

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

**MÉMOIRE DE RECHERCHE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES**

**COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE ET BIOLOGIE CELLULAIRES**

**PAR
JUNIE HURETTE CHANSI KENGNI, B.Sc. (Biologie médicale)**

**RÉGULATION ET EXPRESSION DE LA PROSTAGLANDINE D
SYNTHÉTASE (PGDS) ET DE LA PROSTACYCLINE SYNTHÉTASE (PGIS)
DANS L'ENDOMÈTRE DE RAT GESTANT, NON GESTANT ET
PSEUDOGESTANT**

AOÛT 2006

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

A mes parents

REMERCIEMENTS

Je tiens à souligner au terme de cette maîtrise toute ma reconnaissance envers ces gens qui m'ont encouragé à me surpasser tout en participant à une des grandes expériences de la vie. Cette expérience est celle de la passion pour la recherche de l'inconnu et la lutte pour le sommet des connaissances.

Je remercie d'abord mon excellent directeur de recherche le Dr Éric Asselin pour les belles opportunités qu'il m'a offertes et le projet de recherche passionnant qu'il a mis à ma disposition. Il a été d'une patience et d'un optimisme et m'a enseigné la rigueur, l'honnêteté et l'esprit scientifique.

Je remercie également notre professionnelle de recherche Sophie Parent pour sa grande disponibilité et pour toutes les techniques qu'elle m'a transmises avec douceur. Je remercie mes amis de laboratoire : Valérie, Carl, Pierre-Luc, Guylaine, Marie-Claude, Isabelle, Véronique, Émilie, Kim, Virginie, Geoffroy, pour l'atmosphère amicale et chaleureuse qu'ils ont maintenu dans notre laboratoire.

À tout bien, tout honneur. Je remercie profondément deux être charmants qui ont financé mes années d'études au Canada et ont su me conseiller, me consoler et me transmettre leur amour : il s'agit de mon papa Blaise Kengni et de ma maman Hélène Tchouansi. Je vais tourner cette page en remerciant ma fille Darina qui a été mon soleil et m'a communiqué sa joie de vivre tout au long de ma maîtrise et en remerciant mon cœur et homme Johnn Ankely pour sa présence rassurante et son éternel enthousiasme.

RÉSUMÉ

La gestation représente une situation physiologique particulière. Pendant la gestation, la survie de l'embryon dépend de l'interaction utéro-embryonnaire et de la qualité de l'embryon. Cette interaction utéro-embryonnaire s'effectue en trois étapes : implantation, régression déciduale et parturition. L'implantation est la première étape du développement embryonnaire qui nécessite une interaction entre le tissu maternel et l'embryon. Elle favorise l'attachement du blastocyste à l'épithélium utérin et ainsi l'acquisition d'une position fixe par l'embryon dans l'utérus. Cependant, l'augmentation du degré de proximité entre le trophoblaste et l'épithélium demande la mort par apoptose des cellules épithéliales.

Des études ont démontré la présence des récepteurs de prostaglandine dans l'utérus gestant pendant l'implantation, la régression déciduale et même en absence de signal embryonnaire. D'autres études ont démontré que les prostaglandines via leurs récepteurs pouvaient jouer un rôle primordial dans l'implantation embryonnaire. Cependant, il existe très peu d'information sur la régulation des prostaglandines et leur implication dans la gestation, plus particulièrement la prostaglandine D2 (PGD2) et la prostacycline (PGI2).

La PGD2 est synthétisée par la prostaglandine D2 synthétase (PGDS) et favorise la contraction du muscle utérin pendant le travail. La PGI2 est synthétisée par la prostacycline synthétase (PGIS) et contribue à la relaxation du segment utérin.

Le but principal de cette étude est de démontrer la régulation et l'expression de la PGDS et de la PGIS pendant le cycle oestral, la gestation et la pseudogestation chez le rat. Pour cela, nous avons déterminé l'expression de la PGDS et de la PGIS par les analyses de type western blot pendant le cycle oestral, la gestation, la pseudogestation. Nous avons ensuite localisés ces enzymes par immunohistochimie (IHC) et nous avons enfin déterminé l'expression de leurs métabolites dans le sérum par enzyme immunoessai (EIA).

Les résultats ont démontré pour la première fois que la PGDS et de la PGIS étaient exprimés au cours du cycle oestral, de la gestation et de la pseudogestation. Ces résultats suggèrent aussi que la PGDS et la PGIS sont régulés dans l'endomètre de la rate tout au long de la gestation et de la pseudogestation. Pendant le cycle oestral on a observé une régulation de la PGIS mais une expression constante de la PGDS. Les résultats de la pseudogestation suggèrent alors l'implication des hormones stéroïdiennes : la 17 β -estradiol et la progestérone dans la régulation de la PGDS et la PGIS. Ces résultats suggèrent aussi que l'endomètre pourrait être une source significative de la PGD2 et de la PGI2 pendant des périodes spécifiques de la grossesse.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	III
RÉSUMÉ.....	IV
TABLE DES MATIÈRES	VI
TABLEAU.....	IX
LISTES DES FIGURES	X
LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS	XI
CHAPITRE I	1
INTRODUCTION	2
1.1 LES VOIES GÉNITALES FEMELLES.....	3
1.1.1 Les ovaires.....	3
1.1.2 L'utérus	5
1.1.3 L'endomètre utérin.....	5
1.2 LE CYCLE OESTRAL	5
1.2.1 LE PROESTRUS	6
1.2.2 L'oestrus.....	6
1.3 LES HORMONES OVARIENNES	8
1.3.1 L'hormone folliculo-stimulante et l'hormone lutéinisante.....	8
1.3.2 Les oestrogènes et la progestérone	13
1.3.2.1 Les oestrogènes	14
1.3.2.2 La progestérone.....	14
1.4 LA GESTATION.....	15
1.4.1 L'implantation embryonnaire.....	15
1.5 LA PARTURITION	16

1.6	L' APOPTOSE ET LA PROLIFÉRATION CELLULAIRE	16
1.6.1	<i>L'apoptose</i>	16
1.6.2	<i>La prolifération cellulaire</i>	17
1.7	LES PROSTAGLANDINES	18
1.7.1	<i>Bref historique</i>	18
1.7.2	<i>Biosynthèse des prostaglandines</i>	20
1.7.3	<i>La prostaglandine H synthétase ou cyclooxygénase</i>	22
1.7.4	<i>La prostaglandine D2 synthétase</i>	23
1.7.5	<i>La prostaglandine E2 synthétase</i>	23
1.7.6	<i>La prostaglandine I2 synthétase</i>	24
1.7.7	<i>Mécanisme d'action des prostaglandines</i>	24
1.8	OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES	31
	CHAPITRE II	32
	RÉSUMÉ DE L'ARTICLE	33
	OBJECTIF	33
	MÉTHODOLOGIE	33
	RÉSULTAT	33
	CONCLUSION	34
	PRÉFACE	35
	ABSTRACT	37
	INTRODUCTION	38
	MATERIAL AND METHODS	40
	<i>Reagents</i>	40
	PROTEIN EXTRACTION AND WESTERN ANALYSIS	41

PROSTAGLANDINS METABOLITES ENZYME IMMUNOASSAY	43
RESULTS	44
REFERENCES	49
FIGURE LEGEND	54
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	65
BIBLIOGRAPHIE	71

TABLEAU

Tableau 1-1 : Mécanisme d'action des récepteurs membranaires -----29

LISTES DES FIGURES

FIGURE 1-1 : LES VOIES GÉNITALES DE LA RATTE	4
FIGURE 1-2: COUPE HISTOLOGIQUE D'UN OVAIRE DE RONGEUR	7
FIGURE 1-3: LES PHASES DU CYCLE OESTRAL DU RAT.	9
FIGURE 1-4 : LA DURÉE DES PHASES DU CYCLE OESTRAL DU RAT	10
FIGURE 1-5: CONCENTRATIONS HORMONALES DE L'AXE HYPOTHALAMO-HYPOPHYSAIRE AU COURS D'UN CYCLE SEXUEL CHEZ LA FEMME (EN ABSENCE DE FÉCONDATION). ..	11
FIGURE 1-6 : PROFILS HORMONAUX CHEZ LA RATE AU COURS DU CYCLE OESTRAL.	12
FIGURE 1-7: APOPTOSE.	19
FIGURE 1-8: LE CYCLE CELLULAIRE	21
FIGURE 2-1: PGDS AND PGIS EXPRESSION IN FEMALE RAT ENDOMETRIUM DURING THE ESTROUS CYCLE. CHANSI ET AL.	57
FIGURE 2-2: EXPRESSION OF PGIS IN THE PREGNANT RAT ENDOMETRIUM. CHANSI ET AL.	58
FIGURE 2-3: EXPRESSION OF PGDS IN THE PREGNANT RAT ENDOMETRIUM. CHANSI ET AL.	59
FIGURE 2-4: EXPRESSION OF PGDS AND PGIS DURING PSEUDOPREGNANCY CHANSI ET AL.	60
FIGURE 2-5: LOCALIZATION OF PGDS AND PGIS PROTEINS IN RAT ENDOMETRIUM BY IHC. CHANSI ET AL.	61

LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS

LH	Hormone lutéinisante
GnRH	Gonadolibérine
FSH	Hormone Folliculo-stimulante
E ₁	Oestrone
E ₂	17 β -estradiol
E ₃	Oestriol
P4	Progestérone
PGs	Prostaglandines
PGDS	Prostaglandine D synthétase
PGIS	Prostacycline synthétase
PGD2	Prostaglandine D2
H-PGD2	Prostaglandine de type hématopoïétique
L-PGD2	Prostaglandine de type lipocalin
PGE2	Prostaglandine E2
PGI2	Prostaglandine I2
PGF2	Prostaglandine F2
PGF _{2α}	Prostaglandine F2 alpha
COX	Cyclooxygénase
COX 1	Cyclooxygénase de type 1
COX 2	Cyclooxygénase de type 2
PLA2	Phospholipase A2
PGHS	Prostaglandine H synthétase
PGH2	Prostaglandine H2
PGG2	Prostaglandine G2
IAPs	Inhibitor of apoptosis proteins
EP	Récepteurs des prostaglandines E
DP	Récepteurs des prostaglandines D
IP	Récepteurs des prostaglandines I

AMP	Adénosine monophosphate
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
GTP	Guanosine triphosphate
GMP	Guanosine monophosphate
PPARs	Peroxisome Proliferators-Activated Receptors
PPAR α	Peroxisome Proliferators-Activated Receptors de type alpha
PPAR (β)	Peroxisome Proliferators-Activated Receptors de type beta
PPAR γ	Peroxisome Proliferators-Activated Receptors de type gamma
RXR	9-cis retinoic acid receptor
SRC-1	récepteur stéroïde coactivateur-1
CBP	protéine de liaison CREB
PPRE	peroxisome proliferator response elements
CRTH2	Récepteur chimioattractant homologue de la molécule exprimée sur les cellules T helper de type 2
DHEA	Déhydroépiandrostérone
ER	Récepteurs des œstrogènes
ER α	Récepteurs à l'œstrogène alpha
ER β	Récepteurs à l'œstrogène bêta
PR	Récepteurs à la progestérone
PR-A	Récepteurs à la progestérone de type A
PR-B	Récepteurs à la progestérone de type B
ARN	Acides ribonucléiques
ARNm	ARN messenger
ADN	Acides désoxyribonucléiques
Ca ²⁺	Calcium
kDa	Kilo Dalton
kb	Kilo bases
ATP	Adénosine triphosphate
ADP	Adenosine diphosphate
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BAD	BCL2-antagonist of cell death

BAX	BCL2-associated X protein
Caspases	Cysteine aspartic acid-specific proteases
IHC	Immunohistochimie
CDC47/MCM7	Cell division cycle 47 / Mini Chromosome Maintenance protein 7
Vol.	Volume
pp.	Page
Et al.	Plus d'un auteur
Min	Minute
fig.	Figure
°C	Degré Celsius
POD	Peroxydase
DAB	3,3'-diaminobenzidine
G	gramme
µg	microgramme
ng	nano gramme
Kg	kilogramme
pg	pico gramme
µm	micromètre
mM	milli molaire
ml	millilitre
PBS	Phosphate buffer salt
BSA	Bovine Serum Albumine
SDS	Sodium dodecyl sulfate
GH	Growth hormone

CHAPITRE I
INTRODUCTION

INTRODUCTION

L'infertilité féminine constitue un problème de santé majeur au Canada et dans les pays industrialisés. Ce problème repose sur les mécanismes de communication qui s'établissent entre l'embryon et l'utérus tout au long de la gestation car tout défaut de communication est responsable de plus de 80% des pertes embryonnaires (YE et al, 2005).

La gestation chez le rat se divise en trois grandes étapes : l'implantation embryonnaire, la régression déciduale et la parturition. L'implantation est une interaction entre le blastocyste et l'utérus qui dépend d'un dialogue cellulaire et moléculaire entre l'embryon et la mère (Ma Xing-Hong et al, 2006). Pendant l'implantation, des changements spécifiques se produisent dans l'endomètre utérin permettant ainsi au blastocyste de s'infiltrer dans le mur utérin. En effet, l'implantation du blastocyste va entraîner la mort par apoptose des cellules épithéliales tandis que les cellules stromales vont croître et se différencier en cellules déciduales, processus nommé décidualisation (Parr et al, 1987). Cette transformation des cellules endométriales en cellules déciduales s'effectue sous l'effet de l'œstrogène et de la progestérone (Kim et al, 2005). La mort par apoptose des cellules épithéliales est un événement physiologique très important, autrement le fœtus ne peut trouver aucun espace pour se développer. Elle va donc permettre à l'utérus de se transformer sans perturber la croissance de l'embryon.

Les prostaglandines sont des régulateurs importants de la fonction reproductive femelle (Parent et al, 2002). Ils jouent un rôle dans l'implantation embryonnaire (Poyser et al, 1995 ; Wang et Dey, 2005), la régression déciduale, la parturition (Zakar et Hertelendy, 2001) et leur production est modulée durant le cycle oestral, pendant la reconnaissance de la gestation et lors de la parturition.

Compte tenu du fait que les mécanismes moléculaires et intracellulaires qui régulent les prostaglandines dans les cellules endométriales sont quasi inconnus à ce jour et que l'implication possible des hormones stéroïdiennes dans ce processus reste incomplète, l'essentiel de ce travail est concentré sur la régulation des prostaglandines via les hormones stéroïdiennes afin de comprendre le mécanisme moléculaire des différentes étapes de la gestation.

1.1 Les voies génitales femelles

La ratte représente le modèle animal utilisé parce qu'elle présente des similitudes avec l'humain. En effet, la ratte tout comme l'humain a une implantation de type hémo-choriale, une ovulation spontanée et un placenta discoïde où seule la partie invasive du conceptus participe à la formation du placenta (Levasseur et Thibault, 2001). Cependant, la ratte a une durée de gestation beaucoup plus courte (21-23 jours), ce qui nous permettra d'obtenir des résultats plus rapidement (Waynforth et Flecknell, 1992). Les voies génitales de la ratte sont constituées de deux ovaires en forme de mûre, des trompes, de l'utérus et du vagin.

1.1.1 Les ovaires

Chez la plupart des mammifères, les ovaires sont formés d'une couche centrale : la zone vasculaire ou médulla et d'une couche périphérique : la zone parenchymateuse ou cortex. Les follicules ovariens et les corps jaunes se localisent dans le cortex. Les ovaires de la rate sont muriformes (figure 1.1) et rattachés aux cornes utérines via les oviductes (Waynforth et Flecknell, 1992). Ils ont deux faces, deux bords, deux extrémités et un hile qui permet le passage des vaisseaux sanguins.

Les ovaires sont enfermés dans une bourse ovarienne presque entièrement close et leur poids augmente pendant la gestation. Ils assurent deux fonctions essentielles : la production d'ovocytes matures (ovules), fonction assimilée à une fonction exocrine, et la sécrétion d'hormones stéroïdes (oestrogènes et progestérone), fonction endocrine. L'ovulation est spontanée et se produit donc en dehors de tout rapprochement sexuel. Et la taille des ovaires est proportionnelle au nombre de petits par portée.

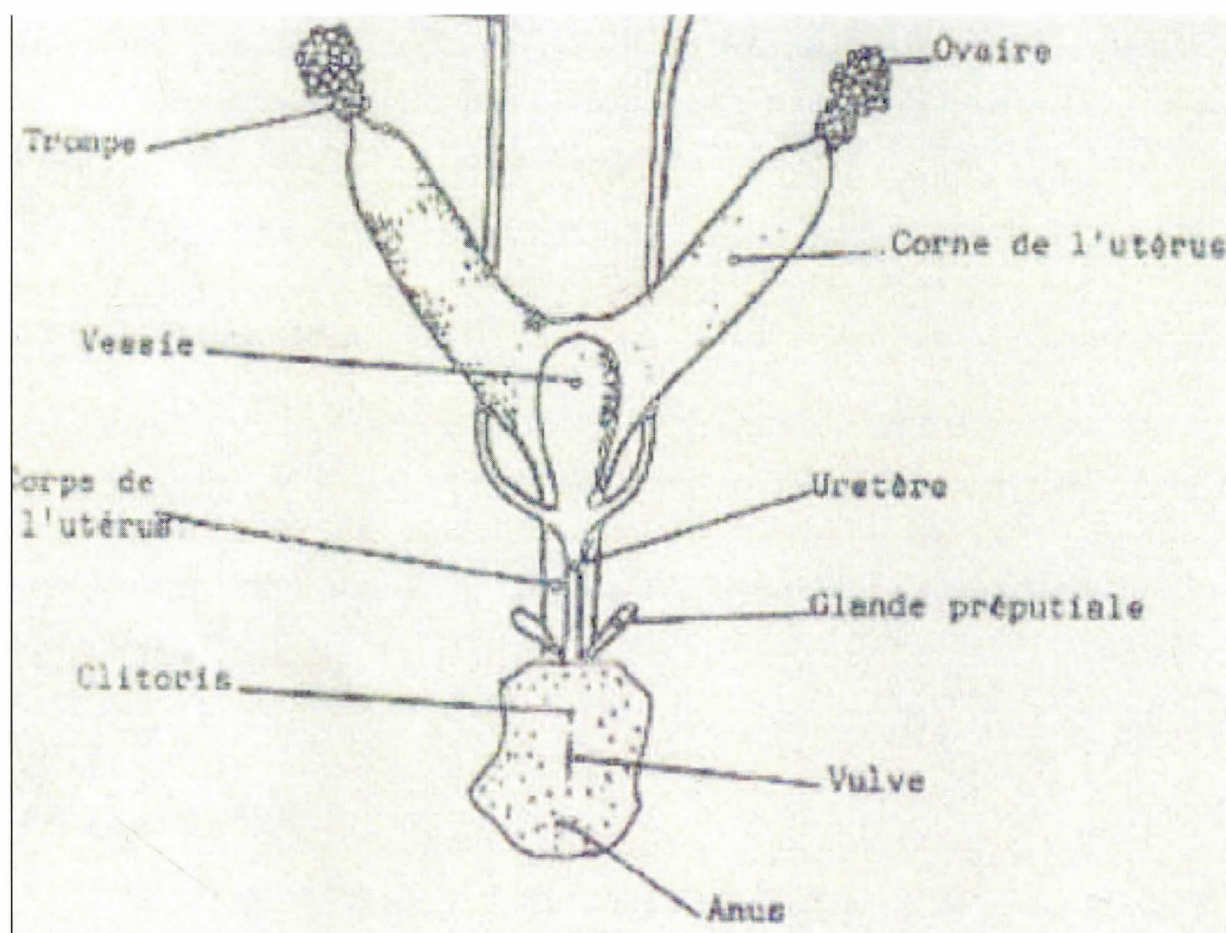


Figure 1-1 : Les voies génitales de la ratte ; les cornes utérines sont séparées sur toute la longueur et les ovaires sont en forme de mûre (La Velle, 1995).

1.1.2 L'utérus

La rate a deux cornes utérines craniales qui s'unissent pour se raccorder au vagin par l'intermédiaire d'un col. Il faut rappeler que le col représente un rétrécissement entre le corps utérin et le vagin. Les cornes utérines et les corps utérins sont allongés de façon longitudinale. La séparation entre l'utérus gauche et droit est bien marquée car la division est complète (deux cornes, deux corps, deux cols utérins) (Parrish, 2000). L'utérus abrite et nourrit l'embryon pendant la gestation et est sensible aux hormones ovariennes tout au long du cycle oestral.

1.1.3 L'endomètre utérin

Histologiquement, l'utérus comprend une couche musculaire épaisse ou myomètre, une cavité appelée cavité utérine et la muqueuse qui tapisse la cavité utérine est appelée l'endomètre. L'endomètre utérin comporte un chorion tapissé d'un épithélium, avec une couche superficielle fonctionnelle et une couche basale. La totalité de sa surface est compétente à l'implantation (Levasseur et Thibault, 2001) et l'ovaire sera alors le siège d'ovulations multiples (figure 1.2)

1.2 Le cycle oestral

Le cycle oestral de la ratte équivaut au cycle menstruel chez la femme car pendant le cycle oestral, on assiste aux différentes phases du développement de l'endomètre qui auront pour but de préparer l'endomètre à une éventuelle fécondation. Le cycle oestral se différencie cependant du cycle menstruel par le fait que la femelle n'a pas de saignement car la muqueuse utérine est réabsorbée par l'utérus. La femelle est également beaucoup plus sensible à l'environnement (lumière, température) qui déclenche des phases d'activité sexuelle. Le comportement de la femelle lors du cycle oestral est beaucoup plus prononcé que celui d'une femme ayant un cycle menstruel et l'évaluation du cycle oestral est basé sur la cytologie des frottis vaginaux (Freeman et al, 1994). L'activité cyclique de la ratte est permanente. Le cycle oestral est divisé en quatre phases : le proestrus, l'oestrus, le métestrus et le diestrus (figure 1.3).

1.2.1 Le proestrus

C'est la phase folliculaire oestrogénique. Elle équivaut à la maturation folliculaire et se divise en deux portions : le proestrus précoce ou début de proestrus et le proestrus tardif ou fin de proestrus. Au début du proestrus, on observe quelques cellules nucléées et cornifiées et quelques polynucléaires. A la fin du proestrus, on observe une très grande quantité de cellules nucléées. C'est pendant cette phase que se fait l'accouplement (Waynforth et Flecknell, 1992). La durée totale du proestrus est de soixante douze heures.

1.2.2 L'oestrus

L'oestrus présente uniquement des cellules cornifiées et conduit à l'ovulation (Levasseur et Thibault, 2001). L'oestrus correspond à une stimulation maximale d'oestrogène dans l'endomètre utérin. L'oestrus commence par une abondante kératinisation de l'épithélium dû à l'augmentation du taux d'oestrogène. L'oestrus commence aussi par une absence de leucocyte. Ensuite, on observe une diminution progressive de la kératine dans l'épithélium permettant ainsi l'apparition des cellules nucléées et des leucocytes : on parle alors de métestrus. L'oestrus a une durée de dix à vingt heures (figure 1.4) (Waynforth et Flecknell, 1992).

1.2.3 Le métestrus

Le métestrus correspond à l'organisation fonctionnelle du corps jaune avec production de progestérone et épaissement de l'endomètre. Le métestrus présente des cellules cornifiées et nucléées ainsi que quelques polynucléaires. Il dure sensiblement huit heures (Waynforth et Flecknell, 1992). L'accouplement s'effectue en fin de proestrus et le premier jour de la gestation est déterminé par la présence des spermatozoïdes sur le frottis vaginal.

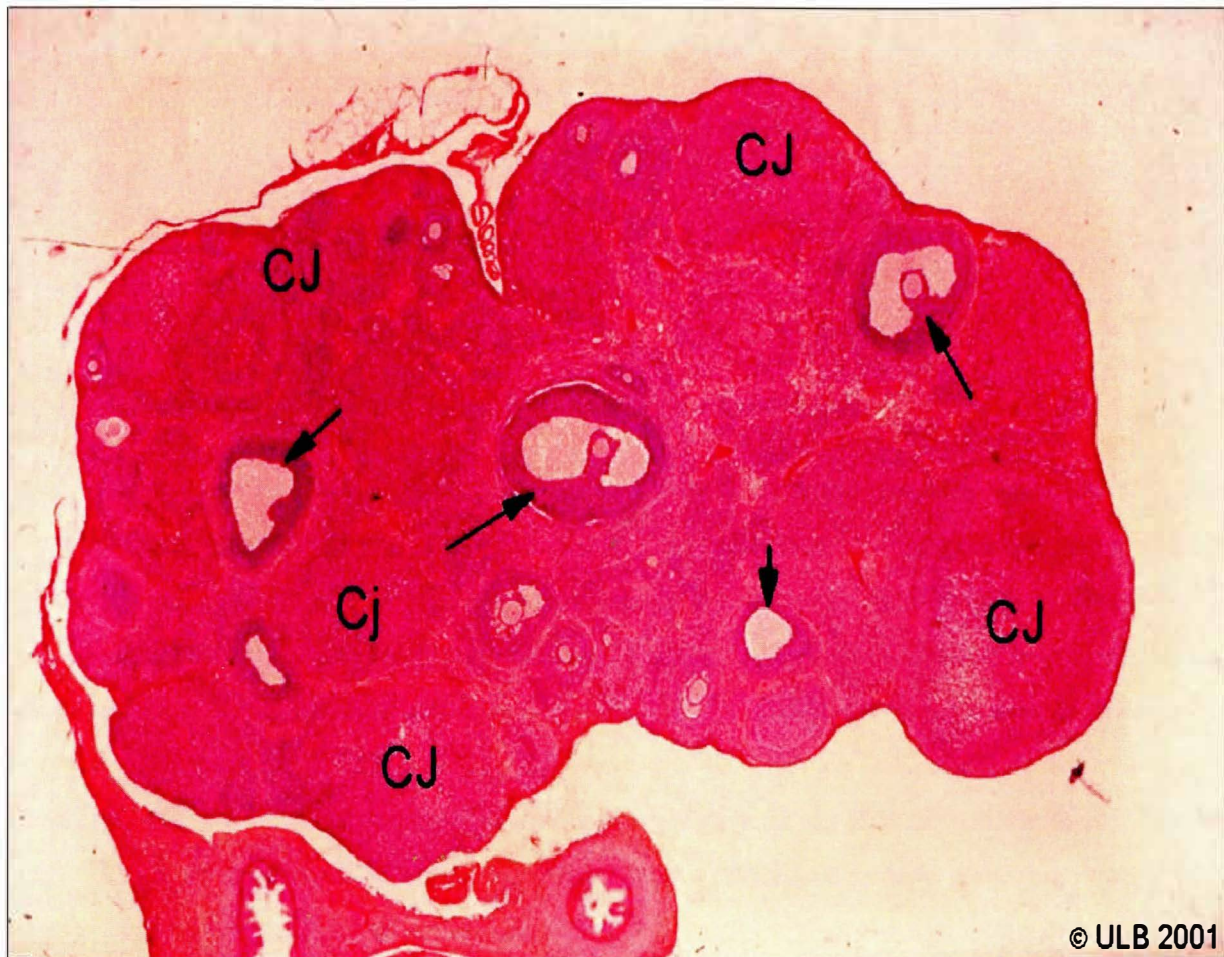


Figure 1-2: Coupe histologique d'un ovaire de rongeur ; on peut observer les follicules cavitaires (flèches) et les nombreux corps jaunes (CJ), signe d'ovulations multiples (Levasseur et Thibault, 2001).

