

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

RÉGULATION DE AKT, DE LA KÉRATINE 18 ET DE FOXA2 DANS  
LES UTÉRUS DES SOURIS ISOFORMES KO CONDITIONNELLES  
À AKT DURANT LE CYCLE CESTRAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ  
COMME EXIGENCE PARTIELLE DE LA  
MAÎTRISE EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE

PAR  
NICOLAS THIBODEAU

MAI 2023

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

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

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, cette thèse ou cet essai. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire, de cette thèse et de son essai requiert son autorisation.

## REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier mes collègues de laboratoire qui m'ont aidé à résoudre de nombreux problèmes de « troubleshooting » encourus tout au long de mon parcours ainsi que leurs nombreux conseils qui m'ont permis de faciliter mon travail de recherche et d'écriture. Je voudrais aussi remercier mon directeur de recherche et ma codirectrice de recherche qui m'ont guidé tout au long de mon travail et qui m'ont permis d'avoir un mémoire et un article exceptionnel.

## RÉSUMÉ

La protéine kinase B (Akt ; qui est représenté par trois isoformes (AKT 1, AKT 2 & AKT 3)) est essentielle à la croissance et à la gestion des fonctions de base de l'utérus. L'objectif de cette étude est d'élargir et consolider nos connaissances des fonctions des différentes isoformes d'Akt dans les glandes utérines. Dans ce but, les effets de l'inhibition (Knock out) des isoformes d'Akt sur les protéines effectrices (p-Akt, K18 et FOXA2) spécifiques au développement et au maintien des glandes utérines ont été étudiés. Des souris « knock-out » simples ou doubles pour les trois isoformes d'Akt ont été générées et les quatre phases du cycle œstral étudiées. Des analyses par immunohistochimie ont été réalisées sur des utérus murins pour la détection des protéines p-Akt, K18 et FOXA2. Nos résultats ont démontré qu'il y avait une diminution de la quantité de p-Akt et de K18 pour le génotype PR-Cre/Akt 2 dans les glandes utérines du cycle proestrus. Le niveau réduit de p-Akt est probablement causé par le fait que Akt 2 est l'isoforme la plus active ou la seule active dans l'utérus en proestrus. La diminution de K18 dans le génotype PR-Cre/Akt 2 serait due à une faible quantité de p-Akt en proestrus. Il y avait également une augmentation du niveau de la protéine FOXA2 dans le génotype PR-Cre/Akt 1-3 pour le cycle de diestrus. Cette augmentation pourrait être causée par le fait que normalement il y a une augmentation de la quantité de p-Akt en diestrus et faire le lien avec le rôle de l'inhibition Knockout de Akt 1 et Akt 3 simultanément. Enfin, ces résultats nous ont permis de montrer l'importance de l'isoforme 2 d'Akt dans l'activation d'Akt dans le cycle œstral. De plus, notre étude a montré que Akt 2 affecte l'expression de la kératine 18. De plus, l'importance d'Akt 1 et Akt 3 en diestrus dans le contrôle de FOXA2 (un facteur de transcription indispensable à la formation des glandes utérines) a été découverte.

Mots-clés: isoformes d'Akt, utérus, cycle œstral, FOXA2 & K18

# TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ .....	3
LISTE DES FIGURES ET TABLEAU .....	5
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES .....	6
I – INTRODUCTION .....	7
1.1 Les rôles des trois isoformes d’Akt .....	7
1.1.1 Effets de KO simple et double sur les isoformes d’Akt.....	8
1.1.2 Phénomène de compensation chez les trois isoformes d’Akt .....	11
1.1.3 Principes d’activation de la voie de signalisation PI3K/Akt .....	13
1.2 Le cycle œstral et ses liens avec les isoformes d’Akt .....	15
1.2.1 Nos modèles de souris exclusives KO conditionnelles d’Akt dans l’utérus .....	17
1.2.2 Spécificité de la souris .....	18
1.2.3 Les variations de l’expression des hormones et ses effets macro-anatomiques et micro-anatomiques sur les glandes utérines murines.....	19
1.3 Les kératines.....	24
1.3.1 Les voies de signalisation affectées les kératines 18 .....	25
1.4 FOXA2.....	27
1.5 Méthodes .....	30
1.6 Hypothèse et objectifs .....	31
II – Article scientifique .....	33
<b>Regulation of Akt, keratin 18 and FOXA2 in the uterus of KO conditional Akt isoforms mouse during the estrous cycle.....</b>	<b>33</b>
III - DISCUSSION .....	65
3.1 Les variations des quantités de p-Akt dans les glandes utérines .....	67
3.2 Les variations de K18 dans les glandes utérines.....	72
3.3 Les variations de FOXA2 dans les glandes utérines.....	74
IV - CONCLUSION .....	78
V - PERSPECTIVES .....	79
VI - RÉFÉRENCES.....	80

# LISTE DES FIGURES ET TABLEAU

FIGURE 1 : STRUCTURE SCHÉMATIQUE DES TROIS ISOFORMES D'AKT.....	7
FIGURE 2 : VOIE DE SIGNALISATION DE AKT DANS L'UTÉRUS. ....	12
FIGURE 3 : VOIE DE SIGNALISATION PI3K/AKT.....	13
FIGURE 4 : VALIDATION DES MODÈLES MURINS UNIQUES DE NOTRE LABORATOIRE.....	17
FIGURE 5: DIAGRAMME DU PROFIL HORMONAL SÉRIQUE POUR CHAQUE ÉTAPE DU CYCLE ŒSTRAL MURIN. ....	20
FIGURE 6 : PHOTOS D'UTÉRUS PRISES EN MICROSCOPIE ET EN MACROSCOPIE PENDANT LE CYCLE ŒSTRAL. ....	22
FIGURE 7: CONCLUSIONS MAJEURES DE CE MÉMOIRE.....	79
TABLEAU 1: PHÉNOTYPE DES SOURIS AKT SIMPLE ET DOUBLE KO .....	9

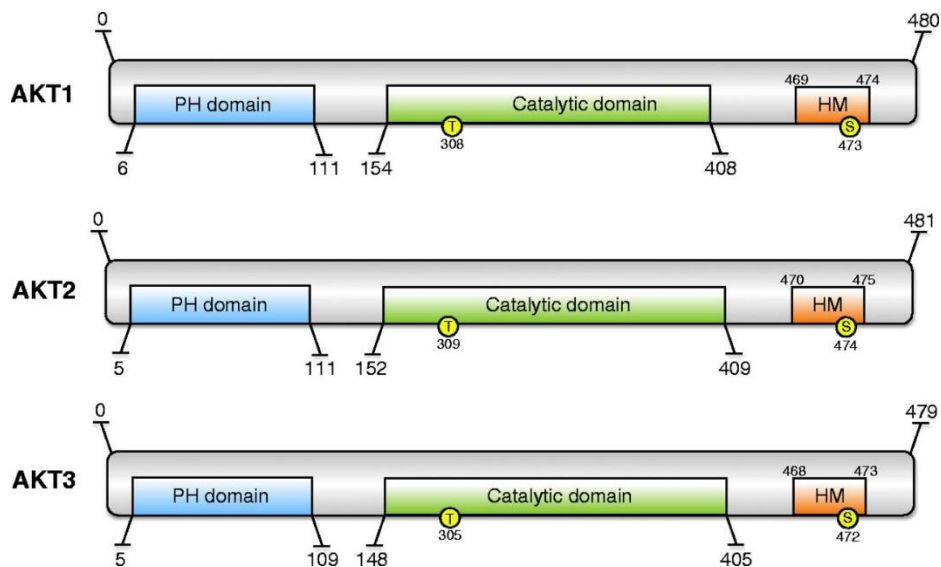
## LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

Akt	Protéine Kinase B
ANOVA	Analyse de la variance
E2	Estradiol
ERK	«Extracellular signal-regulated kinase»
FOXA2	«Forkhead box protein A2»
IHC	Immunohistochimie
IR	Récepteur à l'insuline
IRS	«Insulin receptor substrate»
K8/K18	Hétérodimère de kératines 8 et 18
KO	«Knockout»
LIF	«Leukemia inhibitory factor»
mTOR	Cible mammalienne de la rapamycine
NF- $\kappa$ B	Facteur nucléaire kappa B
PI3K	Phosphatidylinositol 3 -kinase
PR	Récepteur à la progestérone
TNF	Facteur de nécrose tumorale
Wt	Wild type

# I – INTRODUCTION

## 1.1 Les rôles des trois isoformes d’Akt

Les protéines Akt, aussi appelées protéines kinase B (PKB), sont des protéines kinases de type sérine/thréonine qui sont reconnues pour activer de façon directe et indirecte plusieurs réponses liées à la survie cellulaire. En effet, les protéines Akt jouent entre autres un rôle dans la croissance, la prolifération et le métabolisme cellulaire [4, 5]. La famille des protéines Akt est constituée des trois isoformes d’Akt : Akt1/PKB $\alpha$ , Akt2/PKB $\beta$  et Akt3/PKB $\gamma$  [6]. Bien que leur homologie soit de 80% au niveau de leurs séquences d’acides aminés, des gènes distants encodent pour chaque isoforme [7]. La Figure 1 montre la séquence



**Figure 1 : Structure schématique des trois isoformes d’Akt.**

Les résidus qui sont phosphorylés ont été identifiés : T pour thréonine et S pour sérine.  
Source: (Fabi, F. and E. Asselin, Expression, activation, and role of AKT isoforms in the uterus. REPRODUCTION, 2014. 148(5): p. R85-R95.).

d’acides aminés schématique des trois isoformes d’Akt. Il peut être observé dans la Figure 1 les domaines d’homologie « pleckstrin » (PH), les domaines catalytiques ainsi que les motifs hydrophobiques (HM) des trois isoformes d’Akt



[3]. De plus, le numéro du résidu dont ces trois domaines débutent et terminent peut être observé et ces numéros sont différents entre les isoformes[3]. Finalement, bien que les résidus (thréonine et sérine) qui sont phosphorylés sont les mêmes entre les trois isoformes d'Akt, leurs positions sont légèrement modifiées de un à quatre résidus de distance ; cela expliquerait (en plus des différentes positions des domaines PH et catalytique) que les différentes isoformes aient différentes fonctions [3].

