherches sur la physiologie ovarienne pourrait entraîner des progrès significatifs dans notre compréhension de divers phénomènes physiologiques et dans notre capacité à traiter diverses affections comme la réduction de la fertilité chez les animaux d'élevage, en particulier chez les vaches laitières.

Les cellules stéroïdogéniques, telles que les cellules de granulosa (GC), jouent un rôle essentiel dans la maturation et la libération de l'ovocyte pendant les processus de croissance folliculaire et d'ovulation (140, 141). En particulier, les GC jouent un rôle dans la production des hormones stéroïdes, la maturation des ovocytes et la formation du corps jaune après l'ovulation (54). Ainsi, la régulation de la prolifération et de la fonction des GC est complexe et repose sur une régulation précise de la transcription de gènes cibles spécifiques. Ce contrôle revêt une grande importance pour le développement normal du follicule parce qu'il influence l'état physiologique du follicule avant l'ovulation. En raison de l'augmentation de la signalisation intracellulaire médiée par la LH, la transcription de gènes particuliers qui régulent la croissance d'un follicule dominant chez l'espèce bovine est rapidement régulée à la baisse ou inhibée dans les GC (142). En revanche, la LH régule à la hausse ou induit l'expression de gènes liés à l'ovulation et à la lutéinisation (11, 12). De nombreuses études ont établi que la poussée de LH régule positivement les gènes impliqués dans l'inflammation, le mouvement cellulaire, le remodelage tissulaire et l'angiogenèse tout en désactivant l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme et la prolifération chez plusieurs espèces (135, 143). La voie MAPK3/1induite par la LH est également révélée essentielle à l'ovulation (144). Ces résultats soulignent l'importance de mener une recherche fondamentale des gènes et voies de signalisation liées pour mieux coordonner l'activité ovarienne au cours des dernières phases du développement folliculaire et de l'ovulation.

Notre laboratoire a précédemment identifié des gènes dans les GC des follicules ovulatoires bovins suite au pic de LH ou l'injection d'hCG, parmi lesquels Ankyrin-repeat and SOCS-Box

protein 9 (ASB9) (11). ASB9 est induit dans les follicules ovulatoires comparé aux autres phases du développement folliculaire. Dans nos recherches antérieures, nous avons démontré comment la LH/hCG induit l'ASB9 dans les GC et avons rapporté que TNFAIP6, HIF1A, TAOK1 et PAR1 sont des partenaires de liaison d'ASB9 (12). Et plus récemment, nos dernières découvertes suggéraient une possible implication d'ASB9, gène régulé par la LH, dans la modulation de la voie MAPK3/1 probablement à travers une action sur PAR1 dans les GC (14). Cependant, aucune étude n'avait été menée afin d'étudier le rôle d'ASB9 dans la régulation de protéines cibles (PAR1), et analyser son effet sur les voies de signalisation activées par PAR1 (MAPK) et sur l'activité des GC chez l'espèce bovine.

D'un côté, l'effet négatif d'ASB9 sur la prolifération cellulaire a été démontré par deux autres études qui ont rapporté le rôle de l'ASB9 dans le cancer (145, 146). D'une autre coté, d'autres études ont montré que l'activation de PAR1 dans les astrocytes par la thrombine conduit à l'activation de la voie de signalisation MAPK3/1, ce qui entraîne une prolifération accrue des cellules (147). De plus, que l'expression des récepteurs de thrombine (PAR1) par les cellules situées à proximité d'un système actif de production de thrombine suggère que ces facteurs peuvent être des médiateurs importants de la fonction cellulaire dans le follicule ovarien (148). L'harmonie et le contrôle de l'expression des gènes et des voies de signalisation cellulaire dans les cellules de la granulosa sont cruciaux, puisqu'ils sont impliqués dans les connexions importantes entre les cellules somatiques et les ovocytes, ainsi que médiateurs dans les voies métaboliques cruciales pour la croissance des ovocytes et la prolifération des cellules somatiques elles-mêmes (149, 150).

En résumé, ces travaux sont des résultats en accord avec les recherches *in vitro* effectuées dans cette thèse qu'ont mis en évidence l'effet de l'ASB9 sur la prolifération et l'apoptose des GC, et le rôle nécessaire de PAR1 et MAPK3/1 dans les GC au cours du développement folliculaire. L'ensemble de nos résultats révèle qu'ASB9, gène induit par la LH, est impliqué dans la régulation de la prolifération des cellules de granulosa en affectant la signalisation MAPK3/1 via des partenaires de liaison tels que PAR1. Des études supplémentaires seront nécessaires pour identifier et élucider les détails des différents liens entre: ASB9 et PAR1, et les effecteurs potentiels impliquées dans les cascades de signalisations dans les cellules de la granulosa; ainsi que le possible mécanisme direct ou indirect par lequel ASB9 se lierait à PAR1 et l'inhiberait (probablement par la voie de dégradation ubiquitine-protéasome).

5.1.1. Synthèse et pertinence des résultats

Analyse de l'expression d'ASB9 et la régulation de PAR1 pendant le développement folliculaire dans des GC en culture

Les analyses RT-qPCR et Western blot ont montré que l'expression d'ASB9 dans la GC *in vitro* était augmentée 12 h après le traitement avec LH, ce qui est cohérent avec nos résultats précédents rapportés à l'aide d'un modèle *in vivo* dans lequel nous avons montré que l'ASB9 est différentiellement exprimé dans les GC du follicule ovulatoire à partir de 12h post-hCG, avec l'expression maximale à 24h pour l'ARNm et les protéines (12, 14). Ces données révèlent l'implication d'ASB9 dans la régulation de l'expression de diverses gènes cibles dans le follicule avant l'ovulation. Dans la présente étude avec notre modèle *in vitro*, nous avons analysé l'expression de PAR1, un partenaire de liaison d'ASB9, et les résultats ont montré une diminution de l'expression de l'ARNm de PAR1 6 et 12 h après le traitement avec LH.