1.2.4 Le diestrus

Le diestrus correspond à la phase lutéale. Elle présente une très grande quantité de polynucléaires qui détruiront les cellules cornifiées. Elle a une durée de huit heures (Waynforth et Flecknell, 1992).

1.3 Les hormones ovariennes

1.3.1 L'hormone folliculo-stimulante et l'hormone lutéinisante

Au niveau de l'axe gonadotrope, le cycle se caractérise par des variations cycliques des concentrations hormonales (figure 1.5). C'est la gonadolibérine (GnRH) qui est responsable de cette variation cyclique car elle stimule la sécrétion et la libération de l'hormone folliculo-stimulante (FSH) et l'hormone lutéinisante (LH) par l'adénohypophyse (Marieb EN, 1999). En effet, l'augmentation de la stimulation hypophysaire par la GnRH entraînera une augmentation de la fréquence des pics de la LH et de la FSH au cours de la phase folliculaire (proestrus chez le rat). Cette FSH et cette LH sont responsables de réguler la maturation et le développement folliculaire.

Le cycle hormonal de la rate aura deux particularités : La chute d'inhibine après l'ovulation va entraîner un pic de FSH et la formation des follicules de l'antrum qui ovuleront au cycle suivant (figure 1.6). On aura aussi des niveaux de progestérone élevés entre le métestrus et le diestrus (Levasseur et Thibault, 2001). La FSH va aussi stimuler l'activité de l'aromatase dans les cellules de la granulosa (enzyme qui permet la conversion des androgènes en œstrogènes) (Knobil et Neil, 1994) tandis que La LH stimulera les cellules thécales (Knobil et Neil, 1994) qui sécrètent alors des androgènes qui diffusent à travers la membrane basale où ils sont transformés en oestrogènes par les cellules de la granulosa sensibilisées par la FSH (Marieb EN, 1999). Le pic ovulatoire d'hormone lutéinique (LH) déclenche la déhiscence folliculaire et induit la formation du corps jaune. Le pic ovulatoire de LH apparaît suite à l'accroissement de la production d'oestrogènes (folliculine) par le follicule. C'est l'arrêt de l'activité du corps jaune qui sera responsable de l'arrêt de la sécrétion des hormones ovariennes

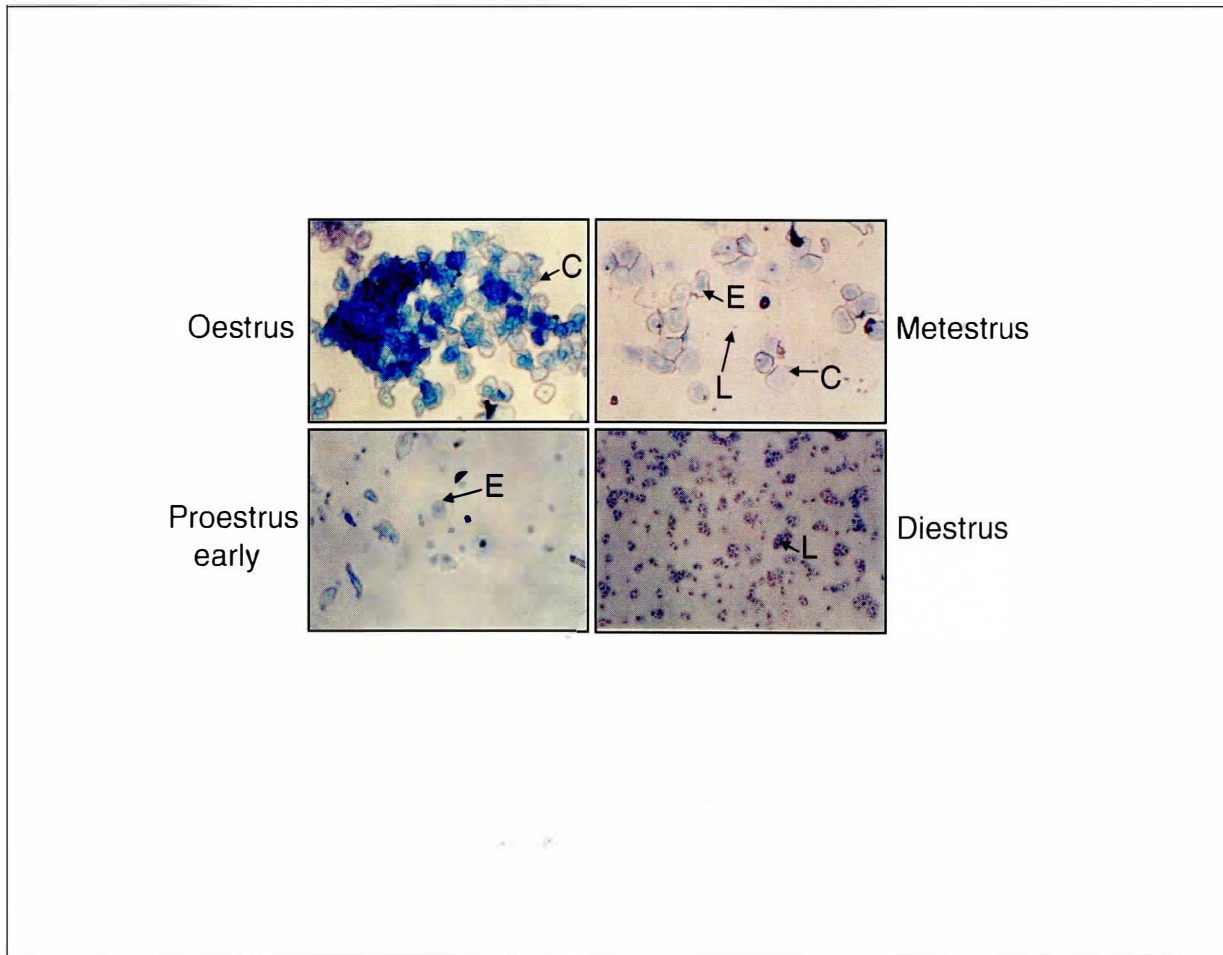


Figure 1-3: Les phases du cycle oestral du rat; les cellules cornifiées, épithéliales et les leucocytes sont indiqués. Les cellules irrégulières et annuclées sont appelées cellules cornifiées (C); les cellules rondes et nucléées sont des cellules épithéliales (L); les petites cellules rondes sont les leucocytes (L). C'est la proportion des trois types de cellules qui permettra de déterminer la phase du cycle oestral. L'oestrus aura une grande proportion de cellules cornifiées, le proestrus aura une prédominance de cellules épithéliales, le métestrus aura des proportions égales de leucocytes, cellules nucléées et de cellules cornifiées, le diestrus aura une prédominance de leucocytes. On n'observe pas dans le frottis vaginal d'autres mammifères des populations cellulaires aussi homogènes permettant d'identifier les stades du cycle (Levasseur et Thibault, 2001) (photos laboratoire d'Éric Asselin).

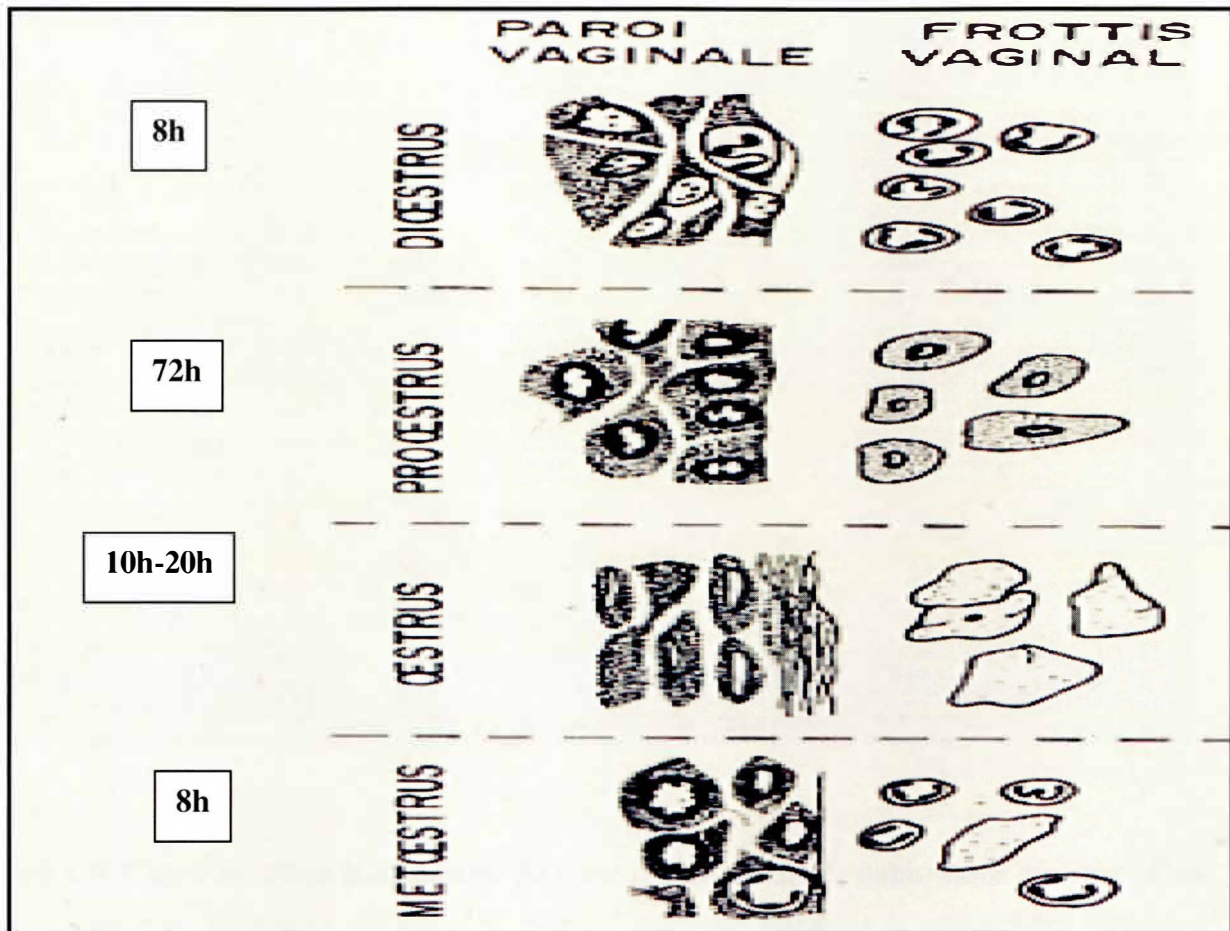


Figure 1-4 : La durée des phases du cycle oestral du rat ; le diestrus à une durée de 8h, le poestrus dure 72h, l'oestrus dure 10 à 20h et le métestrus dure 8h. L'accouplement est possible 12h avant la fin du proestrus et très tôt en début d'oestrus. (Ruckebusch, 1981).

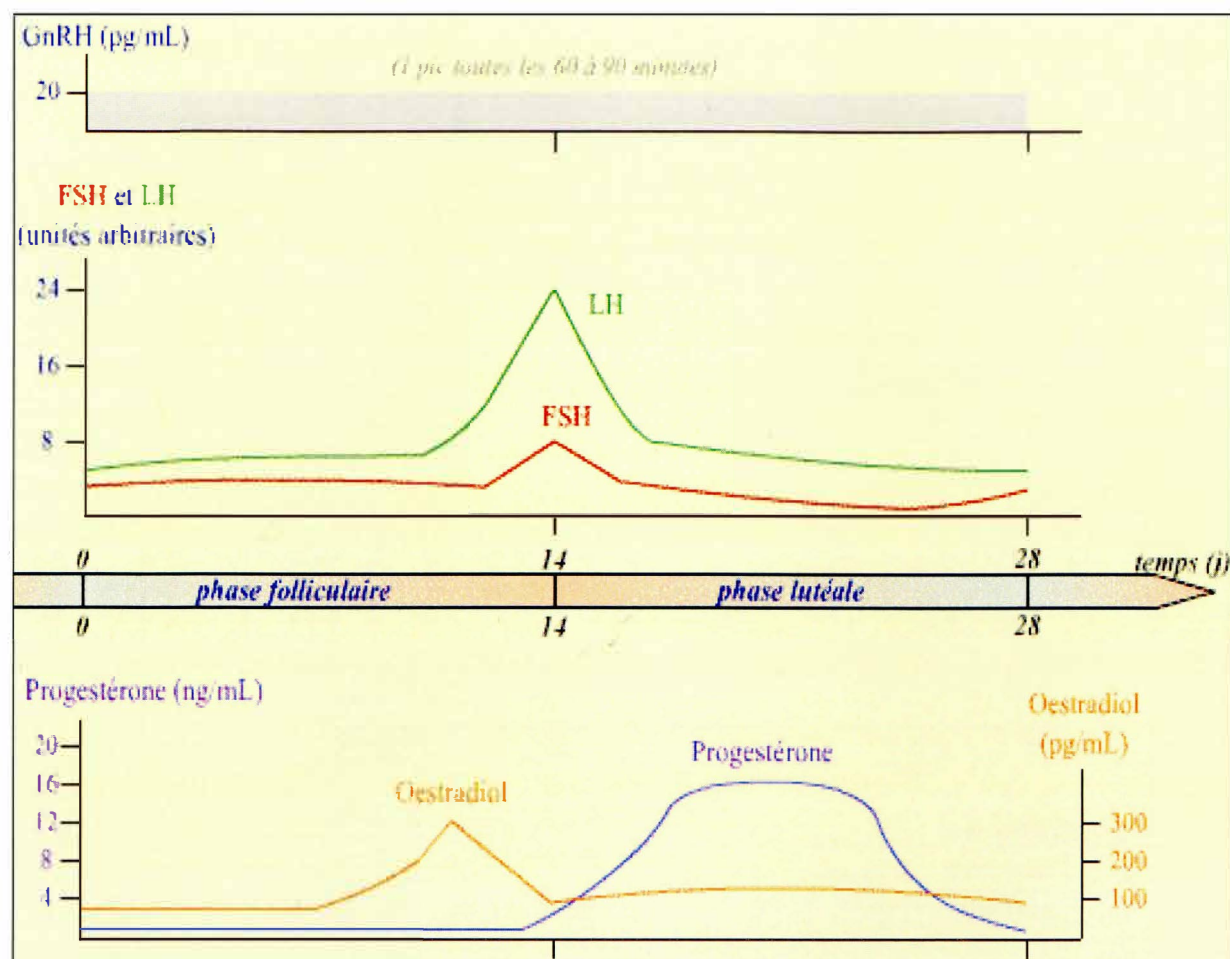


Figure 1-5: Concentrations hormonales de l'axe hypothalamo-hypophysaire au cours d'un cycle sexuel chez la femme (en absence de fécondation) ; pendant la phase folliculaire, on observe une production de FSH et de LH par la GnRH qui stimule la production d'oestrogène dans l'ovaire. Le jour 14 (ovulation), la FSH a une rétroaction positive et stimule une forte concentration de LH et à moindre niveau la FSH. Le pic de LH sera responsable de l'ovulation. Pendant la phase lutéale, le corps jaune produit la progestérone qui réduira les sécrétions de FSH et LH (Gilles Furelaud, 2004).

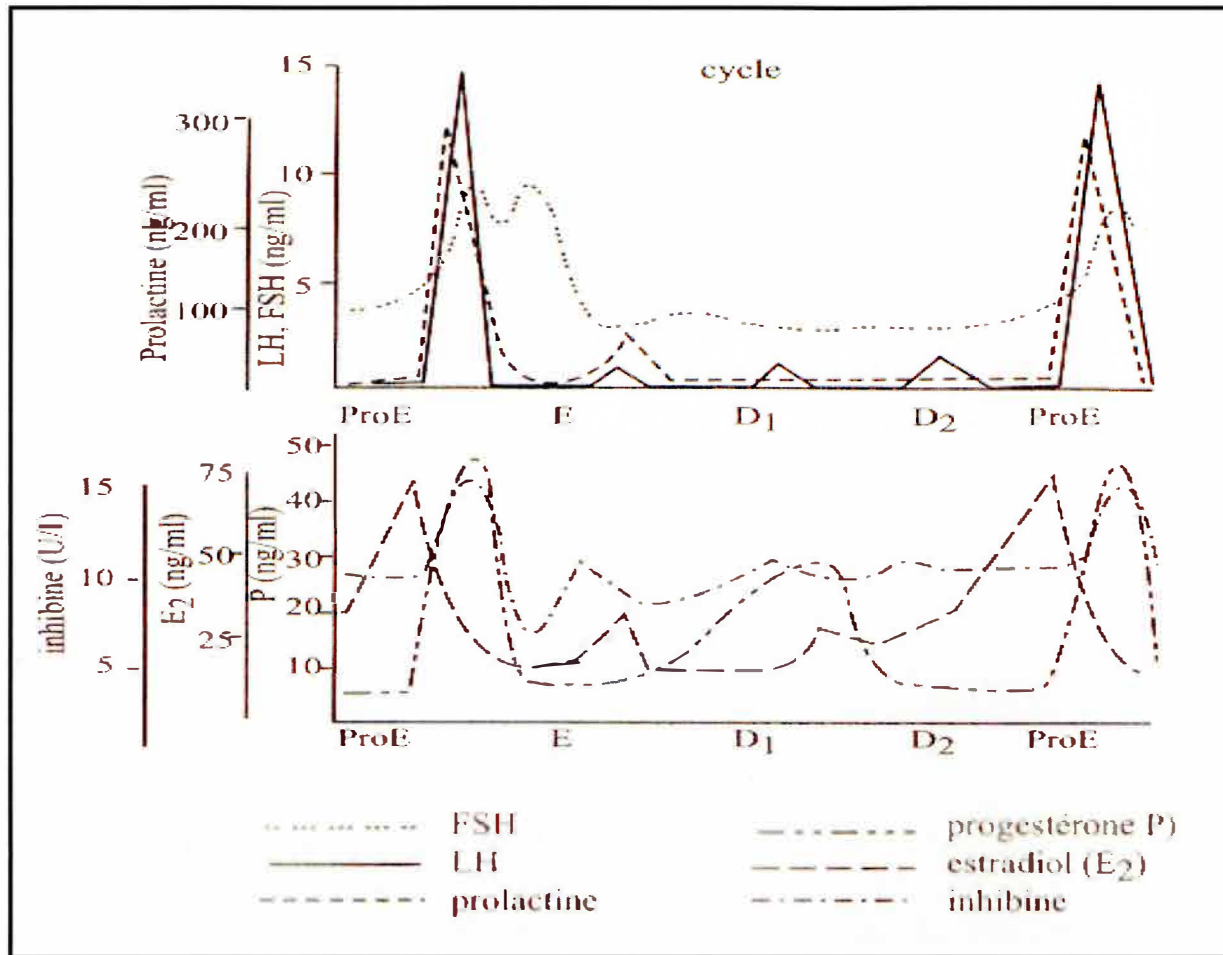


Figure 1-6 : Profils hormonaux chez la rate au cours du cycle oestral ; la phase folliculaire ou proestrus s'accompagne d'une sécrétion croissante d'oestrogènes. Le pic ovulatoire de la LH apparaît suite à l'accroissement de la production d'oestrogènes. La FSH stimule la sécrétion d'inhibine par les cellules de la granulosa ; l'inhibine, à son tour diminue la sécrétion de FSH et, à un moindre degré, de LH. La montée de la progestérone qui se produit dès le proestrus est responsable de l'apparition de l'oestrus et joue un rôle important dans l'ovulation (Levasseur et Thibault, 2001).

1.3.2 Les oestrogènes et la progestérone

Les oestrogènes (dont la forme la plus active est l'œstradiol) et la progestérone sont les deux principales hormones stéroïdiennes de l'ovaire. Elles appartiennent à une famille d'hormones dérivées du cholestérol et métabolisées dans les ovaires. En fonction de leurs concentrations respectives, les oestrogènes et la progestérone influencent également les différentes étapes de la gestation et puis de la parturition (Mesiano, 2001 ; Mann et al, 2005). En effet, elles sont synthétisées pendant la phase folliculaire à partir du cholestérol par les cellules de la thèque interne et les cellules de la granulosa de l'ovaire (Levasseur et al, 2001). Il y a une coopération cellulaire entre ces 2 types cellulaires car les cellules de la granulosa importent les androgènes produits par les cellules de la thèque interne et les transforment en œstradiol. Les grandes et les petites cellules lutéales (du corps jaune) qui proviennent respectivement des cellules de la thèque et de la granulosa synthétisent et sécrètent de la progestérone et interagissent comme dans le follicule pour produire de l'œstradiol.

Pendant la phase folliculaire (proestrus) la production d'oestrogènes augmente. La croissance des follicules cavitaires s'accompagne d'une élévation progressive de la production d'œstradiol. L'oestrogène augmente rapidement en fin de phase folliculaire pour atteindre un maximum avant l'ovulation (pic pré ovulatoire). Il y a peu de progestérone produite et un peu d'inhibine. Pendant l'ovulation, la rétroaction positive des oestrogènes plasmatiques induit une forte stimulation des sécrétions de GnRH, FSH et LH. Ceci conduit à un pic de LH très important, et dans une moindre mesure à un pic de FSH. Le pic de LH a pour conséquence de déclencher l'ovulation. Pendant la phase lutéale (diestrus) la production de progestérone augmente. Cette production très élevée de progestérone est due au corps jaune. On observe aussi une production d'oestrogène durant cette phase mais mille fois moins que la progestérone ainsi qu'une forte production d'inhibine. La FSH stimule la sécrétion de l'inhibine. L'inhibine par la suite exerce une rétroaction négative sur la sécrétion de FSH via l'hypothalamus. Le placenta de la ratte ne produit pas d'hormone placentaire lactogène : hormone stimulant la croissance mammaire. C'est donc la prolactine qui sera essentielle au développement mammaire de la ratte.

1.3.2.1 Les oestrogènes

Les œstrogènes sont au nombre de trois : œstrone (E1), œstradiol (E2) et œstriol (E3) (Coelingh, 2004). A concentration égale, l'E2 exerce un effet biologique plus puissant que l'E1 qui lui est plus puissant que l'E3. Les œstrogènes sont excrétés dans l'urine sous forme de glucuronides ou de sulfates.

L'E2 ou 17 β -estradiol est produit essentiellement par conversion enzymatique des androgènes et dépend de l'activité de la FSH et de la LH (Richards et al, 1980). En effet, les androgènes sont produits sous l'influence de la LH par les cellules thécales entourant le follicule et leur conversion en E2 a lieu dans les cellules de la granulosa du follicule grâce à l'aromatase. L'activité de l'aromatase dépend de l'activité de la FSH.

L'E1 est produit essentiellement par conversion enzymatique de l'androstènedione produite sous l'influence de la LH par les cellules thécales. Sa conversion en E1 a lieu dans les cellules de la granulosa grâce à l'aromatase. La fonction biologique de l'E1 n'est que spéculative mais elle pourrait être en rapport avec un effet régulateur qu'exercerait la conversion de l'E1 en E2 pour ajuster le degré d'oestrogénisation. Les très faibles concentrations d'E3 sont la conséquence d'une hydroxylation hépatique de l'E1 et de l'E2.

1.3.2.2 La progestérone

La progestérone (P4) est produite lors de l'ovulation puis pendant la seconde moitié du cycle par le corps jaune et est essentiellement d'origine ovarienne. C'est le pic de LH à mi-cycle qui, en plus d'induire l'ovulation, provoque des changements biochimiques et phénotypiques des cellules de la granulosa, connus sous le nom de lutéinisation. La lutéinisation des cellules de la granulosa les rend capables de produire la P4. Ainsi, la P4 n'est-elle mesurable qu'à partir du pic de LH, elle est donc produite essentiellement par le corps jaune.

1.4 La gestation

1.4.1 L'implantation embryonnaire

L'implantation embryonnaire est une série d'évènements qui commence par l'adhésion du stéroïdiennes à l'endomètre utérin et se termine par l'invasion de l'endomètre par le stéroïdiennes (Simmons et Kennedy, 2000). Elle est garante du succès de la gestation car tout défaut à ce stade ci représente une cause majeure d'infertilité chez la femme. Pendant l'implantation, l'embryon qui possède des propriétés invasives s'infiltrer profondément dans l'endomètre utérin. L'accolement du blastocyste entraîne la transformation des cellules endométriales, sous l'effet de l'œstrogène et de la progestérone (Parr et al, 1987) : c'est la décidualisation. Les cellules de surface de l'utérus (cellules épithéliales) entrent en apoptose dans le but de laisser un espace pour l'implantation des cellules trophoblastiques de l'embryon. Les mécanismes contrôlant l'apoptose sont très peu connus.

