

Effets de l'inactivation de la sous-unité βA de l'inhibine par ARNi sur le développement des cellules de la granulosa chez la souris

Mohamed M'BAYE^{1, 2*}, Guohua HUA², Adama Konaté¹ et Liguo YANG²

¹Département de Biologie de la Faculté des Sciences et des Techniques de l'Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako

²Key Lab of Agricultural Animal Genetics, Breeding and Reproduction, Ministry of Education, Huazhong Agricultural University, Wuhan, China

*courriel de l'auteur correspondant : mbayemohamed@yahoo.fr

Résumé

Les inhibines sont des glycoprotéines dont la principale action est d'inhiber la sécrétion de l'hormone folliculostimulante (FSH) par l'hypophyse afin de contrôler par rétroaction négative la folliculogénèse et la spermatogénèse.

Le but de cette étude était de déterminer le mécanisme d'action de la sous-unité βA de l'inhibine sur le développement des cellules de la granulosa chez la souris.

Les méthodes utilisées dans l'étude sont la culture cellulaire, le PCR en temps réel, le Western blot, la cytométrie en flux et ELISA.

Les résultats ont indiqué que l'expression relative de l'ARNm et de la protéine de la sous-unité βA de l'inhibine dans les cellules de la granulosa de souris a été considérablement réduite par l'ARNi. L'expression relative des ARNm de CYP11A1 et de CYP19A1 était significativement régulée à la baisse. Les protéines Cycline D1 et Cycline E ont été régulées à la baisse, tandis que les protéines Caspase-3, BAX et p21 ont été régulées à la hausse. Les cellules apoptotiques ont augmenté de façon significative.

Les concentrations d'estradiol et de la progestérone ont baissé dans le milieu de culture. Le cycle cellulaire a été arrêté à la phase G1. Ces résultats ont indiqué que la sous-unité βA de l'inhibine pourrait jouer un rôle important dans la régulation de l'apoptose, la croissance, la prolifération et la stéroïdogénèse des cellules de la granulosa chez la souris.

Des travaux supplémentaires seront nécessaires pour approfondir les connaissances sur son mécanisme d'action sur la folliculogénèse chez la souris.

Mots-clés : Inhibine βA , ARNi, Folliculogénèse, Cellules de la granulosa

Date of Submission: 08-04-2022

Date of Acceptance: 25-04-2022

I. Introduction

La folliculogénèse chez les mammifères implique la progression du développement d'un follicule primordial, contenant une seule couche de cellules de la granulosa autour de l'ovocyte, à un grand follicule préovulatoire constitué de plusieurs couches de cellules de la granulosa murale renfermant un complexe cumulus – ovocyte. Au cours de ce processus, les cellules de l'ovocyte et de la granulosa se développent et se différencient, tandis que les cellules thèques sont recrutées à partir du tissu stromal. Après l'ovulation, les cellules de la granulosa et de la thèque se différencient en cellules lutéales. L'ensemble de ce processus est régulé et coordonné par des hormones endocrines telles que les gonadotrophines et par des facteurs de croissance locaux de manière autocrine ou paracrine [1]. Les principales fonctions des cellules de la granulosa comprennent la production de stéroïdes sexuels, ainsi qu'une myriade de facteurs de croissance censés interagir avec l'ovocyte au cours de son développement. La production de stéroïdes sexuels consiste en l'hormone folliculo-stimulante (FSH) stimulant les cellules de la granulosa pour convertir les androgènes en œstradiol par l'aromatase pendant la phase folliculaire du cycle menstruel [2].

L'inhibine a d'abord été isolée du liquide folliculaire ovarien et caractérisée comme des protéines principalement produites dans les testicules et les ovaires qui peuvent agir de manière endocrinienne pour réguler négativement la synthèse et la sécrétion de l'hormone folliculo-stimulante (FSH) par l'hypophyse antérieure [3]. L'inhibine est un hétérodimère d'une sous-unité α unique disulfure liée à l'une des deux sous-unités β (βA et βB), aboutissant respectivement à l'inhibine A ou à l'inhibine [4,5]. Les trois sous-unités sont codées par des gènes séparés et appartiennent à la superfamille de protéines TGF- β [6,7]. En plus de leur rôle

dans la rétroaction endocrinienne dans le système reproducteur, les inhibines favorisent les rôles régulateurs locaux dans de nombreux tissus extra-gonadiques, y compris le cerveau, les surrénales, la moelle osseuse, le placenta et, plus particulièrement, l'hypophyse antérieure. Chez la femelle, l'inhibine est principalement produite par les cellules de la granulosa [8]. La suppression de la sous-unité β A activine /inhibine partagée entraîne une létalité périnatale [9] ou une hypofertilité lorsqu'elle est conditionnellement nulle dans l'ovaire [10], alors que la suppression de la sous-unité unique d'inhibine α (Inha) entraîne le développement des tumeurs stromales du cordon sexuel chez des souris adultes dès l'âge de 4 semaines [11]. Des études *in vivo* impliquant des souris transgéniques «knock-out» déficientes en sous-unités inhibine / activine α ou β , les récepteurs de l'activine ont également fourni des indices vitaux sur les rôles critiques de ces protéines dans la fonction ovarienne [12].

Des animaux domestiques et de laboratoire ont été immunisés contre une variété de préparations d'inhibine et des augmentations du taux d'ovulation ont été signalées chez des juments [13], des brebis [14,15,16], bovins [14], caprins [17] et cobayes [18] et la production de sperme chez les béliers [19]).

Récemment, il a été découvert que l'inhibine se lie (via sa sous-unité α) avec une forte affinité au récepteur du TGF- β de type III, le β -glycane [20], et que cette liaison améliore nettement la liaison de l'inhibine (via son sous-unité β) au récepteur de l'activine de type II.