#### 1.1.1 Effets de KO simple et double sur les isoformes d'Akt

Afin de comprendre les effets des différentes isoformes d'Akt, une des stratégies utilisées est d'invalider les gènes d'intérêt via un KO (knock-out) [8]. Cette invalidation du gène permet l'étude perte de fonction du gène et permet de comprendre les fonctions différentes et/ou similaires entre des gènes similaires [8]. En effet, cette sous-section présentera des exemples des effets du KO simple ou double des trois isoformes d'Akt. Il est important de spécifier que dans les exemples qui seront présentés dans cette sous-section, tous les gènes seront KO/invalidité dans les deux allèles et que la souris est homozygote (-/-), résultant en ce que la protéine n'est pas présente dans aucune des cellules de l'organisme. Cependant, il sera spécifié dans la sous-section 1.2.1 que notre étude étudie des souris qui sont KO pour nos protéines d'intérêt uniquement dans les cellules sexuelles.

L'isoforme 1 d'Akt est très exprimée dans une grande majorité des tissus. Il y a dans les tissus sensibles à l'insuline comme le foie, le tissu adipeux et les muscles squelettiques, une prépondérance de l'expression d'Akt 2 ; quant à elle, la protéine Akt 3 est principalement et fortement exprimée dans le cerveau et les testicules [9]. Depuis la découverte d'Akt 1 en 1991 par le Dr Philip Tsichlis[10],

les protéines Akt ont fait l'objet de plus de 50 000 études dénombrées en date du 30 novembre 2016[11]. De nombreuses études chez la souris ont porté sur la délétion totale des isoformes d'Akt 1, Akt 2 et/ou Akt 3. Ces études ont mené à plusieurs interprétations des rôles des « knockouts » sur les changements physiologiques et métaboliques. Le Tableau 1 présente les effets globaux et détaillés des différents phénotypes Akt KO total. Ce mémoire présentera également dans les paragraphes suivants les effets des KO sur Akt de façon un peu plus spécifique à notre recherche.

**Tableau 1: Phénotype des souris Akt simple et double KO**

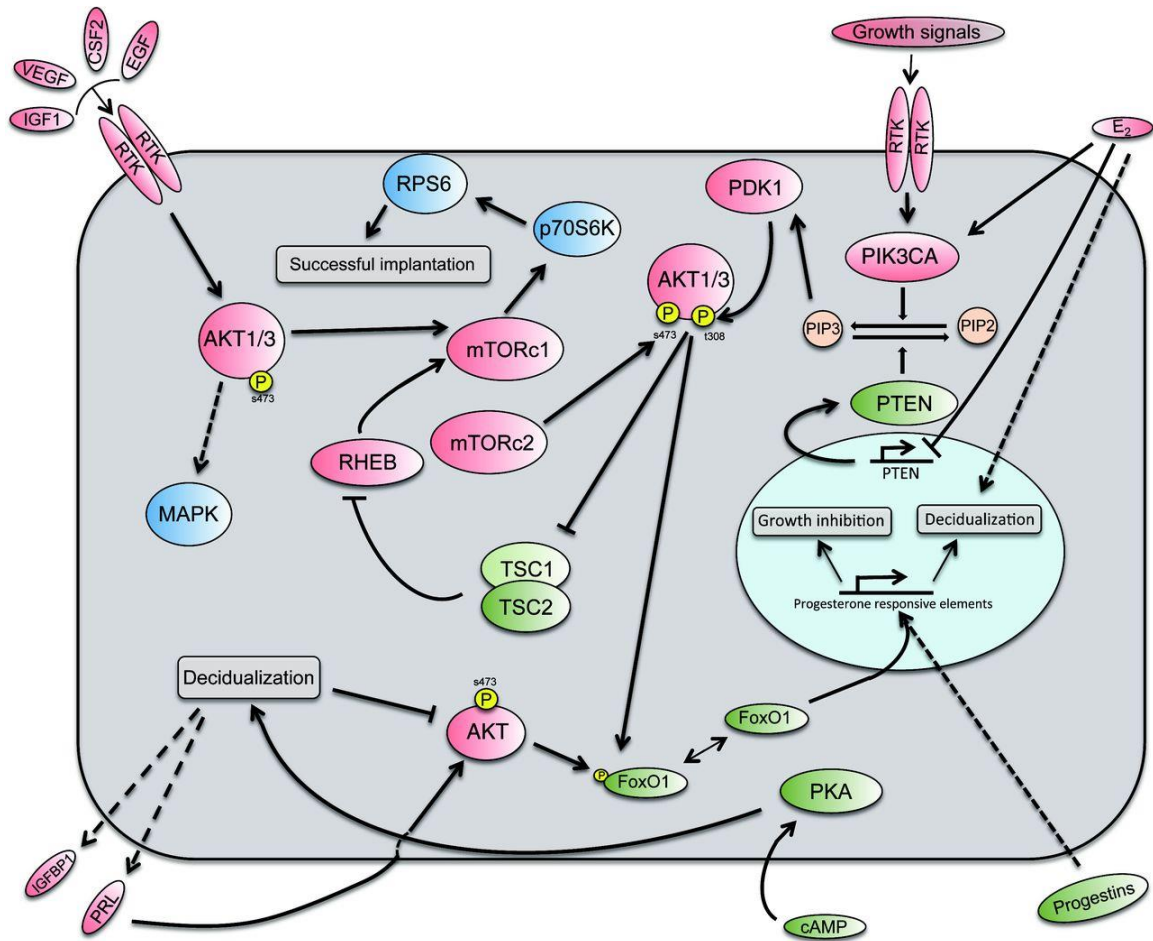
Isoforme KO	Effets globaux du phénotype	Effets détaillés du phénotype	Sources
Akt 1	Diminution de la croissance globale	Provoque une diminution de la taille de plusieurs organes, un retard de croissance et une augmentation de la mortalité périnatale	[12, 13]
Akt 2	Débalancement de métabolisme glucidique	Entraîne un développement de symptômes diabétiques typiques, une intolérance à l'insuline et déficit de croissance	[14-16]
Akt 3	Diminution la taille du cerveau	Sans symptôme. Cependant, les souris possèdent un cerveau plus petit, un plus petit nombre de cellules et des cellules plus petites dans le cerveau	[17]
Akt 1 & Akt 3	Mort des embryons	Cause la mort des embryons de souris entre les jours 11 et 12	[18]
Akt 1 & Akt 2	Mort des souris après la naissance	Engendre la mort des souris après la naissance, avec des muscles atrophiés et un ensemble de problèmes développementaux	[19]
Akt 2 & Akt 3	Affecte l'équilibre du glucose et la taille des souris	Crée des problèmes d'équilibre de glucose et une plus petite taille des souris	[20]

Une inhibition complète du gène Akt 1 provoque plusieurs anomalies, telles qu'une diminution de la taille de plusieurs organes, un retard de croissance et une augmentation de la mortalité périnatale. Plus spécifiquement, l'inhibition totale d'Akt 1 entraîne par exemple une augmentation spontanée de l'apoptose dans les testicules et le thymus. De plus, cette inhibition est associée à une sensibilité à l'apoptose induite par le retrait du sérum, de l'anticorps anti-Fas (Fas appartient à un sous-groupe de récepteur du facteur de nécrose tumorale), du TNF (Facteur de nécrose tumorale) et de l'irradiation UV dans les fibroblastes d'embryons de souris, aussi appelés « mouse embryo fibroblasts » (MEFs)[12, 21]. Des souris dépourvues d'Akt 2 développeront une résistance à l'insuline avec un haut taux de triglycérides sanguin, résultant en un déficit de croissance [14, 15]. Cependant, les souris dont le gène Akt 3 a été retiré n'ont pas de symptômes visibles à l'œil nu, mais ont un cerveau jusqu'à 20% plus petit, une diminution du nombre de cellules dans le cerveau et des cellules plus petites dans le cerveau par rapport à une souris Akt 1 KO total[17]. Ces exemples illustrent bien que l'expression des trois isoformes d'Akt peut être tissu-dépendant et que chaque isoforme peut avoir une fonction différente. Concrètement, un consensus de plusieurs études a déterminé que l'expression et activation de Akt 1 chez la souris est très importante pour la survie cellulaire, l'expression et activation de Akt 2 joue un rôle significatif dans l'homéostasie du glucose, alors que l'expression et activation de Akt 3 serait probablement impliquée dans le développement du cerveau[22]. De plus, les trois isoformes ont en plus de leurs fonctions spécifiques déjà mentionnées plus haut, certaines fonctions redondantes, mais leur point commun est que les isoformes d'Akt sont toutes activées par la protéine intermédiaire phosphoinositide 3-kinase (PI3K), qui est elle-même activée par des facteurs de croissance[23]. Les différentes fonctions ont été décrites plus tôt lors des exemples des inhibitions simples des trois isoformes d'Akt. En résumé, les protéines Akt 1, 2 et 3 ont comme fonctions

globales bien établies chez la souris, respectivement, la survie cellulaire, le métabolisme du glucose et la taille du cerveau et de ces cellules.