Chez les rongeurs, le premier signe de l'implantation est une augmentation de la perméabilité vasculaire de l'endomètre (Psychoyos, 1973). Cette augmentation de la perméabilité s'effectue sous l'action de différentes hormones comprenant entre autre les prostaglandines E2 (Kennedy ,1985. Tawfik et al, 1987).

Les prostaglandines (PGs) sont présentes à différents niveaux d'expressions sur le site d'implantation chez les rates gestantes (Lim et Dey, 1997) et la plus abondante est la prostaglandine I2 (PGI2), dérivée de la cyclooxygénase de type 2 (COX-2) (Lim et al, 1999). En effet, son enzyme de synthèse qui est la prostaglandine I synthétase (PGIS) est exprimée dans le noyau et le cytoplasme des cellules stromales pendant l'implantation, suggérant ainsi la localisation de la prostaglandine à ces endroits pendant l'implantation. La PGI2, de par son action vasoactive augmente la perméabilité vasculaire de l'utérus pendant l'implantation (Murohara et al.1998 ; Wheeler-Jones et al.1997) en agissant via son récepteur peroxydase activé γ (PPAR γ) (Barak et al. 2002).

1.5 La parturition

La parturition est l'ensemble des événements physiologiques permettant l'expulsion des fœtus et des annexes embryonnaires hors des voies génitales à la fin de la gestation. La parturition est composée de cinq événements physiologiques séparés : la rupture de la membrane fœtale, la dilatation cervicale, la contraction du myomètre, la séparation du placenta et l'involution de l'utérus. Il a été démontré que les PGs jouaient un rôle central dans chacun de ces événements (Olson DM.2003). En effet, les PGs et l'ocytocine sont responsables de la régulation de la contraction du myomètre. Les PGs vont stimuler la libération du calcium intracellulaire. Le calcium intracellulaire libéré va initier un ensemble de phénomènes tels que la dépolarisation, la contraction des muscles, la sécrétion hormonale et l'activation de la phospholipase A2. Les PGs agissent directement sur la contraction utérine en augmentant les jonctions (gap) entre les cellules myométriales et en augmentant le nombre de récepteur à l'ocytocine. L'ocytocine va permettre la contraction du muscle utérin en déclenchant la décharge dépolarisante via l'abaissement du seuil d'excitabilité. Le travail est la phase la plus longue de la parturition et est caractérisé par des contractions du myomètre et la maturation du col et se termine par l'expulsion.

1.6 L'apoptose et la prolifération cellulaire

1.6.1 L'apoptose

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est un processus physiologique de mort cellulaire responsable de l'homéostasie des cellules de l'organisme. Il est impliqué dans le développement embryonnaire, les cellules infectées, mutées, endommagées ou âgées. Il affecte en général des cellules isolées, aboutissant ainsi à un processus de condensation et de fragmentation. L'apoptose apparaît de façon cyclique entre autres dans l'endomètre non gestant (Leblanc et al, 2003.), pendant la gestation chez la souris (Mu et al, 2002), dans la décidue (Kokawaka et al, 1998) et le placenta (Smith et al, 1997) de l'humain, dans les cellules épithéliales de l'amnion (Lei et al, 1978. Kumagai

et al, 2001) du rat et dans les cellules épithéliales pendant l'implantation chez le rat (Parr et al, 1987 ; Shooner et al, 2005). Les manifestations morphologiques se caractérisent par une compaction de la chromatine nucléaire, une convolution des membranes nucléaires et cytoplasmiques et une condensation du cytoplasme (figure 1.7). Il s'ensuit une fragmentation du noyau et la formation de corps apoptotiques. Les corps apoptotiques sont des éléments cytoplasmiques et nucléaires qui seront relargués et phagocytés par les cellules voisines sans aucune réaction inflammatoire.

De nombreux facteurs interviennent pour induire l'apoptose, et certains aboutissent à une voie commune passant par la mitochondrie et l'action de la protéine Bcl-2 ainsi que la cascade des caspases (Déry et al, 2003). Toutes les atteintes amenant la cellule au suicide entraînent l'ouverture des pores de la mitochondrie, sous l'effet de la disparition de l'effet protecteur d'une protéine, soit Bcl-2. Les protéines Bcl-2, Bax et Bad ont un effet régulateur permettant la fermeture ou l'ouverture de ces pores qui, si elles sont ouvertes, permettent l'entrée d'ions et la sortie de cytochrome C, qui active une cascade de réactions menant à l'activation de la caspase 3 qui clivera des protéines cruciales (protéines du cytosquelette, PARP) pour la survie de la cellule et entraînera la mort de celle-ci (Thornberry NA, 1997). Il faut préciser que la protéine Bcl-2 s'oppose aux effets pro-apoptotiques de Bax, Bad et Bak.

1.6.2 La prolifération cellulaire

La prolifération cellulaire s'associe à l'apoptose afin de maintenir l'homéostasie de la cellule. En effet la prolifération cellulaire normale demande la progression de la cellule dans les quatre phases du cycle cellulaire : G1, S, G2, M (Gary et Pardee, 2004). La phase G1 permet de définir le type cellulaire car c'est pendant cette phase que la cellule synthétise des protéines, croît et adopte une morphologie propre à son type cellulaire. À sa sortie de la phase G1, la cellule a trois possibilités : soit elle quitte le cycle cellulaire et entre en phase d'attente (G0), soit elle entre en mitose, soit elle meure. La phase S ou phase de synthèse permet à la cellule de dupliquer son ADN et d'effectuer une copie de ses chromosomes (Nigg EA, 1995 ; Gao et Zelenka, 1997). La phase G2 est la phase de transition entre la synthèse et la mitose, elle permet à la cellule de s'assurer que la réplication de l'ADN a bien été réalisé et de se préparer pour la mitose.

La phase M ou mitose est la phase de division cellulaire car elle permet à la cellule mère de produire deux cellules filles. La mitose proprement dite est divisée en plusieurs phases : la prophase, la métaphase, l'anaphase et la télophase. Il existe une phase supplémentaire qui suit ces quatre là et correspond à la division du cytoplasme : la cytokynèse. Après la division, les cellules retournent en phase G₁ et le cycle cellulaire est bouclé. La durée du cycle cellulaire dépend du type de cellule et varie la plupart du temps entre 10 et 30 heures. Le passage dans chacune des quatre phases est régulé par un complexe de protéines telles que les cyclines et les cyclines kinases dépendantes (figure 1.8) (Nigg EA, 1995 ; Gao et Zelenka, 1997).

Certaines voies de signalisation semblent être plus particulièrement responsables de la prolifération de la cellule. En effet, lorsque le mitogène se fixe sur son récepteur, il active une cascade de signalisation qui repose d'une part sur une protéine cytoplasmique, la molécule ras, et d'autre part sur des protéines nucléaires, les cyclines. A la suite de ce signal, et après une étape de croissance indispensable, la cellule va se diviser.

1.7 Les prostaglandines

1.7.1 Bref historique

Les prostaglandines ont été découvertes pour la première fois vers 1930 dans le liquide séminal par le Docteur Suédois Von Euler (Von Euler, 1936). Il leur donna le nom prostaglandine car il pensait que la prostate était le seul organe qui les sécrétait. Plus tard, on se rendit compte que les prostaglandines étaient présentes dans tous les organes et dans la plupart des cellules. Durant les dernières décennies, un nombre considérable de recherches a été effectué sur les eicosanoïdes. Ces recherches ont permis d'élucider le rôle physiologique de ces composés et la façon dont leur synthèse est contrôlée. En effet, les prostaglandines appartiennent à la grande classe des eicosanoïdes, c'est-à-dire des acides gras poly insaturés à 20 atomes de carbone (Narumiya., 1999), et à la sous classe des prostanoides (prostaglandine D₂ ; prostaglandine I₂ ; prostaglandine E₂ ; prostaglandine F₂ alpha ; et thromboxane A₂) (Rolin al, 2006).

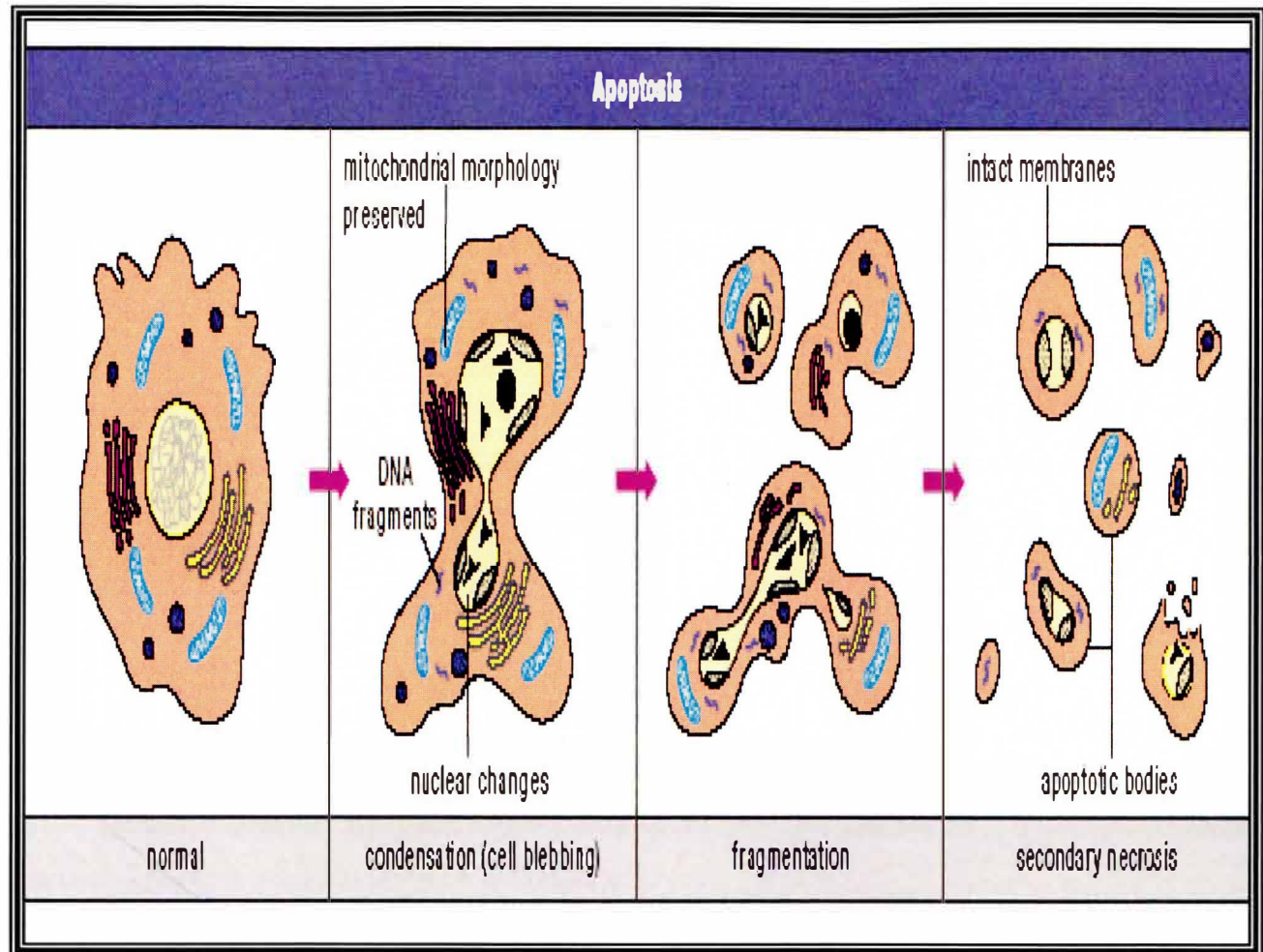


Figure 1-7: Apoptose ; les premières manifestations morphologiques se caractérisent par une compaction et une marginalisation de la chromatine nucléaire. On observe alors une condensation du cytoplasme, une fragmentation du noyau avec formation de corps apoptotiques. Les corps apoptotiques seront relargués et phagocytés par les cellules voisines. Roche MB.

Elles sortent par diffusion facilitée de la cellule qui les a synthétisés (Smith W, 1986) afin d'agir de façon autocrine et/ou paracrine via leur récepteur couplé à la protéine G et induire des changements dans le niveau des seconds messagers (Smith W, 1989). Il existe 20 variétés de prostaglandines réparties en neuf classes, nommées de A à I (PGA, PGE, PGF, PGI etc...) selon leur structure.

Les prostaglandines sont produites par l'amnios, le chorion, la décidue, le myomètre et le placenta (Zakar et al, 1996 ; Mitchell et al, 1995) et plusieurs facteurs peuvent augmenter leur production. Parmi ces facteurs, se trouvent les cytokines (Mitchell et al, 1993 ; Norwitz et al, 1992 ; Ishihara et al, 1996) et les facteurs de croissance (Kniss et al.1992). En effet, une augmentation du ratio PGE2 : PGF2 α par l'interleukine-1 en milieu de phase lutéale a été observé chez les bovins (Tanikawa et al, 2005). Aussi, une augmentation de la sécrétion de la PGE2 par le TGF- α dans les cellules déciduales et stromales de la ratte a été reporté (Tamada et al, 2001). Enfin, au niveau des neurones de la région pré optique de l'hypothalamus antérieur, l'interaction entre la cytokine et son récepteur active la phospholipase A2 et induit la libération de la prostaglandine via la libération d'acide arachidonique.

1.7.2 Biosynthèse des prostaglandines

La biosynthèse des prostaglandines s'effectue en deux grandes étapes : l'hydrolyse de l'acide arachidonique et sa transformation en différents substrats.

1.7.2.1 Hydrolyse de l'acide arachidonique

L'acide arachidonique est le précurseur des prostaglandines (PGs) et a plusieurs sources. Elle provient soit des phospholipides membranaires intracellulaires (Dennis EA, 1987), soit des esters de cholestérol (Habenicht et al, 1990). L'acide arachidonique produite doit être libéré afin d'être métabolisée. Cette libération se fait sous l'action de la phospholipase A2 (PLA2) (William L, 1991).

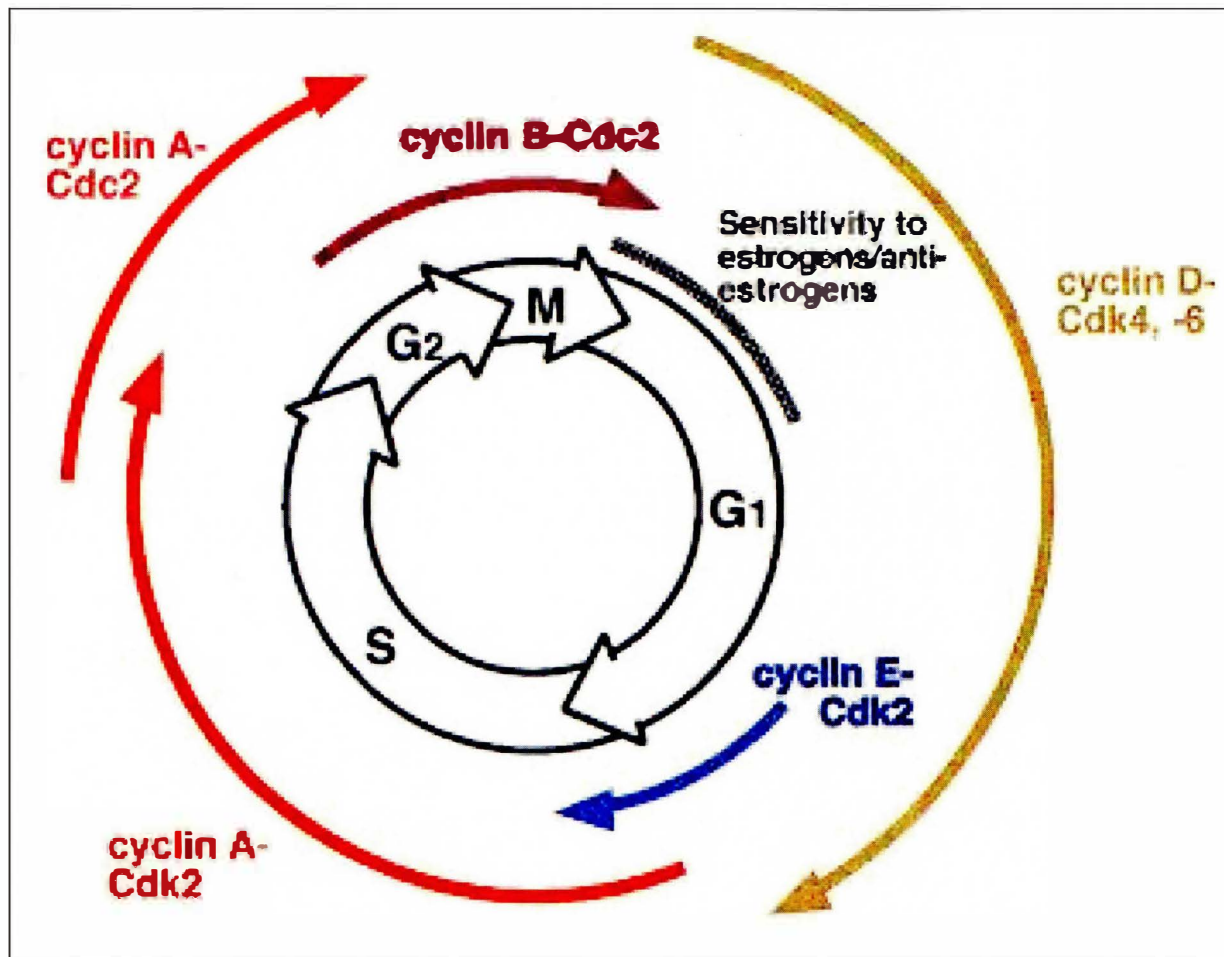


Figure 1-8: Le cycle cellulaire ; les cyclines sont des protéines formées et dégradées au cours du cycle cellulaire tandis que les gènes CDK (Cyclin Dependent Kinase) contrôlent les différents passages du cycle cellulaire. La concentration des protéines CDK ne varie pas tandis que celle des cyclines varie périodiquement au cours du cycle cellulaire. Les cyclines se fixent sur les molécules de CDK, régulant l'activité des CDK en phosphorylant les protéines. La dégradation périodique des cyclines est importante dans le contrôle du cycle cellulaire (Marie-Claude Lebart, 2004).

1.7.2.2 Transformation de l'acide arachidonique en différents substrats

La seconde étape de la biosynthèse est la conversion de l'acide arachidonique mobilisé en prostaglandine H₂ (PGH₂) (figure 1.9). Pour cela, l'acide arachidonique libéré sera oxygéné en prostaglandine G₂ (PGG₂) puis réduit en prostaglandine H₂ (PGH₂) sous l'action de la prostaglandine H synthétase (ou cyclooxygénase).

1.7.3 La prostaglandine H synthétase ou cyclooxygénase

La prostaglandine H synthétase (PGHS) est communément appelée cyclooxygénase (COX) (Zakar et Hertelendy, 2001). Elle existe sous deux isoformes codés par des gènes différents : la cyclooxygénase de type 1 (COX-1) et la cyclooxygénase de type 2 (COX-2) (William et Dubois, 1996). La COX-1 et la COX-2 sont exprimées dans le réticulum endoplasmique des membranes et dans l'enveloppe nucléaire (Spencer et al, 1998).

La COX 1 est une protéine signal de 576 acides aminés qui fait référence à une enzyme purifiée originellement chez les ovins et les bovins. (Smith et al, 1991). Elle est exprimée de façon constitutive dans la plupart des tissus (O'Neill et Ford, 1993). La COX-2 a été isolée à l'origine comme un gène inducible de l'oncogène *v-src* produit par les fibroblastes de poulet (Xie et al, 1991; Simmons et al, 1991). Elle est exprimée en réponse à des stimuli tels que les phorbols esters, les lipopolysaccharides bactériens (Niir et al, 1997 ; Masferrer et al, 1990), les cytokines et les facteurs de croissance (Albert et al, 1994 ; Angel et al, 1994 ; Premyslova et al, 2003).

La COX-2 est importante pour la production des prostaglandines dans les tissus intra-utérins (Loudon et al, 2003). La COX-2 aussi responsable de la production des PGs essentielles lors de l'ovulation, la maturation ovocytaire, l'implantation du blastocyste et la décidualisation (Lim et Dey, 1997). Elle permettra la synthèse de la PGH₂ qui pourra par la suite donner la prostaglandine D₂ (PGD₂), la prostaglandine F₂ α (PGF₂α), la prostaglandine E₂ (PGE₂), la prostacycline (PGI₂) et les thromboxanes sous l'action des prostaglandines synthétases (Spencer et al, 1998).

1.7.4 La prostaglandine D2 synthétase

La PGD2 est le prostanoïde le plus abondamment produit par le système nerveux des mammifères (Naomi et al, 1999). Elle provient de l'isomérisation de la PGH2 catalysée par la prostaglandine D synthétase (PGDS). La PGDS a deux fonctions : elle agit comme enzyme de synthèse de la PGD2 (Tsuchida et al, 2004) et comme un ligand lipophile pour la liaison des protéines telles que la protéine de liaison du rétinol et la protéine de liaison de l'acide rétinoïque. La PGDS existe sous deux types distincts : la prostaglandine D synthétase de type hématopoïétique (H-PGDS) et la prostaglandine D synthétase de type lipocalin (L-PGDS).

La H-PGDS est une enzyme cytosolique membre de la classe Sigma des glutathione S-transferase. Elle est présente sur les mastocytes, les cellules présentatrices d'antigènes et les cellules T helper (Urade et al, 2004). Chez l'humain, la H-PGDS est présente dans le placenta (Rachel et al, 2005). La L-PGDS est une protéine monomérique N-glycosylée identifiée pour la première fois dans le cerveau de rat comme l'enzyme qui catalyse la transformation de la PGH2 en PGD2 (Urade et Eguchi, 2002). On a alors découvert plus tard qu'elle était identique à la protéine β -trace (protéine humaine présente dans le fluide cérébrospinal) (Watanabe et al, 1994). La L-PGDS est présente dans le système nerveux central, les organes génitaux male, le fluide cérébrospinal (Chen et al, 2004) et peut être utilisée comme marqueur dans des maladies rénales ou des artérioscléroses (Urade et al, 2004). Chez l'humain, la L-PGDS est présente dans le fluide amniotique (Helliwell et al, 2006). La PGD2 synthétisée par la L-PGDS aura de nombreux effets biologiques incluant la prévention de l'agrégation des plaquettes et la relaxation du muscle lisse des vaisseaux (Shiki et al. 2004).

1.7.5 La prostaglandine E2 synthétase

La PGE2 est une des prostaglandines importantes pour l'implantation et la décidualisation (Lim et al, 1997). Elle joue un rôle dans les systèmes cardiovasculaire, rénal, pulmonaire, endocrine, gastro-intestinal, neural, reproductif et immun (Coleman et al, 1994). Elle provient de la conversion de la PGH2 sous l'action de la PGE2 synthétase (PGES). La PGES est un prostanoïde terminal synthétase qui convertit de façon enzymatique la PGH2 en PGE2. Elle existe sous deux iso formes :

la PGES microsomal (mPGES) et la PGES cytosolique (cPGES) (Sun et al, 2004). La cPGES est la plupart du temps liée à la COX-1 et induit la réponse immédiate tandis que la mPGES est préférentiellement couplée avec la COX-2 afin de générer la PGE₂ (Sun et al, 2004).

1.7.6 La prostaglandine I₂ synthétase

La PGI₂ a été découverte pour la première fois en 1976 lors de l'identification des écosanoïdes instables dans les vaisseaux sanguins (Lim et al, 2002). C'est le médiateur lipidique le plus abondamment généré par les tissus vasculaires et est caractérisé comme anticoagulant plaquettaire endogène et un puissant vasodilatateur (Bunting et al, 1983). Elle représente aussi une des prostaglandines essentielles à l'implantation et la décidualisation. La PGI₂ provient de la transformation de la PGH₂ sous l'action de la PGI₂ synthétase (PGIS) (Vane et Botting, 1995). La PGIS est une protéine membranaire de la famille de P450 (Tone et al, 1997). Elle est localisée dans le noyau et dans le réticulum endoplasmique des membranes (Moncada et al, 1977 ; DeWitt et Meade, 1983 ; Liou et al, 2000), ce qui lui confère une dualité d'action.

Les PGs sont le plus souvent labile et ont une durée de vie plutôt brève : de quelques minutes pour la PGI₂ et de 10 à 30 minutes pour la PGD₂. La PGI₂ est très labile et est transformé de façon spontanée *in vivo* en 6-keto-PGF_{1α} (Omini et al, 1977).

1.7.7 Mécanisme d'action des prostaglandines

De nombreux processus de la reproduction, en particulier l'ovulation, la fertilisation, l'implantation, la décidualisation et la parturition, dépendent d'interactions entre le ligand et le récepteur des prostaglandines. Il a déjà été démontré que l'habilité des PGs à produire une réponse biologique variée dépendait de sa liaison à son récepteur spécifique présent sur la membrane plasmique (Hatae et al, 2001).

Les récepteurs de surface des prostaglandines PGE₂, PGF_{2α}, PGD₂, prostacycline (PGI₂) et thromboxanes ont été clonés comme *EP*, *FP*, *DP*, *IP* et *TP*, respectivement (Negishi et al, 1995).

Cependant, la PGE₂ se lie et active un ensemble de sous types de récepteurs EP fonctionnels et distincts nommés EP₁, EP₂, EP₃ et EP₄ (Negishi et al, 1995).

Les COX ont été localisées sur le réticulum endoplasmique et sur la membrane nucléaire (Morita et al.1995, Spencer et al, 1998). Les deux localisations des COX ont suggéré deux mécanismes d'action pour chaque prostaglandine. Le premier mécanisme est que les PGs dérivées de la COX présente sur le réticulum endoplasmique peuvent sortir des cellules et exercer leurs fonctions via des récepteurs de surface couplée à la protéine G (figure1.10) (Negishi et al, 1995). Par exemple, la voie de signalisation utilisée par la PGI₂ est le récepteur de surface IP couplé à la protéine G. L'activation du récepteur IP par la PGI₂ entraîne une production intracellulaire de l'AMP cyclique par stimulation de l'adényl cyclase. L'augmentation intracellulaire d'AMP cyclique active la cascade de la protéine kinase A ou mobilise le calcium intracellulaire par activation de la phospholipase C. D'où les rôles de vasodilatateur et d'anticoagulant de la PGI₂.