L'interférence ARN (ARNi) est le processus d'inactivation génique spécifique à la séquence, post-transcriptionnel chez les animaux et les plantes, initié par un ARN double brin (ARNdb) homologue en séquence au gène cible [21]. Récemment, l'ARNi a été utilisé comme un outil puissant pour caractériser le mécanisme d'action de l'inhibine α dans les cellules de Sertoli de souris et les cellules primaires de l'hypophyse antérieure de souris [22,23]. Cependant, la fonction la sous-unité β A de l'inhibine sur le développement des cellules de la granulosa chez la souris par l'ARNi reste à explorer. Par conséquent, l'ARNi est une méthode efficace pour inactiver partiellement la sous-unité β A de l'inhibine. La compréhension du mécanisme par lequel la sous-unité β A de l'inhibine est impliquée dans la régulation du développement des cellules de la granulosa élargira nos connaissances sur la reproduction. Ce qui pourrait en retour nous aider à développer de nouvelles alternatives à la superovulation chez les animaux.

L'objectif de cette étude était de déterminer le mécanisme d'action de la sous-unité β A de l'inhibine sur le développement des cellules de la granulosa chez la souris.

II. Matériel et Méthodes

2.1. Matériel animal

Des souris femelles immatures de souche Kunming (qualité SPF, âgées de 21 jours) ont été achetées auprès du Centre Médical des animaux de laboratoire de la province du Hubei, Wuhan, Chine et logées dans une seule pièce dans des conditions de température constante (20 à 25°C) et d'humidité (60 à 75%), éclairage (cycle lumière/obscurité de 12 h) avec de la nourriture et de l'eau *ad libitum*. Tous les protocoles ont été approuvés par le Comité Ethique institutionnel concernant les soins et l'utilisation des animaux.

2.2. Isolement et culture des cellules de la granulosa de souris

Pour collecter les cellules de la granulosa, des souris immatures de souche Kunming ont été stimulées pendant 44 à 48 h avec du PMSG. Les ovaires ont été collectés et les cellules de la granulosa ont été récoltées en perforant de grands follicules antraux dans du DMEM / F12 (Invitrogen, USA) supplémenté avec 2,4 g de NaHCO₃, 0,3% de BSA, 10 mm HEPES et 1% de pénicilline-streptomycine (Invitrogen). Les cellules ont été filtrées à travers une maille de nylon de 40 μ m (Becton, Dickinson and Company) pour éliminer les débris tissulaires et les ovocytes. Les cellules de granulosa ont été centrifugées à 1500 tr / min pendant 5 min, le surnageant a été aspiré et le culot a été remis en suspension et cultivé dans du milieu de culture DMEM / F12 supplémenté avec 10% de FBS et 1% de pénicilline et de streptomycine. La viabilité des cellules de la granulosa a été déterminée par le bleu de trypan. Les cellules ont été comptées à chaque passage et ensemencées à une densité de 2 x 10⁶ cellules viables dans des plaques à 6 puits pour la transfection. Pour l'extraction des protéines, les cellules ont été cultivées dans des boîtes de culture de 35 mm et plus tard transfectées avec les vecteurs recombinants respectifs. Toutes les cultures ont été réalisées à 37°C dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO₂.

2.3. Construction et transfection de vecteurs pSIREN-RetroQ-ZsGreen recombinants

En bref, trois sites cibles de siRNA ont été sélectionnés dans la séquence codante de l'inhibine bêta A de souris (INH β A, NM_008380) selon le programme en ligne siRNA (<http://www.genscript.com>) aux positions 661, 307 et 1021 (tableau 1). Pour obtenir un ARN en épingle à cheveux court, un oligonucléotide typique qui a 5 bases contenant un site de restriction à son extrémité 5', 19 bases de brin sens, 7 à 9 bases de boucle en épingle à cheveux, 19 bases de brin antisens, 6 bases de terminateur et 6 des bases correspondant à un site de restriction Hind III unique (résultant en une longueur totale de 65 bases) et 2 oligonucléotides complémentaires ont été synthétisés. Ceux-ci ont été annelés et insérés dans les sites BamHI et EcoRI du vecteur pSIREN-

RetroQ-ZsGreen RNAi-Ready (BD Biosciences, Clontech, CA). Les plasmides recombinants ont été désignés comme pshRNA-A1, pshRNA-A2 et pshRNA-A3, respectivement. Un plasmide (pshRNA négatif) codant pour un siRNA en épingle à cheveux comprenant une séquence non-sens qui n'a pas été trouvée dans les génomes de souris ou humain a été utilisé comme contrôle négatif [22].

Les plasmides de pshRNA-A1, pshRNA-A2, pshRNA-A3 et pshRNA-négatifs ont été extraits sous forme superenroulée en utilisant le kit de plasmide EndoFree (Tiangen, Beijing, Chine) et confirmés par séquençage. Ces vecteurs exprimaient indépendamment un *Zoanthus* sp protéine fluorescente verte, qui avait été conçue pour une fluorescence plus brillante (maximum d'excitation = 496 nm; maximum d'émission = 506 nm), et par conséquent, les cellules transfectées ont émis une fluorescence verte (GFP).

Tableau 1. Séquences cibles de l'inhibine βA de souris (NM_008380)

Noms	Séquences cibles 5'-->3'	Position on CDS
siRNA-A1	GGCTAACAGAACCCAGGACC	661
siRNA-A2	GGATGGACCTAACTCTCAG	307
siRNA-A3	GGAACAGTCACATAGACC	1021
Contrôle Négatif *	TGGACATAGGCGACGTGT	

* (Cai et al. 2011) [22]

Un jour avant la transfection, les cellules de la granulosa (2×10^5 cellules viables) ont étéensemencées dans une plaque à 6 puits avec une confluence de 70 à 80%. Quatre groupes de cellules de la granulosa ont été préparés au total pour être transfectées par pshRNA-A1, pshRNA-A2, pshRNA-3 ou pshRNA-négatif, respectivement. La procédure de transfection a été réalisée en utilisant le réactif Lipofectamine® RNAiMAX (Invitrogen) selon les instructions du fabricant. Après 6 h, le milieu de transfection a été changé en milieu de croissance frais sans antibiotiques. Les cellules ont été collectées pour l'ARN ou l'extraction de protéines, et dans certaines expériences, le milieu de culture a été collecté et conservé pour la détection des hormones 48 h après transfection.