Pour confirmer la régulation de PAR1, nous avons traité les GC non seulement avec de la LH et de la FSH, mais également avec de la thrombine. Les PAR sont activés lorsque l'extrémité NH2 extracellulaire du récepteur est clivée par des protéases spécifiques, par exemple une stimulation par la thrombine. Les résultats ont démontré que la thrombine augmentait l'expression de l'ARNm de PAR1 dans les GC *in vitro*, alors que la FSH n'avait aucun effet sur PAR1. Contrairement à la FSH, le traitement par la LH a réduit PAR1, même en présence de thrombine, démontrant que la LH régule négativement PAR1, éventuellement via l'ASB9. Ainsi, la thrombine semble empêcher l'ASB9 d'exercer un effet inhibiteur sur PAR1 après 1 h de traitement. Cependant, comme indiqué à 6 et 12 h, cette protéase pourrait ne plus affecter ASB9 après une période plus longue (6 h ou 12 h). Ce résultat confirme nos données précédentes du modèle *in vivo* qui montreraient une réduction de l'expression de PAR1 dans les follicules ovulatoires 24h après l'injection d'hCG par rapport aux follicules dominants à jour 5 du cycle œstral (12).

Le marqueur de prolifération CCND2 et le marqueur d'apoptose BAX2 ont été utilisés pour analyser les effets de la stimulation de l'ASB9 et de PAR1 avec la thrombine sur la survie/mort des cellules de la granulosa *in vitro*. ASB9 régule négativement le nombre de GC ainsi que le

marqueur de prolifération *CCND2* à 12 h, tandis que le marqueur d'apoptose *BAX2* a augmenté avec le traitement par la LH, probablement par induction de l'ASB9 après le traitement avec LH. Même si la thrombine semble empêcher l'effet d'apoptose de l'ASB9 sur la GC *in vitro* après 6 h de traitement, comme indiqué après 12 h, cette protéase pourrait ne plus affecter ASB9. Ce qui est cohérent avec le rôle de ASB9 en tant que frein la prolifération des cellules de la granulosa pour l'initiation de la différenciation des GC ou le contrôle de l'apoptose des GC.

PAR1 régule la phosphorylation de ERK1/2 dans les GC traités avec la thrombine

La croissance cellulaire et la progression du cycle cellulaire sont toutes deux régulées par la voie de signalisation MAPK3/1, impliquée dans la prolifération cellulaire. Dans les cellules normales, l'activation maintenue de MAPK3/1 est nécessaire à la progression de la phase G1 vers la phase S et est associée à l'induction de régulateurs positifs du cycle cellulaire et à l'inactivation des gènes antiprolifératifs. Nous avons précédemment signalé que dans les échantillons *in vitro*, qu'il y avait une augmentation du niveau de phosphorylation de MAPK3/1 suite à l'inhibition d'ASB9 au niveau basal (14). Dans cette étude, les analyses par Western blot ont montré une augmentation relative du niveau de phosphorylation de MAPK3/1 dans la GC très tôt après le traitement à la thrombine. Cette augmentation relative de la phosphorylation de MAPK3/1 est probablement modulée par une augmentation de PAR1 en réponse au traitement à la thrombine. De plus, nous avons analysé la phosphorylation de MAPK dans des GC en culture en réponse au traitement avec LH. Les analyses ont montré que pMAPK3/1 augmentait significativement après 30 minutes, tandis que la MAPK3/1 totale diminuait significativement au même moment et 1 heure après le traitement avec LH. La phosphorylation de MAPK3/1 dans les GC traités avec thrombine pourrait être contrôlée par PAR1, tandis que l'induction d'ASB9 par la LH réduit probablement la phosphorylation de MAPK par une action négative sur PAR1.

5.2. Conclusions

À ce jour, plusieurs questions centrales restent encore à être élucidés dans l'étude de la physiologie ovarienne, particulièrement lors des processus de développement folliculaire et d'ovulation. Malgré les avancées des dernières années par notre laboratoire et d'autres, les détails des rôles biologiques et modes d'action des protéines ASB9 et PAR1 dans les tissus reproductifs restent à être élucidés. Ce projet de mémoire apporte une contribution significative, notamment en précisant certaines interactions entre des acteurs importants des cellules de granulosa (GC) de follicules ovulatoires, spécifiquement ASB9 et PAR1 et des voies de signalisation telle que la voie des MAPK. Ce projet a aussi permis une exploration de l'implication d'ASB9 et PAR1 dans la régulation de la prolifération et la survie cellulaires, ainsi que le rôle d'ASB9 au cours des dernières phases du développement folliculaire et de l'ovulation, tous des processus essentiels à la fertilité.

Nos résultats supportent les conclusions du projet qui démontrent que la LH induit ASB9 dans les GC, ce qui module négativement les actions de PAR1 sur la prolifération des GC. La phosphorylation de MAPK3/1 (ERK1/2) dans les GC traités à la thrombine pourrait ainsi être contrôlée par PAR1 alors que l'induction d'ASB9 par la LH réduit la phosphorylation de MAPK. Nos données montrent également que la thrombine pourrait bloquer l'action négative d'ASB9, mais seulement pendant une courte période avant qu'ASB9 atteigne son induction maximale par la LH.

Étant donné que l'expression d'ASB9 dans le follicule ovulatoire est induite considérablement par la LH/hCG, il est concevable qu'ASB9 puisse jouer un rôle dans le processus ovulatoire, la différenciation des cellules de granulosa et le remodelage de la matrice extracellulaire en ciblant des protéines spécifiques par une liaison et dégradation. La surexpression d'ASB9 a conduit à une diminution de la prolifération des GC, ce qui démontre l'importance d'ASB9 dans les cellules de granulosa du follicule ovulatoire. Le blocage de la signalisation de PAR1 et par subséquence la voie MAPK3/1, causé par ASB9, pourrait mener à la différenciation des cellules de granulosa en cellules lutéales, avec une augmentation de la production de progestérone et réduction d'estrogène. L'inhibition de MAPK3/1 *in vivo* conduit à un phénotype anovulatoire avec des ovocytes piégés et une rupture folliculaire défectueuse. Le passage de la production d'œstrogènes à la progestérone est un facteur clé dans la régulation de l'ovulation par la LH.

L'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans les différents stades du développement folliculaire et le processus ovulatoire est crucial parce qu'ils contribuent à la qualité de l'ovocyte produit, à la formation d'un corps jaune fonctionnel et au développement embryonnaire pour assurer la gestation. Ces mécanismes associés à la reproduction des animaux d'élevage, dont l'espèce bovine, ont des impacts économiques importants sur le maintien du cheptel et la production laitière.