Le deuxième mécanisme est que les PGs dérivées de la COX présente sur la membrane nucléaire vont exercer leurs fonctions directement sur le noyau en interagissant avec les peroxisomes proliferator-activated receptors (PPARs) (Mangelsdorf et al, 1995) (figure1.11). En effet, les PPARs régulent le métabolisme des prostaglandines et activent leur transcription en se fixant sur les séquences éléments de l'ADN nommées PPRE (peroxisome proliferator response elements).

1.7.7.1 Action via les récepteurs membranaires

Sept types et sous types de récepteurs membranaires de prostaglandines ont été identifiés chez les mammifères (Narumiya et al, 1999) : le récepteur DP pour la PGD₂, quatre sous types de récepteurs EP (EP₁, EP₂, EP₃, EP₄) pour la PGE₂, le récepteur FP pour la PGF₂ et le récepteur IP pour la PGI₂. Ces récepteurs sont des récepteurs couplés à la protéine G de type rhodopsine et ont sept domaines transmembranaires. Chaque récepteur est codé par des gènes différents.

Les récepteurs DP (359 acides aminés) et IP (386 acides aminés) sont des protéines qui traversent sept fois la membrane. Ces protéines sont structurées en hélice α transmembranaire. Chaque segment (ou hélice) a un rôle propre. Les protéines G sont sous la membrane, accrochées à celle-ci par un lipide, ajouté durant le processus de modification post-traductionnelle. Les protéines G

sont mobiles sous la membrane. Ces protéines sont composées de trois sous unités $G\alpha$, $G\beta$, $G\gamma$, qui peuvent être dissociées (Fig.1.10). La fixation de l'hormone (PGD2 ou PGI2) sur son récepteur (DP ou IP) provoque un changement conformationnel qui permet à la région interne du récepteur d'interagir avec la protéine G.

La nouvelle forme obtenue a une grande affinité pour cette protéine G. La liaison récepteur/protéine G entraîne le remplacement du GDP par du GTP car il y a un changement d'affinité. Ce remplacement provoque la séparation des sous unités en sous unité $G\alpha$ libre et un ensemble des deux sous unités restantes G (β et γ). La sous unité $G\alpha$ va présenter une conformation affine pour l'effecteur, soit (l'adénylate cyclase). L'adénylate cyclase va alors être activée par la sous unité α car celle-ci est une GTPase (qui hydrolyse le GTP en GDP) et l'adénylate cyclase activée va transformer l'ATP en AMPc. D'où l'augmentation intracellulaire de la concentration d'AMPc par les récepteurs DP et IP (Negishi et al, 1995)

Cette augmentation d'AMPc confère aux récepteurs DP et IP leur rôle dans la relaxation des muscles lisses (tableau 1.1). Le récepteur IP peut aussi se coupler à la protéine G et entraîner une augmentation de calcium intracellulaire (Smith et al, 2000). L'augmentation du calcium intracellulaire confère au récepteur IP son rôle dans la contraction musculaire.

1.7.7.2 Action via les récepteurs nucléaires

Cela fait un peu plus de 10 ans que le premier des membres de la famille des Peroxisomes Proliferator-Activated Receptors (PPARs) fut découvert et classé parmi les récepteurs nucléaires. Les "Peroxisome Proliferator Activated Receptors" (PPARs) sont les membres de la superfamille des récepteurs nucléaires (Kang et al, 2006), à laquelle appartiennent également les récepteurs des hormones stéroïdes, des hormones thyroïdiennes ainsi que de l'acide rétinoïque.

Chacun est codé par un gène différent et présente un profil d'expression différent selon les tissus. Trois sous-types de PPAR(s) ont été décrits à ce jour : PPAR alpha (PPAR α), PPAR beta (PPAR β) et PPAR gamma (PPAR γ) (Kliwer et al, 1994). Ces 3 types de PPAR(s) sont des récepteurs pour les acides gras alimentaires et certains eicosanoides.

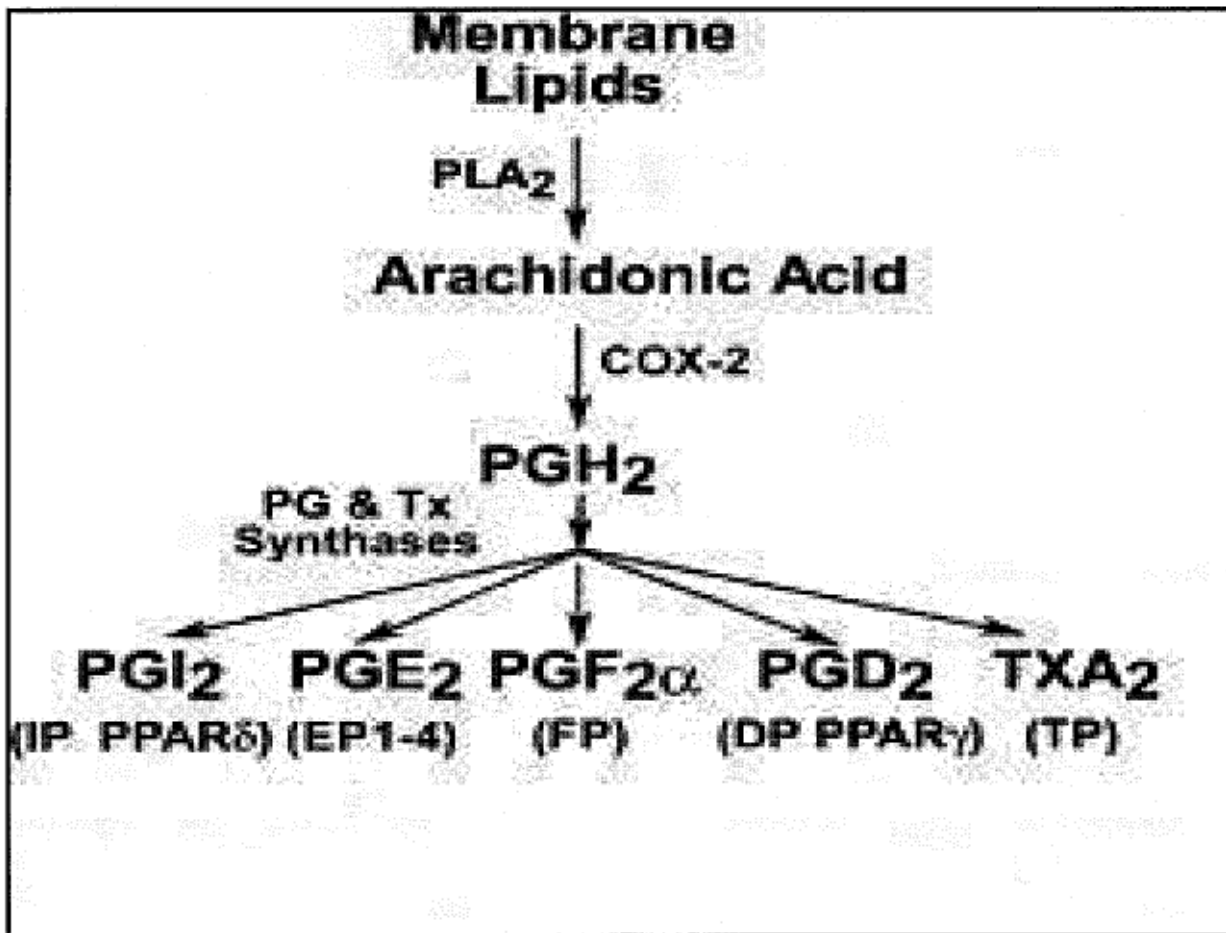


Figure 1-9 : Biosynthèse des prostaglandines ; l'étape clé dans la synthèse des prostaglandines est la réduction de l'acide arachidonique en PGH₂ sous l'action de la cyclooxygénase. La PGH₂ sera métabolisé par des synthétases spécifiques en cinq prostaglandines : PGI₂; PGE₂; PGF₂α; PGD₂ et TXA₂. Les prostaglandines agiront via des récepteurs nucléaires ou membranaires. On aura les récepteurs IP et PPARδ pour la PGI₂; les récepteurs EP1 à EP4 pour la PGE₂; le récepteur FP pour la PGF₂α; les récepteurs DP et PPARγ pour la PGD₂ et le récepteur TP pour la TXA₂. Abréviations : PLA₂ (phospholipase A₂); COX (cyclooxygénase); PG (prostaglandine); TX (thromboxane); PPAR (péroxysome proliférateur-activé récepteur) ("Lipid signaling in embryo implantation" Wang H, 2005).

Ces récepteurs sont activés par des ligands spécifiques (Forman et al, 1995 ; Forman et al, 1997; Kliewer et al, 1997). Une fois activés par leurs ligands, les PPAR forment des hétéro dimères avec le récepteur nucléaire RXR (9-cis retinoic acid receptor) (Kliewer et al, 1992). Ces hétérodimères recrutent des coactivateurs transcriptionnels tels que le récepteur stéroïde coactivateur-1 (SRC-1) et la protéine de liaison CREB (CBP) (Direnzo et al, 1997; Zhou et al, 1998) et modulent la transcription après s'être fixés sur des séquences spécifiques PPRE (peroxisome proliferator response elements) localisées dans les régions régulatrices de leurs gènes cibles (Muerhoff et al, 1992). Ainsi, les différents ligands peuvent, via un même récepteur nucléaire, induire des réponses biologiques communes, mais aussi des réponses biologiques qui leur sont spécifiques

Comme les autres récepteurs nucléaires, l'activité transcriptionnelle des PPARs est non seulement régulée par la fixation de ligands mais aussi par des protéines appelées cofacteurs pouvant abolir (corépresseur) ou décupler (coactivateur) leur activité transcriptionnelle. Tous les mécanismes moléculaires qui permettent aux cofacteurs de moduler l'activité des récepteurs nucléaires ne sont toutefois pas encore connus.

Lim et al (1999) ont démontré la présence du récepteur nucléaire PPAR δ qui forme un hétéro dimère avec le RXR α pendant l'implantation. Ils ont alors prouvé que la PGI₂ agissait dans l'implantation et la décidualisation par activation du récepteur PPAR δ hétéro dimère de RXR α .

De plus, de récentes pistes ont identifié un récepteur de PGD₂ appelé récepteur CRTH2 (récepteur membranaire homologue de la molécule exprimée sur les cellules T helper de type 2) (Hirai et al, 2001). Elles ont alors démontré que la migration des cellules T helper dépendantes de PGD₂ dans la phase précoce de la gestation se fait via le récepteur CRTH2. Le récepteur CRTH2 se couple à la protéine G_i. Les protéines G_i sont une des familles principales des protéines G associées à un récepteur. Il s'agit entre autre du récepteur muscarinique à l'acétylcholine, situé au niveau des muscles cardiaques. La fixation de la PGD₂ sur le récepteur CRTH2 couplé à la protéine G entraîne une diminution du taux d'AMPc en mobilisant le calcium intracellulaire.

Bien que l'inactivation génique de la cyclooxygénase 2 ait démontré l'importance des prostaglandines lors de l'implantation embryonnaire du rat, les mécanismes moléculaires et cellulaires qui régulent la PGDS et la PGIS endométrial restent inconnus.

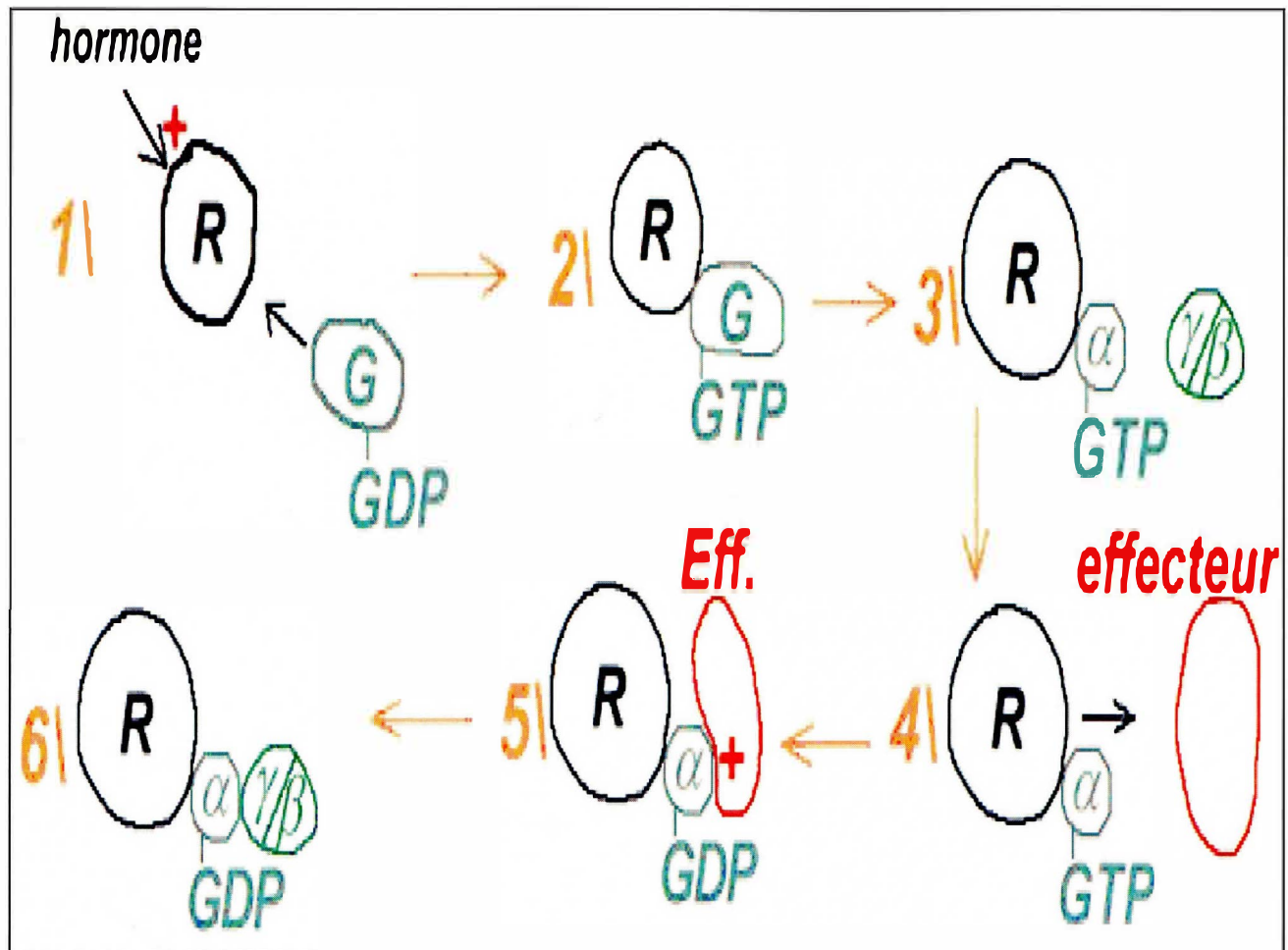


Figure 1-10: Mécanisme d'action des Récepteurs membranaires ; la protéine G est un hétéro dimère comportant 3 sous unités nommées α , β et γ . 1/ La liaison de l'hormone (modulateur) à son récepteur spécifique. 2/ L'activation d'une protéine G. Le GDP est remplacé par le GTP. 3/ Dissociation des sous unités β et γ car le GTP a une affinité forte pour α mais très faible pour β et γ . 4/ et 5/ Activation d'un système enzymatique effecteur impliqué dans la production du second messenger. 6/ Réassociation de la sous unité α avec les sous unités β et γ .

HORMONE	RÉCEPTEUR	DISTRIBUTION DU RÉCEPTEUR	MODE D'ACTION
PGD2	DP	Utérus, muscle lisse des vaisseaux.	Augmente l'activité de l'adénylate cyclase d'où l'augmentation d'AMPc.
		Cellules éosinophiles, cellules basophiles et les cellules T helper.	Mobilise le calcium intracellulaire.
PGI2	IP	Muscle lisse des vaisseaux.	Augmente l'activité de l'adénylate cyclase d'où l'augmentation d'AMPc
PGF2	FP	Utérus, corps jaune	Augmente le phosphoinositol, ce qui entraîne une augmentation du calcium intracellulaire libre.
PGE2	EP1	Utérus	Augmente le phosphoinositol, ce qui entraîne une augmentation du calcium intracellulaire libre
	EP2	Placenta	Augmente l'activité de l'adénylate cyclase d'où l'augmentation d'AMPc
	EP3	Utérus	La plupart des récepteurs EP3 diminuent l'AMPc par inhibition de l'adénylate cyclase. D'autres augmentent le niveau de calcium.
	EP4	Utérus	Augmente l'activité de l'adénylate cyclase d'où l'augmentation d'AMPc

Tableau 1-1 : Mécanisme d'action des récepteurs membranaires selon CAYMAN ; les récepteurs membranaires sont : le récepteur DP pour la PGD2, quatre sous types de récepteurs EP (EP1, EP2, EP3, EP4) pour la PGE2, le récepteur FP pour la PGF2 et le récepteur IP pour la PGI2. Il faut noter que la plupart des prostaglandines auront comme second messenger l' AMPc

1.8 Objectifs et hypothèses

Compte tenu du fait que l'expression des prostaglandines au cours des étapes clés de la gestation pourrait jouer un rôle crucial tout au long de la gestation. Et que d'autre part, l'expression de la PGDS et de la PGIS avait déjà été démontré dans le myomètre, nous avons émis comme hypothèse que la PGDS et la PGIS pourraient être régulés dans l'endomètre utérin. Notre objectif est d'étudier l'expression et la régulation de la PGIS et de la PGDS endométriale dans l'utérus gestant et non gestant et de déterminer si celles-ci peuvent être régulées par les hormones sexuelles.

CHAPITRE II

EXPRESSION OF PROSTAGLANDIN D SYNTHASE (PGDS) AND PROSTACYCLIN SYNTHASE (PGIS) IN THE ENDOMETRIUM OF CYCLIC, PREGNANT AND PSEUDOPREGNANT RATS AND THEIR REGULATION BY SEX STEROIDS

RÉSUMÉ DE L'ARTICLE

Objectif

Les prostaglandines (PGs) sont les médiateurs lipidiques produits par la voie de la cyclo-oxygénase (COX). Les PGs sont les régulateurs importants des fonctions reproductrices femelles telles que l'ovulation, l'implantation, la décidualisation et la parturition. Les prostaglandine synthétases (PGS) sont les enzymes cellulaires impliquées dans la synthèse d'écosanoides et qui induisent la synthèse des prostaglandines à partir de la prostaglandine G2 (PGG₂). Compte tenu du fait que la présence et l'expression de PGS dans l'utérus de rat restaient inconnu, nous avons comme objectif de la présente étude d'étudier l'expression de la prostaglandine synthétase hématopoïétique D (hPGDS) et de la prostacycline synthétase (PGIS) dans l'endomètre pendant la grossesse, la pseudogestation et le cycle oestral dans l'utérus de rat.

Méthodologie

Les utérus de rates ont été prélevées à différentes phases du cycle oestral (métestrus, proestrus, oestrus et diestrus), pendant les jours 2 à 22 de la gestation et les jours 1 à 9 de la pseudogestation. Les protéines endométriales extraites ont été utilisées pour les analyses de type Western blot et des sections de tissu ont été prélevé et fixé afin de localiser les protéines par immunohistochimie. Les métabolites des prostaglandines D₂ (PGD₂), I₂ (PGI₂), F₂ (PGF₂) et E₂ (PGE₂) dans le sérum ont été déterminés par l'enzyme immunoessai (EIA).

Résultat

La PGIS et la PGDS ont été détectés dans l'endomètre des rates pendant le cycle oestral, la gestation et la pseudogestation. L'expression de la PGIS et de la PGDS n'a pas été influencée par le cycle oestral. Cependant, au début de la gestation, la PGIS avait augmentée de façon significative au jour 5 de la gestation et a graduellement diminué du jour 5.5 à 6.5. Au milieu de la gestation,

l'expression PGIS était maximale le jour 12 et avait graduellement diminuée à la fin de la grossesse. L'expression de la PGDS était élevée au début de la gestation et induite de façon maximale à la fin de la gestation (jours 20 et 22). Un résultat semblable fut observé dans l'expression de la PGDS et la PGIS pendant la pseudogestation : l'expression des deux enzymes a augmenté d'une façon dépendante du temps et leurs expressions étaient maximales au jour 5 et ont graduellement diminué jusqu'au jour 9. Les analyses d'IHC ont indiqué que la PGDS et la PGIS sont localisées dans les cellules épithéliales lumineuses et glandulaires. Les résultats ont montré une diminution significative du niveau du métabolite PGI₂ au proctus. À la fin de la gestation, les résultats ont montré une augmentation significative du niveau du métabolite PGD₂ aux jours 21 et 22 et une augmentation du métabolite de la prostaglandine E pendant la régression déciduale (jour 14). Pendant la pseudogestation, le métabolite de la PGE₂ et le métabolite de la PGI₂ ont augmenté de façon semblable : les métabolites ont augmenté de façon dépendante du temps et étaient maximaux au jour 7.

Conclusion

Ces résultats suggèrent que la PGDS et la PGIS sont présents et pourraient être régulés par la 17 β -estradiol et la progestérone dans l'utérus de rat pendant la gestation. Ces résultats suggèrent aussi que l'endomètre pourrait être une source significative de la PGD₂ et de la PGI₂ pendant des périodes spécifiques de la gestation chez le rat.

Préface

Les auteurs du chapitre II sont Junie Hurette Chansi Kengni (fait les expériences en relation avec les jours du cycle oestral, de la gestation et de la pseudogestation, l'immunohistochimie, écriture de l'article, matériel et méthodes), Isabelle St louis (contribution à l'écriture de l'article), Sophie Parent (contribution importante au dosage des métabolites), Valérie Leblanc (récolte des tissus et ovariectomies) , Carl Shooner (récolte des tissus) et Éric Asselin , direction, encadrement et supervision des travaux de recherche. Le Dr Asselin a aussi effectué la correction finale de l'article.

Regulation of prostaglandin D synthase (PGDS) and prostacyclin synthase (PGIS) in the endometrium of cyclic, pregnant and pseudopregnant rats and their regulation by sex steroids

Junie Hurette Chansi Kengni, Isabelle St-Louis, Sophie Parent, Valérie Leblanc, Carl Shooner and
Eric Asselin*

Département de Chimie-Biologie, Groupe de Recherche en Biopathologies Cellulaires et
Moléculaires, Université du Québec à Trois-Rivières, C.P. 500, Trois-Rivières, Québec,
Canada G9A 5H7

Short title: PGDS and PGIS expression in the rat endometrium.

Key Words: Prostaglandin D, prostacyclin, PGD synthase, prostacyclin synthase, apoptosis,
pregnancy.

*Corresponding Author: Eric Asselin, Ph.D.
Département de Chimie-Biologie
Section Biologie Médicale
Université du Québec à Trois-Rivières, C.P. 500
Trois-Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7
E-mail: Eric.Asselin@uqtr.ca

[†] This work has been supported by a grant from NSERC (238501-01). Eric Asselin is holder of a New Investigator Award of the Canadian Institute of Health Research of Canada (CIHR). We are grateful to Mrs Rollande Caron for the contribution of her precious time and expertise to our projects. We thank also Mrs Daphne Efford and Dr Céline Van Themsche for reviewing the manuscript.

ABSTRACT

AIM: Prostaglandins (PGs) are the downstream bioactive lipid mediators generated by the cyclooxygenase (COX) pathway and are critical regulators of a number of reproductive processes, including ovulation, implantation, decidualization and parturition. Prostaglandin synthases (PGS) are cellular enzymes involved in the eicosanoid synthetic pathway that mediates the synthesis of prostaglandins from prostaglandin G₂ (PGG₂). To date, the presence and regulation of PGS in the rat endometrium have not yet been described. The objective of the present study was to investigate the expression of hematopoietic prostaglandin D synthase (hPGDS) and prostacyclin synthase (PGIS) in the endometrium during pregnancy, pseudopregnancy and estrous cycle in the rat. **METHODS:** Uteri were collected from cyclic, pregnant and pseudopregnant rats at each day of the estrous cycle (metestrus, proestrus, estrus and diestrus) and each two days of pregnancy (days 2 to 22) and steroids-induced pseudopregnancy (days 1 to 9). Endometrial protein extracts were used for Western blot analysis and tissue sections were prepared for protein localisation using immunohistochemistry. Measurements of PGD₂, PGI₂, PGF₂ α and PGE₂ metabolites in serum were performed by enzyme immunoassay (EIA). **RESULTS:** PGIS and PGDS were detected in the endometrium of cyclic, pregnant and pseudopregnant rats but were not influenced by the estrous cycle. During early pregnancy, PGIS was significantly higher at day 5 of pregnancy and was gradually decreased from day 5.5 to 6.5. Later during pregnancy, PGIS was maximal on day 12 and gradually decreased to the end of pregnancy. PGDS expression was high during early pregnancy and was maximal at the end of pregnancy (days 20 and 22). A similar pattern of expression was observed during pseudopregnancy for PGDS and PGIS: both enzymes were increased in a time-dependent manner; their expressions were maximal at day 5 and were gradually reduced to day 9. IHC analysis revealed that PGDS and PGIS were found in luminal as well as glandular epithelial cells. The results showed a significant decrease of PGI₂ metabolite in rat sera at proestrus. We also found a significant increase of PGD₂ metabolite at days 21 and 22 and an increase of PGE₂ and PGF₂ α metabolites during regression of the decidua basalis (days 10-14). During pseudopregnancy, PGE₂ and PGI₂ metabolites were modulated in a similar fashion: the metabolites were increased in a time-dependent manner and were maximal at day 7. **CONCLUSIONS:** These results suggest that PGDS and PGIS are present and

could be regulated by 17β -estradiol and progesterone in the rat uterus during pregnancy, and that the endometrium could be a significant source of PGD₂ and PGI₂ at specific times during pregnancy.