2.4. Extraction d'ARN et PCR en temps réel

Les cellules de la granulosa (2×10^6 cellules viables), 48 h après la transfection, ont été lavées dans du PBS et l'ARN total a été isolé en utilisant TRIzol (Invitrogen, USA). Pour l'élimination de l'ADN génomique résiduel, les échantillons ont été traités avec de la DNaseI. L'ADNc du premier brin a été synthétisé en utilisant le kit de synthèse d'ADNc RevertAid First Strand (code : # K1622; Fermentas, USA) et une PCR quantitative en temps réel a été réalisée en utilisant SYBRGreen (SYBR Green /Fluorescein qPCR Master Mix 2X; Fermentas, USA). Des paramètres de PCR spécifiques ont été utilisés dans un système de PCR en temps réel ViiA™ 7. Toutes les paires d'amorces utilisées pour la PCR en temps réel sont résumées dans le tableau 2. Pour vérifier la pureté du produit de PCR ; les échantillons ont été soumis à des analyses de courbe de fusion après des réactions de PCR en temps réel. Les nombres de cycle seuil (CT) ont été calculés pour l'ADNc amplifié pour chaque ARNm étudié et pour le gène domestique (β -actine) dans chaque échantillon. Les niveaux d'expression génique ont été normalisés au gène domestique GAPDH en utilisant ce qui suit : $2^{-\Delta\Delta CT}$ [24].

Tableau 2. Séquences des d'amorces pour la PCR quantitative en temps réel

Nom du gene	Numéro Accession	Séquences des amorces (5'→3')	Température de denaturation (°C)	Taille du produit (pb)
<i>GAPDH</i>	NM_008084	GGCAAATTCAACGGCACAGT TAGGGCCTCTCTTGCTCAGT	59	900
<i>INHβA</i>	NM_008380	GGTATGTGGAGATAGAGGACC GCTGAAATAGACGGATGGTG	58	237
<i>CYP19A1</i>	NM_007810	GCACAGTCACTACATCTCCCGA CACACAAACTTCCACCATTCTGA	58	172
<i>CYP11A1</i>	NM_019779	CACTGAGACTCCACCCCAT CTCGACCCATGGCAAAGCTA	60	124

2.5. Extraction de protéines et Western blot

Des cellules de granulosa de souris (2×10^6 cellules viables) transfectées avec des vecteurs ARNi recombinants de la sous-unité βA de l'inhibine ont été collectées 48 h après transfection, lavées dans du PBS froid et lysées dans du tampon RIPA (Santa Cruz, USA) contenant un cocktail d'inhibiteur de protéase (Santa Cruz, USA). Après 1 h d'incubation à 4°C, les cellules ont été centrifugées à 12 000 rpm pendant 10 minutes

pour l'élimination des débris cellulaires. La concentration totale de protéine a été mesurée par dosage BCA (Pierce, Rockford, USA), et 50 μ g de protéine totale ont été soumis à une électrophorèse sur gel. Les protéines ont été séparées sur un gel de polyacrylamide à 12% avant de les transférer sur des membranes PVDF (Millipore, Bedford, MA). Après blocage dans du PBS supplémenté avec 5% de lait écrémé (Sigma-Aldrich) et 0,05% de Tween 20 (Sigma-Aldrich), les membranes ont été incubées pendant une nuit à 4°C avec un anticorps primaire : anti-inhibine β A (1: 200, PTG, Chicago, USA); anti-P21 (1: 700, Bioworld Technology, USA); anti-caspase-3 (1: 200, Santa Cruz, USA), anti-cycline A1 (1: 200, Santa Cruz), anti-cycline B1 (1: 200, Santa Cruz) et anti-GAPDH (1: 1000, Hangzhou Goodhere Biotechnology, Chine). Après incubation avec l'anticorps primaire, les membranes ont été lavées trois fois avec du PBS contenant 0,1% de Tween 20, incubées pendant 2 h avec des anticorps secondaires de chèvre anti-lapin marqués à la HRP dilués 5000 fois (Wuhan Boster Biological Engineering Co., Ltd.) à la température du local et lavé trois fois avec du PBS préchauffé contenant 0,1% de Tween 20.

Après lavage, des transferts ont été développés en utilisant le système de détection ECL Western Blotting (Thermo, USA), puis exposés à un film radiographique pour la visualisation des bandes de protéines. Les transferts de PVDF ont ensuite été dépouillés des anticorps liés et traités avec un anticorps de lapin anti-GAPDH (dilution 1: 1000; Hangzhou Goodhere Biotechnology Co., LTD, Chine) pour normalisation. Les intensités des bandes ont été mesurées avec le logiciel AlphaEaseFC (AlphaInnotech, USA).

2.6. Analyse de l'apoptose

Après transfection, les cellules de la granulosa (2×10^6 cellules viables) ont été lavées avec du PBS puis, récoltées par digestion avec de la trypsine sans EDTA à 37 ° C pendant 5 min. L'apoptose cellulaire a été sondée avec l'Annexine V-APC / 7-AAD et plus tard détectée par cytométrie en flux (BD FACS Calibur, USA) selon les instructions du fabricant (Apoptosis Detection Kit, KeyGEN, Nanjing, Chine). Dans ce kit, les cellules viables restent négatives pour l'Annexine V-APC et 7-AAD; les cellules apoptotiques précoces se colorent positivement avec l'Annexine V-APC et restent négatives pour le 7-AAD, tandis que les cellules apoptotiques tardives sont doublement colorées par l'Annexine V-APC et le 7-AAD. Les expériences ont été répétées trois fois, indépendamment.

2.7. Analyse du cycle cellulaire

Les cellules de la granulosa de souris (2×10^6 cellules viables) transfectées avec différents vecteurs ARNi de la sous-unité β A de l'inhibine ont été récoltées 48 h après transfection, lavées avec du PBS, fixées dans de l'éthanol glacé à 70% pendant une nuit à 4° C, lavées à nouveau dans du PBS et colorées avec une solution d'iodure de propidium / RNase A à 37°C dans la chambre noire pendant 30 min. Une analyse cytométrique en flux a été réalisée en utilisant un logiciel BD FACS Calibur (Becton, Dickinson and Company, USA) et ModFit LT pour Mac V3.0. Pour chaque détermination, un minimum de 20 000 cellules a été analysé. Toutes les expériences ont été répétées trois fois indépendamment.