5.3. Contribution à la recherche et perspectives

Cette étude nous a permis de comprendre plus profondément les mécanismes d'action d'ASB9 dans les cellules de granulosa (GC) et déterminer si l'induction d'ASB9 par la LH/hCG est nécessaire à la régulation de gènes cibles tels que PAR1 et des voies de signalisation impliquées dans la fonction et l'activité des GC. Nous avons démontré que la thrombine augmente l'expression de l'ARNm de *PAR1* dans les GC *in vitro*, et qu'un traitement avec la LH réduit *PAR1*, même en présence de la thrombine, démontrant que la LH régule négativement *PAR1*, possiblement via ASB9. Également, nous avons démontré le rôle d'ASB9 comme frein à la prolifération des CG pour l'initiation de la différenciation ou le contrôle de l'apoptose. ASB9 régule négativement le nombre des GC ainsi que le marqueur de prolifération *CCND2*, tandis que le marqueur d'apoptose *BAX2* a augmenté avec le traitement avec la LH, probablement via l'induction d'ASB9. Finalement, nos données montrent que la phosphorylation de MAPK3/1 augmente significativement après le traitement avec thrombine, tandis que la MAPK3/1 totale diminue. La phosphorylation de MAPK3/1 dans les GC post-thrombine pourrait être contrôlée par PAR1 alors que l'induction d'ASB9 par la LH réduit la phosphorylation de MAPK3/1. Ensemble, ces données montrent les effets fonctionnels d'ASB9 sur l'activité des GC via PAR1 et les conséquences potentielles sur le processus ovulatoire chez l'espèce bovine.

Bien que à travers notre modèle *in vitro* nous renforçons nos données du modèle *in vivo* (Nosratpour et Ndiaye, 2021), plusieurs expériences supplémentaires pourraient être ajoutées au présent travail. Une perspective intéressante de recherche supplémentaire pourrait inclure des études plus spécifiques sur PAR1 dans le modèle *in vivo* et *in vitro,* pour comprendre son

comportement basal et en culture cellulaire à différents temps de traitement avec thrombine. Aussi, la poursuite de la caractérisation de l'activation de PAR1 dans les cellules de granulosa *in vitro* et de son expression protéique dans ces cellules serait une perspective à explorer. En plus d'une éventuelle évaluation de la sécrétion détaillée de médiateurs à partir des GC de vaches après traitement avec thrombine, étudier les possibles protéines et les voies de signalisation cellulaire associées à cette stimulation par immunoblotting ou ELISA. D'autre part, une analyse de l'activité de PAR1 pourrait être réalisée à travers un test d'activité par activation protéolytique (thrombine) ; pour mieux comprendre les résultats de l'expression de la protéine PAR1 dans les GC à différentes périodes de traitement. De même, une expérience utilisant un antagoniste de PAR1 afin de comprendre le processus d'activation de PAR1 par clivage de protéase dans les GC et également d'identifier une éventuelle imitation avec l'antagoniste de l'effet de blocage d'ASB9 sur PAR1.

L'élucidation des mécanismes de régulation de PAR1 et la voie de signalisation MAPK par ASB9 permettra de mieux comprendre la fonction ovarienne en identifiant les gènes cibles associés à l'activité des CG, au développement folliculaire et l'ovulation. Ainsi, la possibilité de mieux contrôler la fonction ovarienne et améliorer la fertilité chez la vache laitière sera grandement améliorée.

Références

1. Canada AeA. Aperçu de l'industrie laitière 2022 [Available from: https://agriculture.canada.ca/fr/secteur/production-animale/centre-canadien-information-laitiere/industrie-laitiere.

2. Canada Dfo. National Dairy Research Strategy 2022 [Available from: https://dairyfarmersofcanada.ca/en/dairy-research/national-dairy-research-strategy.

3. Mossa F, Ireland JJ. PHYSIOLOGY AND ENDOCRINOLOGY SYMPOSIUM: Anti-Müllerian hormone: a biomarker for the ovarian reserve, ovarian function, and fertility in dairy cows. Journal of Animal Science. 2019;97(4):1446-55.

4. Simões J, Stilwell G. Reproductive Anatomy and Physiology of the Nonpregnant and Pregnant Cow. Calving Management and Newborn Calf Care: An interactive Textbook for Cattle Medicine and Obstetrics. Cham: Springer International Publishing; 2021. p. 1-23.

5. Nabors B. Anatomy of the Reproductive System of the Cow. Bovine Reproduction2021. p. 249-57.

6. Ginther OJ. The theory of follicle selection in cattle. Domest Anim Endocrinol. 2016;57:85-99.

7. Grimsey N, Aguilar B, Smith TH, Le P, Soohoo A, Puthenveedu M, et al. Ubiquitin plays an atypical role in GPCR-induced p38 MAP kinase activation on endosomes. Journal of Cell Biology. 2015;210(7):1117-31.

8. Haughian JM, Ginther OJ, Diaz FJ, Wiltbank MC. Gonadotropin-releasing hormone, estradiol, and inhibin regulation of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone surges: implications for follicle emergence and selection in heifers. Biol Reprod. 2013;88(6):165.

9. Macmillan K, Kastelic J, Colazo M. Update on Multiple Ovulations in Dairy Cattle. Animals. 2018;8(5):62.

10. Carvalho PD, Santos VG, Giordano JO, Wiltbank MC, Fricke PM. Development of fertility programs to achieve high 21-day pregnancy rates in high-producing dairy cows. Theriogenology. 2018;114:165-72.

11. Selvaraj V, Stocco D, Clark B. Current knowledge on the acute regulation of steroidogenesis†. Biology of Reproduction. 2018;99(1):13-26.

12. Godin P, Tsoi M, Morin M, Gévry N, Boerboom D. The gr

anulosa cell response to luteinizing hormone is partly mediated by YAP1-dependent induction of amphiregulin. Cell Communication and Signaling. 2022;20(1).

13. Lussier J, Diouf M, Lévesque V, Sirois J, Ndiaye K. Gene expression profiling of upregulated mRNAs in granulosa cells of bovine ovulatory follicles following stimulation with hCG. Reproductive Biology and Endocrinology. 2017;15(1).