INTRODUCTION

Prostanoids, which consist of prostaglandins (PG) and thromboxanes (TX), exert a variety of effects in diverse tissues and cell types. These prostanoids products are derived from C-20 unsaturated fatty acids and biosynthesised by prostaglandins H (PGH) synthases (1). PGH synthases catalyze the formation of PGH₂ from arachidonic acid. Newly formed PGH₂ is subsequently converted to what are considered to be the biologically active prostanoids, PGD₂, PGE₂, PGF₂ α , thromboxane A₂, or PGI₂. There are two PGH synthase isoforms called PGHS-1 (COX-1) and PGHS-2 (COX-2). These two isoforms share important similarities at the protein level; they are approximately the same size (70–72 KDa), and the important structural and functional domains are highly conserved (2;3). However, PGHS-1 and -2 transcripts are encoded by distinct genes located on different chromosomes and differ in size (2;3). PGHS-1 is a constitutive enzyme present in many mammalian cells (4–6) and its expression appears to be regulated developmentally (7). PGHS-2 is undetectable in most mammalian tissues (4), but its expression can be induced by growth factors, cytokines and tumor promoters (8–10).

Prostaglandins receptors were recently identified and cloned. They are G protein-coupled receptors with seven transmembrane domains. There are eight types and subtypes of prostanoid receptors that are encoded by different genes but as a whole constitute a subfamily in the superfamily of the rhodopsin-type receptors. Receptors specific for TX, PGI, PGE, PGF, and PGD are named TP, IP, EP, FP, and DP receptors respectively (1;11;12). It is believed therefore that prostaglandins work locally, acting only at the site of their production (1).

In the rat uterus, attachment and invasion of embryonic trophoblast is accompanied by decidualization of the adjacent endometrial stroma. Decidualization involves the proliferation and differentiation of endometrial stromal cells into decidual cells, which ultimately form the maternal component of the placenta and is necessary for the successful establishment of pregnancy (13). Decidualization can be initiated only when the endometrium is receptive, and this only occurs during a short period in pregnancy. Several decades of investigations have showed that prostaglandins (PGs)

are needed to trigger the events of blastocyst implantation, which include blastocyst-uterine attachment and stromal decidualization with vascular permeability changes (14;15). Indeed, Kennedy group and others have showed that prostaglandin E₂ (PGE₂) plays a major role in the implantation and decidualization in the rodent uterus because the inhibitory effect of indomethacin on plasminogen activator secretion was reversed by prostaglandin E₂ (16).

PGD₂ is synthesized by the prostaglandin D synthase enzyme (PGDS) and induces sleep, allergic responses, inhibition of platelet aggregation, and relaxation of vascular and non-vascular smooth muscle, and has some roles in reproduction. Two types of PGD₂ synthase are known: lipocalin-type PGD synthase (L-PGDS) and hematopoietic PGD synthase (H-PGDS) (11;17). Lipocalin-type PGD synthase is an N-glycosylated dual functional monomeric protein which acts as a PGD₂-producing enzyme, as well as a lipophilic ligand-binding protein. L-PGDS is present in cerebrospinal fluid, seminal plasma and may play an important role in male reproduction. Hematopoietic PGD synthase is a cytosolic enzyme that isomerizes PGH₂ (a common precursor for all PGs and thromboxanes) to PGD₂ in a glutathione-dependent manner (17;18). H-PGDS is present in the spleen, fallopian tube, endometrial gland cells, extravillous trophoblasts and villous trophoblasts, and perhaps plays an important role in female reproduction (18;19). PGI₂ or prostacyclin is synthesized by the prostaglandin I synthase enzyme (PGIS) and contributes to relaxation in the lower uterine segment. PGI synthase is a membrane-bound hemoprotein that has been localized by immunohistochemical techniques in endothelial cells and both vascular and nonvascular smooth muscle cells (20;21). PGIS is expressed in human myometrial smooth muscle (22).

The expression and regulation of PGDS and PGIS has never been described in the non-pregnant, pseudopregnant and pregnant rat endometrium. We hypothesized that PGIS and PGDS might be important enzymes involved in the regulation of uterine functions during pregnancy.

MATERIAL AND METHODS

Reagents

PGDS and PGIS antibodies were purchased from Oxford Biomedical Research (Oxford, MI). Prostaglandin D2 (PGD2) metabolite 11-beta-PGF1alpha; prostaglandin I2 (PGI2) metabolite 6-keto-PGF1alpha; prostaglandin F2 α (PGF2 α) metabolite 13,14-dihydro-15-keto-PGF2 alpha and prostaglandin E2 (PGE2) metabolite PGEM were purchased from Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI). Vectastain ABC Kit for rabbit IgG was purchased from Vector Laboratories Inc. (Burlingame, CA). Protease Inhibitor Cocktail Tablets, POD and DAB substrate were purchased from Roche (Laval, QC). 17 β -estradiol (E₂) and progesterone were purchased from Laboratoire Mat (Québec, QC).

Animals

Sprague-Dawley female rats, 200-225g, were obtained from Charles River Laboratories Canada. Animals were maintained on standard chow and water, which were available *ad libitum*, in animal facilities illuminated between 6:00 h and 20:00 h. All procedures were performed in accordance with guidelines of the Canadian Council on Animal Care for the handling and training of laboratory animals and the Good Health and Animal Care Committee of the Université du Québec à Trois-Rivières. Male and female rats were mated overnight and confirmation of pregnancy was determined by vaginal smears and/or the presence of a vaginal plug (day 1). Rats were killed on days 2, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 21 and 22 of pregnancy at 10:00 h in the morning and at 18:00 h for days 5.5 and 6.5. Six to 8 different rats were used for each stage of pregnancy. Uteri were collected and fixed for immunohistochemical staining (IHC) or endometrial protein extracts collected for Western blot analysis.

Pseudopregnancy

A total of 3 rats per day of pseudopregnancy were ovariectomized and then allowed to recover from surgery for a minimum of 10 days. They were pre-treated with physiological doses of E₂ and progesterone to induce decidualization as described previously (23): 1) 0.2 μ g estradiol per day for three days (in the morning, day -2,-1 and 0); 2) On the third day (day 0 of pseudopregnancy), another

1 injection of estradiol (0.2 μ g) and progesterone (1 mg) was performed in the afternoon; 3) No
2 treatment for 2 days (day 1 and 2 of pseudopregnancy); 4) Injections of estradiol (0.1 μ g) and
3 progesterone (4 mg) for three days (day 3, 4 and 5 of pseudopregnancy); 5) Another injection of
4 estradiol (0.1 μ g) in the afternoon on day 7 (day 4 of pseudopregnancy); 6) Rats were killed on day 1,
5 3, 5, 7 and 9 of pseudopregnancy. Uteri were collected and fixed for immunohistochemical staining
6 (IHC) or endometrial protein extracts collected for Western blot analysis.

8 **Immunohistochemistry**

9 The uterus was fixed in 4% paraformaldehyde solution and embedded in paraffin. Tissue
10 sections 7 μ m thick were mounted on polylysine-coated slides, deparaffinized, rehydrated, and then
11 heated in 10 mM citrate buffer (pH 6) containing 0.1% (v/v) Triton X-100 (Sigma-Aldrich). After
12 two washes with PBS, slides were incubated with 0.3 % hydrogen peroxide in methanol for 30 min to
13 quench endogenous peroxidase activity. After washing with PBS, tissues were incubated with
14 blocking serum (Vectastain ABC Kit) at room temperature for 1 h. Then, a primary antibody diluted
15 in blocking serum (PGIS 1:250; PGDS 1:500 dilutions) was added to the slides and incubated at 4°C
16 overnight in a humidified chamber. After washing 5 min. in PBS, tissue sections were incubated for
17 30 min. with 3 μ g/ml biotinylated antibody (anti-rabbit or anti-mouse). Subsequently, slides were
18 washed with PBS and incubated with avidin-biotin complex reagent containing horseradish
19 peroxidase for 30 min. Slides were washed with PBS for 5 min and color development was achieved
20 using DAB substrate. The tissue sections were counterstained with haematoxylin. Negative controls
21 were performed using the same protocol but substituting the primary antibody with normal rabbit IgG
22 (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA).

24 **Protein extraction and Western analysis**

25 Protein homogenates from pregnant endometrium were isolated according to a protocol
26 previously described (24). Briefly, uteri from day 2 to day 20 pregnant rats were rapidly excised and
27 placed in ice-cold saline until dissected. Uteri were carefully laid on a glass plate and placed on the
28 stage of a dissecting microscope. In early pregnancy (day 2 to 5.5), total endometrium was scraped
29 using a microscope glass and collected. Uteri from day 6 to 10, because the placenta and decidua

1 were at an early stage of differentiation, could not be reliably separated. For this reason, DB dissected
2 from animals between these days of pregnancy contained some chorioallantoic cells, but
3 antimesometrial decidua, choriovitelline tissues, fetus, and myometrium were removed. Even though
4 we carefully dissected DB from these tissues, there was a possibility that contamination with some
5 antimesometrial decidual cells that regress to form the deciduas capsularis (DC) would occur. In uteri
6 collected from day 12 to 20, DB were isolated by gently separating the placenta and myometrial
7 regions with 23-gauge needles. Additionally, the DB began to regress on day 14 and became too thin
8 to reliably dissect after Day 17. The protocol for DB isolation was described previously by Ogle and
9 George (25).

10
11 Endometrial cells from pregnant animals were homogenized using a pipette in RIPA lysis
12 buffer (PBS 1X pH 7.4; 1% Nonidet P-40; 0.5% Sodium deoxycholate; 0.1% SDS; Protease
13 Inhibitor Cocktail Tablets). Homogenates were centrifuged (12,000 X g for 20 min at 4°C) to
14 remove insoluble material. The supernatant was recovered and stored at -20 °C pending analysis.
15 Protein content was determined with the Bio-Rad DC Protein Assay. Protein extracts (50µg) were
16 heated at 94°C for 3 min, resolved by 10% SDS-PAGE and electrotransferred to nitrocellulose
17 membranes using a semidry transfer apparatus (Bio-Rad, Mississauga, ON). The membranes were
18 then blocked 2 h at room temperature with PBS containing 5 % milk powder, then incubated with
19 anti PGDS 1:1000; and anti PGIS 1:8000, and subsequently with horseradish peroxidase-conjugated
20 anti-rabbit or anti-mouse secondary antibody respectively (1:3000; room temperature for 45 min). All
21 membranes were stripped with Restore western blot stripping buffer (Pierce), reprobed with an
22 antibody specific to β -actin which was used as an internal standard. Peroxidase activity was visualized
23 with the Super signal[®] West Femto maximum sensitivity substrate (Pierce, Arlington Heights, IL, USA),
24 according to the manufacturer's instructions. Signal was visualized using the Biochemi Imaging
25 System (UVP, CA, USA). Densitometrical analysis were performed (protein of interest and β -actin)
26 using Quantity One software (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada). Results are expressed as a ratio
27 (protein of interest/ β -actin) to correct for loading for each endometrial sample.

Prostaglandins metabolites enzyme immunoassay

After collection from the animals, blood was allowed to clot for 30-60 min at 37°C. The serum was then separated from the clot and any remaining insoluble material removed by centrifugation at 3500 rpm for 10 min at 4 °C. After preparation, serums were kept at -80 °C until further use. EIAs for prostaglandins metabolites were used according to manufacturer's instructions. Briefly, 50- μ l of serum obtained during experimentation was used for each of the PGD2, PGI2, PGF2 α and PGE2 metabolites in 96-well plates coated with goat anti-rabbit IgG antibodies. 50 μ l of metabolite tracer and 50 μ l of the metabolite specific antibody were added to each well. The plates were incubated overnight at 4°C or room temperature depending on the metabolite. Then, wells were washed five times with 10 mM phosphate buffer (pH 7.4) containing Tween-20 (0.05%) at pH 7.4, and 200 μ l of Ellman's reagent (69 mM acetylthiocholine and 54 mM 5,5'-dithio-bis [2-nitrobenzoic acid] in 10 mM phosphate buffer, pH 7.4) was added to each well; plates were incubated in the dark at room temperature for 60-90 min. This allowed the bound enzyme tracer to react with Ellman's reagent to yield a yellow solution that could be measured photometrically with a microplate reader at 420 nm. A standard curve was developed simultaneously with standards of the PGs metabolites, and determination of metabolite concentrations relative to those standards was calculated.

Statistical analysis

Western analyses of cycling, pregnant and pseudopregnant animals were repeated four times (four different different rats). Endometrial extracts from each rat were assessed individually. Results subjected to statistical analysis were expressed as mean $\pm$ SEM. Data was subjected to one-way ANOVA (PRISM software version 4.0; GraphPad, San Diego, CA). Differences between experimental groups were determined by the Tukey's test. Statistical significance was accepted when $P < 0.05$.

RESULTS

PGDS and PGIS are expressed in the female rat endometrium during the estrous cycle

Expression of PGD2 and PGI2 proteins has been reported in the uterine myometrium (26), but their regulation in the endometrium during the estrous cycle, pregnancy or pseudopregnancy remains unknown. We have found that PGDS and PGIS proteins were indeed present in the rat endometrium, at all stages of the estrous cycle (Fig.1). However, the levels of PGDS and PGIS were not influenced by the estrous cycle (metestrus, diestrus, estrus and proestrus), indicating that both enzymes might play a role in the maintenance of uterine function but are not regulated during this period in the absence of embryo.

Expression of PGIS and PGDS is regulated in the pregnant rat endometrium

To document the regulation of PGIS and PGDS enzymes in the uterus during pregnancy, Western and IHC analysis were performed on uterine sections and lysates of pregnant rats. Immunodetection of PGIS by Western blot resulted in a band with a molecular mass of 51 kDa (Fig.2), while immunodetection of hematopoietic PGDS resulted in a single band with a molecular mass of 25 kDa (Fig.3). We found that PGIS as well as PGDS were present in the rat uterus at all days of pregnancy. Noteworthy, protein levels of both enzymes were significantly increased at day 5 when compared to other days of early pregnancy, suggesting a possible role for PGIS and PGDS in trophoblast implantation. Levels of PGIS also increased at days 12, 14 and 16 of pregnancy, which coincides with the initiation of DB regression, while the expression levels of PGDS gradually increased from day 12 to peak at day 20, suggesting another role for this enzyme in the preparation for parturition. Lipocalin-type PGD synthase (L-PGDS) was not detected in the endometrial protein extracts (data not shown). These results suggest that PGIS and PGDS are similarly regulated in the rat uterus throughout pregnancy, except in the days preceding parturition where PGDS would play a prominent role.

Expression of PGDS and PGIS during pseudopregnancy

Since we have showed that PGDS and PGIS are regulated during pregnancy, we hypothesised that their expression could be influenced by sex steroids. Indeed, in pseudopregnant uterus of rats stimulated with E2 and progesterone, PGDS and PGIS protein expression were stimulated in a similar fashion (Fig.4). Both enzymes expression levels were increased significantly in a time-dependent manner from day 1 to 5 of pseudopregnancy and were significantly reduced at days 7 and 9. These results suggest that sex steroids influence the expression levels of PGDS and PGIS in the rat uterus.

Localization of PGDS and PGIS proteins in rat endometrium by IHC

To localize PGDS and PGIS proteins, uterine tissues from pregnant rats were sectioned and immunohistochemical analysis were performed (Fig.5). The results showed that both enzymes were expressed in luminal and glandular endometrial epithelial cells during pregnancy.

Measurement of prostaglandins metabolites by enzyme immunoassay (EIA)

To confirm the possible activity of PGDS and PGIS on the production of PGD2 and PGI2 in the rat endometrium, their metabolites (11 β -PGF1 α and 6-keto-PGF1 α respectively) were measured in the rat sera during the estrous cycle (Fig.6), pregnancy (Fig.7) and pseudopregnancy (Fig.8). PGE2 (PGEM) and PGF2 α (13,14-dihydro-15-keto-PGF2 α) metabolites were also measured at the same time. We found an inverse relationship between the levels of PGE2 and PGI2 metabolites, but no significant change in PGD2 metabolite levels, during the estrous cycle. In addition, there was a significant increase of PGE2 and PGF2 α metabolites at proestrus and a decrease of PGI2 metabolite at proestrus ($p < 0.05$). During early pregnancy (Fig.7), the results showed a significant increase of PGE2 metabolite on day 5.5 and an increase of PGI2 but not PGD2 metabolite on day 6. During late pregnancy, the results showed a significant increase of PGD2, but not PGI2, metabolite on day 21 and 22. An increase of PGE2 and of PGF2 α metabolites was observed during decidua basalis regression on days 10, 12 and 14 ($p < 0.05$). PGF2 α metabolites was also increased at days 21 and 22 of pregnancy. During pseudopregnancy (Fig.8), PGE2 and PGI2 metabolites were increased in a

1 similar fashion: the metabolites were increased in a time-dependent manner and were maximal on
2 day 7 of pseudopregnancy. PGF2 α metabolite was significantly ($p<0.05$) increased at day 7 of
3 pseudopregnancy when compared with all other days measured, while systemic levels of PGD2
4 metabolite were not influenced by the pseudopregnancy.

6 DISCUSSION

7 Basic and clinical research to better understand preimplantation embryo development and
8 uterine preparation will help alleviate problems of female infertility, improve fertility in women, and
9 possibly lead to the development of new and improved contraceptive methods (27). Successful
10 implantation is the result of reciprocal interactions between the implantation-competent blastocyst
11 and receptive uterus, which is a multistep process including apposition of the blastocyst to the uterine
12 luminal epithelium, adhesion to the epithelium, penetration through the epithelium and basal lamina
13 and invasion into the stromal vasculature (28). Due to the impracticalities of studying implantation in
14 humans, implantation has been studied in mice and rats (27), guinea pigs (29;30), rabbits (31;32),
15 sheep (reviewed in (33)), and pigs (34-36). Because prostaglandins have been implicated in the
16 implantation process (27), ovulation, fertilization and parturition, and that prostaglandins are
17 involved in the apoptosis process (1), we hypothesized that PGDS and PGIS might be important
18 regulators of uterine function. Also we hypothesized that they might be involved in the apoptosis
19 regulation during implantation and regression of the decidua basalis at the end of rat pregnancy. The
20 present data are the first to show the presence, activity and regulation of PGDS and PGIS in the
21 pregnant, pseudopregnant and the non-pregnant rat uterus.

22
23 During the estrous cycle, death of uterine cells occurs. It has been shown that apoptotic death
24 was low at proestrus and increased at estrus (37-39). This phenomenon is closely associated with the
25 concentrations of ovarian steroids, which increase from diestrus to proestrus and decrease at estrus
26 (40). We have demonstrated that PGDS and PGIS enzymes were present at elevated levels that
27 remained unchanged in rat uterus throughout the estrous cycle, suggesting that their respective
28 products PGD2 and PGI2 exert possibly important roles in uterine function and/or homeostasis. In

1 accordance, we have measured constant levels of PGD2 metabolite in rat sera during the estrous
 2 cycle. Systemic levels of PGI2 metabolite however, which was the most abundant of all PG
 3 metabolites in the female rat sera, was not constant during the estrous cycle as it was markedly
 4 decreased at proestrus, indicating that the source of increased PGI2 might not originate from the
 5 uterus. Our results have also highlighted an inverse relationship between systemic levels of PGI2 and
 6 PGE2 metabolites during the estrous cycle. In this regard, recent studies have showed that PGE2
 7 induces proliferation of human endometrial epithelial cells (41); the significant increase of PGE2
 8 metabolite at proestrus may suggest its implication in cellular proliferation as seen in the
 9 endometrium during this period preceding embryo implantation, and argues for an anti-proliferative
 10 function for PGI2, as previously described (42;43). Our study also showed a significant increase in
 11 PGF2 α metabolite at metestrus. Many studies have showed that PGF2 α is the PG which induces
 12 luteal regression in dogs (7), in bovine (44), in porcine (45) and in rats (46). Luteolytic capacity is
 13 defined as the ability of corpora lutea (CL) to undergo luteolysis and to secrete PGs, the levels of
 14 which appear to be elevated in the early corpus luteum (CL) and during the period of luteolysis. The
 15 increase of PGF2 α at metestrus is thus probably related to the process of luteolysis in rats.

16

17 Our results also demonstrate that PGDS and PGIS are expressed in the endometrium of
 18 pregnant female rats throughout gestation, suggesting that local production of PGD2 and PGI2 might
 19 be important in the regulation of endometrial function. The increase of PGIS and PGDS levels at the
 20 time of establishment of pregnancy and implantation (days 5 to 7) and during regression of the
 21 decidua basalis (days 14 to 20) suggests a possible implication of these two prostaglandins in these
 22 key stages of gestation. PGDS protein, which is high during early pregnancy, could alternatively be
 23 implicated in the recruitment of Th2 cells to the site of implantation in order to protect the embryo
 24 and the placenta from an attack by the immune system, similar to what was shown in human
 25 pregnancy (47). We have also showed a significant increase of PGE2 metabolite on days 10, 12 and
 26 14 of pregnancy. Kennedy et al. (23) studies have clearly showed that PGE2 is involved in
 27 decidualization. Here we show that PGE2 could also be involved in decidua basalis regression since
 28 it is significantly increased during this specific period of pregnancy. Recently, we have showed that
 29 TGF- β isoforms are increased in the decidua basalis and induce apoptosis in decidual cells *in vitro*,
 30 suggesting that TGF- β might be involved in decidua basalis regression (48). TGF- β isoforms has

1 been shown to increase PGE2 secretion in several systems (49-52). Whether TGF- β induces decidual
2 cells apoptosis through the stimulation of PGE2 remains to be elucidated.

3
4 Since both PGIS and PGDS are up-regulated on different days of rat pregnancy in the
5 endometrium and are not regulated during the estrous cycle, we wondered whether sex steroids might
6 be involved in this process and whether embryonic factors are involved. To answer these questions,
7 we used ovariectomized rats treated with sex steroids to induce pseudopregnancy. The results clearly
8 showed that PGIS, as well as its metabolite, are up-regulated in response to sex steroids and in a
9 dose-dependent manner. PGDS protein was also increased albeit to a lesser level as compared to
10 PGIS, but its metabolite was not influenced by pseudopregnancy as opposed to pregnancy. These
11 results suggest that regulation of PGDS expression is dependent on the presence of an embryo while
12 regulation of PGIS expression is not dependent on embryonic factors and is directly regulated by sex
13 steroids. PGE2 metabolite was also increased during pseudopregnancy which confirms the findings
14 by Kennedy et al. showing that PGE2 is increased and responsible for initiating decidualization
15 (4;14;23).

16
17 In conclusion, this study is the first to characterize the expression of PGIS and PGDS in the
18 non-pregnant, pregnant and pseudopregnant uterus and shows that these two enzymes might be key
19 factors involved in embryo implantation and decidua basalis regression. PGDS might also be an
20 important enzyme to induce PGD2 synthesis at the time of parturition. Whether these enzymes are
21 directly or indirectly involved in the activation of luminal epithelial cell apoptosis during
22 implantation and apoptosis activation during DB regression remains to be elucidated.