2.8. Mesure des hormones stéroïdes

Les cellules de la granulosa (5×10^4 cellules viables) ont été cultivées dans une plaque à 96 puits avec 200 μ l de milieu. Après transfection avec pshRNA-A3 et pshRNA-négatif, respectivement, le milieu de culture a été collecté 48 h après pour mesurer les concentrations d'estradiol et de progestérone en utilisant des kits ELISA de souris. La procédure ELISA a été réalisée conformément aux instructions du fabricant. La sensibilité des kits ELISA d'estradiol et de progestérone était de 2 à 50 ng / L et de 40 à 2400 pmol / L, respectivement. Toutes les expériences ont été répétées indépendamment trois fois.

2.9. Analyse statistique

Toutes les données sont représentées sous forme de moyenne \pm SEM d'expériences répétées (n = 3). L'analyse statistique a été réalisée à l'aide de l'ANOVA. Une valeur de P < 0,05 a été considérée comme significative.

III. Résultats

3.1. Identification et validation des plasmides ARNi la sous-unité β A de l'inhibine

Les plasmides recombinants ARNi la sous-unité β A de l'inhibine ont été identifiés par une analyse de restriction et un séquençage. Il y avait un site *HindIII* en position 2456 dans le plasmide pSIREN-RetroQ-ZsGreen, et un autre site *HindIII* a été inséré dans le fragment en épingle à cheveux du shRNA. L'analyse de 2 fragments (respectivement 2460 et 4173 paires de bases) libérés des plasmides recombinants par digestion avec des enzymes de restriction homologues a révélé que tous les siRNA étaient insérés correctement. Ces clones ont en outre été confirmés par séquençage (TaKaRa, Co., Japon).

3.2 La sous-unité β A de l'inhibine a été efficacement inactivée par le pshRNA-A3

Pour révéler la distribution au niveau cellulaire de l'expression de la sous-unité β A de l'inhibine, des cellules de granulosa ont été cultivées et transfectées par pshRNA-A1, pshRNA-A2, pshRNA-A3 et pshRNA-négatif, respectivement. 48 h après la transfection, la présence d'une fluorescence verte sous microscope à fluorescence (Nikon TE2000-U, Japon) a indiqué que la sous-unité β A de l'inhibine était normalement exprimée dans les cellules de la granulosa de souris (figure 1).

Pour la poursuite de la progression de l'expérience, nous avons sélectionné le plasmide le plus efficace pour les cellules de la granulosa. Nous avons construit trois plasmides recombinants contre l'inhibine β A et les avons transfectés dans les cellules primaires de la granulosa. Après 48 h, nous avons détecté leur efficacité d'inactivation par qPCR et par western blot. Les résultats ont montré que les trois plasmides étaient capables de réguler à la baisse l'expression de la sous-unité β A de l'inhibine aux niveaux transcriptionnel et traductionnel. Le pshRNA-A3 a induit le meilleur effet d'inactivation dans les cellules de la granulosa par rapport aux autres plasmides.

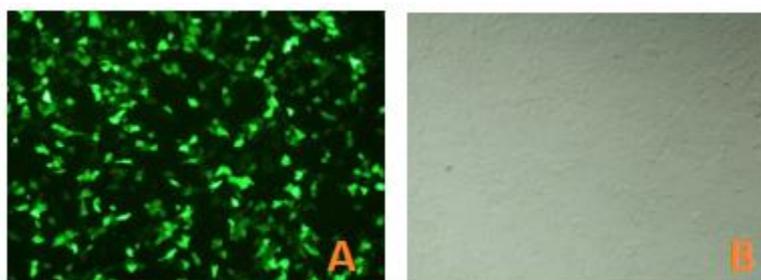


Figure 1. Expression de la sous-unité β A de l'inhibine dans les cellules de la granulosa (CG). Expression de la GFP dans les CG avec (A) ou sans (B) transfection par des plasmides recombinants ARNi 48 h après.

3.3 Les effets d'inactivation de la sous-unité β A de l'inhibine sur l'apoptose

Pour élucider le rôle de la sous-unité β A de l'inhibine dans la régulation de l'apoptose des cellules de la granulosa, nous avons détecté l'exposition de la phosphatidylserine à la surface cellulaire avec une double coloration Annexine V-APC / 7-AAD dans les cellules de la granulosa transfectées. Les résultats ont montré que l'inactivation de la sous-unité β A de l'inhibine augmentait l'apoptose dans le groupe pshRNA-A3 par rapport à celle du témoin (tableau 3).

Pour davantage révéler les effets du "knock-down" de la sous-unité β A de l'inhibine sur l'apoptose, nous avons quantifié le niveau de protéines Casp3 et de p21 dans ces cellules. Le "knock-down" de la sous-unité β A de l'inhibine a diminué de manière significative l'expression protéique de casp3 et p21 (Figure 2). Ces résultats ont confirmé que l'inactivation de la sous-unité β A de l'inhibine par ARNi induisait l'apoptose dans les cellules de la granulosa de souris.

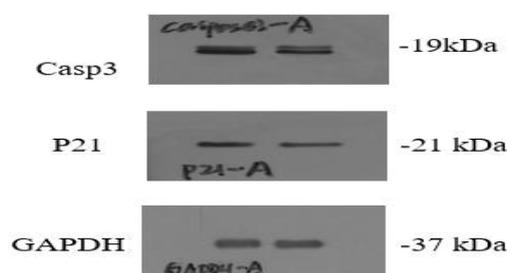


Figure 2. L'expression des protéines des gènes liés à l'apoptose. Les résultats ont montré que la Caspase-3 et le p21 étaient régulés à la hausse après l'inactivation du gène de la sous-unité β A de l'inhibine.