14. Benoit G, Warma A, Lussier J, Ndiaye K. Gonadotropin regulation of ankyrin-repeat and SOCS-box protein 9 (ASB9) in ovarian follicles and identification of binding partners. PLOS ONE. 2019;14(2):e0212571.

15. Huang L, Yuan H, Shi S, Song X, Zhang L, Zhou X, et al. CLOCK inhibits the proliferation of porcine ovarian granulosa cells by targeting ASB9. Journal of Animal Science and Biotechnology. 2023;14(1).

16. Nosratpour S, Ndiaye K. Ankyrin-repeat and SOCS box-containing protein 9 (ASB9) regulates ovarian granulosa cells function and MAPK signaling. Mol Reprod Dev. 2021;88(12):830-43.

17. Heuberger D, Schuepbach R. Protease-activated receptors (PARs): mechanisms of action and potential therapeutic modulators in PAR-driven inflammatory diseases. Thrombosis Journal. 2019;17(1).

18. Lerner DJ, Chen M, Tram T, Coughlin SR. Agonist recognition by proteinase-activated receptor 2 and thrombin receptor. Importance of extracellular loop interactions for receptor function. J Biol Chem. 1996;271(24):13943-7.

19. Cheng Y, Kawamura K, Deguchi M, Takae S, Mulders SM, Hsueh AJW. Intraovarian Thrombin and Activated Protein C Signaling System Regulates Steroidogenesis during the Periovulatory Period. Molecular Endocrinology. 2012;26(2):331-40.

20. Ishii K, Chen J, Ishii M, Koch WJ, Freedman NJ, Lefkowitz RJ, Coughlin SR. Inhibition of thrombin receptor signaling by a G-protein coupled receptor kinase. Functional specificity among G-protein coupled receptor kinases. J Biol Chem. 1994;269(2):1125-30.

21. Wolfe BL, Marchese A, Trejo J. Ubiquitination differentially regulates clathrin-dependent internalization of protease-activated receptor-1. J Cell Biol. 2007;177(5):905-16.

22. Paing MM, Stutts AB, Kohout TA, Lefkowitz RJ, Trejo J. beta -Arrestins regulateprotease-activated receptor-1 desensitization but not internalization or Down-regulation. J Biol Chem. 2002;277(2):1292-300.

23. Silva JM, Hamel M, Sahmi M, Price CA. Control of oestradiol secretion and of cytochrome P450 aromatase messenger ribonucleic acid accumulation by FSH involves different intracellular pathways in oestrogenic bovine granulosa cells in vitro. Reproduction. 2006;132(6):909-17.

24. Holesh JE, Bass AN, Lord M. Physiology, Ovulation. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing

Copyright © 2023, StatPearls Publishing LLC.; 2023.

25. Jimenez A. Manejo Hormonal del Ciclo Estral2016. Available from: https://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/inseminacion_artificial/251-Manejo_hormonal.pdf.

26. Adhikari D, Liu K. The regulation of maturation promoting factor during prophase I arrest and meiotic entry in mammalian oocytes. Mol Cell Endocrinol. 2014;382(1):480-7.

27. Sakaguchi K, Yanagawa Y, Yoshioka K, Suda T, Katagiri S, Nagano M. Relationships between the antral follicle count, steroidogenesis, and secretion of follicle-stimulating hormone and anti-Müllerian hormone during follicular growth in cattle. Reproductive Biology and Endocrinology. 2019;17(1).

28. Spicer LJ. Proteolytic Degradation of Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins by Ovarian Follicles: A Control Mechanism for Selection of Dominant Follicles1. Biology of Reproduction. 2004;70(5):1223-30.

29. Eppig J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. Reproduction. 2001;122(6):829-38.

30. Hsueh A, Kawamura K, Cheng Y, Fauser B. Intraovarian Control of Early Folliculogenesis. Endocrine Reviews. 2015;36(1):1-24.

31. Jennings R, Premanandan C. Veterinary Histology: The Ohio State University; 2017.

32. Adams GP, Singh J. Ovarian Follicular and Luteal Dynamics in Cattle. Bovine Reproduction2021. p. 292-323.

33. Crowe M, Mullen M. Regulation and Function of Gonadotropins Throughout the Bovine Oestrous Cycle. InTech; 2013.

34. Fortune J, Yang M, Muruvi W. In vitro and in vivo regulation of follicular formation and activation in cattle. Reproduction, Fertility and Development. 2011;23(1):15.

35. Marques P, Skorupskaite K, Rozario KS, Anderson RA, George JT. Physiology of GnRH

and Gonadotropin Secretion. In: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, Boyce A, Chrousos G, Corpas E, et al., editors. Endotext. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.

Copyright © 2000-2023, MDText.com, Inc.; 2022.

36. Gregory SJ, Kaiser UB. Regulation of gonadotropins by inhibin and activin. Semin Reprod Med. 2004;22(3):253-67.

37. Cahill LSI, J.J. Importance of Estrogen in the Regulation of Reproduction in Domestic Ruminants. Animal Reproduction Science. 2013.

38. Lopez H, Sartori R, Wiltbank M. Reproductive Hormones and Follicular Growth During Development of One or Multiple Dominant Follicles in Cattle1. Biology of Reproduction. 2005;72(4):788-95.

39. Forde N, Beltman ME, Lonergan P, Diskin M, Roche JF, Crowe MA. Oestrous cycles in Bos taurus cattle. Anim Reprod Sci. 2011;124(3-4):163-9.

40. Senger PL. Pathways to Pregnancy & Parturition: Current Conceptions; 2012.

41. Sartori R, Guardieiro MM, Surjus RS, Melo LF, Prata AB, Ishiguro M, et al. Metabolic hormones and reproductive function in cattle. Animal Reproduction; 2013. p. 199-205.

42. Bogdanova N. Evaluation of the gonadotropic preparation effect on the hormonal status of the infertile cows. BIO Web of Conferences. 2022;52:00013.

43. Skovorodin EM, R.; Bogoliuk, S.; Bazekin, G.; Gimranov, V. Clinical and structural changes in reproductive organs and endocrine glands of sterile cows. Veterinary World. 2022.