REFERENCES

1. Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi 1999 Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev* 79:1193-1226
2. Williams CS, DuBois RN 1996 Prostaglandin endoperoxide synthase: why two isoforms? *Am J Physiol* 270:G393-G400
3. Xie WL, Chipman JG, Robertson DL, Erikson RL, Simmons DL 1991 Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:2692-2696
4. Kennedy TG 1994 Involvement of local mediators in blastocyst implantation. In: Glasser SR, Mulholland J, Psychoyos A (Eds). *Endocrinology of Embryo-Endometrium Interactions*. Plenum Press, New York: 183-194
5. Kraemer SA, Meade EA, DeWitt DL 1992 Prostaglandin endoperoxide synthase gene structure: identification of the transcriptional start site and 5'-flanking regulatory sequences. *Arch Biochem Biophys* 293:391-400
6. Kujubu DA, Herschman HR 1992 Dexamethasone inhibits mitogen induction of the TIS10 prostaglandin synthase/cyclooxygenase gene. *J Biol Chem* 267:7991-7994
7. Kiriwara N, Naganawa A, Hori T, Kawakami E, Tsutsui T 2005 Influence of a PGF $_{2\alpha}$ -analogue, etiproston tromethamine, on the functional corpus luteum of dogs. *J Vet Med Sci* 67:1-6
8. Evett GE, Xie W, Chipman JG, Robertson DL, Simmons DL 1993 Prostaglandin G/H synthase isoenzyme 2 expression in fibroblasts: regulation by dexamethasone, mitogens, and oncogenes. *Arch Biochem Biophys* 306:169-177
9. O'Neill GP, Ford-Hutchinson AW 1993 Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human tissues. *FEBS Lett* 330:156-160
10. Simmons DL, Xie W, Chipman JG, Evett GE 1991 Prostaglandins, Leukotrienes, Lipoxins, and PAF. In: Bailey JM (ed). *Plenum Publishing Corp.*, New York:67-78

11. Coleman RA, Grix SP, Head SA, Louttit JB, Mallett A, Sheldrick RL 1994 A novel inhibitory prostanoid receptor in piglet saphenous vein. *Prostaglandins* 47:151-168
12. DeWitt DL, Meade EA 1993 Serum and glucocorticoid regulation of gene transcription and expression of the prostaglandin H synthase-1 and prostaglandin H synthase-2 isozymes. *Arch Biochem Biophys* 306:94-102
13. Abrahamsohn PA, Zorn TM 1993 Implantation and decidualization in rodents. *J Exp Zool* 266:603-628
14. Kennedy TG 1983 Embryonic signals and the initiation of blastocyst implantation. *Aust J Biol Sci* 36:531-543
15. Rankin JC, Ledford BE, Jonsson HT, Jr., Baggett B 1979 Prostaglandins, indomethacin and the decidual cell reaction in the mouse uterus. *Biol Reprod* 20:399-404
16. Zhang X, Shu MA, Ross HE, Kennedy TG 1996 Regulation of plasminogen activator in rat endometrial stromal cells: the role of prostaglandin E2. *Biol Reprod* 54:1046-1051
17. Coleman RA, Kenendy I, Humphrey PPA, Bunce K, Lumley P 1990 Prostanoids and their receptors. In: Emmett JC (ed). *Comprehensive Medicinal Chemistry. Membranes and Receptors*. Pergamon, Oxford:643-671
18. Urade Y, Eguchi N 2002 Lipocalin-type and hematopoietic prostaglandin D synthases as a novel example of functional convergence. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69:375-382
19. Kanaoka Y, Urade Y 2003 Hematopoietic prostaglandin D synthase. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 69:163-167
20. Giannoulis D, Alfaidy N, Holloway AC, Gibb W, Sun M, Lye SJ, Challis JR 2002 Expression of prostaglandin I(2) synthase, but not prostaglandin E synthase, changes in myometrium of women at term pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 87:5274-5282
21. Saito S, Tsuda H, Michimata T 2002 Prostaglandin D2 and reproduction. *Am J Reprod Immunol* 47:295-302
22. Tanabe T, Ullrich V 1995 Prostacyclin and thromboxane synthases. *J Lipid Mediat Cell Signal* 12:243-255
23. Kennedy TG, Ross HE 1993 Effect of prostaglandin E2 on rate of decidualization in rats. *Prostaglandins* 46:243-250

24. Dai D, Ogle TF 1999 Progesterone regulation of epidermal growth factor receptor in rat decidua basalis during pregnancy. *Biol Reprod* 61:326-332
25. Ogle TF, George P 1995 Regulation of the estrogen receptor in the decidua basalis of the pregnant rat. *Biol Reprod* 53:65-77
26. Crankshaw DJ, Gaspar V 1992 Effects of prostanoids on the rat's myometrium in vitro during pregnancy. *Biol Reprod* 46:392-400
27. Dey SK, Lim H, Das SK, Reese J, Paria BC, Daikoku T, Wang H 2004 Molecular cues to implantation. *Endocr Rev* 25:341-373
28. Enders AC, Schlafke S, Hendrickx AG 1986 Differentiation of the embryonic disc, amnion, and yolk sac in the rhesus monkey. *Am J Anat* 177:161-185
29. Enders AC, Schlafke S 1969 Cytological aspects of trophoblast-uterine interaction in early implantation. *Am J Anat* 125:1-29
30. Enders AC 2000 Trophoblast-uterine interactions in the first days of implantation: models for the study of implantation events in the human. *Semin Reprod Med* 18:255-263
31. Enders AC, Schlafke S 1971 Penetration of the uterine epithelium during implantation in the rabbit. *Am J Anat* 132:219-230
32. Hoffman LH, Olson GE, Carson DD, Chilton BS 1998 Progesterone and implanting blastocysts regulate Muc1 expression in rabbit uterine epithelium. *Endocrinology* 139:266-271
33. Gray CA, Bartol FF, Tarleton BJ, Wiley AA, Johnson GA, Bazer FW, Spencer TE 2001 Developmental biology of uterine glands. *Biol Reprod* 65:1311-1323
34. Bazer FW 1975 Uterine protein secretions: Relationship to development of the conceptus. *J Anim Sci* 41:1376-1382
35. Burghardt RC, Johnson GA, Jaeger LA, Ka H, Garlow JE, Spencer TE, Bazer FW 2002 Integrins and extracellular matrix proteins at the maternal-fetal interface in domestic animals. *Cells Tissues Organs* 172:202-217
36. Geisert RD, Yelich JV 1997 Regulation of conceptus development and attachment in pigs. *J Reprod Fertil Suppl* 52:133-149
37. Dery MC, Leblanc V, Shooner C, Asselin E 2003 Regulation of Akt expression and phosphorylation by 17 β -estradiol in the rat uterus during estrous cycle. *Reprod Biol Endocrinol* 1:47

38. Leblanc V, Dery MC, Shooner C, Asselin E 2003 Opposite regulation of XIAP and Smac/DIABLO in the rat endometrium in response to 17beta-estradiol at estrus. *Reprod Biol Endocrinol* 1:59
39. Sandow BA, West NB, Norman RL, Brenner RM 1979 Hormonal control of apoptosis in hamster uterine luminal epithelium. *Am J Anat* 156:15-35
40. Smith MS, Freeman ME, Neill JD 1975 The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology* 96:219-226
41. Jabbour HN, Boddy SC 2003 Prostaglandin E2 induces proliferation of glandular epithelial cells of the human endometrium via extracellular regulated kinase 1/2-mediated pathway. *J Clin Endocrinol Metab* 88:4481-4487
42. Kothapalli D, Stewart SA, Smyth EM, Azonobi I, Pure E, Assoian RK 2003 Prostacyclin receptor activation inhibits proliferation of aortic smooth muscle cells by regulating cAMP response element-binding protein- and pocket protein-dependent cyclin a gene expression. *Mol Pharmacol* 64:249-258
43. Kothapalli D, Fuki I, Ali K, Stewart SA, Zhao L, Yahil R, Kwiatkowski D, Hawthorne EA, FitzGerald GA, Phillips MC, Lund-Katz S, Pure E, Rader DJ, Assoian RK 2004 Antimitogenic effects of HDL and APOE mediated by Cox-2-dependent IP activation. *J Clin Invest* 113:609-618
44. Tanaka J, Acosta TJ, Berisha B, Tetsuka M, Matsui M, Kobayashi S, Schams D, Miyamoto A 2004 Relative changes in mRNA expression of angiopoietins and receptors tie in bovine corpus luteum during estrous cycle and prostaglandin F2alpha-induced luteolysis: a possible mechanism for the initiation of luteal regression. *J Reprod Dev* 50:619-626
45. Diaz FJ, Wiltbank MC 2005 Acquisition of luteolytic capacity involves differential regulation by prostaglandin F2alpha of genes involved in progesterone biosynthesis in the porcine corpus luteum. *Domest Anim Endocrinol* 28:172-189
46. Olofsson J, Selstam G 1988 Changes in corpus luteum content of prostaglandin F2 alpha and E in the adult pseudopregnant rat. *Prostaglandins* 35:31-40
47. Michimata T, Tsuda H, Sakai M, Fujimura M, Nagata K, Nakamura M, Saito S 2002 Accumulation of CRTH2-positive T-helper 2 and T-cytotoxic 2 cells at implantation sites of human decidua in a prostaglandin D(2)-mediated manner. *Mol Hum Reprod* 8:181-187

48. Shooner C, Caron PL, Frechette-Frigon G, Leblanc V, Dery MC, Asselin E 2005 TGF-beta expression during rat pregnancy and activity on decidual cell survival. *Reprod Biol Endocrinol* 3:20
49. Chen KH, Hsu WM, Chiang CC, Li YS 2003 Transforming growth factor-beta2 inhibition of corneal endothelial proliferation mediated by prostaglandin. *Curr Eye Res* 26:363-370
50. Bradbury DA, Newton R, Zhu YM, Stocks J, Corbett L, Holland ED, Pang LH, Knox AJ 2002 Effect of bradykinin, TGF-beta1, IL-1beta, and hypoxia on COX-2 expression in pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283:L717-L725
51. Ishida A, Fujita N, Kitazawa R, Tsuruo T 2002 Transforming growth factor-beta induces expression of receptor activator of NF-kappa B ligand in vascular endothelial cells derived from bone. *J Biol Chem* 277:26217-26224
52. Fong CY, Pang L, Holland E, Knox AJ 2000 TGF-beta1 stimulates IL-8 release, COX-2 expression, and PGE(2) release in human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279:L201-L207

FIGURE LEGEND

Figure 1: PGDS and PGIS expression in the female rat endometrium during estrous cycle. Total endometrial proteins were collected from polyoestrus cycling rats at each stage of the estrous cycle (diestrus, proestrus, estrus and metestrus). Western blots analysis of PGIS (A) and PGDS (B) (one representative blot). Histograms show densitometric analysis of PGIS and PGDS proteins normalized to β -actin (42 kDa), which was used as an internal control for protein loading. Data represent the mean $\pm$ SEM of four independent experiments (four different rats).

Figure 2: PGIS expression in the female rat endometrium during pregnancy. Total endometrial proteins were collected at indicated days of pregnancy. Western blots analysis of PGIS during early and late pregnancy was performed (one representative blot presented). Histograms show densitometric analysis of PGIS protein normalized to β -actin (42 kDa), which was used as an internal control for protein loading. Data represent the mean $\pm$ SEM of four independent experiments (four different rats). * $P < 0.05$ compared to day 6.5 (early pregnancy) and * $P < 0.05$ compared to days 8, 10, 18 and 20 (late pregnancy).

Figure 3: PGDS expression in the female rat endometrium during pregnancy. Total endometrial proteins were collected at indicated days of pregnancy. . Western blots analysis of PGDS during early and late pregnancy was performed (one representative blot presented). Histograms show densitometric analysis of PGDS protein normalized to β -actin (42 kDa), which was used as an internal control for protein loading. Data represent the mean $\pm$ SEM of four independent experiments (four different rats). * $P < 0.05$ compared to day 6.5 (early pregnancy) and * $P < 0.05$ compared to all other day (late pregnancy). # $P < 0.05$ compared to days 8 and 10.

Figure 4: PGDS and PGIS expression in the female rat endometrium during the pseudopregnancy. Total endometrial proteins were collected at days 1, 3, 5, 7 and 9 of the

induced pseudopregnancy. Western blots analysis of A) PGDS and B) PGIS (one representative blot presented). Histograms show densitometric analysis of PGDS and PGIS protein normalized to β -actin (42 kDa), which was used as internal controls for protein loading. Data represent the mean $\pm$ SEM of four independent experiments (four different rats). A) * $P < 0.05$ compared to days 1, 7 and 9. B) * $P < 0.05$ compared to days 1, 7 and 9.

Figure 5: Immunohistochemical staining was performed to localize PGDS and PGIS proteins in the rat endometrium. PGDS and PGIS immunoreactivity was detected in the pregnant endometrium. They were both localized in the epithelial cells of endometrium and their expressions were absent in the stoma. A high level of PGDS immunostaining was observed in the luminal and glandular epithelium at days 14 (DB regression) and 20 (parturition) of pregnancy. A strong staining of PGIS immunostaining in the luminal epithelium at day 14 (DB regression) of pregnancy was observed.

Figure 6: A) PGE₂, B) PGD₂, C) PGI₂, and D) PGF₂ α metabolites concentrations in serum were determined during the estrous cycle by enzyme immunoassay (EIA). Serum samples were collected from polyoestrus cycling rats at each stage of the estrous cycle (diestrus, proestrus, estrus and metestrus) and were measured using a high sensitivity enzyme immunoassay (EIA) kit obtained from Cayman Chemicals. Statistical significance was reached when $P < 0.05$; * indicates values different from all the others, while different letters indicate significant differences.

Figure 7: A) PGE₂, B) PGD₂, C) PGI₂, and D) PGF₂ α metabolites concentrations in serum were determined during pregnancy by enzyme immunoassay (EIA). Serum samples were collected from pregnant rats at indicated days of pregnancy and were measured using a high sensitivity enzyme immunoassay (EIA) kit obtained from Cayman Chemicals. A) * $P < 0.05$ compared to all other days. # $P < 0.05$ compared to day 5. B) * $P < 0.05$ compared to days 16, 18 and 20. C) * $P < 0.05$ compared to days 5 and 5.5. D) * $P < 0.05$ compared to days 6.5 and 8. # $P < 0.05$ compared to day 20.

Figure 8: A) PGE₂, B) PGD₂, C) PGI₂, and D) PGF₂ α metabolites concentrations in serum were determined during pseudopregnancy by enzyme immunoassay (EIA). Serum samples were collected from pseudopregnant rats at indicated days of pregnancy and were measured using a high sensitivity enzyme immunoassay (EIA) kit obtained from Cayman Chemicals. A) * P<0.05 compared to day 1. C) * P<0.05 compared to days 1 and 9. D) * P<0.05 compared to all other days.

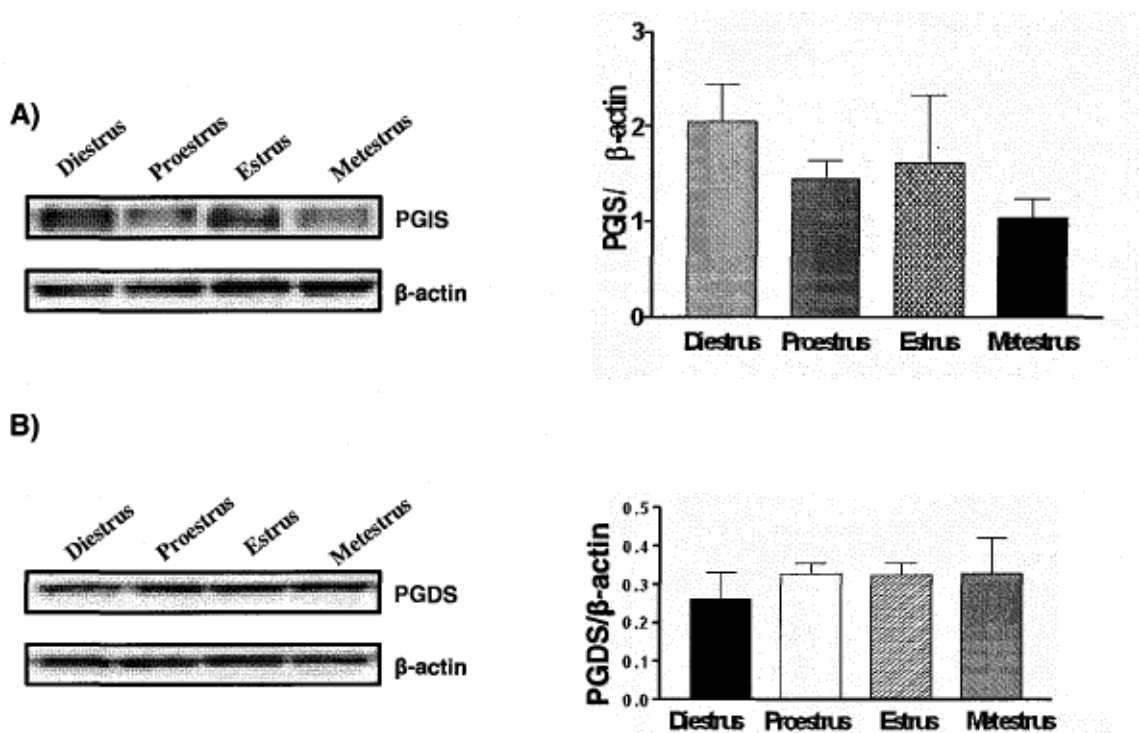


Figure 2-1: PGDS and PGIS expression in female rat endometrium during the estrous cycle. Chansi et al.

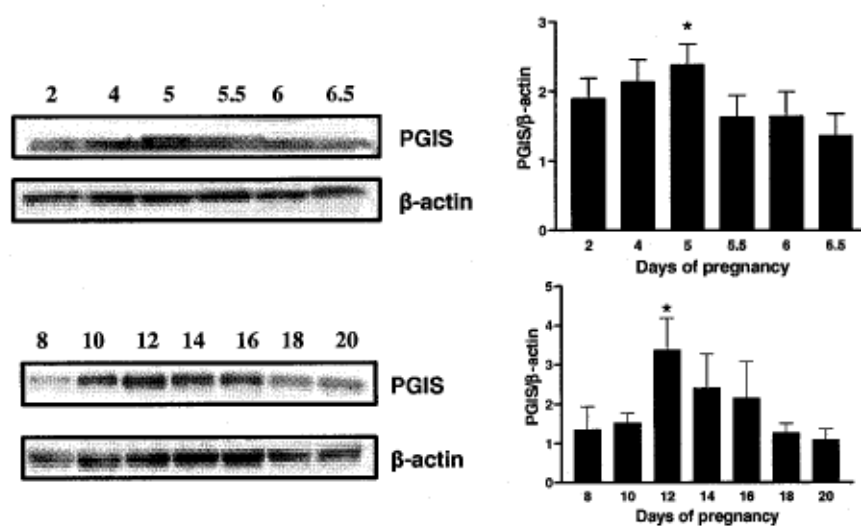


Figure 2-2: Expression of PGIS in the pregnant rat endometrium. Chansi et al.

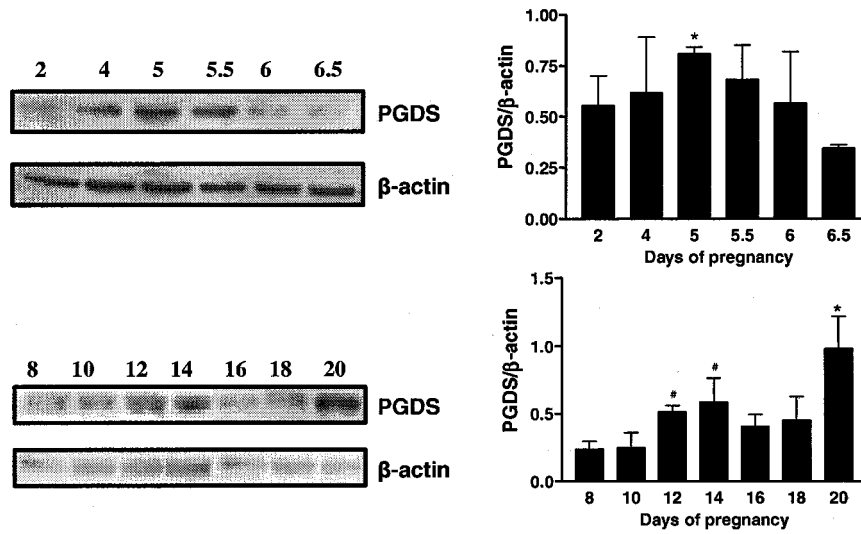


Figure 2-3: Expression of PGDS in the pregnant rat endometrium. Chansi et al.

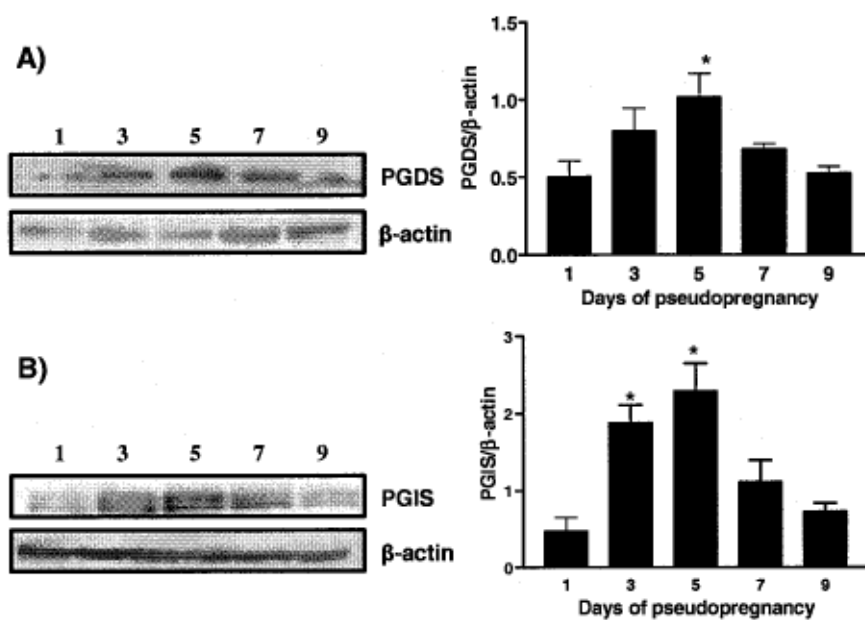


Figure 2-4: Expression of PGDS and PGIS during pseudopregnancy Chansi et al.

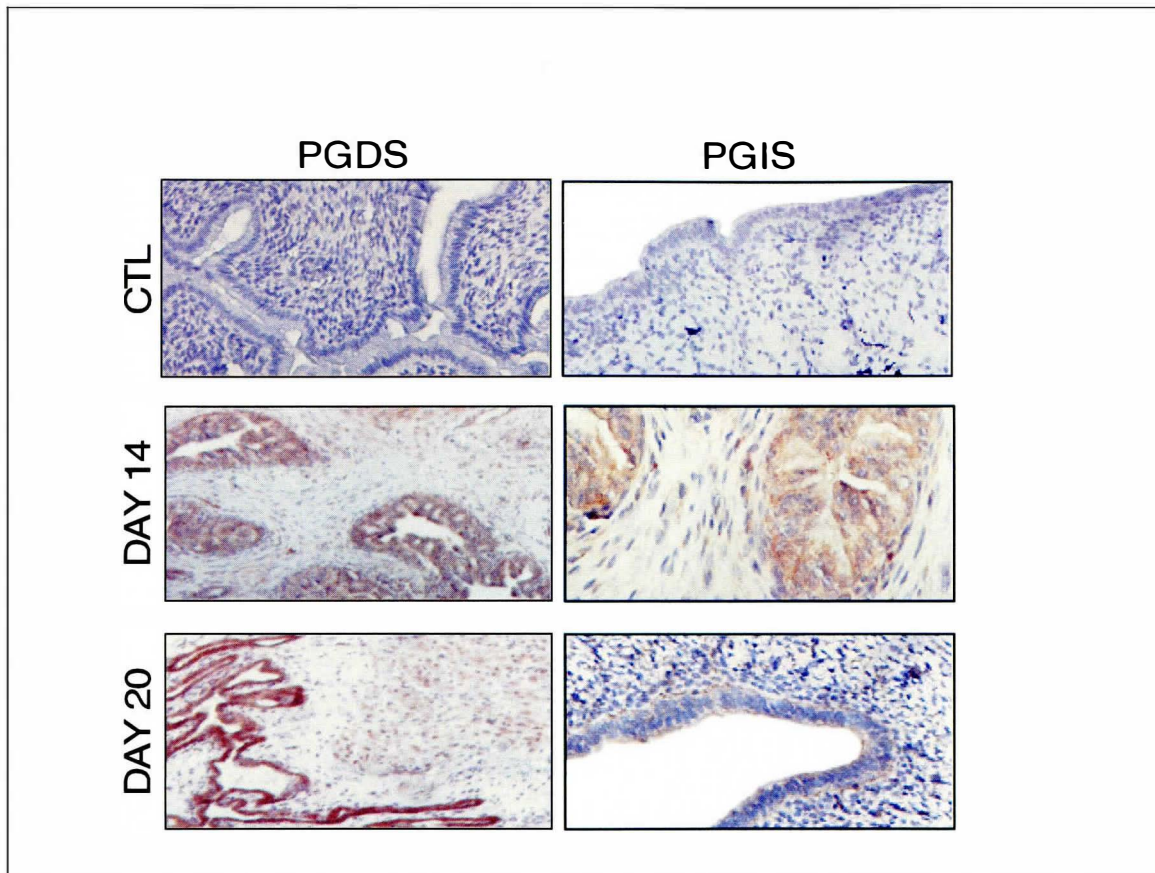


Figure 2-5: Localization of PGDS and PGIS proteins in rat endometrium by IHC.
Chansi et al.

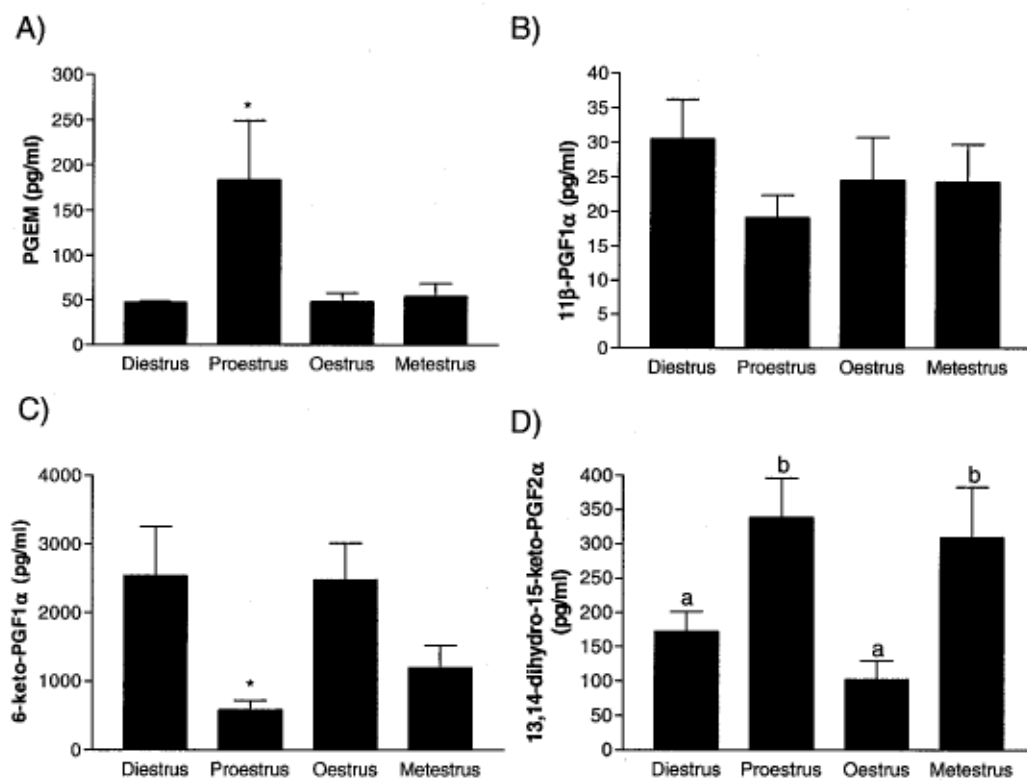


Figure 2.6: Measurement of PGE₂, PGI₂, PGD₂, and PGF₂ α metabolites during the estrous cycle by enzyme immunoassay (EIA). Chansi et al.