### 1.1.2 Phénomène de compensation chez les trois isoformes d'Akt

Le phénomène de compensation sera expliqué brièvement dans cette sous-section parce que ce phénomène est une hypothèse plausible expliquant les résultats obtenus dans la Figure 2 de l'article. Une souris inhibée totalement pour Akt 1 et Akt 2 mourra rapidement après la naissance, avec des symptômes de nanisme, des problèmes développementaux de la peau et des os, une atrophie des muscles squelettiques et un problème de lipogenèse, alors qu'aucun de ces symptômes n'est observé chez une souris simple Akt1 KO ou Akt 2 KO [24]. Ces résultats suggèrent qu'il y a une addition des effets des protéines Akt 1 et Akt 2 causant des fonctions redondantes entre ces deux isoformes [24]. De plus, des mécanismes compensatoires seraient observés lorsqu'il y a la perte d'une ou deux isoformes d'Akt[25]. Cette compensation spécifique d'Akt peut être décrite brièvement par l'auteur de ce mémoire comme suit : « l'inhibition simple ou double d'une isoforme d'Akt cause la suractivation de l'isoforme restante (non inhibé) et/ou le remplacement des fonctions spécifiques (potentiellement unique) de l'isoforme inhibé par l'isoforme restante (non inhibé) ». Les résultats de ce mémoire permettent d'émettre l'hypothèse suivante : « il semble que la quantité totale de p-Akt ne sera pas modifiée lorsqu'il y a inhibition simple ou double d'Akt et qu'il y a compensation (excepté pour un génotype/phase (Figure 2 de l'Article)) ». Ce phénomène est très peu étudié et les hypothèses émises afin d'expliquer ce phénomène sont toujours obtenues lorsqu'il y a des résultats inattendus lors de l'inhibition simple ou double d'une isoforme d'Akt (plus souvent une inhibition double d'Akt). Finalement, il semble y avoir des redondances entre les fonctions



**Figure 2 : Voie de signalisation de Akt dans l'utérus.**

Schéma des protéines impliquées dans la décidualisation et l'implantation embryonnaire (Fabi, F., & Asselin, E. (2014). Expression, activation, and role of AKT isoforms in the uterus) [3].

des isoformes d'Akt qui peuvent être observées lors de l'inhibition des isoformes d'Akt et dont le phénomène de compensation soit la pierre angulaire de l'explication logique des redondances. En effet, la Figure 2 montre que l'isoforme 1 d'Akt et l'isoforme 3 d'Akt vont être activées par les mêmes stimuli, tels que des facteurs de croissance ou les protéines IGF1 et EGF, causant l'activation de la voie PI3K/Akt. Cette activation provoque la décidualisation et l'implantation embryonnaire, comme il peut être observé dans la Figure 2. Finalement, le phénomène de compensation sera décrit et expliqué dans la section discussion, où les fonctions spécifiques qui peuvent être combinées ne sont pas détaillées dans ce

mémoire, parce que seule la phosphorylation totale d'Akt a été analysée via des immunohistochimies de p-Akt.

### 1.1.3 Principes d'activation de la voie de signalisation PI3K/Akt

Il y a de nombreuses voies de signalisation qui contrôlent directement avec le développement et la croissance des fonctions vitales des cellules, des tissus et des organes des mammifères. Parmi ces voies de signalisations, peu ont aussi comme rôles le maintien et l'équilibre du métabolisme cellulaire. La voie de signalisation qui correspond entre autres à ces caractéristiques est la voie PI3K/Akt. Elle constitue une des voies les plus importantes pour les organismes multicellulaires comme les mammifères, puisque cette voie intervient directement dans la survie et la croissance cellulaire.

Au cours des années 1980, les travaux de recherche pourtant sur la

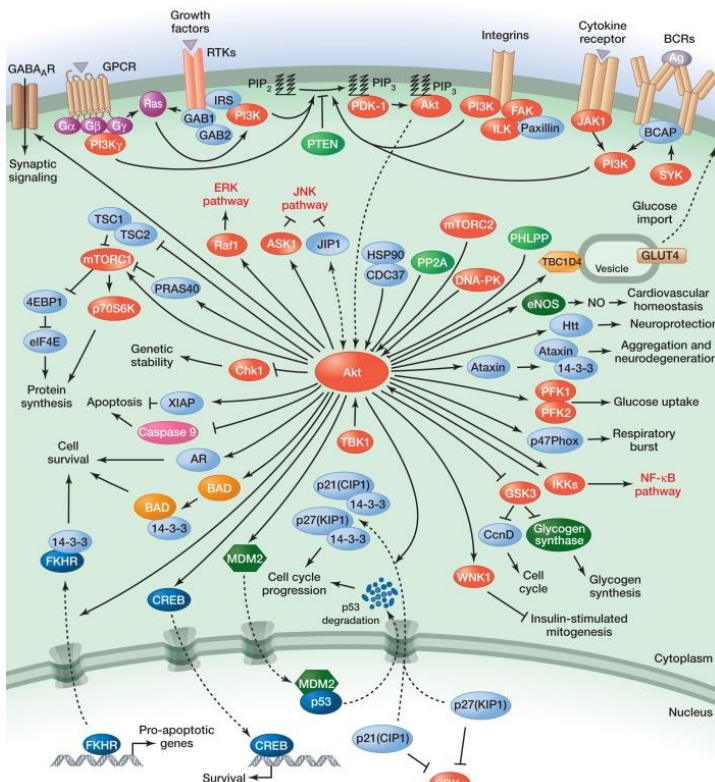


Figure 3 : Voie de signalisation PI3K/Akt[2].

signalisation du récepteur à l'insuline a permis l'identification des protéines principales de la voie Akt, soit la protéine « phosphoinositide-3-kinase » (PI3K) et Akt. Les récepteurs tyrosines kinases qui activent PI3K/AKT ont également été découverts[26, 27]. Ces recherches ont permis d'identifier plusieurs autres protéines effectrices,

molécules intermédiaires et molécules activatrices de la voie PI3K/Akt. Par exemple, l'activation de la voie PI3K/Akt lors de la tumorigenèse a permis de découvrir les molécules régulatrices négatives « protein phosphatase 2 (PP2A)», « PH-domain leucine-rich-repeat-containing protein phosphatases (PHLPP1/2) » et « phosphatase and tensin homolog (PTEN) »[2]. De plus, plusieurs études plus récentes ont démontré les liens directs entre la voie PI3K/Akt et les protéines mTORC1 et mTORC2 (« mechanistic Target of Rapamycin »)(FIG. 3)[2]. La protéine mTORC1 a comme fonction principale la synthèse protéique alors que mTORC2 est plutôt responsable l'activation des facteurs de croissance [28]. Finalement, ces quelques exemples illustrent les nombreuses interactions qu'à Akt avec son environnement. La protéine Akt interagit toutefois avec un nombre bien plus élevé d'autres protéines lorsqu'elle est activée comme il peut être observé dans la Figure 3.

Il peut être observé dans la Figure 3 que les stimuli qui peuvent également activer Akt sont les intégrines, les cytokines et les antigènes qui se lient aux « B cell antigen receptor » (BCR). De plus, la Figure 3 montre que plusieurs stimuli peuvent activer plusieurs récepteurs membranaires. Par exemple, des facteurs de croissance se lie aux récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) et active la voie PI3K qui permet de phosphoryler le PIP2 en PIP3 + PDK1[3]. La voie PI3K/Akt se résume à l'activation de la kinase Akt par phosphorylation. Cette phosphorylation se fait en 2 étapes importantes. Premièrement, Akt doit se lier aux phospholipides de la membrane cellulaire, puis PDK1 (couplé à PIP3) active une boucle d'activation et Akt est phosphorylé à la thréonine 308 (Thr308)[29]. Deuxièmement, il y a exposition d'un second site de phosphorylation à la position Ser473 en position c-terminal[30, 31]. La Figure 1 montre que la position des résidus phosphorylés thréonine et sérine peut varier d'un à quatre résidus selon

l'isoforme d'Akt activée. Ainsi dans notre exemple, la phosphorylation de Thr308 et Ser473 représente l'activation de l'isoforme 1 d'Akt (FIG. 1). Le complexe mTORC2 vient phosphoryler cette position (Ser473) et vient alors activer complètement Akt[32]. Les rôles sont activés par cette seconde phosphorylation d'Akt. Puis, Akt activé peut phosphoryler plusieurs cibles, par exemple les facteurs de transcription Forkhead qui causent l'inhibition de l'apoptose[33]. L'action d'Akt dépend de l'état de la cellule.