44. Ventsova IY, Safonov VA. The Role of Oxidative Stress during Pregnancy on Obstetric Pathology Development in High-Yielding Dairy Cows. American Journal of Animal and Veterinary Sciences. 2021;16:7-14.

45. Xu X, Bai J, Liu K, Xiao L, Qin Y, Gao M, Liu Y. Association of Metabolic and Endocrine Disorders with Bovine Ovarian Follicular Cysts. Animals (Basel). 2023;13(21).

46. Hunzicker-Dunn M, Mayo K. Gonadotropin Signaling in the Ovary. Elsevier; 2015. p. 895-945.

47. Hillier SG. Current concepts of the roles of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in folliculogenesis. Hum Reprod. 1994;9(2):188-91.

48. Howles CM. Role of LH and FSH in ovarian function. Mol Cell Endocrinol. 2000;161(1-2):25-30.

49. Luo W, Gumen A, Haughian JM, Wiltbank MC. The Role of Luteinizing Hormone in Regulating Gene Expression During Selection of a Dominant Follicle in Cattle. Biology of Reproduction. 2011;84(2):369-78.

50. Pattison J, Saltzman W, Abbott D, Hogan B, Nguyen A, Husen B, et al. Gender and gonadal status differences in zona reticularis expression in marmoset monkey adrenals: Cytochrome b5 localization with respect to cytochrome P450 17,20-lyase activity. Molecular and Cellular Endocrinology. 2007;265-266:93-101.

51. Bird I. In the zone: understanding zona reticularis function and its transformation by adrenarche. Journal of Endocrinology. 2012;214(2):109-11.

52. Pulley SL, Keisler DH, Stevenson JS. Concentrations of luteinizing hormone and ovulatory responses in dairy cows before timed artificial insemination. Journal of Dairy Science. 2015;98(9):6188-201.

53. Lapointe E, Boerboom D. WNT signaling and the regulation of ovarian steroidogenesis. Front Biosci (Schol Ed). 2011;3(1):276-85.

54. Stevenson JS, Lamb GC. Contrasting effects of progesterone on fertility of dairy and beef cows. Journal of Dairy Science. 2016;99(7):5951-64.

55. Quirk SM, Cowan RG, Harman RM, Hu CL, Porter DA. Ovarian follicular growth and atresia: the relationship between cell proliferation and survival. J Anim Sci. 2004;82 E-Suppl:E40-52.

56. Silva LOE, Valenza A, Alves R, Silva MAD, Silva T, Motta JCL, et al. Progesterone release profile and follicular development in Holstein cows receiving intravaginal progesterone devices. Theriogenology. 2021;172:207-15.

57. Site V. Clinical use of hormones in cow reproductive system The Veterinary Site; 2021 [Available from: https://www.theveterinarysite.com/2021/06/how-reproductive-hormones-induce-heat-in-cows.html.

58. Abdulrahman Alrabiah N, Evans ACO, Fahey AG, Cantwell N, Lonergan P, McCormack J, et al. Immunological aspects of ovarian follicle ovulation and corpus luteum formation in cattle. Reproduction. 2021;162(3):209-25.

59. Rimon-Dahari N, Yerushalmi-Heinemann L, Alyagor L, Dekel N. Ovarian Folliculogenesis. Springer International Publishing; 2016. p. 167-90.

60. McNatty KP, Fidler AE, Juengel JL, Quirke LD, Smith PR, Heath DA, et al. Growth and paracrine factors regulating follicular formation and cellular function. Mol Cell Endocrinol. 2000;163(1-2):11-20.

61. Richards JS, Ascoli M. Endocrine, Paracrine, and Autocrine Signaling Pathways That Regulate Ovulation. Trends Endocrinol Metab. 2018;29(5):313-25.

62. Yoshioka S, Abe H, Sakumoto R, Okuda K. Proliferation of Luteal Steroidogenic Cells in Cattle. PLoS ONE. 2013;8(12):e84186.

63. Richards J, Ren Y, Candelaria N, Adams J, Rajkovic A. Ovarian Follicular Theca Cell Recruitment, Differentiation, and Impact on Fertility: 2017 Update. Endocrine Reviews. 2018;39(1):1-20.

64. Fan H, Liu Z, Shimada M, Sterneck E, Johnson P, Hedrick S, Richards J. MAPK3/1 (ERK1/2) in Ovarian Granulosa Cells Are Essential for Female Fertility. Science. 2009;324(5929):938-41.

65. Morrison DK. MAP Kinase Pathways. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. 2012;4(11):a011254-a.

66. Puri P, Little-Ihrig L, Chandran U, Law N, Hunzicker-Dunn M, Zeleznik A. Protein Kinase A: A Master Kinase of Granulosa Cell Differentiation. Scientific Reports. 2016;6(1):28132.

67. Ryan K, Glister C, Lonergan P, Martin F, Knight P, Evans A. Functional significance of the signal transduction pathways Akt and Erk in ovarian follicles: in vitro and in vivo studies in cattle and sheep. Journal of Ovarian Research. 2008;1(1):2.

68. López-Gatius F. Revisiting the Timing of Insemination at Spontaneous Estrus in Dairy Cattle. Animals. 2022;12(24):3565.

69. Duffy DM, Ko C, Jo M, Brannstrom M, Curry TE. Ovulation: Parallels With Inflammatory Processes. Endocr Rev. 2019;40(2):369-416.

70. Breen S, Andric N, Ping T, Xie F, Offermans S, Gossen J, Ascoli M. Ovulation Involves the Luteinizing Hormone-Dependent Activation of Gq/11 in Granulosa Cells. Molecular Endocrinology. 2013;27(9):1483-91.

71. García A, Gonzalez J, Castejón F, Murillo M, Salido G, De la Cruz L. Fisiología Veterianaria2018.

72. Jonczyk AW, Piotrowska-Tomala KK, Kordowitzki P, Skarzynski DJ. Effects of prostaglandin F2α on angiogenic and steroidogenic pathways in the bovine corpus luteum may depend on its route of administration. Journal of Dairy Science. 2019;102(11):10573-86.

73. Sweett H, Fonseca PAS, Suárez-Vega A, Livernois A, Miglior F, Cánovas A. Genome-wide association study to identify genomic regions and positional candidate genes associated with male fertility in beef cattle. Scientific Reports. 2020;10(1).