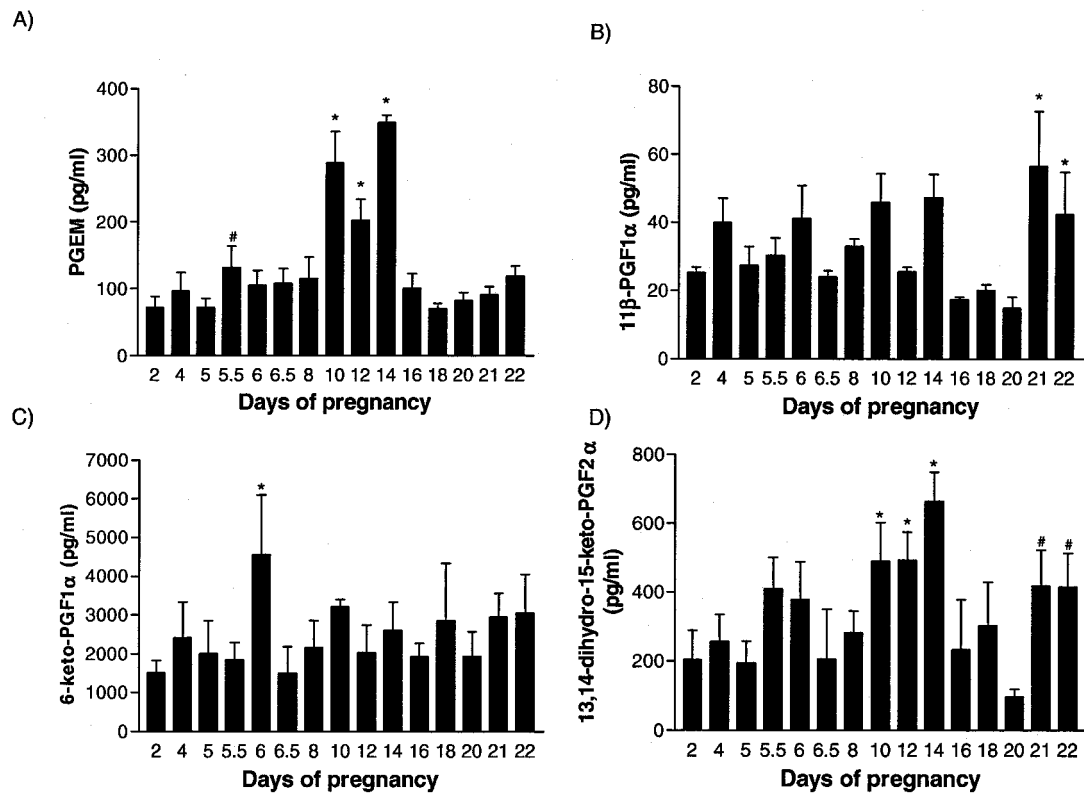


Figure 2-7: Measurement of PGE₂, PGI₂, PGD₂, and PGF₂α metabolites during the pregnancy by enzyme immunoassay (EIA). Chansi et al.

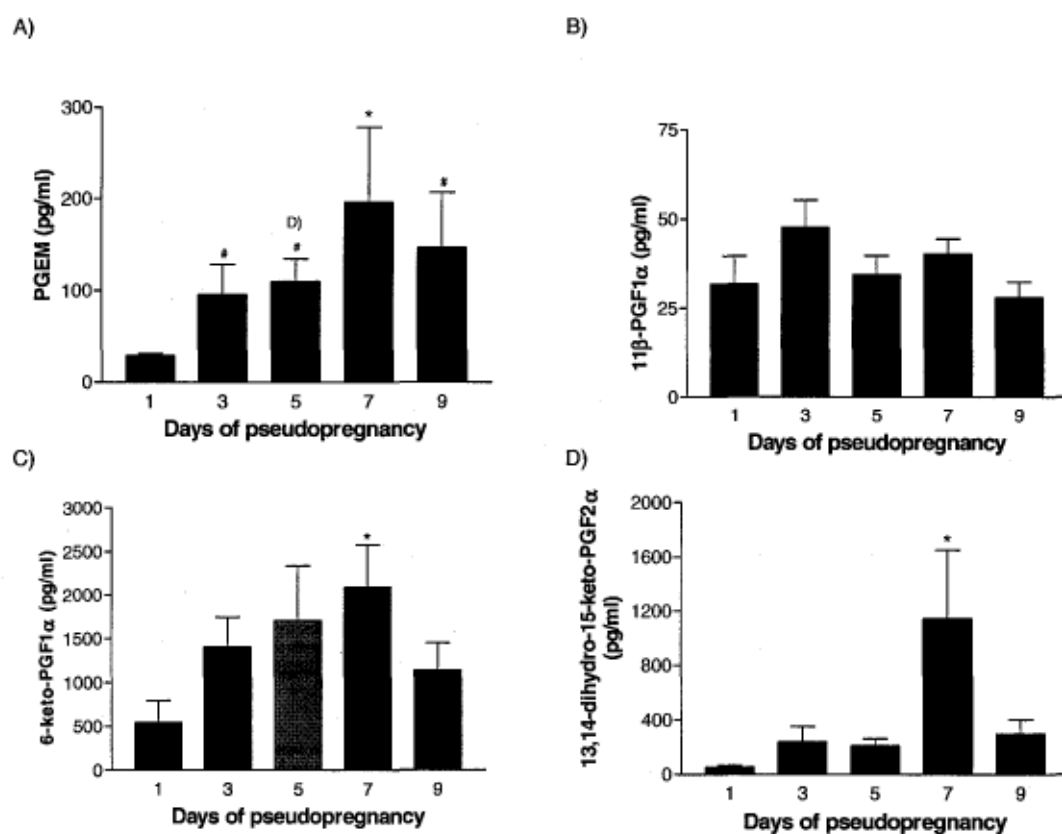


Figure 2-8: Measurement of PGE₂, PGI₂, PGD₂, and PGF₂ α metabolites during the pseudo pregnancy by enzyme immunoassay (EIA). Chansi et al.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

D'origine fœtale et/ou maternelle, plusieurs mécanismes biologiques, immunologiques et hormonaux sont nécessaires afin de créer un équilibre favorisant le développement et le maintien du fœtus.

En effet, beaucoup d'études animales supportent le rôle indispensable des prostaglandines dans l'ovulation et dans l'implantation (Matsumoto, 2001; Lim, 1999; Yang, 1997; Kennedy, 1999). Certaines études ont même suggéré leur rôle dans le transport de l'embryon et le maintien de la gestation (Paria, 1993; Davis, 1999). Mais très peu d'études ont proposé d'établir que l'implication des prostaglandines pourrait être due à la régulation de leur enzyme de synthèse. C'est pour cela que nous avons émis comme hypothèse que la PGDS et la PGIS pourraient être présente dans l'endomètre utérin et qu'elles pourraient être des régulateurs importants des fonctions utérines. Ainsi, nous avons voulu dans un premier temps démontrer leur expression dans l'endomètre chez la rate au cours du cycle oestral et pendant la gestation afin de déterminer leur implication dans les étapes clés de la gestation et pendant le cycle oestral. Comme l'expression de la PGDS et de la PGIS était régulé au cours du cycle oestral et pendant la gestation, nous avons supposé que les hormones sexuelles pourraient être impliqués dans leur régulation. Ces résultats sont les premiers qui déterminent l'expression, la localisation, et la régulation de la PGDS et de la PGIS dans l'endomètre de rat gestants, non gestant et pseudo gestant.

L'objectif de la première partie de la recherche était de vérifier l'expression de la prostaglandine D synthétase (PGDS) et la prostacycline synthétase (PGIS) dans l'endomètre de la rate pendant la gestation et le cycle oestral. Nos résultats ont démontré leur expression tout au long de la gestation et pendant le cycle oestral.

En effet, chez la rate gestante, nous avons observé que la PGDS et la PGIS étaient exprimées tous les jours de la gestation suggérant que cette production locale de la PGD2 et de la PGI2 pourrait être importante dans la régulation des fonctions endométriales. Nous avons noté que l'expression de la PGDS et de la PGIS était régulée

car leurs niveaux d'expression dépendaient du jour de la gestation. La régulation de la PGDS et de la PGIS à des périodes spécifiques de la gestation nous amène à penser que la PGDS et la PGIS sont nécessaires au contrôle de la gestation. Nous avons observé de fortes expressions de la PGDS et de la PGIS au jour 5 (implantation) au début de la gestation. Cette observation est en accord avec l'augmentation de la PGDS lors de l'implantation chez l'humain observé par Toshihiko (Toshihiko et al, 2002). La forte expression de la PGDS et de la PGIS pourrait indiquer une augmentation de la PGD2 et de la PGI2 dans l'implantation. Cette augmentation aux jours 5-6 (en début de gestation) pourrait aussi servir au recrutement des cytokines Th2 au site d'implantation afin de protéger l'embryon et le placenta d'une attaque par le système immunitaire maternel comme suggéré par Toshihiko chez l'humain (Toshihiko, 2002). En effet, les travaux de Toshihiko avaient mis en évidence une forte présence du récepteur CRTH2 de la PGD2 à l'interface foeto-maternel. Le récepteur CRTH2 est le récepteur de la PGD2 présent sur les cellules t helper de type 2. Ils ont aussi démontré que le CRTH2 permettait le recrutement des cellules t helper de type 2 au site d'implantation. Les travaux de Toshihiko ont alors suggéré que la fixation de la PGD2 au CRTH2 permet le recrutement des cellules t helper de type 2 à l'interface foeto-maternel. Ce qui confirme l'implication de la PGDS dans l'implantation embryonnaire et suggère un mode d'action pour la PGDS au niveau de l'interface foeto maternel. La PGDS et la PGIS augmentaient aussi au jour 14 (régression déciduale) et au jour 20 (parturition) à la fin de la gestation, ce qui laisse suggérer une implication de la PGD2 et de la PGI2 dans la régression déciduale. L'augmentation de la PGIS et de la PGDS lors de l'implantation, de la régression déciduale et de la parturition pourrait signifier une augmentation de la PGI2 et de la PGD2 et laisse suggérer une implication possible de la PGI2 et de la PGD2 dans les étapes clés (implantation, régression déciduale, parturition) de la gestation. Ce qui répond par la même occasion à notre hypothèse selon laquelle la PGI2 et la PGD2 seraient impliquées dans l'implantation embryonnaire, la régression déciduale et la parturition.

L'ovulation se produit pendant le cycle oestral et particulièrement en oestrus chez la ratte. Les prostaglandines sont des facteurs importants dans le mécanisme ovulatoire puisque l'utilisation d'un inhibiteur peut bloquer l'ovulation (Lim et al, 1997). Des résultats antérieurs obtenus dans notre laboratoire dans le cycle oestral (Déry et al, 2003 ;

Leblanc et al, 2003) avaient démontré que l'apoptose était maximale en oestrus et la prolifération cellulaire maximale en proestrus au cours du cycle oestral. Pendant le cycle oestral, nous avons observé une expression constante de la PGDS et une légère régulation de la PGIS pendant les différentes phases du cycle oestral (oestrus, proestrus, métestrus et diestrus). Aucune différence significative n'a été retenue. L'expression constitutive de la PGDS au cours du cycle oestral pourrait provenir de la COX 1 et servir d'enzyme de maintenance. Les travaux de Matsumo ont démontré l'implication de la PGE2 dans l'ovulation (Matsumo et al, 2001). Nos travaux démontrent que la PGDS et la PGIS ne sont pas impliquées dans la maturation folliculaire et l'ovulation chez la ratte mais sont impliquées dans la gestation.

Après avoir observé une expression locale de la PGIS et de la PGDS dans l'endomètre gestant, nous avons voulu savoir les cellules responsables de cette production. Ainsi, l'immunohistochimie nous a montré que la PGDS et la PGIS sont exprimées dans les glandes et la lumière de l'endomètre utérin de la ratte suggérant ainsi que les cellules glandulaires et lumineuses endométriales sont responsables de leur production.

Après avoir constaté que la PGDS et la PGIS étaient exprimées et régulées dans l'endomètre, nous avons voulu établir le lien entre l'expression de la PGDS et de la PGIS et celle de la PGD2 et de la PGI2, et ainsi confirmer l'activité de la PGDS et de la PGIS sur la production de la PGD2 et de la PGI2 dans l'endomètre de rat. Pour cela, les métabolites de la PGD2 et de la PGI2 (11β -PGF1 α et 6-keto-PGF1 α respectivement) ont été mesurés dans le sérum de la ratte pendant le cycle oestral, la gestation, et la pseudogestation. Nous avons également mesuré le 13,14-dihydro-15- kéto PGF2 α (métabolite de la prostaglandine F2) (PGF2) et le prostaglandine E2 métabolite (métabolite de la prostaglandine E2) (PGE2) afin qu'ils nous servent de control. Pendant le cycle oestral au métestrus, notre étude a montré une augmentation significative du métabolite de la PGF2 α . Cette augmentation confirme l'activité lutéolytique de la PGF2 α et suggère que la PGF2 α pourrait être impliqué dans la lutéolyse (régression du corps jaune) chez les rattes tels que démontré par les travaux de Olofsson et Selstam (Olofsson et Selstam, 1988). Les résultats ont également montré une augmentation

significative du métabolite de la PGE2 au proestrus. Des études récentes ont prouvé que la PGE2 induit la prolifération des cellules épithéliales de l'endomètre humain (Diaz et Wiltbank, 2005). L'augmentation significative du métabolite de la PGE2 au proestrus laisse suggérer son implication dans la prolifération des cellules endométriales peu avant l'implantation de l'embryon. En plus, des quatre métabolites dosés, seuls les métabolites de la PGE2 et de la PGF2 α montraient une forte activité en proestrus. Le proestrus correspond à la maturation folliculaire chez la ratte. Des études précédentes chez la ratte avaient montré l'implication des prostaglandines dans la rupture folliculaire en utilisant l'indométacine (inhibiteur de la cyclooxygénase 2) et un anticorps anti prostaglandine F2 α (anti-PGF2 α) (Mikuni et al, 1998 ; Armstrong et al, 1974). Nos travaux démontrent que la PGE2 et la PGF2 α pourraient être impliquées dans la maturation folliculaire. Les études de Kennedy avaient démontré le rôle de la PGE2 lors de la décidualisation (Kennedy et al ; 1988). Nous avons observé une augmentation significative du métabolite de la PGE2 aux jours 10, 12 et 14 de la gestation et une augmentation significative du métabolite de la PGF2 α au jour 14 de la gestation. Ce qui prouve que la PGE2 et la PGF2 pourrait également être impliqué dans la régression déciduale puisqu'il augmente au jour 14 de la gestation. Récemment, nous avons prouvé que les iso formes de TGF β augmentaient dans les cellules déciduales et induisaient l'apoptose des cellules décidual in vitro suggérant que le TGF-b pourrait être impliqué dans la régression déciduale (Schooner et al, 2005). Il serait intéressant de savoir si le TGF β induit l'apoptose dans les cellules déciduales en stimulant la PGE2.

La 6-kéto prostaglandine F1 α est le métabolite de la PGI2 et déterminera l'activité de la PGI2. Ainsi, nous avons constaté une activité de la PGI2 dans le cycle oestral et la gestation. De plus, en corrélation avec les résultats obtenus par Thaler (Thaler et al, 1982) nous n'avons noté aucune différence significative dans la production de 6 keto α en diestrus et en oestrus. Nous avons noté une diminution considérable de ce métabolite en proestrus chez les rattes non gestantes. Ce qui signifie que la PGI2 est faiblement dégradée et par conséquent très peu impliqué dans la phase proliférative chez les rattes non gestante. Nous avons aussi noté une diminution non significative dans l'expression de la PGIS. La baisse d'expression de la PGIS et d'activité du métabolite de

la PGI2 pourrait attribuer à la PGI2 un rôle d'inhibiteur de la prolifération cellulaire endométriale. Ce qui expliquerait que la PGI2 soit inhibée afin de favoriser la prolifération cellulaire endométriale en proestrus. Cependant des analyses supplémentaires restent à effectuer pour confirmer cette hypothèse.

Chez les rattes gestantes, nous avons remarqué comme Kenedy (Kenedy et al, 1978) que la 6-kéto prostaglandine F1 alpha était le métabolite fortement détecté dans le sérum. En effet, sa concentration tout au long de la gestation était supérieure à 1 nanogramme par millilitre tandis que les trois autres métabolites avaient des concentrations inférieures à 1 nanogramme par millilitre. Ce qui pourrait conférer à la PGI2 un rôle clé dans le maintien de la gestation. En plus, en début de la gestation, on a observé une augmentation de l'activité de la PGI2 tout au long de l'implantation. L'augmentation d'expression de la PGI2 et d'activité du métabolite de la PGI2 confirme le rôle clé de la PGI2 dans l'implantation embryonnaire. Nous avons aussi observé une augmentation d'activité du métabolite de la PGI2 tout au long de la parturition. Ce qui confirme l'implication de la PGI2 dans la parturition.

Le métabolite 11 bêta-Prostaglandine F2 est le métabolite de la PGD2. Chez les rattes gestantes, l'activité de la PGD2 augmente de façon progressive tout au long de l'implantation, lors de la régression déciduale et augmentait de façon significative au milieu de la parturition. Ce qui confirme l'implication de la PGD2 lors de l'implantation, la régression déciduale et la parturition.

Des études antérieures effectuées dans notre laboratoire (Shooner et al, 2005) ont démontré la présence d'apoptose dans l'implantation embryonnaire, la régression déciduale et la parturition. Nos études démontrent l'implication de la PGI2 et de la PGD2 dans l'implantation, la régression et la parturition. Il serait intéressant d'établir un lien entre la PGI2, la PGD2 et l'apoptose et de vérifier si la PGD2 et la PGI2 régulent l'apoptose dans l'endomètre utérin.

Après avoir observé une régulation de la PGIS et de la PGDS au cours de l'implantation embryonnaire, de la décidualisation et de la parturition, nous nous sommes demandé si cette régulation était dû aux hormones stéroïdiennes ou aux facteurs

embryonnaires. Afin de le vérifier, nous avons observé les effets des hormones sexuelles sur l'expression de la PGDS et de la PGIS pendant la pseudogestation. En effet, les fonctions reproductrices femelles sont principalement contrôlées par les hormones sexuelles ovariennes oestradiol et progestérone. L'oestradiol prépare les cellules utérines à la gestation via l'hyperplasie et l'hypertrophie cellulaire. L'ovaire étant la principale source endogène d'oestradiol et de progestérone, les rates ovariectomisées ne produisent plus d'œstrogène et de progestérone. Nous sommes alors sûr que les seules doses d'œstrogène et de progestérone endogènes sont celles que nous leur administrons lors des injections. Pendant la pseudogestation, l'activité des métabolites de la PGI₂ et de la PGE₂ augmentait avec la dose d'hormone stéroïdienne administrée tandis que celle des métabolites de la PGD₂ et de la PGF₂ α ne dépendait pas des hormones stéroïdiennes. Nous avons alors conclu que l'expression de la PGIS et de son métabolite augmentait avec la dose d'hormones stéroïdiennes administré pendant la pseudogestation. Ce qui prouve que la PGI₂ est régulé par les hormones stéroïdiennes. L'expression de la PGDS a également augmentée bien que son niveau soit faible par rapport au niveau d'expression de la PGIS. Cependant, le niveau du métabolite de la PGDS n'a pas été influencé par la pseudogestation alors que celui ci avait été influencé par la gestation. Ces résultats suggèrent que la régulation de la PGD₂ dépende de la présence d'un embryon alors que celle de la PGI₂ ne dépend pas des facteurs embryonnaires. La PGD₂ est directement régulée par les hormones stéroïdiennes.

En conclusion, ces résultats caractérisent pour la première fois l'expression de la PGDS et de la PGIS pendant le cycle oestral, la gestation et la pseudogestation. En plus, ces résultats suggèrent que la PGDS et la PGIS puissent jouer un rôle crucial dans l'implantation, la régression et la parturition. Ils suggèrent aussi que la PGI₂ est régulée par les hormones stéroïdiennes tandis que la PGD₂ est régulée par les facteurs embryonnaires. Ainsi, bien que nos objectifs aient été généralement atteints, des analyses supplémentaires seront nécessaires dans le but de déterminer plus spécifiquement, les effecteurs intracellulaires et moléculaires impliqués dans le processus d'apoptose au niveau de l'endomètre du rat.

BIBLIOGRAPHIE

Abrahamsohn PA, Zorn TM. Implantation and decidualization in rodents. *J Exp Zool.* 266:603-628 (1993).

Albert TJ, Su HC, Zimmerman PD, Iams JD, Kniss DA. Interleukin-1 beta regulates the inducible cyclooxygenase in amnion-derived WISH cells. *Prostaglandins.* 48(6):401-16 (1994).

Angel J, Berenbaum F, Le Denmat C, Nevalainen T, Masliah J, Fournier C. Interleukin-1-induced prostaglandin E2 biosynthesis in human synovial cells involves the activation of cytosolic phospholipase A2 and cyclooxygenase-2. *Eur J Biochem.* 226(1):125-31 (1994).

Armstrong DT, Grinwich DL, Moon YS, Zamecnick J. Inhibition of ovulation in rabbits by intrafollicular injection of indomethacin and PGF2 α antiserum. *Life Science* 14:129-140 (1974).

Asselin E, Wang Y, Tsang BK. X-linked inhibitor of apoptosis protein activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in rat granulosa cells during follicular development. *Endocrinology.* 142(6):2451-7 (2001).

Bazer FW. Uterine protein secretions: Relationship to development of the conceptus. *J Anim Sci.* 41:1376-1382 (1975).

Burghardt RC, Johnson GA, Jaeger LA, Ka H, Garlow JE, Spencer TE, Bazer FW. Integrins and extracellular matrix proteins at the maternal-fetal interface in domestic animals. *Cells Tissues Organs.* 172:202-217 (2002).

Brown NL, Alvi SA, Elder MG, Bennett PR, Sullivan MH. Regulation of prostaglandin production in intact fetal membranes by interleukin-1 and its receptor antagonist. *J Endocrinol.* 159(3):519-26 (1998).

Bunting S, Moncada S, Vane JR. The prostacyclin--thromboxane A₂ balance: pathophysiological and therapeutic implications. *Br Med Bull.* 39(3):271-6 (1983).

Bunting S, Gryglewski R, Moncada S, Vane JR. Arterial walls generate from prostaglandin endoperoxides a substance (prostaglandin X) which relaxes strips of mesenteric and coeliac arteries and inhibits platelet aggregation. *Prostaglandins.* 12:897-913 (1976).

Chen D, Huang Y, Zhou K. Structure, localization and characterization of lipocalin-type prostaglandin D synthase. *National Journal of andrology.* 10(2):134-8 (2004).

Coelingh Bennink HJ. Are all estrogens the same? *Maturitas.* Apr 15; 47(4):269-75 (2004).

Richards JS. Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Physiol Rev.* 60:51-89 (1980).

Coleman RA, Smith WL, Narumiya S. International union of pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev.* 46:205-229 (1994).

Coleman RA, Grix SP, Head SA, Louttit JB, Mallett A, Sheldrick RL. A novel inhibitory prostanoid receptor in piglet saphenous vein. *Prostaglandins.* 47:151-168 (1994).

Coleman RA, Kenedy I, Humphrey PPA, Bunce K, Lumley P. Prostanoids and their receptors. In: Emmett JC (ed). *Comprehensive Medicinal Chemistry. Membranes and Receptors.* Pergamon, Oxford:643-671 (1990).

Crankshaw DJ, Gaspar V. Effects of prostanoids on the rat's myometrium in vitro during pregnancy. *Biol Reprod* 46:392-400 (1992).

Dai D, Ogle TF: Progesterone regulation of epidermal growth factor receptor in rat decidua basalis during pregnancy. *Biol Reprod* 61:326-332 (1999).

Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME. Akt phosphorylation of BAD couple's survival signals to the cell-intrinsic death machinery Cell. 91:231–241 (1997).

Datta S R, Anne Brunet, and Michael E. Greenberg Cellular survival: a play in three Akts. Vol. 13, 22:2905-2927, (1999).

Del PL, Gonzalez-Garcia M, Page C, Herrera R, Nunez G Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. Science .278:687–689 (1997).

Dennis, E.A. Regulation of eicosanoid production: role of phospholipases and inhibitors. Biotechnology 5:1294-1300 (1987).

Dery MC, Leblanc V, Shooner C, Asselin E. Regulation of Akt expression and phosphorylation by 17beta-estradiol in the rat uterus during estrous cycle. Reprod Biol Endocrinol. 1:47 (2003).

DeWitt DL, Meade EA. Serum and glucocorticoid regulation of gene transcription and expression of the prostaglandin H synthase-1 and prostaglandin H synthase-2 isozymes. Arch Biochem Biophys., 306:94-102 (1993).

DeWitt D. L and W. L Smith. Purification of prostacyclin synthase from bovine aorta by immunoaffinity chromatography: evidence that the enzyme is a hemoprotein. J. Biol. Chem. 258:3285-3293 (1983).

Dey SK, Lim H, Das SK, Reese J, Paria BC, Daikoku T, and Wang H. Molecular cues to implantation. Endocr Rev. 25:341-373 (2004).

Diaz FJ, Wiltbank MC. Acquisition of luteolytic capacity involves differential regulation by prostaglandin F2alpha of genes involved in progesterone biosynthesis in the porcine corpus luteum. Domest Anim Endocrinol. 28:172-189 (2005).

Direnzo J.M. Soderstrom, R. Kurokawa, M. Ogliastro, M. Ricote, S. Ingrey, A. Horlein, M.G. Rosenfeld, and C.K. Glass. Peroxisome proliferator-activated receptors and retinoic acid receptors differentially control the interactions of retinoid X receptor

heterodimers with ligands, coactivators, and corepressors. *Mol. Cell. Biol.* 17: 2166-2176 (1997).

Evelt GE, Xie W, Chipman JG, Robertson DL, Simmons DL. Prostaglandin G/H synthase isoenzyme 2 expression in fibroblasts: regulation by dexamethasone, mitogens, and oncogenes. *Arch Biochem Biophys.* 306:169-177 (1993).