## 1.2 Le cycle œstral et ses liens avec les isoformes d'Akt

Globalement, notre étude se concentre spécifiquement sur les liens entre les isoformes d'Akt et les protéines utérines importantes aux contrôles de la survie et de la croissance des glandes utérines dans les quatre phases œstrales. Cependant, l'étude des isoformes d'Akt et de leurs fonctions est déjà un champ d'études intrinsèquement complexe. En effet, la voie PI3K/AKT est complexe et possède plusieurs protéines signalétiques en amont et une large quantité de protéines effectrices [25]. En effet, plus d'une centaine de substrats d'Akt ont été répertoriés. Toutefois, toutes les interactions spécifiques des isoformes 1, 2 et 3 avec toutes substrats d'Akt n'ont pas été découvertes [34, 35]. De plus, dans le cerveau, les isoformes 1 et 3 d'Akt sont exprimées dans les cellules de l'hippocampe, mais sont présentes à différentes locations dans l'hippocampe. Pour sa part, Akt 2 est principalement présent dans les astrocytes du cerveau [36]. Ces exemples démontrent que la localisation à travers le cerveau détermine quelle isoforme sera exprimé. D'autres études ont montré qu'une suractivation des isoformes d'Akt induit l'apparition de cancers dans différents tissus [37]. Ainsi, selon l'isoforme exprimée, il y a une différence d'expression unique à chaque tissu et cellule. De



plus, les différentes isoformes ont une localisation cellulaire différente selon le type de cellule et l'état physiologique de la cellule.

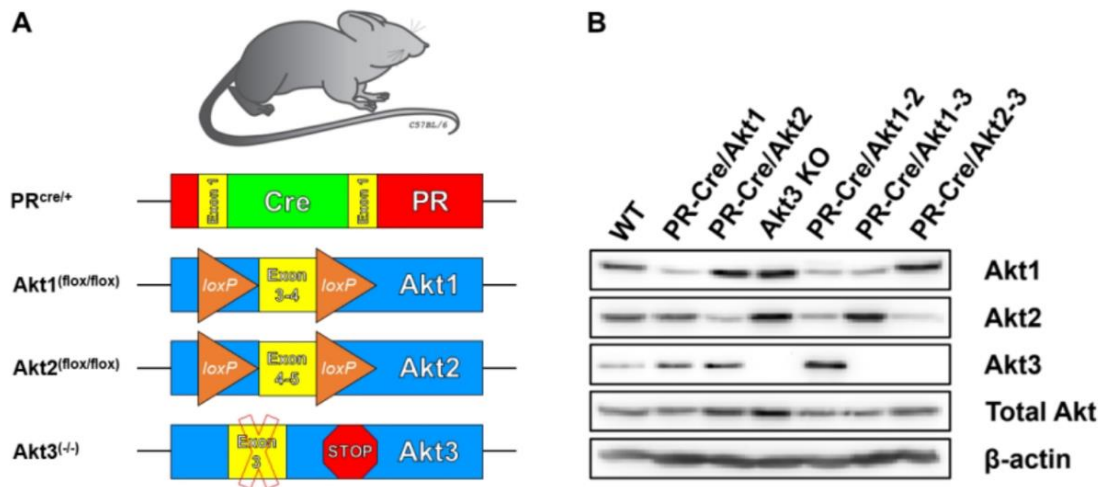
Notre étude est réalisée sur les souris puisqu'elles ont des caractéristiques physiologiques et anatomiques qui ressemblent à l'utérus humain [38]. Chez le rat, plusieurs études ont démontré des liens entre l'endomètre et la survie cellulaire reliée à Akt[39, 40]. De même, une étude de Cinar (2009) utilisant la technique Western blot a mis en lumière la suractivation de Akt dans les lésions endométriales des patientes souffrantes d'endométriose, comparativement aux patientes contrôles saines[41]. Ceci est un exemple de l'apparition de symptômes d'une maladie dans l'utérus lors de la suractivation d'Akt. De plus, chaque isoforme d'Akt est exprimée de façon différente selon le type cellulaire d'origine[25], ce qui complexifie la comparaison des résultats entre différentes études de différentes lignées cellulaires. Finalement, les différents résultats des études présentés dans ce paragraphe et le paragraphe précédent montrent sommairement qu'il y a différentes localisations, l'emplacement cellulaire et les isoformes exprimées activant la voie Akt selon le modèle étudié.

Le cycle œstral a été étudié chez la souris comme il est présenté dans les Figure 5 et Figure 6 [1], mais notre étude est la première à faire le lien direct entre l'expression des trois isoformes d'Akt et l'ensemble des quatre phases œstrales dans l'utérus murin. De plus, la régulation d'Akt via la phosphorylation (p-Akt, qui représente la somme de p-Akt 1, p-Akt 2 et p-Akt 3) causée par l'estradiol à travers le cycle œstral chez le rat est décrit par Déry (2003) : p-Akt total est présent en grande quantité en diestrus, proestrus et metestrus, mais il y a une faible quantité de Akt phosphorylé en estrus, lors d'analyse Western Blot[42]. En ce qui a trait à la quantité de la protéine Akt lors d'analyse Western Blot, il y a une forte quantité dans les quatre phases œstrales, mais il y a une expression maximale en

estrus [42]. Notre étude s'intéresse au niveau de p-Akt dans les utérus murins, où il n'y a pas de données disponibles dans la littérature scientifique.

### 1.2.1 Nos modèles de souris exclusives KO conditionnelles d'Akt dans l'utérus

Pour mieux comprendre les liens entre Akt et le cycle œstral, un nouveau modèle de souris a été développé dans notre laboratoire. Afin d'étudier plus en détail Akt chez les utérus murins, des souris PR-cre/+ « progesterone receptor Cre knockin » provenant du Dr Franco De Mayo (Collège Baylor de Médecine) [43] ont été accouplées par notre laboratoire à des souris « floxées » d'Akt1 et d'Akt2. Les souris Akt3 KO totales ont été obtenus par le laboratoire du Dr Birnbaum de l'Université de Pennsylvanie.



**Figure 4 : Validation des modèles murins uniques de notre laboratoire.**

(A) Représentation schématique des différentes constructions des gènes et du système Cre-loxP. (B) Différents niveaux d'expression des isoformes d'Akt dans les génotypes développés dans le laboratoire. Source: (Pascal Adam, L.T., François Fabi, Dadou Likonza Lokengo, Léa-Isabelle and S.P. Renaud, Monique Cadrin, Derek Boerboom, Eric Asselin, Redundant roles of Akt1 and Akt2 in fertility, estrous cyclicity and endometrial gland development. 2022: Reproduction. En cours de

Le génotype PR-cre/+ représenté dans la Figure 4A permet qu'uniquement les cellules possédant le récepteur à la progestérone (PR) soient affectées par le knock-out, soit les cellules sexuelles des organes du système reproducteur comme l'utérus et les ovaires. Nous étudions les isoformes 1 à 3 d'Akt dans le cycle œstral

en procédant à des inhibitions simple ou double des différentes isoformes d'Akt. Ainsi, toutes les recombinaisons de KO ont été effectuées et validées dans la Figure 4B (Wt, PR-Cre/Akt1, PR-Cre/Akt2, Akt3 KO, PR-Cre/AKT1-2, PR-Cre/Akt 1-3 et PR-Cre/Akt 2-3). Les utérus ont été prélevés dans les quatre phases du cycle œstral murin et dans les 7 modèles murins.

### 1.2.2 Spécificité de la souris

La souris (*mus musculus*) est un modèle largement utilisé dans les laboratoires de recherches fondamentales. Leur étude permet de mieux comprendre les fonctionnements normaux, les différentes maladies et les dysfonctionnements chez les mammifères. Dans un article de revue, Cunha (2019) affirme qu'il y a différentes ressemblances entre la souris et l'homme. Il souligne que dans plusieurs cas, des études montrent que des phénotypes reliés à des problèmes de maladies génétiques chez l'humain peuvent être comparés à ces mêmes phénotypes chez la souris [38]. Cependant, ce même article met en garde qu'il existe d'importantes différences endocrinologiques, anatomiques et développementales entre les humains et la souris et qu'il faut toujours être très prudent lorsque nous extrapolons les résultats obtenus chez la souris et l'humain [38].