74. Mihm M, Baker PJ, Ireland JLH, Smith GW, Coussens PM, Evans ACO, Ireland JJ. Molecular Evidence That Growth of Dominant Follicles Involves a Reduction in Follicle-Stimulating Hormone Dependence and an Increase in Luteinizing Hormone Dependence in Cattle1. Biology of Reproduction. 2006;74(6):1051-9.

75. Townson D, Combelles C. Ovarian Follicular Atresia. InTech; 2012.

76. Hsueh A, Billig H, Tsafriri A. Ovarian Follicle Atresia: A Hormonally Controlled Apoptotic Process*. Endocrine Reviews. 1994;15(6):707-24.

77. Regan S, Knight P, Yovich J, Stanger J, Leung Y, Arfuso F, et al. The effect of ovarian reserve and receptor signalling on granulosa cell apoptosis during human follicle development. Molecular and Cellular Endocrinology. 2018;470:219-27.

78. Amsterdam A, Keren-Tal I, Aharoni D, Dantes A, Land-Bracha A, Rimon E, et al. Steroidogenesis and apoptosis in the mammalian ovary. Steroids. 2003;68(10-13):861-7.

79. Matsuda-Minehata F, Inoue N, Goto Y, Manabe N. The Regulation of Ovarian Granulosa Cell Death by Pro- and Anti-apoptotic Molecules. Journal of Reproduction and Development. 2006;52(6):695-705.

80. Matsuda F, Inoue N, Manabe N, Ohkura S. Follicular Growth and Atresia in Mammalian Ovaries: Regulation by Survival and Death of Granulosa Cells. Journal of Reproduction and Development. 2012;58(1):44-50.

81. Regan S, Knight P, Yovich J, Stanger J, Leung Y, Arfuso F, et al. Infertility and ovarian follicle reserve depletion are associated with dysregulation of the FSH and LH receptor density in human antral follicles. Molecular and Cellular Endocrinology. 2017;446:40-51.

82. Xu H, Khan A, Zhao S, Wang H, Zou H, Pang Y, Zhu H. Effects of Inhibin A on Apoptosis and Proliferation of Bovine Granulosa Cells. Animals. 2020;10(2):367.

83. Carou MC, Cruzans PR, Maruri A, Farina MG, Fiorito CD, Olea G, Lombardo DM. Apoptosis of bovine granulosa cells: Intracellular pathways and differentiation. Acta Histochem. 2017;119(5):462-70.

84. Chun SY, Eisenhauer KM, Minami S, Billig H, Perlas E, Hsueh AJ. Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle-stimulating hormone as a major survival factor. Endocrinology. 1996;137(4):1447-56.

85. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. Toxicologic Pathology. 2007;35(4):495-516.

86. Jin-Yi Jiang C, Cheung Y, Tsang B. Regulation of cell death and cell survival gene expression during ovarian follicular development and atresia. Frontiers in Bioscience. 2003;8(4):d222-37.

87. Osaki M, Oshimura M, Ito H. PI3K-Akt pathway: Its functions and alterations in human cancer. Apoptosis. 2004;9(6):667-76.

88. Andrade G, Da Silveira J, Perrini C, Del Collado M, Gebremedhn S, Tesfaye D, et al. The role of the PI3K-Akt signaling pathway in the developmental competence of bovine oocytes. PLOS ONE. 2017;12(9):e0185045.

89. Shi J, Yoshino O, Osuga Y, Koga K, Hirota Y, Nose E, et al. Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) Increases Gene Expression of FSH Receptor and Aromatase and Decreases Gene Expression of LH Receptor and StAR in Human Granulosa Cells. American Journal of Reproductive Immunology. 2011;65(4):421-7.

90. Li X, Xu G, Li Z, Liu H, Ma X, Yang L, et al. Gonadotropin-inhibiting hormone promotes apoptosis of bovine ovary granulosa cells. Life Sci. 2021;270:119063.

91. McEvoy M, Sinderewicz E, Creedon L, McAfee M, Jonczyk AW, Piotrowska-Tomala KK, Skarzynski DJ. Death Processes in Bovine Theca and Granulosa Cells Modelled and Analysed Using a Systems Biology Approach. International Journal of Molecular Sciences. 2021;22(9):4888.

92. Slee E, Adrain C, Martin S. Executioner Caspase-3, -6, and -7 Perform Distinct, Non-redundant Roles during the Demolition Phase of Apoptosis. Journal of Biological Chemistry. 2001;276(10):7320-6.

93. Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C, Kroemer G. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. Cell Death & Differentiation. 2006;13(9):1423-33.

94. Haimovici A, Höfer C, Badr M, Bavafaye Haghighi E, Amer T, Boerries M, et al. Spontaneous activity of the mitochondrial apoptosis pathway drives chromosomal defects, the appearance of micronuclei and cancer metastasis through the Caspase-Activated DNAse. Cell Death & Disease. 2022;13(4).

95. Yazawa T, Imamichi Y, Sekiguchi T, Miyamoto K, Uwada J, Khan MR, et al. Transcriptional Regulation of Ovarian Steroidogenic Genes: Recent Findings Obtained from Stem Cell-Derived Steroidogenic Cells. BioMed Research International. 2019;2019:1-13.

96. Bremer A. Regulation of Steroidogenesis. Cellular Endocrinology in Health and Disease. 2014:207-27.

97. Omura T, Morohashi K. Gene regulation of steroidogenesis. J Steroid Biochem Mol Biol. 1995;53(1-6):19-25.

98. Miller W, Auchus R. The Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology of Human Steroidogenesis and Its Disorders. Endocrine Reviews. 2011;32(1):81-151.

99. Lima F, Acosta D, Egan T, Skenandore C, Sulzberger S, French D, Cardoso F. Steroidogenic, Metabolic, and Immunological Markers in Dairy Cows Diagnosed With Cystic Ovarian Follicles at Early and Mid-Late Lactation. Frontiers in Veterinary Science. 2019;6.

100. Wang Y, Jin C, Yi Y, Hu Y, Han X, Tan Z, et al. Rumen-protected glucose stimulates the secretion of reproductive hormones and the mTOR/AKT signaling pathway in the ovaries of early postpartum. Scientific Reports. 2023;13(1).