Tableau 3. Effets de l'inactivation de la sous-unité β A de l'inhibine sur la sécrétion d'estradiol et de progestérone

Groupes	progestérone	
	Estradiol (E2) (ng/L)	Progesterone (P4) (pmol/L)
pshRNA-A3	48.04 ± 0.06*	2089 ± 1.66
pshRNA-Négatif	71.92 ± 0.96	2307 ± 5.40*

Chaque expérience a été répétée 3 fois. Les valeurs représentent la moyenne ± SEM (n = 3). "*" indique le niveau de signification dans les colonnes (P < 0,01).

Tableau 4. Effets de l'inactivation de la sous-unité β A de l'inhibine sur l'apoptose.

Groupes	Cellules vivantes (%)	Cellules Apoptotiques (%)
pshRNA-A3	81.65 \pm 0.30	18.35 \pm 1.58*
pshRNA-Négatif	86.30 \pm 0.66	13.70 \pm 2.23

Chaque expérience a été répétée 3 fois. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM (n = 3). Tous les résultats ont été évalués par ANOVA unidirectionnelle. "*" indique le niveau de signification dans les colonnes (P < 0,05).

3.4 Les cellules de la granulosa ont été arrêtées à la phase G1 après le "knock-down" de la sous-unité β A de l'inhibine

Pour déterminer si la sous-unité β A de l'inhibine est impliquée dans la régulation de la progression du cycle cellulaire, nous avons saturé les cellules de la granulosa transfectés avec de l'iodure de propidium (PI) qui colore généralement le contenu nucléaire d'une cellule. Ensuite, les cellules ont été soumises à un trieur de cellules activé par fluorescence (FACS). Les résultats ont montré qu'un nombre significatif de cellules de la granulosa ont été arrêtés à la phase G1 après le "knock-down" de la sous-unité β A de l'inhibine (P < 0,05) par rapport au groupe témoin (tableau cycle cellulaire).

De plus, pour confirmer davantage les résultats de l'analyse du cycle cellulaire, le niveau de protéine des facteurs du cycle cellulaire (cycline A1 et cycline B) a été déterminé par Western blot. Les résultats ont montré qu'après l'inactivation de la sous-unité β A de l'inhibine par ARNi, une diminution significative du taux de protéine de la cycline D1 et de la cycline E a été observée (P < 0,05) (Figure 3). Ces résultats suggéraient que l'inactivation de la sous-unité β A de l'inhibine bloque la croissance cellulaire en induisant l'arrêt du cycle cellulaire dans les cellules de la granulosa de souris.

Tableau 5. Effets de l'inactivation de la sous-unité β A de l'inhibine sur le cycle cellulaire.

Groups	G1 (%)	S (%)	G2 (%)
pshRNA-A3	69.51 \pm 0.28a	11.92 \pm 2.09	18.56 \pm 1.81
pshRNA-Negative	65.10 \pm 2.06b	13.95 \pm 0.79	20.95 \pm 1.55

Chaque expérience a été répétée 3 fois. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM (n = 3). Tous les résultats ont été évalués par ANOVA unidirectionnelle. « a » et « b » indiquent le niveau de signification dans les colonnes (P < 0,05).

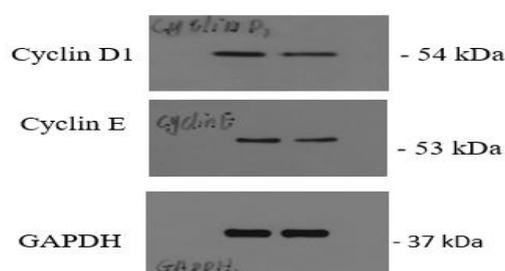


Figure 3. Les expressions des protéines des gènes liés au cycle cellulaire. Les résultats ont montré que les taux de la cycline D1 et de la cycline E étaient significativement régulés à la baisse dans le groupe pshRNA-A3 48 h après la transfection, par rapport au groupe pshRNA-négatif.

3.5 Le "knock-down" de la sous-unité β A de l'inhibine a diminué la concentration d'estradiol et de progestérone

Pour évaluer l'effet de l'inhibition de l'INH β A sur les hormones stéroïdes, nous avons mesuré la concentration de E2 et de progestérone dans le milieu de culture 48 h après la transfection. Les résultats ont montré qu'après transfection, la libération de E2 et de progestérone dans les cellules de la granulosa était significativement plus faible dans les groupes pshRNA-A3 (P < 0,01 et P < 0,05, respectivement), par rapport aux groupes pshRNA-négatifs (tableau hormones).

Pour confirmer davantage la libération plus faible de ces hormones stéroïdes par le "knock-down" de la sous-unité β A de l'inhibine, nous avons analysé l'expression de l'ARNm des enzymes stéroïdogènes

(CYP11A1 et CYP19A1) par PCR en temps réel. Les résultats ont montré que l'inactivation de la sous-unité βA de l'inhibine a diminué significativement l'expression de l'ARNm de CYP11A1 et CYP19A1 (Figure 4), qui sont importants pour la synthèse de la progestérone et de l'estradiol. Ces résultats suggèrent que la sous-unité βA de l'inhibine pourrait être impliquée dans la régulation de la stéroïdogénèse dans les cellules de la granulosa de souris.

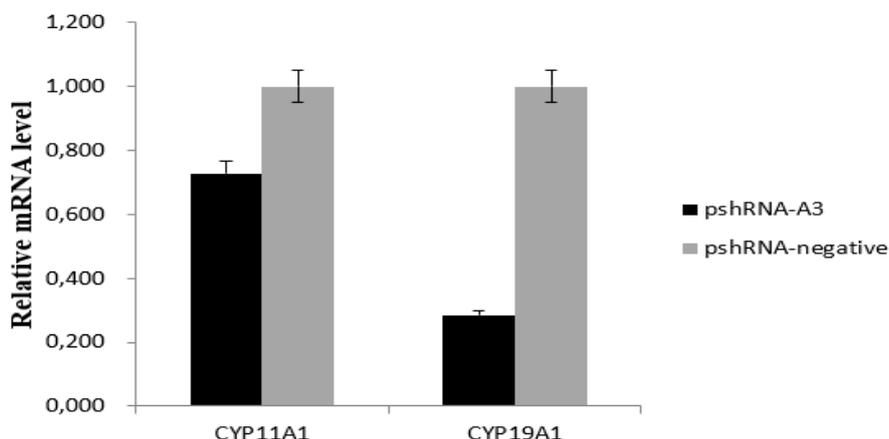


Figure 4. Effets de l'inactivation de la sous-unité βA de l'inhibine sur les gènes liés à la stéroïdogénèse. Pour détecter les effets de l'inactivation de la sous-unité βA de l'inhibine sur la stéroïdogénèse, nous avons quantifié l'expression de l'ARNm des gènes CYP19A1 et CYP11A1 48 h après la transfection. Les résultats ont indiqué que les niveaux relatifs d'ARNm de CYP19A1 et CYP11A1 étaient significativement régulés à la baisse ($P < 0,05$).