Comme dans plusieurs laboratoires, les souris ont été choisies comme animal modèle pour notre étude sur le système reproducteur féminin. Les souris possèdent les avantages suivants : une petite taille, très fécond («inherent fecundity»), un cycle œstral de 4 à 5 jours, un temps de partition relativement court de 21 jours et elles ovulent spontanément [44]. Leurs cycles œstraux sont des événements répétés coordonnés qui affectent le comportement, la physiologie, l'anatomie et l'endocrinologie. Le succès de la reproduction repose sur

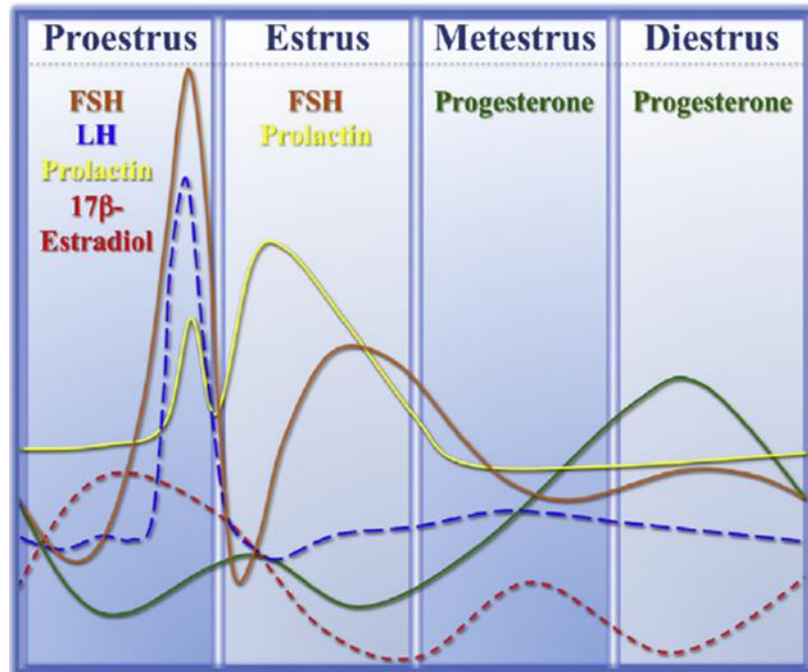
l'expression successive des différentes hormones au sein de la voie hypothalamus pituitaire-gonade (le système reproducteur féminin est contrôlé via les interactions de l'hypothalamus, la glande pituitaire (antéhypophysaire) et les ovaires) [44].

### 1.2.3 Les variations de l'expression des hormones et ses effets macro-anatomiques et micro-anatomiques sur les glandes utérines murines

L'hypothalamus va sécréter la « gonadotropin-releasing hormone » (GnRH). Cette hormone GnRH va permettre de contrôler la libération de façon pulsative de l'hormone lutéinisante (LH) et de l'hormone folliculo-stimulante (FSH) dans la glande antéhypophysaire[45]. En autres, les hormones LH (FIG. 5; ligne pointillé bleu) et FSH (FIG. 5; ligne orange) promouvaient l'ovulation et la sécrétion des hormones sexuelles progestérone et estradiol par les ovaires[45]. De façon plus spécifique, l'hormone FSH agit sur la croissance des follicules dans les ovaires l'expression de récepteur LH, la prolifération des cellules de la granulosa et l'«aromatization» d'androgène en estrogène [1]. L'hormone LH favorise aussi la croissance des follicules, mais davantage dans les étapes tardives de croissance des follicules ovariens, comme en estrus où il y a ovulation [1]. Finalement, les hormones LH et FSH promouvaient la sécrétion de la progestérone et l'estradiol, qui sont les deux principales hormones qui contrôlent directement le développement des glandes utérines [1]. L'estradiol (E2) active directement Akt via la voie non conventionnelle/non-génomique de l'estradiol : E2 se lie au son récepteur membranaire à l'estrogène, ce qui active la voie PI3K, puis PI3K active la voie Akt[46, 47]. De plus, E2 peut également se lier à la protéine-G du récepteur à l'estrogène (GPER1) et activer la voie PI3K/Akt[46].

Les variations des hormones définissent le passage entre les quatre phases (proestrus, estrus, metestrus et diestrus) lors du cycle œstral. Plus en détail, les

variations dans la quantité de ces hormones entre ces phases contrôlent les variations dans le nombre et la forme des glandes utérines et leurs fonctions



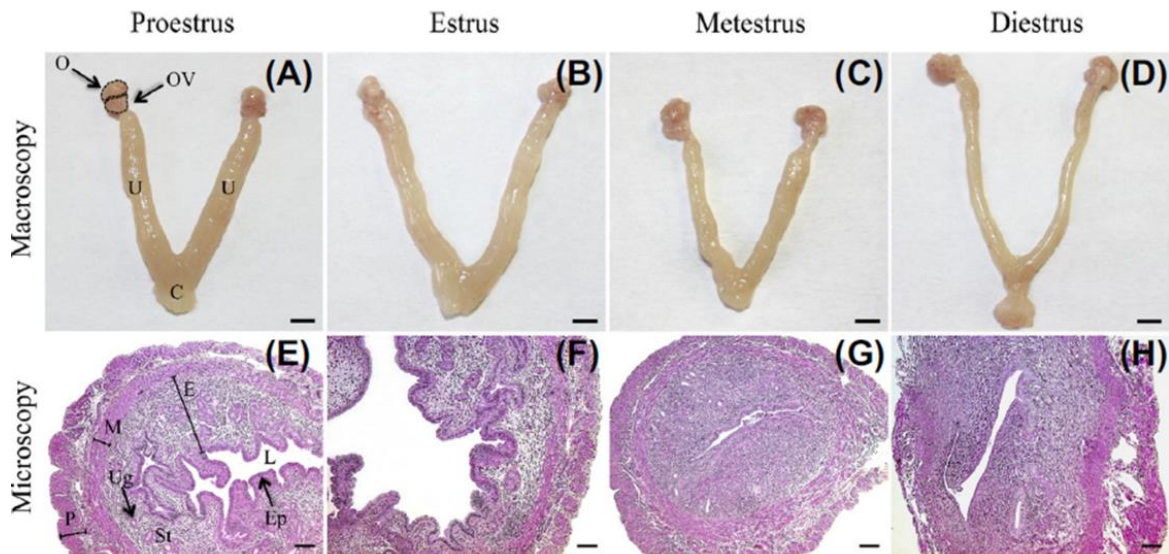
**Figure 5: Diagramme du profil hormonal sérique pour chaque étape du cycle œstral murin.**  
 FSH pour la ligne orange ; LH, bleu ; prolactine, jaune ; 17β-estradiol, rouge ;  
 progesterone, vert. Source: Figure modifiée de « Croy, B.A., et al., The Guide to  
 Investigation of Mouse Pregnancy. 2014»[1].

spécifiques. Dans le cycle œstral de la souris, il y a une faible expression de progesterone (FIG. 5; ligne verte) en proestrus, en estrus et au début de la phase metestrus (Fig. 5). Ensuite, il y a une augmentation de l'expression à un niveau moyen jusqu'à la fin de la phase metestrus (Fig. 5). Finalement, il y a une forte expression de progesterone en diestrus (Fig. 5) [44]. Pour ce qui est de l'expression de l'estradiol (FIG. 5; ligne pointillée rouge), il y a une très faible expression en estrus et diestrus, une faible expression en metestrus et une forte expression en proestrus (Fig. 5) [44]. Pour conclure, il y a une variation de la quantité des hormones pendant l'écoulement d'une même phase pour toutes les phases et les deux hormones impliquées. Par exemple, il y a une faible quantité de progesterone

lors du passage du cycle d'estrus à metestrus, mais il y a une forte quantité de progestérone lors du passage de metestrus à diestrus.

En résumé, les phases proestrus et estrus se caractérisent par une prolifération du tract génital, avec comme point culminant une ovulation (estrus). L'accouplement et la fertilisation dans la phase estrus cause l'arrêt du cycle œstral, ces deux processus ne font pas partie des phases proestrus/estrus, mais conditionnels à la présence et « l'action » d'un mâle reproducteur. Cependant, si le cycle œstral progresse en metestrus, il y aura une dégénération dans le conduit reproducteur. Finalement, il y a une faible croissance ou une quiescence lors du cycle diestrus [44]. Une étude chez le rat concluait que l'activation d'Akt était contrôlée par la quantité d'estradiol exprimée au cours du cycle œstral [39]. En effet, l'estradiol viendrait promouvoir l'expression et l'activité d'Akt, et cela favoriserait la prolifération de l'endomètre et permettrait de protéger les cellules endométriales de l'apoptose [39, 40]. De plus, une inhibition d'Akt chez le rat cause directement l'apoptose des cellules endométriales [42]. Plusieurs études ont démontré que l'estradiol active Akt via le récepteur à l'œstrogène et un lien peut être établi entre la division cellulaire, l'activation d'Akt et l'expression de l'estradiol [47-49]. Ainsi, la phase de croissance proestrus est la phase où il y a également un fort niveau d'estradiol (comparativement aux trois autres phases) et ceci peut être associé à la division cellulaire. Les phases metestrus et diestrus, où il y a peu d'estradiol, seraient davantage reliées à l'apoptose.