Enders AC, Schlafke S, Hendrickx AG. Differentiation of the embryonic disc, amnion, and yolk sac in the rhesus monkey. *Am J Anat.* 177:161-185 (1986).

Enders AC, Schlafke S. Cytological aspects of trophoblast-uterine interaction in early implantation. *Am J Anat.* 125:1-29 (1969).

Enders AC. Trophoblast-uterine interactions in the first days of implantation: models for the study of implantation events in the human. *Semin Reprod Med.* 18:255-263 (2000).

Enders AC, Schlafke S. Penetration of the uterine epithelium during implantation in the rabbit. *Am J Anat.* 132:219-230 (1971).

Forman B.M., P. Tontonoz, J. Chen, R.P. Brun, B.M. Spiegelman, and R.M. Evans. 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J_2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR γ . *Cell* 83: 803-812 (1995).

Forman B.M., J. Chen and R.M. Evans. Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors α and δ . *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 4312-4317 (1997).

Freeman ME, Smith MS, Nazian SJ, Neill JD. Ovarian and hypothalamic control of the daily surges of prolactin secretion during pseudopregnancy. *Endocrinology* 94: 875-882 (1994).

Gao CY, Zelenka PS. Cyclins, cyclin-dependent kinases and differentiation. *Bioessays* 19:307-315 (1997).

Gary S. Stein, Arthur B. Pardee *Cell Cycle and Growth Control*. May, (2004).

Geisert RD, Yelich JV: Regulation of conceptus development and attachment in pigs. *J Reprod Fertil Suppl.* 52:133-149 (1997).

Giannoulas D, Alfaidy N, Holloway AC, Gibb W, Sun M, Lye SJ, Challis JR. Expression of prostaglandin I (2) synthase, but not prostaglandin E synthase, changes in myometrium of women at term pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 87:5274-5282 (2002).

Gills, Alan P. Kozikowski and Phillip A. Dennis. Preferential Inhibition of Akt and Killing of Akt-Dependent Cancer Cells by Rationally Designed Phosphatidylinositol Ether Lipid Analogues. *Cancer Res.* 64(8):2782-92 (2004).

Gray CA, Bartol FF, Tarleton BJ, Wiley AA, Johnson GA, Bazer FW, Spencer TE: Developmental biology of uterine glands. *Biol Reprod.* 65:1311-1323 (2001).

Guo Y, Guo KJ, Huang L, Tong XG, Li X. Effect of estrogen deprivation on follicle/oocyte maturation and embryo development in mice. *Chin Med J (Engl).* 117(4):498-502 (2004).

Habenicht, A.J.R., P.Salbach, M.Goerig. The LDL receptor pathway delivers arachidonic acid for eicosanoid formation in cells stimulated by platelet derived growth factor. *Nature Lond.* 345:634-636 (1990).

Hatae T, Wada M, Yokoyama C, Shimonishi M, Tanabe T. Prostacyclin-dependent apoptosis mediated by PPAR delta. *J Biol Chem.* 276(49):46260-7 (2001).

Helliwell RJ, Keelan JA, Marvin KW, Adams L, Chang MC, Anand A, Sato TA, O'Carroll S, Chaiworapongsa T, Romero RJ, Mitchell MD. Gestational age-dependent up-regulation of prostaglandin D synthase (PGDS) and production of PGDS-derived antiinflammatory prostaglandins in human placenta. *J Clin Endocrinol Metab.* 91(2):597-606 (2006).

Hirai H, Tanaka K, Yoshie O, Ogawa K, Kenmotsu K, Takamori Y, Ichimasa M, Sugamura K, Nakamura M, Takano S, Nagata K. Prostaglandin D2 selectively induces

chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2. *J Exp Med.* 193(2):255-61 (2001).

H Niiro, T Otsuka, K Izuhara, K Yamaoka, K Ohshima, T Tanabe, S Hara, Y Ishihara O, Numari H, Saitoh M, Arai Y, Takanashi H, Kitagawa H, Kinoshita K. Prostaglandin E2 production by endogenous secretion of interleukin-1 in decidual cells obtained before and after the labor. *Prostaglandins.* 52(3):199-208 (1996).

Hoffman LH, Olson GE, Carson DD, Chilton BS. Progesterone and implanting blastocysts regulate Muc1 expression in rabbit uterine epithelium. *Endocrinology.* 139:266-271 (1998).

Jabbour HN, Boddy SC. Prostaglandin E2 induces proliferation of glandular epithelial cells of the human endometrium via extracellular regulated kinase 1/2-mediated pathway. *J Clin Endocrinol Metab.* 88:4481-4487 (2003).

Kanaoka Y, Urade Y. Hematopoietic prostaglandin D synthase. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 69:163-167 (2003).

Kang HY, Lee JY, Lee JS, Choi YM. Peroxisome proliferator-activated receptors- γ activator, ciglitazone, inhibits human melanocyte growth through induction of apoptosis. *Arch Dermatol Res.* 1-5 (2006).

Kennedy TG. Embryonic signals and the initiation of blastocyst implantation. *Aust J Biol Sci.* 36:531-543 (1983).

Kennedy TG. Involvement of local mediators in blastocyst implantation: *Endocrinology of Embryo-Endometrial Interactions.* New York: Plenum Press. 183–194 (1994).

Kennedy TG, Ross HE. Effect of prostaglandin E2 on rate of decidualization in rats. *Prostaglandins.* 46:243-250 (1993).

Kennedy TG. Evidences for the involvement of prostaglandins throughout the decidual cell reaction in the rat. *Biol Reprod.* 33:140–146 (1985).

Kennedy TG, Zamecnik J. The concentration of 6-keto-prostaglandin F₁α is markedly elevated at the site of blastocyst implantation in the rat. *Prostaglandins*. 16(4): 599-605 (1978).

Knobil E, Neill JD. The physiology of reproduction. Second Edition, Volume 1, Raven Press, USA, (1994).

Kokawa K, Shikone T, Nakano R. Apoptosis in human chorionic villi and decidua during normal embryonic development and spontaneous abortion in the first trimester. *Placenta*. 19: 21-26 (1998).

Kim MR, Park DW, Lee JH, Choi DS, Hwang KJ, Ryu HS, Min CK. Progesterone-dependent release of transforming growth factor-β₁ from epithelial cells enhances the endometrial decidualization by turning on the Smad signalling in stromal cells. *Mol Hum Reprod*. 11(11):801-8 (2005).

Kliwer, S.A., K. Umenoso, D.J. Noonan, R.A. Heyman, and R.M. Evans. Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature*. 358: 771-774 (1992).

Kliwer, S.A., B.M. Forman, B. Blumberg, E.S. Ong, U. Borgmeyer, D.J. Mangelsdorf, K. Umenoso, and R.M. Evans. Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 91: 7355-7359 (1994).

Kliwer, S.A., J.M. Lenhard, T.M. Willson, I. Patel, D.C. Morris, and J.M. Lehmann. A prostaglandin J₂ metabolite binds peroxisome proliferator activated receptor-γ and promotes adipocyte differentiation. *Cell* 83: 813-819 (1995).

Kliwer S.A., S.S. Sundseth, S.A. Jones, P.J. Brown, G.B. Wisley, C.S. Koble, P. Devchand, W. Wahli, T.M. Willson, J.M. Lenhard, and J.M. Lehmann. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors α and γ. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 94: 4318-4323 (1997).

Knobil E, Neill JD. The physiology of reproduction. Second Edition, Volume 1, Raven Press, USA (1994).

Kraemer SA, Meade EA, DeWitt DL. Prostaglandin endoperoxide synthase gene structure: identification of the transcriptional start site and 5'-flanking regulatory sequences. *Arch Biochem Biophys*. 293:391-400 (1992).

Kumagai K, Otsuki Y, Ito Y, Shibata MA, Abe H, Ueki M. Apoptosis in the normal human amnion at term, independent of Bcl-2 regulation and onset of labour. *Mol. Hum. Reprod*. 7: 681-689. 611 (2001).

Kujubu DA, Herschman HR. Dexamethasone inhibits mitogen induction of the TIS10 prostaglandin synthase/cyclooxygenase gene. *J Biol Chem*. 267:7991-7994 (1992).

Kirihara N, Naganawa A, Hori T, Kawakami E, Tsutsui T. Influence of a PGF2alpha analogue, etiproston tromethamine, on the functional corpus luteum of dogs. *J Vet Med Sci*. 67:1-6 (2005).

Leblanc V, Dery MC, Shooner C, Asselin E. Opposite regulation of XIAP and Smac/DIABLO in the rat endometrium in response to 17beta-estradiol at estrus. *Reprod Biol Endocrinol*. Aug 27; 1:59 (2003).

Lei H, Furth EE, Kalluri R, Chiou T, Tilly KI, Tilly JL, Elkon KB, Jeffrey JJ, Strauss JF, III. A program of cell death and extracellular matrix degradation is activated in the amnion before the onset of labor. *J. Clin. Invest*. 98: 1971-1978.608 (1996).

Levasseur MC, Thibault C. La reproduction chez les mammifères et l'homme. 2e Édition, Ellipses Edition Marketing SA, Paris, France (2001).

Lim, H., B.C. Paria, S.K. Das, J.E. Dinchuk, R. Langenbach, J.M. Trzaskos, and S.K. Dey. Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase-2 deficient mice. *Cell* 91: 197-208 (1997).

Lim, H, Rajnish A. Gupta, Wen-ge Ma, B.C. Paria, D.E. Moller, J.D. Morrow, R.N. DuBois, J.M. Trzaskos, and S.K. Dey Cyclo-oxygenase-2-derived prostacyclin mediates

embryo implantation in the mouse via PPAR δ . Vol. 13, No. 12, pp. 1561-1574, June 15, (1999).

Lim H., S. K. Dey. Prostaglandin E₂ Receptor Subtype EP₂ Gene Expression in the Mouse Uterus Coincides with Differentiation of the Luminal Epithelium for Implantation. *Endocrinology*. 11: 4599-4606 (1997).

Lim, H., B.C. Paria, S.K. Das, J.E. Dinchuk, R. Langenbach, J.M. Trzaskos, and S.K. Dey. Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase-2 deficient mice. *Cell* 91: 197-208 (1997).

Liou JY, Shyue SK, Tsai MJ, Chung CL, Chu KY, Wu KK. Colocalization of prostacyclin synthase with prostaglandin H synthase-1 (PGHS-1) but not phorbol ester-induced PGHS-2 in cultured endothelial cells. *J Biol Chem*. 275(20):15314-20 (2000).

Loudon JA, Groom KM, Bennett PR. Prostaglandin inhibitors in preterm labour. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. Oct; 17(5):731-44 (2003).

Ma XH, Hu SJ, Ni H, Zhao YC, Tian Z, Liu JL, Ren G, Liang XH, Yu H, Wan P, Yang ZM. Serial analysis of differential gene expression in mouse uterus at implantation site. *J Biol Chem*. 281(14):9351-60 (2006).

Mangelsdorf, D.J., U. Borgmeyer, R.A. Heyman, J.Y. Zhou, E.S. Ong, A. Kakizuka, and R.M. Evans. Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis-retinoic acid. *Genes & Dev*. 6: 329-344 (1992).

Mann PE, Babb JA. Neural steroid hormone receptor gene expression in pregnant rats. *Brain Res Mol Brain Res*. 142(1):39-46 (2005).

Marieb EN. *Anatomie et Physiologie Humaine*. 2e Édition française, Edition Erpi (1999).

Mesiano S. Roles of estrogen and progesterone in human parturition. *Front Horm Res*. 27:86-104 (2001).

- Michimata T, Tsuda H, Sakai M, Fujimura M, Nagata K, Nakamura M, Saito S: Accumulation of CRTH2-positive T-helper 2 and T-cytotoxic 2 cells at implantation sites of human decidua in a prostaglandin D(2)-mediated manner. *Mol Hum Reprod.* 8:181-187 (2002).
- Mikuni M, Pall M, Peterson CM, Peterson CA, Hellberg P, Brannstrom M, Richards JS and Hedin L. The selective prostaglandin endoperoxide synthase-2 inhibitor, NS-398, reduces prostaglandin production and ovulation in vivo and in vitro in the rat. *Biology of Reproduction* 59:1077-1083 (1998).
- Mitchell MD, Edwin SS, Silver RM, Romero RJ. Potential agonist action of the interleukin-1 receptor antagonist protein: implications for treatment of women. *J Clin Endocrinol Metab.* 76(5):1386-8 (1993).
- Mitchell MD, Romero RJ, Edwin SS, Trautman MS. Prostaglandins and parturition. *Reprod Fertil Dev.* 7(3):623-32 (1995).
- Moncada, S., A. G. Herman, E. A. Higgs, and J. R. Vane. Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI₂) by layers of the arterial wall: an explanation for the anti-thrombotic properties of vascular endothelium. *Thromb. Res.* 11:323-344 (1977).
- Morita I , Melvin Schindler , Martha K. Regier , James C. Otto , Takamitsu Hori , David L. DeWitt , William L. Smith. Different Intracellular Locations for Prostaglandin Endoperoxide H Synthase-1 and -2 .the American Society for Biochemistry and Molecular Biology Volume 270, Number 18, Issue of May 5, pp. 10902-10908, 1995
- Mu J, Kanzaki T, Tomimatsu T, Fukuda H, Wasada K, Fujii E, Endoh M, Kozuki M, Murata Y, Sugimoto Y, Ichikawa A. Expression of apoptosis in placentae from mice lacking the prostaglandin F receptor. *Placenta* 23: 215-223. 599 (2002).
- Muerhoff A.S., K.J. Griffin, and E.F. Johnson. The peroxisomal proliferator-activated receptor mediates the induction of CYP4A6, a cytochrome P450 fatty acid α -hydroxylase, by clofibrilic acid. *J. Biol. Chem.* 267: 19051-19053 (1992).

Murata, T., F. Ushikubi, T. Matsuoka, M. Hirata, A. Yamasaki, Y. Sugimoto, A. Ichikawa, Y. Aze, T. Tanaka, N. Yoshida, A. Ueno, S. Oh-ishi, and S. Narumiya. Altered pain perception and inflammatory response in mice lacking prostacyclin receptor. *Nature*. 388: 678-682 (1997).

Murohara, T., J. Horowitz, M. Silver, Y. Tsurumi, D. Chen, A. Sullivan, and J. Isner. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor enhances vascular permeability via nitric oxide and prostacyclin. *Circulation* 97: 99-107 (1998).

Naomi Eguchi, Toshiaki Minami Naoki Shirafuji, Yoshihide Kanaoka, Takashi Tanaka, Akihisa Nagata, Nobuaki Yoshida, Yoshihiro Urade, Seiji Ito, and Osamu Hayaishi. Lack of tactile pain (allodynia) in lipocalin-type prostaglandin D synthase-deficient mice. Vol. 96, Issue 2, 726-730 (1999).

Narumiya, S., Sugimoto, Y., & Ushikubi, F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol. Rev.* 79, 1193–1226 (1999).

Neale DM, Mor G. The role of Fas mediated apoptosis in preeclampsia. *J Perinat Med*. 33(6):471-7 (2005).

Negishi M, Sugimoto Y, Ichikawa A. Molecular mechanisms of diverse actions of prostanoid receptors. *Biochim Biophys Acta*.1259(1):109-19 (1995).

Nigg EA. Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays* 17:471–480 (1995).

Olofsson J, Selstam G. Changes in corpus luteum content of prostaglandin F2 alpha and E in the adult pseudopregnant rat. *Prostaglandins*. 35:31-40 (1988).

Olson DM. The role of prostaglandins in the initiation of parturition. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*.17 (5):717-30 (2003).

Omini C, Moncada S, Vane JR. The effects of prostacyclin (PGI₂) on tissues which detect prostaglandins (PG'S). *Prostaglandins*. 14(4):625-32 (1977).

O'Neill GP, Ford-Hutchinson AW. Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human tissues. *FEBS Lett.* 330:156-160 (1993).

Parent J, Chapdelaine P, Sirois J, Fortier MA. Expression of microsomal prostaglandin E synthase in bovine endometrium: coexpression with cyclooxygenase type 2 and regulation by interferon-tau. *Endocrinology.* 143(8):2936-43 (2002).

Parr EL, Tung HN, Parr MB. Apoptosis as the mode of uterine epithelial cell death during embryo implantation in mice and rats. *Biol Reprod.* 36(1):211-25 (1987).

Parrish JJ (9 juin 2000) "Animal Science 434 – reproductive physiology", University Wisconsin-Madison URL: www.wisc.edu/ansci_repro.

Poyser NL. The control of prostaglandin production by the endometrium in relation to luteolysis and menstruation. *Prostaglandins Leukotrienes Essent Fatty Acids.* 53:147–195 (1995).

Premyslova M, Li W, Alfaidy N, Bocking AD, Campbell K, Gibb W, Challis JR. Differential expression and regulation of microsomal prostaglandin E(2) synthase in human fetal membranes and placenta with infection and in cultured trophoblast cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 88(12):6040-7 (2003).

Psychoyos A. Endocrine control of egg implantation. American Physiological Society, Washington DC. 187–215 (1973).

Rankin JC, Ledford BE, Jonsson HT, Jr., Baggett B: Prostaglandins, indomethacin and the decidual cell reaction in the mouse uterus. *Biol Reprod* 1979, 20:399-404.

Rolin S, Masereel B, Dogne JM. Prostanoids as pharmacological targets in COPD and asthma. *Eur J Pharmacol.* Feb 1 (2006).

Saito S, Tsuda H, Michimata T. Prostaglandin D2 and reproduction. *Am J Reprod Immunol.* 47:295-302 (2002).

Sales KJ, Milne SA, Williams AR, Anderson RA, Jabbour HN. Expression, localization, and signaling of prostaglandin F2 alpha receptor in human endometrial adenocarcinoma: regulation of proliferation by activation of the epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *J Clin Endocrinol Metab.* 89(2):986-93 (2004).

Sandow BA, West NB, Norman RL, Brenner RM: Hormonal control of apoptosis in hamster uterine luminal epithelium. *Am J Anat.* 156:15-35 (1979).

Shooner C, Caron PL, Frechette-Frigon G, Leblanc V, Dery MC, Asselin E. TGF-beta expression during rat pregnancy and activity on decidual cell survival. *Reprod Biol Endocrinol.* May 31; 3(1):20 (2005).

Shiki Y, Shimoya K, Tokugawa Y, Kimura T, Koyama M, Azuma C, Murata Y, Eguchi N, Oda H, Urade Y. Changes of lipocalin-type prostaglandin D synthase level during pregnancy. *J Obstet Gynaecol Res.* 30(1):65-70 (2004).

Shynlova O, Oldenhof A, Dorogin A, Xu Q, Mu J, Nashman N, Lye SJ. Myometrial Apoptosis: Activation of the Caspase Cascade in the Pregnant Rat Myometrium at Midgestation. *Biol Reprod.* 74(5):839-49 (2006).

Simmons DG, Kennedy TG. Induction of glucose-regulated protein 78 in rat uterine glandular epithelium during uterine sensitization for the decidual cell reaction. *Biol Reprod.* 62(5):1168-76 (2000).

Simmons DL, Xie W, Chipman JG, Evett GE. Prostaglandins, Leukotrienes, Lipoxins, and PAF. In: Bailey JM (Ed). Plenum Publishing Corp., New York: 67-78 (1991).

Smith, E.M., Austin, S.C., Reilly, M.P., & Fitz Gerald, G.A. Internalization and sequestration of the human prostacyclin receptor. *J. Biol. Chem.* 275, 32037-32045 (2000).

Smith SC, Baker PN, Symonds EM. Placental apoptosis in normal human pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 177: 57-65 (1997).

Smith, W.L. Prostaglandins biosynthesis and its compartmentation in vascular smooth muscle and endothelial cells. *Annu. Rev. Physiol.* 48:251-262 (1986).

Smith, W.L. The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action. *Biochem. J.* 259 :315-324 (1989)

Smith MS, Freeman ME, Neill JD: The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology.* 96:219-26 (1975).

Smith, W.L., L.J. Marnett, and D.L. DeWitt. Prostaglandin and thromboxane biosynthesis. *Pharmacol. Ther.* 49 :153-179 (1991).

Spencer, A.G., J.W. Woods, T. Arakawa, I.I. Singer, and W.L. Smith. Subcellular localization of prostaglandin endoperoxide synthase-1 and -2 by immunoelectron microscopy. *J. Biol. Chem.* 273: 9886-9893 (1998).

Sun T, Li SJ, Diao HL, Teng CB, Wang HB, Yang ZM. Cyclooxygenases and prostaglandin E synthases in the endometrium of the rhesus monkey during the menstrual cycle. *Reproduction.* Apr;127(4):465-73 (2004).

Tamada H, Sakaguchi H, Inaba T, Kawate N, Sawada T. The effect of transforming growth factor- α on the progression of decidualization in rats. *Life Sci.* 69(13):1549-58 (2001).

Tanabe T, Ullrich V: Prostacyclin and thromboxane synthases. *J Lipid Mediat Cell Signal* 12:243-255 (1995).

Tanaka J, Acosta TJ, Berisha B, Tetsuka M, Matsui M, Kobayashi S, Schams D, Miyamoto A. Relative changes in mRNA expression of angiopoietins and receptors tie in bovine corpus luteum during estrous cycle and prostaglandin F $_{2\alpha}$ -induced luteolysis: a possible mechanism for the initiation of luteal regression. *J Reprod Dev.* 50:619-626 (2004).

Tanikawa M, Acosta TJ, Fukui T, Murakami S, Korzekwa A, Skarzynski DJ, Piotrowska KK, Park CK, Okuda K. Regulation of prostaglandin synthesis by interleukin-1 α in bovine endometrium during the estrous cycle. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 78(1-4):279-90 (2005).

Tawfik OW, Sagrillo C, Johnson DC, Dey SK. Decidualization in the rat: role of leukotrienes and prostaglandins. *Prostaglandins Leukotr Med.* 29:221-227 (1987).

Thaler-Dao H, Saintot M, Ramonatxo M, Chavis C, de Paulet AC. Prostaglandin biosynthesis by the rat uterus during the oestrus cycle, temporal correlation with plasma oestradiol and progesterone concentrations, identification of 6 keto PGF 1α as the major metabolite. *Prostaglandins.* 23(3):347-59 (1982).

Thornberry NA. The caspase family of cysteine proteases. *Br. Med. Bull.* 53:478-490. (1997).

Tone Y, Inoue H, Hara S, Yokoyama C, Hatae T, Oida H, Narumiya S, Shigemoto R, ukawa S, Tanabe T. The regional distribution and cellular localization of mRNA encoding rat prostacyclin synthase. *Eur J Cell Biol. Mar;* 72(3):268-77 (1997).

Toshihiko Michimata, Hiroshi Tsuda, Masatoshi Sakai, Masaki Fujimura, Kinya Nagata, Masataka Nakamura and Shigeru Saito. Accumulation of CRTH2-positive T-helper 2 and T-cytotoxic 2 cells at implantation sites of human decidua in a prostaglandin D $_2$ -mediated manner. *Molecular Human Reproduction.* Vol. 8, No. 2, 181-187 (2002).

Tsuchida T, Eguchi N, Eguchi Y, Numabe A, Nakajima H, Oda H, Seiki K, Hakamada-Taguchi R, Urade Y, Uehara Y. Lipocalin-type prostaglandin d synthase in urine in adriamycin-induced nephropathy of mice. *Nephron Physiol.* 96(2):P42-51 (2004).

Urade Y, Eguchi N. Lipocalin-type and hematopoietic prostaglandin D synthases as a novel example of functional convergence. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69:375-382 (2002).

- Vane JR, Botting RM. Pharmacodynamic profile of prostacyclin. *Am J Cardiol.* 75(3):3A-10A (1995).
- Von Euler. On the specific vasodilating and plain muscle stimulating substances from accessory genital glands in man and in certain animal. *Journal of physiology.* 88: 213-234 (1939).
- Wang H, Dey SK. Lipid signaling in embryo implantation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 77 (1-4):84-102 (2005).
- Waynforth HB, Flecknell PA. Experimental and surgical technique in the rat. Second Edition, Academic Press, London, Angleterre (1992).
- Wheeler-Jones, C., R. Abu-Ghazaleh, R. Cospedal, R.A. Houliston, J. Martin, and I. Zachary. Vascular endothelial growth factor stimulates prostacyclin production and activation of cytosolic phospholipase A2 in endothelial cells via p42/p44 mitogen-activated protein kinase. *FEBS Letts.* 420: 28-32 (1997).
- Williams CS, DuBois RN. Prostaglandin endoperoxide synthase: why two isoforms? *Am J Physiol.* 270:G393-G400 (1996).
- William L.Smith. Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action. *Am. J.Physiol.* 263 (Renal fluid electrolyte Physiol.32): F181-F191 (1992).
- Xie WL, Chipman JG, Robertson DL, Erikson RL, Simmons DL. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88:2692-2696 (1991).
- Ye X, Hama K, Contos JJ, Anliker B, Inoue A, Skinner MK, Suzuki H, Amano T, Kennedy G, Arai H, Aoki J, Chun J. LPA3-mediated lysophosphatidic acid signalling in embryo implantation and spacing. *Nature.* 435(7038):104-8 (2005).
- Zakar T, Hertelendy F. Regulation of prostaglandin synthesis in the human uterus. *J Matern Fetal Med.* 10(4):223-35 (2001).

Zakar T, Olson DM, Teixeira FJ, Hirst JJ. Regulation of prostaglandin endoperoxide H2 synthase in term human gestational tissues. *Acta Physiol Hung.*; 84(2):109-18 (1996).

Zhang X, Shu MA, Ross HE, and Kennedy TG: Regulation of plasminogen activator in rat endometrial stromal cells: the role of prostaglandin E2. *Biol Reprod.* 54:1046-1051 (1996).

Zhou, G., R. Cummings, Y. Li, S. Mitra, H.A. Wilkinson, A. Elbrecht, J.D. Hermes, J.M. Schaeffer, R.G. Smith, and D.E. Moller. Nuclear receptors have distinct affinities for coactivators: Characterization by fluorescence resonance energy transfer. *Mol. Endocrinol.* 12: 1594-1604 (1998).