IV. Discussion

Le "knock-down" de gènes à l'aide de shRNA représente un excellent outil pour étudier la fonction des gènes liés à la reproduction *in vitro*. Des études antérieures démontrent que la suppression de la sous-unité partagée βA activine / inhibine entraîne une létalité périnatale [9] ou une sous-fertilité lorsqu'elle est conditionnellement nulle dans l'ovaire [10], alors que la suppression seule de la sous-unité α de l'inhibine entraîne le développement de tumeurs stromales du cordon sexuel chez des souris adultes dès l'âge de 4 semaines [11]. Le but de la présente étude était d'étudier les effets de l'inactivation de la sous-unité βA de l'inhibine sur l'apoptose, le cycle cellulaire et la sécrétion d'œstrogènes et de progestérone des cellules de la granulosa de souris. Dans cette optique, nous avons construit avec succès trois plasmides recombinants pour inactiver la sous-unité βA de l'inhibine et les avons transfectés dans les cellules primaires de la granulosa de souris. Après 48 h, en utilisant la microscopie fluorescente, la GFP exprimant les cellules de la granulosa de souris nous a aidés dans le criblage initial et la sélection d'un vecteur très efficace entre trois vecteurs inhibine βA ARNi. Après perturbation de l'expression de l'inhibine βA par l'ARNi, les niveaux d'ARNm et de protéine ont été détectés par qPCR et Western blot. Les mécanismes du développement des cellules de la granulosa, l'apoptose et le cycle cellulaire ont été analysés par la cytométrie en flux. De plus, les hormones ont été détectées par ELISA.

Les résultats ont montré que les trois plasmides étaient capables de réguler à la baisse l'ARNm et les niveaux d'expression des protéines de la sous-unité βA de l'inhibine. Le pshRNA-A3 a induit le meilleur effet d'inactivation dans les cellules de la granulosa (60% de régulation à la baisse) par rapport aux autres plasmides. La présente étude a montré que nos plasmides recombinants étaient normalement exprimés dans les cellules de la granulosa de souris et que les niveaux d'ARNm et de protéines de la sous-unité βA de l'inhibine étaient régulés à la baisse après l'inactivation par ARN interférence.

La fonction principale de l'ovaire est de produire des ovocytes destinés à la fécondation sous forme d'ovules et de créer un environnement favorable au début de la gestation. Chez les mammifères adultes, l'ovaire est un organe hétérogène contenant des follicules à différents stades de développement et des corps jaunes, actifs ou à différents stades d'involution [25]. Le développement folliculaire ovarien chez les mammifères et l'atrésie sont étroitement régulés par la diaphonie des signaux de mort cellulaire et de survie cellulaire, qui comprennent les hormones endocrines (gonadotrophines) et les régulateurs intra-ovariens (stéroïdes gonadiques, cytokines et facteurs de croissance). Le sort du follicule dépend d'un équilibre délicat dans l'expression et les actions des facteurs favorisant la prolifération, la croissance et la différenciation des cellules folliculaires et de ceux induisant la mort cellulaire programmée (apoptose) [26]. À cet égard, le rôle de la sous-unité βA de l'inhibine dans la régulation de l'apoptose des cellules de la granulosa n'est pas complètement compris. Nos résultats ont montré que le "knock-down" de cette sous-unité augmentait l'apoptose, ce qui a été confirmé par la régulation

à la hausse de l'expression protéique de casp3 et p21. Nos résultats concordent avec les premiers rapports observés après une surexpression ou une inactivation de la sous-unité α de l'inhibine dans les cellules de la granulosa de vache et d'oie [27,28,22,29]. Ces données ont confirmé que la sous-unité β A de l'inhibine agirait comme un inhibiteur de l'apoptose et joue un rôle dans la régulation du développement des cellules de la granulosa.

De plus, nous avons démontré que la Caspase 3 augmentait de manière significative après l'inactivation de la sous-unité β A de l'inhibine. La Caspase 3, la plus importante de toutes les caspases effectrices, est localisée en aval dans la cascade caspases et représente la principale molécule effectrice de l'apoptose et exécute de manière irréversible la mort cellulaire programmée [30]. Pendant ce temps, l'analyse par Western blot a indiqué que le niveau d'expression de P21 était plus élevé dans pshRNA-A3 par rapport à pshRNA-négatif. P21 était un puissant inhibiteur de la cycline G1 dépendantes des kinases [31]. Ainsi, cela a montré que la sous-unité β A de l'inhibine pourrait réguler le développement des GC par la suppression de l'apoptose dans les cellules de la granulosa, qui est régulée par l'expression des gènes de la famille Bcl2 induite par la voie de l'apoptose dépendante de la Caspase 3 [22].