Lors des événements proestrus et metestrus, il y a un environnement stéroïdien qui est favorable aux modifications morphologiques de l'utérus. Il y a ainsi plusieurs changements spécifiques à ces deux phases œstrales dans les cellules stromales, dans l'épithélium glandulaire et luminal ainsi que dans le patron de sécrétion des glandes utérines [44]. Le niveau de l'œstrogène est directement corrélé à l'épaisseur de l'endomètre de l'utérus, alors qu'il y a une



**Figure 6 : Photos d'utérus prises en microscopie et en macroscopie pendant le cycle œstral.** (A-D) Tract reproducteur féminin où OV représente les oviductes; O, ovaires; U, utérus et C, cervix. La barre d'échelle représente 2 mm. (E-H) Images microscopiques à champ clair coloré à l'hématoxyline-éosine contenant des sections d'utérus représentant les modifications histologiques observées au cours du cycle oestral. E représente l'endomètre; P, périmètre; M, myomètre; Ug, glandes utérines; St, compartiment stromale; L, lumen; Ep; épithélium endométrial. La barre d'échelle représente 0.1 mm. Source : Figure modifiée de (Croy, B.A., et al., The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy).

relation inverse observée dans l'épaisseur de l'endomètre avec le niveau hormonal de progestérone [44]. Concrètement, la réduction de la prolifération épithéliale, la baisse de l'apoptose stromal et l'épaisseur de l'utérus peuvent être corrélées avec un niveau élevé de progestérone, comme à la fin de la phase metestrus et le début de la phase diestrus [44]. Lors d'une hausse du niveau de l'œstrogène comme en proestrus, plusieurs éléments sont constatés, dont une augmentation de

l'épaisseur de l'utérus, une baisse de la prolifération glandulaire épithéliale, davantage de prolifération des cellules stromales et une diminution de l'apoptose glandulaire, stromale et luminale [44]. La phase proestrus est considérée comme une phase de croissance. Il y a, pendant les cycles proestrus et estrus, un utérus épais et avec un œdème (gonflement des tissus mous) [44]. Cette macro-anatomie s'explique par une sécrétion maximale (très grande activité) des glandes utérines dans ces cycles, plus particulièrement pour la phase estrus. De plus, il y a une forte prolifération stromale corrélé avec une augmentation de l'œstrogène [44]. Il y a spécifiquement en proestrus une présence de projections de tissu endométrial dans la lumière utérine et un endomètre ondulé [44]. Dans la phase estrus, il y a une augmentation du fluide extracellulaire dans tout l'endomètre, expliquant un plus fort œdème dans ce cycle comparativement à la phase proestrus. Ce gonflement des tissus mous (œdème) de l'utérus diminue vers la fin de la phase estrus (Fig. 6F), jusqu'à connaître une baisse importante en metestrus, où il y a davantage d'apoptose stromale; ceci correspond à une faible quantité de progestérone et d'estradiol (Fig. 5). Il y a également en metestrus une faible activité des glandes utérines et une dégénérescence, qui s'explique par une désorganisation de l'épithélium (Fig. 6G) [1]. Cette dégénérescence est causée par une augmentation progressive de l'expression de la progestérone en metestrus dont le point culminant de la cloche gaussienne se situe dans la phase diestrus (Fig. 5). Finalement, il y a une phase de régénération qui est observée vers le milieu de la phase diestrus, où il y a une baisse de la progestérone et une augmentation de l'estradiol (Fig. 5). Dans ce cycle, l'utérus a la caractéristique d'être allongé et aminci (Fig. 6D), avec les parois d'utérus anémiques et effondrées, comme il peut être observé dans la Figure 6H [44]. En diestrus et proestrus, il est fréquent qu'il y ait de la mitose dans les glandes (cellules épithéliales), mais le résultat final de la progression de ces deux cycles est une diminution de la quantité des cellules



épithéliales glandulaires, alors que leurs activités fonctionnelles augmentent [50]. Les glandes utérines présentes dans l'endomètre des mammifères transportent ou synthétisent, puis sécrètent une multitude de substances vitales au développement et à la survie du conceptus (l'embryon/fœtus et les tissus extracellulaires associés) [51]. Une meilleure connaissance du fonctionnement des glandes utérines est d'une importance capitale pour mieux prévenir, diagnostiquer et traiter les nombreux problèmes de fertilité, telle que l'endométriose [51].

### 1.3 Les kératines

Les filaments intermédiaires, les microtubules et les microfilaments d'actine forment le cytosquelette des cellules épithéliales. La famille des filaments intermédiaires se caractérise principalement par sa taille d'environ 10 nm, un autoassemblage de ses sous-unités et par sa tige située au centre possédant un domaine  $\alpha$ -hélicoïdal [52]. Les kératines représentent une famille de protéines incluse dans les protéines de filaments intermédiaires [53]. Les kératines sont exprimées de façon spécifique dans les cellules épithéliales. Les filaments de kératines sont formés par des hétéropolymères obligatoires de kératines de type I et de type II [54]. Les kératines K8/K18 sont la paire la plus commune des kératines et sont les premières exprimées au cours du développement embryonnaire. La K18 (type I) est associée à la K8 (type II) et elles forment un réseau de filaments pan cytoplasmique qui est le plus souvent concentré à proximité de la membrane plasmique et de la membrane nucléaire [52]. Les monomères de kératines (une protéine de K18 par exemple) sont très instables lors de plusieurs configurations biologiques et deviennent plus stables lorsque les kératines s'assemblent. Une revue d'études de Jacob (2018) tend à montrer que les kératines, en s'assemblant

et se désassemblant, pourraient jouer de nombreux rôles régulateurs dans les tissus épithéliaux comme la croissance, la progression du cycle cellulaire, la synthèse des protéines et comme médiateurs inflammatoires et immunitaires[52]. Une étude de Vijayaraj (2009) démontre d'ailleurs que les transporteurs de glucose GLUT (« GLUcose Transporter ») peuvent être activés par les kératines afin de coordonner la synthèse protéique et la croissance cellulaire [55]. Une autre fonction qui est découverte sur les kératines est leur possibilité de faire interagir les protéines 14-3-3 en les liant avec plusieurs cibles responsables: des signalisations, de la polarité cellulaire et du transport d'organelles [55]. De plus, la revue de Jacob (2018), mentionnée ci-haut, a également montré qu'il y a une interaction dépendante de la phosphorylation entre la paire de kératines K8-K18 et la protéine adaptatrice 14-3-3 lors de la progression du cycle cellulaire [52]. Finalement, un autre exemple des fonctions des kératines est qu'elles agissent sur les médiateurs de l'inflammation et de l'immunité en contrôlant leur expression et leur activation; ces médiateurs peuvent, entre autres, stimuler la croissance des tissus épithéliaux [52]. De plus, les kératines pourraient servir de plateforme de signalisation pour plusieurs voies de signalisation [56]. Dans certaines situations de stress cellulaire, les kératines deviennent phosphorylées. Il a été suggéré que, dans ces situations, elles pourraient servir de réservoir de phosphate afin de permettre aux cellules de résister aux kinases de stress. Cette phosphorylation permettrait, entre autres, d'augmenter la résistance des cellules à l'apoptose [52].

### 1.3.1 Les voies de signalisation affectées par les kératines 18

Plusieurs voies de signalisation sont régulées ou activées par la paire de kératines d'intérêt K8/K18 et inversement, K18 peut également activer plusieurs voies [54, 57]. Certaines études ont établi un lien entre la voie de signalisation Akt

(ou une voie indirectement liée à Akt) et la protéine K18. Par exemple, la paire de kératines K8/K18 contrôle la signalisation et le transport du récepteur à l'insuline (IR) par l'entremise de la voie Akt dépendante à la phosphoinositide [54]. De plus, un autre exemple chez les souris où les kératines subissent des modifications post-traductionnelles; lorsque K18 est hypoglycosylé, l'activité de la kinase Akt 1 diminue [58-61]. Il est donc possible que les protéines K8/K18 puissent séquestrer certaines protéines des voies PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B dans le cytoplasme, les empêchant d'aller dans le noyau et/ou d'interagir avec d'autres protéines de la même cascade de signalisation. La séquestration et la libération de ces protéines proviendraient de modifications post-traductionnelles des kératines[61]. Il a été démontré dans le mémoire de Stéphanie Lamontagne (2017) qu'il y a bien une interaction de type séquestration, puisque Akt et NF- $\kappa$ B immunoprécipitent avec les kératines K8/K18. Il a été conclu que les kératines K8/K18 s'associaient avec Akt dans le but de contrôler son activation et réguler la voie Akt [61]. Dans un article, Fortier (2010) a montré qu'il existe un lien particulier entre Akt et K18. Dans cet article, les auteurs mettent en évidence un lien entre une augmentation de l'expression protéique de la paire de kératines K8/K18 et l'isoforme 1 d'Akt dans les cellules de carcinomes épithéliales. Dans cet article, il est aussi démontré que l'isoforme Akt 2 peut aussi augmenter l'expression protéique de K18 et de la vimentine (protéine de la famille des filaments intermédiaires), mais qu'il n'affecte pas l'expression de K8[62]. En résumé, ces études *in vitro* et *in vivo* illustrent que les K8/K18 jouent, à la suite de plusieurs modifications post-traductionnelles, des rôles dans la croissance, la survie, la mitose et dans l'activation de plusieurs voies protéiques telles que ERK1/2 et Akt. Notre objectif global de l'étude des kératines est d'évaluer les effets des inhibitions des trois isoformes d'Akt sur les kératines. Plus spécifiquement, nous cherchons à savoir quelle isoforme d'Akt affecte l'expression de la kératine K18 lors du cycle œstral dans les cellules glandulaires des utérus.