101. Douville G, Sirard M. Changes in granulosa cells gene expression associated with growth, plateau and atretic phases in medium bovine follicles. Journal of Ovarian Research. 2014;7(1):50.

102. Gate C. Ovarian Hormones: Structure, Biosynthesis, Function, Mechanism of Action, and Laboratory Diagnosis 2015 [Available from: https://clinicalgate.com/ovarian-hormones-structure-biosynthesis-function-mechanism-of-action-and-laboratory-diagnosis/#:~:text=Figure%202-2%20Steroid%20hormone%20biosynthesis%20pathways%20in%20the,is%20the%20preferred%20pathway%20in%20the%20thecal%20cells.

103. Anasa V, Ravanan P, Talwar P. Multifaceted roles of ASB proteins and its pathological significance. Frontiers in Biology. 2018;13(5):376-88.

104. Xie D, Dai L, Yang X, Huang T, Zheng W. A Survival Model Based on the ASB Genes and Used to Predict the Prognosis of Kidney Renal Clear Cell Carcinoma. Genetics Research. 2023;2023:1-11.

105. Van Den Eshof B, Hoogendijk A, Simpson P, Van Alphen F, Zanivan S, Mertens K, et al. Paradigm of Biased PAR1 (Protease-Activated Receptor-1) Activation and Inhibition in Endothelial Cells Dissected by Phosphoproteomics. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 2017;37(10):1891-902.

106. Lee MR, Kim SK, Kim JS, Rhim SY, Kim KS. Expression of murine Asb-9 during mouse spermatogenesis. Mol Cells. 2008;26(6):621-4.

107. Benoit G, Warma A, Lussier JG, Ndiaye K. Gonadotropin regulation of ankyrin-repeat and SOCS-box protein 9 (ASB9) in ovarian follicles and identification of binding partners. PloS one. 2019;14(2):e0212571.

108. Balasubramaniam D, Schiffer J, Parnell J, Mir SP, Amaro RE, Komives EA. How the ankyrin and SOCS box protein, ASB9, binds to creatine kinase. Biochemistry. 2015;54(8):1673-80.

109. Kile BT, Schulman BA, Alexander WS, Nicola NA, Martin HM, Hilton DJ. The SOCS box: a tale of destruction and degradation. Trends Biochem Sci. 2002;27(5):235-41.

110. Schiffer J, Malmstrom R, Parnell J, Ramirez-Sarmiento C, Reyes J, Amaro R, Komives EA. Model of the Ankyrin and SOCS Box Protein, ASB9, E3 Ligase Reveals a Mechanism for Dynamic Ubiquitin Transfer. Structure. 2016;24(8):1248-56.

111. Kwon S, Kim D, Rhee J, Park J, Kim D, Kim D, et al. ASB9 interacts with ubiquitous mitochondrial creatine kinase and inhibits mitochondrial function. BMC Biology. 2010;8(1):23.

112. Swatek K, Komander D. Ubiquitin modifications. Cell Research. 2016;26(4):399-422.

113. Guo HJ, Rahimi N, Tadi P. Biochemistry, Ubiquitination. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing

Copyright © 2023, StatPearls Publishing LLC.; 2023.

114. Hoeller D, Dikic I. How the proteasome is degraded. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2016;113(47):13266-8.

115. Herrmann J, Lerman L, Lerman A. Ubiquitin and Ubiquitin-Like Proteins in Protein Regulation. Circulation Research. 2007;100(9):1276-91.

116. Lecker SH, Goldberg AL, Mitch WE. Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. J Am Soc Nephrol. 2006;17(7):1807-19.

117. Vergnolle N, Wallace JL, Bunnett NW, Hollenberg MD. Protease-activated receptors in inflammation, neuronal signaling and pain. Trends Pharmacol Sci. 2001;22(3):146-52.

118. Willis Fox O, Preston R. Molecular basis of protease-activated receptor 1 signaling diversity. Journal of Thrombosis and Haemostasis. 2020;18(1):6-16.

119. Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. Cell. 1991;64(6):1057-68.

120. Kahn M, Ishii K, Kuo W, Piper M, Connolly A, Shi Y, et al. Conserved Structure and Adjacent Location of the Thrombin Receptor and Protease-Activated Receptor 2 Genes Define a Protease-Activated Receptor Gene Cluster. Molecular Medicine. 1996;2(3):349-57.

121. Han X, Nieman M, Kerlin B. Protease-activated receptors: An illustrated review. Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis. 2021;5(1):17-26.

122. Chen X, Zhang H, Hao H, Zhang X, Song H, He B, et al. Thrombin induces morphological and inflammatory astrocytic responses via activation of PAR1 receptor. Cell Death Discovery. 2022;8(1).

123. Han X, Nieman MT. The domino effect triggered by the tethered ligand of the protease activated receptors. Thromb Res. 2020;196:87-98.

124. Smith T, Li J, Dores M, Trejo J. Protease-activated receptor-4 and purinergic receptor P2Y12 dimerize, co-internalize, and activate Akt signaling via endosomal recruitment of β-arrestin. Journal of Biological Chemistry. 2017;292(33):13867-78.

125. Grimsey N, Soto AG, Trejo J. Regulation of protease-activated receptor signaling by post-translational modifications. IUBMB Life. 2011;63(6):403-11.

126. Gurevich VV, Gurevich EV. GPCR Signaling Regulation: The Role of GRKs and Arrestins. Front Pharmacol. 2019;10:125.

127. Sulon SM, Benovic JL. Targeting G protein-coupled receptor kinases (GRKs) to G protein-coupled receptors. Curr Opin Endocr Metab Res. 2021;16:56-65.

128. Zhao L, Hu J, Zheng P, Mi B, Chen Z, Zhao X, et al. PAR1 regulates sepsis-induced vascular endothelial barrier dysfunction by mediating ERM phosphorylation via the RhoA/ROCK signaling pathway. Int Immunopharmacol. 2023;124(Pt B):110992.

129. Tiruppathi C, Yan W, Sandoval R, Naqvi T, Pronin AN, Benovic JL, Malik AB. G protein-coupled receptor kinase-5 regulates thrombin-activated signaling in endothelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97(13):7440-5.