Les transitions entre les phases consécutives du cycle cellulaire eucaryote sont conduites par l'activité catalytique d'ensembles sélectionnés de kinases dépendantes des cyclines [32]. Dans un effort pour élucider le rôle de la sous-unité β A de l'inhibine dans la régulation du cycle cellulaire, nous l'avons inactivé par l'ARNi dans les cellules de la granulosa. Le résultat a montré que l'inactivation de la sous-unité β A de l'inhibine est suivie d'une augmentation significative du nombre de cellules de la granulosa en phase G1 et d'une diminution significative du nombre de cellules en phase G2. Ce résultat a indiqué que la sous-unité β A de l'inhibine serait impliquée dans la régulation du cycle cellulaire pendant la transition de phase G1 à S. Pendant ce temps, l'inactivation la sous-unité β A de l'inhibine entraîne également une diminution de la cycline D1 et de la cycline E et une augmentation de l'inhibiteur du cycle cellulaire p21. Ces résultats ont confirmé que la sous-unité β A de l'inhibine affecte le cycle cellulaire par l'activation des cyclines lors de la transition de phase G1 à S. Ce résultat était conforme à celui de la cytométrie en flux. Les kinases dépendantes de la cycline se sont avérées être des régulateurs universels du cycle cellulaire chez tous les eucaryotes. La cycline D1 est une sous-unité régulatrice des kinases dépendantes de la cycline CDK4 et CDK6 et est nécessaire pour que les cellules progressent de G0 / G1 à S [33]. La cycline E est essentielle pour la transition de phase G1 à S [34]. Nous pensons que la sous-unité β A de l'inhibine a le potentiel d'affecter le développement des cellules de la granulosa en régulant leur progression de G1 à S et d'agir de manière autocrine / paracrine pour moduler la fonction ovarienne et la folliculogénèse. Pris ensemble, ces résultats ont montré que la sous-unité β A de l'inhibine semble avoir un rôle crucial dans la progression de la croissance des cellules de la granulosa de souris.

Le développement folliculaire est un processus biologique complexe qui est régulé par divers facteurs des cellules de la granulosa, en particulier la progestérone et l'estradiol [35]. Des études antérieures ont montré qu'un supplément de testostérone pouvait faciliter la synthèse de l'estradiol dans les cellules de granulosa en culture [36,37]. Cependant, les cellules primaires de granulosa cultivées ont également été capables de synthétiser et de sécréter de l'estradiol dans d'autres rapports par un supplément de 10% de FBS [28, 29]. Dans notre système de culture, l'inactivation de la sous-unité β A de l'inhibine a réduit de manière significative le niveau des concentrations de progestérone et d'estradiol. Le niveau inférieur de ces deux hormones pourrait être dû au taux d'ARNm faible du CYP11A1 causé par l'inactivation de la sous-unité β A de l'inhibine, qui est responsable de l'initiation de la cascade de stéroïdogénèse dans l'ovaire [39] et de la diminution du taux d'ARNm du CYP19A1, qui est une enzyme responsable d'une étape clé dans la biosynthèse des œstrogènes à partir des androgènes [22].

En conclusion, cette étude a révélé que la sous-unité β A de l'inhibine pourrait favoriser la croissance et la différenciation des GC de souris en régulant le cycle cellulaire et l'apoptose, et augmenter la synthèse de l'œstradiol et de la progestérone en contrôlant l'expression des gènes stéroïdogènes, ce qui pourrait favoriser la folliculogénèse. Ses rôles dans la régulation de la folliculogénèse ont également été mis en évidence par la régulation des gènes dans les GC de souris.

References

- [1]. Richards J.S., Russell D.L., Ochsner S., Hsieh M., Doyle K.H., Falender A.E., Lo Y.K. & Sharma S.C. (2002) Novel signaling pathways that control ovarian follicular development, ovulation, and luteinization. *Recent Prog Horm Res* **57**, 195-220.
- [2]. Garzo V.G. & Dorrington J.H. (1984) Aromatase activity in human granulosa cells during follicular development and the modulation by follicle-stimulating hormone and insulin. *Am J Obstet Gynecol* **148**, 657-62.
- [3]. Knight P.G. & Glister C. (2001) Potential local regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary. *Reproduction* **121**, 503-12.
- [4]. Mason A.J., Hayflick J.S., Ling N., Esch F., Ueno N., Ying S.Y., Guillemin R., Niall H. & Seeburg P.H. (1985) Complementary DNA sequences of ovarian follicular fluid inhibin show precursor structure and homology with transforming growth factor-beta. *Nature* **318**, 659-63.
- [5]. Knight P.G. (1996) Roles of inhibins, activins, and follistatin in the female reproductive system. *Front Neuroendocrinol* **17**, 476-509.