Pour conclure l'introduction de K18, il est important de spécifier la nouveauté de cette étude entre K18 et Akt : l'activité observée dans un organe est très différente de l'expression *in vitro*, spécialement si des cellules immortalisées sont utilisées. Les cellules immortalisées *in vitro* n'ont pas les mêmes stimuli et communications intertissulaires que dans un organe, affectant probablement K18. En effet, il y a augmentation de K18 dans des cellules épithéliales mammaires dérivant de tumeurs comparativement aux cellules normales du même type [63]. Akt est impliqué directement dans les voies de la survie et la prolifération; cependant, les cellules immortalisées possèdent des modifications non négligeables dans au moins une de ces voies de signalisation. Toutes ces explications ont pour but d'introduire la possibilité que nos résultats diffèrent des résultats des précédentes études énoncées sur K18 puisque les études précédentes se concentrent presque uniquement sur des modèles de cellules immortalisées. En contrepartie, notre étude se concentre sur les utérus entiers de souris au travers du cycle œstral. Ainsi, cette étude est une des premières études faites sur l'utérus, le cycle œstral, Akt et K18 (en même temps).

#### 1.4 FOXA2

De nombreuses familles de protéines influencent et contrôlent l'activation et l'inhibition de la transcription des protéines. La famille des facteurs de transcription « forkhead box » (FOX) agit lors du développement et au cours de la vie adulte. Il y a plus de 50 membres à cette famille, regroupés et classés en 19 sous-groupes allant de FOXA à FOXS[64]. Toutes les protéines FOX possèdent un domaine unique FOX-DBD («forkhead box - DNA-binding domain») leur permettant une liaison à l'ADN de manière spécifique. Les différences majeures entre les différents FOX sont les modifications post-traductionnelles, leurs

différents domaines de liaison à l'ADN et leurs régions fonctionnelles ajoutées à leur séquence protéique comme les séquences de localisation nucléaire, les séquences d'exclusion nucléaire et les domaines de transactivation[64].

Forkhead box protein A2 (FOXA2) est une protéine de type facteur de transcription qui a de nombreuses fonctions dans les différentes phases du cycle de vie des mammifères, telles que les stades du développement des organes et également dans les cellules spécialisées [65]. FOXA2 se différencie des protéines de la même famille comme FOXA1 et FOXA3 en étant présente exclusivement dans l'épithélium de l'utérus; lors de la formation de cet organe et pendant le fonctionnement normal de l'utérus [66]. De plus, sous l'activation de FOXA2, l'épithélium luminal deviendrait de l'épithélium glandulaire [67], qui débiterait vers la fin de la phase diestrus et continuerait principalement en proestrus. En résumé, FOXA2 va permettre de la décondensation de certaines parties de l'hétérochromatine pour agir, par exemple, sur le récepteur à l'œstrogène 1(alpha), le récepteur aux androgènes ou encore le récepteur aux glucocorticoïdes [67]. De plus, FOXA2 pourrait s'autoréguler pour augmenter sa transcription en se liant à son propre promoteur [68]. Le facteur de transcription FOXA2 ouvre la chromatine hautement condensée afin d'inhiber ou activer plusieurs gènes et ainsi contrôler leurs fonctions durant la cyclicité des phases œstrales [67]. Les facteurs Foxa sont des facteurs dits « pionniers », qui peuvent être décrits comme des facteurs qui sont indépendants de la liaison à la chromatine/nucléosome et qui peut procéder plusieurs autres facteurs de liaison [69]. Cependant, selon Zaret (2011), le fait que les facteurs Foxa soient pionniers ferait qu'ils seraient utilisés pour le développement d'un lignage, plutôt que pour son maintien [69]. Le mécanisme d'action de FOXA2 est complexe et requiert plusieurs interactions. Premièrement, FOXA2 va se lier à un site sur la chromatine compacte et sans enzyme ATP-

dépendant, va ouvrir le domaine local du nucléosome [70]. Deuxièmement, le mécanisme d'ouverture de la chromatine survient grâce à une haute affinité au site de liaison à l'ADN et parce que le domaine C-terminal de FOXA2 vient se lier aux histones H3 et H4 [70]. Finalement, FOXA2 dérèglerait les interactions dans le complexe tétramère H3/H4, changerait l'orientation de certaines régions de liaison à proximité et aiderait la liaison d'autres facteurs de transcription [67, 70]. Pour toutes ces raisons, FOXA2 peut ouvrir la chromatine hautement condensée.

L'expression de FOXA2 n'a pas encore été étudiée à travers chaque phase du cycle œstral, mais plusieurs études utilisant différents modèles animaux et divers traitements à la progestérone et l'œstradiol ont analysé l'expression de FOXA2 dans l'utérus. Dans un modèle ovin, le traitement avec la progestérone réprime le développement des glandes utérines [71]. Un fort niveau de progestérone est exclusivement présent dans la phase diestrus de la souris. Une étude de Jeong (2010) montre qu'un traitement à la progestérone n'a pas d'effets sur FOXA2 chez la souris néonatale [67]. En revanche, un traitement de la souris néonatal avec de la progestérone combinée à l'œstradiol inhibe l'expression de FOXA2 [67]. Normalement, il n'y a pas de cycle chez la souris qui correspond à un fort niveau de progestérone et d'œstradiol, mais il y a, dans la phase proestrus, un fort niveau d'œstradiol et un faible niveau de progestérone [44]. Lorsqu'il y a un traitement avec de la progestérone et de l'œstradiol au niveau néonatal, il y a une diminution du développement des glandes endométriales (glandes utérines en développement) [67]. L'absence de FOXA2 cause l'impossibilité de décidualisation et d'implantation chez des souris; cela est dû à l'absence de glandes endométriales murines [67]. Finalement, le contrôle du cycle œstral par la progestérone et l'œstradiol permettrait le maintien, la croissance et la dégénération des glandes

utérines, mais il n'y a pas d'étude qui concerne l'expression de FOXA2 en condition réelle à travers le cycle œstral.

## 1.5 Méthodes

Afin de répondre à la question de recherche qui est « est-ce que l'inhibition simple et double (conditionnel à PR) des isoformes d'Akt va causer des modifications dans la quantité des protéines clés des glandes utérines lors des moments charnières du cycle œstral? », nous avons procédé à une analyse semi-quantitative de la quantité de protéines (p-Akt, K18 et FOXA2) en utilisant l'immunohistochimie. En effet, cette technique permet l'analyse des protéines en marquant le tissu avec des anticorps primaires spécifiques, contre les protéines étudiées, suivies par l'application des anticorps secondaires couplés à l'enzyme «Horseradish peroxidase» (HRP) ; DAB (3,3'-Diaminobenzidine) est oxydé par la HRP et révèle un signal qui représente la quantité de la protéine d'intérêt [72]. Lors de l'étape de la réactivation des épitopes, une modification au protocole d'analyse par IHC a été effectuée afin d'obtenir un résultat valable et reproductible pour la protéine phosphorylée p-Akt. La modification est l'utilisation d'un autocuiseur à la place d'un bain-marie pour la réactivation des épitopes; les avantages sont nombreux, comme le fait que la technique permet une constance de la température et de la pression tout au long de la réactivation des épitopes [73]. Cette technique est considérée plus puissante lorsqu'utilisée sur des protéines phosphorylées puisque ces protéines phosphorylées sont souvent exprimées en plus petites quantités et les anticorps utilisés sont souvent moins puissants puisqu'ils sont concentrés sur la spécificité de l'anticorps.