130. Wess J, Oteng A, Rivera-Gonzalez O, Gurevich EV, Gurevich VV. β−Arrestins: Structure, Function, Physiology, and Pharmacological Perspectives. Pharmacological Reviews. 2023;75(5):854-84.

131. Chen C, Paing MM, Trejo J. Termination of Protease-activated Receptor-1 Signaling by β-Arrestins Is Independent of Receptor Phosphorylation. Journal of Biological Chemistry. 2004;279(11):10020-31.

132. Arakaki A, Pan W, Wedegaertner H, Roca-Mercado I, Chinn L, Gujral T, Trejo J. α-Arrestin ARRDC3 tumor suppressor function is linked to GPCR-induced TAZ activation and breast cancer metastasis. Journal of Cell Science. 2021;134(8):jcs.254888.

133. Dores M, Trejo J. Endo-lysosomal sorting of G-protein-coupled receptors by ubiquitin: Diverse pathways for G-protein-coupled receptor destruction and beyond. Traffic.2019;20(2):101-9.

134. Burton J, Grimsey N. Ubiquitination as a Key Regulator of Endosomal Signaling by GPCRs. Frontiers in Cell and Developmental Biology. 2019;7.

135. Goth CK, Petäjä-Repo UE, Rosenkilde MM. G Protein-Coupled Receptors in the Sweet Spot: Glycosylation and other Post-translational Modifications. ACS Pharmacol Transl Sci. 2020;3(2):237-45.

136. Patwardhan A, Cheng N, Trejo J. Post-Translational Modifications of G Protein-Coupled Receptors Control Cellular Signaling Dynamics in Space and Time. Pharmacol Rev. 2021;73(1):120-51.

137. Compton S. Glycosylation and proteinase-activated receptor function. Drug Development Research. 2003;59(4):350-4.

138. Xiao YP, Morice AH, Compton SJ, Sadofsky L. N-linked glycosylation regulates human proteinase-activated receptor-1 cell surface expression and disarming via neutrophil proteinases and thermolysin. J Biol Chem. 2011;286(26):22991-3002.

139. Soto AG, Trejo J. N-Linked Glycosylation of Protease-activated Receptor-1 Second Extracellular Loop. Journal of Biological Chemistry. 2010;285(24):18781-93.

140. Soto AG, Smith TH, Chen B, Bhattacharya S, Cordova IC, Kenakin T, et al. N-linked glycosylation of protease-activated receptor-1 at extracellular loop 2 regulates G-protein signaling bias. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015;112(27):E3600-8.

141. Price R, Ferrari E, Gardoni F, Mercuri NB, Ledonne A. Protease-activated receptor 1 (PAR1) inhibits synaptic NMDARs in mouse nigral dopaminergic neurons. Pharmacol Res. 2020;160:105185.

142. Liu X, Yu J, Song S, Yue X, Li Q. Protease-activated receptor-1 (PAR-1): a promising molecular target for cancer. Oncotarget. 2017;8(63):107334-45.

143. Alturkistani A, Ghonem N, Power-Charnitsky VA, Pino-Figueroa A, Migliore MM. Inhibition of PAR-1 Receptor Signaling by Enoxaparin Reduces Cell Proliferation and Migration in A549 Cells. Anticancer Res. 2019;39(10):5297-310.

144. Lucy MC. Symposium review: Selection for fertility in the modern dairy cow—Current status and future direction for genetic selection. Journal of Dairy Science. 2019;102(4):3706-21.

145. Gao F, Zhang J, Wang X, Yang J, Chen D, Huff V, Liu Y. Wt1 functions in ovarian follicle development by regulating granulosa cell differentiation. Human Molecular Genetics. 2014;23(2):333-41.

146. Kranc W, Brązert M, Ożegowska K, Nawrocki M, Budna J, Celichowski P, et al. Expression Profile of Genes Regulating Steroid Biosynthesis and Metabolism in Human Ovarian Granulosa Cells—A Primary Culture Approach. International Journal of Molecular Sciences. 2017;18(12):2673.

147. Ndiaye K, Fayad T, Silversides DW, Sirois J, Lussier JG. Identification of downregulated messenger RNAs in bovine granulosa cells of dominant follicles following stimulation with human chorionic gonadotropin. Biol Reprod. 2005;73(2):324-33.

148. Wissing ML, Kristensen SG, Andersen CY, Mikkelsen AL, Høst T, Borup R, Grøndahl ML. Identification of new ovulation-related genes in humans by comparing the transcriptome of granulosa cells before and after ovulation triggering in the same controlled ovarian stimulation cycle. Human Reproduction. 2014;29(5):997-1010.

149. Schuermann Y, Rovani MT, Gasperin B, Ferreira R, Ferst J, Madogwe E, et al. ERK1/2-dependent gene expression in the bovine ovulating follicle. Sci Rep. 2018;8(1):16170.

150. Tokuoka M, Miyoshi N, Hitora T, Mimori K, Tanaka F, Shibata K, et al. Clinical significance of ASB9 in human colorectal cancer. Int J Oncol. 2010;37(5):1105-11.

151. Uranbileg B, Enooku K, Soroida Y, Ohkawa R, Kudo Y, Nakagawa H, et al. High ubiquitous mitochondrial creatine kinase expression in hepatocellular carcinoma denotes a poor prognosis with highly malignant potential. Int J Cancer. 2014;134(9):2189-98.

152. Wang H, Ubl J, Stricker R, Reiser G. Thrombin (PAR-1)-induced proliferation in astrocytes via MAPK involves multiple signaling pathways. American Journal of Physiology-Cell Physiology. 2002;283(5):C1351-C64.

153. Roach L, Petrik J, Plante L, Lamarre J, Gentry P. Thrombin Generation and Presence of Thrombin Receptor in Ovarian Follicles1. Biology of Reproduction. 2002;66(5):1350-8.

154. Dumesic D, Meldrum D, Katz-Jaffe M, Krisher R, Schoolcraft W. Oocyte environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health. Fertility and Sterility. 2015;103(2):303-16.

155. Kranc W, Brązert M, Budna J, Celichowski P, Bryja A, Nawrocki M, et al. Genes responsible for proliferation, differentiation, and junction adhesion are significantly up-regulated in human ovarian granulosa cells during a long-term primary in vitro culture. Histochemistry and Cell Biology. 2019;151(2):125-43.