- [6]. Ying S.Y. (1988) Inhibins, activins, and follistatins: gonadal proteins modulating the secretion of follicle-stimulating hormone. *Endocr Rev* **9**, 267-93.
- [7]. de Kretser D.M., Meinhardt A., Meehan T., Phillips D.J., O'Bryan M.K. & Loveland K.A. (2000) The roles of inhibin and related peptides in gonadal function. *Mol Cell Endocrinol* **161**, 43-6.
- [8]. Findlay J.K., Drummond A.E., Dyson M., Baillie A.J., Robertson D.M. & Ethier J.F. (2001) Production and actions of inhibin and activin during folliculogenesis in the rat. *Mol Cell Endocrinol* **180**, 139-44.
- [9]. Matzuk M.M. (1995) Functional analysis of mammalian members of the transforming growth factor-beta superfamily. *Trends Endocrinol Metab* **6**, 120-7.
- [10]. Pangas S.A., Jorgez C.J., Tran M., Agno J., Li X., Brown C.W., Kumar T.R. & Matzuk M.M. (2007) Intraovarian activins are required for female fertility. *Mol Endocrinol* **21**, 2458-71.
- [11]. Matzuk M.M., Finegold M.J., Su J.G., Hsueh A.J. & Bradley A. (1992) Alpha-inhibin is a tumour-suppressor gene with gonadal specificity in mice. *Nature* **360**, 313-9.
- [12]. Nishimori K. & Matzuk M.M. (1996) Transgenic mice in the analysis of reproductive development and function. *Rev Reprod* **1**, 203-12.
- [13]. McCue P.M., Carney N.J., Hughes J.P., Rivier J., Vale W. & Lasley B.L. (1992) Ovulation and embryo recovery rates following immunization of mares against an inhibin alpha-subunit fragment. *Theriogenology* **38**, 823-31.
- [14]. Medan M.S., Takedom T., Aoyagi Y., Konishi M., Yazawa S., Watanabe G. & Taya K. (2006) The effect of active immunization against inhibin on gonadotropin secretions and follicular dynamics during the estrous cycle in cows. *J Reprod Dev* **52**, 107-13.
- [15]. Han L., Mao D.G., Zhang D.K., Liang A.X., Fang M., Moaen-ud-Din M. & Yang L.G. (2008) Development and evaluation of a novel DNA vaccine expressing inhibin alpha (1-32) fragment for improving the fertility in rats and sheep. *Anim Reprod Sci* **109**, 251-65.
- [16]. Naqvi S.M.K., Joshi A., Gulyani R., Saha S., Manik R.S. & Palta P. (2009) Increase in ovulation rate by active immunization against bovine inhibin-based synthetic peptides in a non-prolific sheep breed. *Small Ruminant Research* **85**, 70-3.
- [17]. Medan M.S., Watanabe G., Sasaki K., Nagura Y., Sakai H., Fujita M., Sharawy S. & Taya K. (2003) Effects of passive immunization of goats against inhibin on follicular development, hormone profile and ovulation rate. *Reproduction* **125**, 751-7.
- [18]. Shi F., Ozawa M., Komura H., Watanabe G., Tsonis C.G., Suzuki A.K. & Taya K. (2000) Induction of superovulation by inhibin vaccine in cyclic guinea-pigs. *J Reprod Fertil* **118**, 1-7.
- [19]. Pan Z., Zhang J., Lin F., Ma X., Wang X. & Liu H. (2012) Expression profiles of key candidate genes involved in steroidogenesis during follicular atresia in the pig ovary. *Mol Biol Rep* **39**, 10823-32.
- [20]. Lewis K.A., Gray P.C., Blount A.L., MacConell L.A., Wiater E., Bilezikjian L.M. & Vale W. (2000) Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling. *Nature* **404**, 411-4.
- [21]. Hammond S.M., Boettcher S., Caudy A.A., Kobayashi R. & Hannon G.J. (2001) Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* **293**, 1146-50.
- [22]. Cai K., Hua G., Ahmad S., Liang A., Han L., Wu C., Yang F. & Yang L. (2011) Action mechanism of inhibin alpha-subunit on the development of Sertoli cells and first wave of spermatogenesis in mice. *PLoS One* **6**, e25585.
- [23]. Han L., Wu C., Riaz H., Bai L., Chen J., Zhen Y., Guo A. & Yang L. (2013) Characterization of the mechanism of inhibin alpha-subunit gene in mouse anterior pituitary cells by RNA interference. *PLoS One* **8**, e74596.
- [24]. Livak K.J. & Schmittgen T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-8.
- [25]. Bonnet A., Cabau C., Bouchez O., Sarry J., Marsaud N., Foissac S., Woloszyn F., Mulsant P. & Mandon-Pepin B. (2013) An overview of gene expression dynamics during early ovarian folliculogenesis: specificity of follicular compartments and bi-directional dialog. *BMC Genomics* **14**, 904.
- [26]. Jiang J.Y., Cheung C.K., Wang Y. & Tsang B.K. (2003) Regulation of cell death and cell survival gene expression during ovarian follicular development and atresia. *Front Biosci* **8**, d222-37.
- [27]. Chen F., Jiang X., Chen X., Liu G. & Ding J. (2007) Effects of downregulation of inhibin alpha gene expression on apoptosis and proliferation of goose granulosa cells. *J Genet Genomics* **34**, 1106-13.
- [28]. Geng L.Y., Fang M., Yi J.M., Jiang F., Moaen-ud-Din M. & Yang L.G. (2008) Effect of overexpression of inhibin alpha (1-32) fragment on bovine granulosa cell proliferation, apoptosis, steroidogenesis, and development of co-cultured oocytes. *Theriogenology* **70**, 35-43.
- [29]. Wang S.J., Liu W.J., Wu C.J., Ma F.H., Ahmad S., Liu B.R., Han L., Jiang X.P., Zhang S.J. & Yang L.G. (2012) Melatonin suppresses apoptosis and stimulates progesterone production by bovine granulosa cells via its receptors (MT1 and MT2). *Theriogenology* **78**, 1517-26.
- [30]. Sudo H. & Minami A. (2010) Regulation of apoptosis in nucleus pulposus cells by optimized exogenous Bcl-2 overexpression. *J Orthop Res* **28**, 1608-13.
- [31]. Harper J.W., Adami G.R., Wei N., Keyomarsi K. & Elledge S.J. (1993) The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**, 805-16.
- [32]. Donjerkovic D. & Scott D.W. (2000) Regulation of the G1 phase of the mammalian cell cycle. *Cell Res* **10**, 1-16.
- [33]. Alao J.P., Gamble S.C., Stavropoulou A.V., Pomeranz K.M., Lam E.W., Coombes R.C. & Vigushin D.M. (2006) The cyclin D1 proto-oncogene is sequestered in the cytoplasm of mammalian cancer cell lines. *Mol Cancer* **5**, 7.
- [34]. Ohtsubo M., Theodoras A.M., Schumacher J., Roberts J.M. & Pagano M. (1995) Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol Cell Biol* **15**, 2612-24.
- [35]. Riaz H., Dong P., Shahzad M. & Yang L. (2014) Constitutive and follicle-stimulating hormone-induced action of somatostatin receptor-2 on regulation of apoptosis and steroidogenesis in bovine granulosa cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* **141**, 150-9.
- [36]. McNatty K.P., Makris A., DeGrazia C., Osathanondh R. & Ryan K.J. (1979) The production of progesterone, androgens, and estrogens by granulosa cells, thecal tissue, and stromal tissue from human ovaries in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* **49**, 687-99.
- [37]. Zachow R. & Uzumcu M. (2006) The methoxychlor metabolite, 2,2-bis-(p-hydroxyphenyl)-1,1,1-trichloroethane, inhibits steroidogenesis in rat ovarian granulosa cells in vitro. *Reprod Toxicol* **22**, 659-65.

Mohamed M'BAYE, et al. "Effets de l'inactivation de la sous-unité β A de l'inhibine par ARNi sur le développement des cellules de la granulosa chez la souris." *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences (IOSR-JPBS)*, 17(2), (2022): pp. 13-21.