## 1.6 Hypothèse et objectifs

Malgré plusieurs années de recherches sur l'ensemble des trois isoformes d'Akt, p-Akt et le cycle œstral, peu de résultats aident à comprendre l'intégralité des interactions entre ces trois isoformes et nos protéines d'intérêts (p-Akt, K18 et FOXA2) des glandes utérines chez la souris. En effet, les études tendent à étudier l'inhibition simple d'une isoforme d'Akt, et ce dans divers organes *in vivo* (rarement dans le système reproducteur féminin) ou dans des cellules immortalisées *in vitro*. L'hypothèse de notre étude est que l'inhibition simple, double ou triple des isoformes d'Akt va causer des modifications dans la quantité des protéines clés des glandes utérines lors des moments charnières du cycle œstral. Ainsi, l'objectif principal de ce projet de recherche est de comprendre le rôle des différentes isoformes d'Akt par l'inactivation simple, double ou triple des trois isoformes d'Akt chez la souris au cours du cycle œstral. Notre laboratoire a développé des modèles murins uniques ayant une perte d'expression de façon simple ou double pour les trois isoformes d'Akt spécifiquement dans les cellules possédant le récepteur à la progestérone (PR-Cre/Akt). Les utérus des souris ont été collectés dans les 4 phases du cycle œstral pour l'ensemble des 28 génotypes/cycles disponibles. Afin de mieux comprendre l'importance des 3 isoformes d'Akt, nous analyserons l'effet de KO conditionnel simple ou double des trois isoformes d'Akt sur la phosphorylation d'Akt, la quantité de K18 et de FOXA2 dans les utérus de souris lors du cycle œstral. Pourquoi choisir K18 et FOXA2 ? Premièrement, dans les cellules cancéreuses, les protéines K8/K18 augmenteraient en raison d'une surexpression d'Akt 1, et Akt 2 augmente la régulation de K18 [62]. Deuxièmement, l'ablation conditionnelle de FOXA2 entraîne des défauts dans la formation des glandes, des problèmes de décidualisation et de fertilité [67]. Enfin, l'œstradiol et la progestérone peuvent



activer Akt [74, 75], puis p-Akt inhibe FOXA2 [76]. De même, une combinaison d'œstradiol et de progestérone inhibe FOXA2 [67]. Il est donc possible que l'œstradiol et la progestérone contrôlent l'inhibition de FOXA2 par l'intermédiaire de la protéine p-Akt.

## II – Article scientifique

Les résultats présentés dans cet article seront soumis dans la revue scientifique *Reproduction* d'ici peu.

### **Regulation of Akt, keratin 18 and FOXA2 in the uterus of KO conditional Akt isoforms mouse during the estrous cycle**

Nicolas Thibodeau, Pascal Adam, Monique Cadrin and Eric Asselin\*

\*Corresponding author: Université du Québec à Trois-Rivières, 3351 boul. Desforges, Trois-Rivières, Québec, G9A 3H7, Pierre Boucher Building room 2029, Canada. Tel.: 819-376-5011, Ext. 3359; Email: eric.asselin@uqtr.ca

Keywords: Akt isoforms, uterus, p-Akt, K18 & FOXA2

#### Abstract

Protein kinase B (Akt) which in fact corresponds to three different isoforms is essential for the growth and management of numerous uterine functions. The goal of this study was to better understand the role of the three Akt isoforms functions in the different phases of the estrous cycle. For this purpose, we took advantage of mice that are affected by the Knockout (KO) of the different Akt isoforms. The knockouts are specific to sexual cell since they are dependant on the presence of progesterone receptor on cells. We analysed the effects of all simple and double combinations of conditional Akt KO on p-Akt, K18 and FOXA2 proteins in the four phases of the estrous cycle, i.e. proestrus, estrus, metestrus and diestrus. For instance, by immunohistochemistry we analysed the presence and level of p-Akt,

K18 and FOXA2 proteins on murine uteri. Our results showed that there was a significant decrease in the amount of p-Akt and K18 in Akt 2 KO genotype in proestrus phase. In the Akt 1-3 KO genotype during the diestrus cycle, a significant increase of the quantity of FOXA2 protein was observed. Our hypothesis is that Akt 2 is the main isoform activated in proestrus and that explain the decrease of p-Akt in the absence of Akt 2. The decrease of K18 in proestrus upon inhibition of Akt 2 is correlated with a low quantity of p-Akt. Our hypothesis is that Akt 1 and Akt 3 normally inhibit FOXA2, thus explaining the increase in the level of FOXA2 during inhibition of the Akt 1 and Akt 3 isoforms in diestrus. Finally, these results allowed us to understand the importance of Akt isoform 2 in Akt activation in the estrous cycle as well as the timing of Akt 2 activation on K18. Furthermore, the importance of Akt 1 and Akt 3 for the inhibition of FOXA2, especially in diestrus, has been discovered.

## Introduction

The protein kinase B, also known as Akt, is a serine/threonine kinase which regulates many cellular processes such as growth, cell proliferation and cell metabolism [4, 5]. In fact, there is not only one Akt protein, but there are three distinct isoforms [6]. They are Akt1/PKB $\alpha$ , Akt2/PKB $\beta$  and Akt3/PKB $\gamma$ . They have 80% homology for their amino acid sequences, but they are expressed by different genes [7]. In order to understand the role of each isoform in animal, knockout (KO) mice for the different Akt isoforms have been produced. The analysis of these KO mice has shown that each isoform presents specific physiological and metabolic changes. For example, inhibition of the Akt1 gene in mice causes several defects, such as stunt growth decrease size of several organs, and increase perinatal mortality [12, 13]. Knock out of Akt 2, showed an intolerance to insulin and the development of typical diabetic symptoms [14, 16]. Thus, these results suggest that

the role of Akt 2 is more related to cellular metabolism and Akt 1 affects growth [17]. Regarding Akt 3 inhibition, there is reduction of 20% brain size, a consequence of decrease of cell number and cell sizes [17]. These latter showed that the three Akt isoforms have different functions and *in vitro* studies have shown that they also share similar function.

Akt plays important roles in the signaling pathways activated in response to growth factors and other extracellular stimuli that regulate several cellular functions including nutrient metabolism, cell growth, apoptosis, and cell survival. Growth factors activate phosphoinositide 3-kinase (PI3K) and PI3K then activates Akt [23]. Upon loss (KO) of an Akt isoform, the PI3K/AKT pathway interact with several compensatory signaling pathways, mainly related to the RAF/MEK/ERK pathway [25]. Moreover, there are many levels of complexity that are added when compiling different studies on Akt. This is caused by the specificity of the three Akt isoforms functions, their presence in one cell type and not in another and their presence in specific subcellular compartment. For example, a study in brain showed that Akt 2 is primarily expressed in astrocytes, while Akt 1 and Akt 3 were expressed in neurons, but they showed local expression differences [36]. Furthermore, the increase expression of the different Akt isoforms and their overactivation are known to be involved in the development of cancer in different tissues [37]. For example, mutation of PIK3CA (which is part of the PI3K/AKT/mTOR pathway) have been reported in breast tumors [77]. PI3K/AKT/mTOR pathway is also involved in cancer related to ovarian cancer [78].

It is recognized that Akt in his activated form, p-Akt, has a role in the progression of the estrous cycle. However, only one study highlight the role of p-Akt in rodent uteri [39]. This study by Dery (2003) described total p-Akt is present

in large quantities in diestrus, proestrus and metestrus, but there is a small amount of phosphorylated Akt in estrus (Western blot analysis) [39]. Regarding the amount of Akt protein in Western blot analysis, there is a high amount in all four estrus phases, but there is a maximum expression in estrus[39]. In the present study, we investigated the effects of the deletion of the different Akt isoforms on the murine estrous cycle. In normal situation, the three Akt isoforms can be affected by different stimuli, at different time or simultaneously [36]. These stimuli are mainly growth factors, hormones, and extracellular matrix component[79]. Thus, the main question of this study arises: what is the function of the different Akt isoforms in uterine glands through the estrous cycle? Our laboratory has unique mouse models that have a single or double KO for AKT 1 and AKT 2 isoforms specifically in their sex cells, like the uterine glands' cells. In addition, our laboratory has mice with total AKT 3 KO. There are many proteins that are related to PI3K/Akt pathway and that play important roles in the maintenance of endometrium activity. In the present study we will analyse the different level of p-Akt and of two proteins that are related to Akt pathway, FOXA2 and keratin 18 (K18), during the estrous cycle of the different Akt isoform-specific KO mice. Why choose K18 and FOXA2? Firstly, in cancer cells, K8/K18 proteins would increase by an overexpression of Akt 1, and Akt 2 up-regulates K18 [62]. Secondly, the conditional ablation of FOXA2 leads to faults in gland formation, problems in decidualization and fertility [67]. Finally, estradiol and progesterone could activate Akt [74, 75], then p-Akt inhibits FOXA2 [76]. Similarly, a combination of estradiol and progesterone inhibits FOXA2 [67]. Thus, it is possible that estradiol and progesterone control the inhibition of FOXA2 via the p-Akt protein.

To answer the research question: will single, double or triple inhibition of Akt isoforms cause changes in the amount of key uterine gland proteins at key

times in the estrous cycle?, we proceeded to a semiquantitative analyse of the level of proteins expression (p-Akt, K18 and FOXA2) using immunohistochemistry [72]. This technique is commonly used in cancer diagnoses, to confirm a clinical diagnosis of other diseases and in laboratory applications [80-82].

There are three main results that can be pull out from this study. Firstly, there is lower level of p-Akt in the PR-Cre/Akt2 genotype compared to the Wt and the other Akt KO in the proestrus phase. Secondly, there is a significant decrease in K18 level in the PR-Cre/Akt2 genotype when compared to the Wt and other Akt KO genotype in proestrus. Finally, there is a higher level of FOXA2 protein in the PR-Cre/Akt1-3 genotype compared to the Wt genotype in the diestrus cycle. This study of the downstream effectors of Akt lead to a better understanding of the relation of each AKT isoforms with the uterine gland at the different phases of estrous cycle.

## Methods

### *Animals and tissue collection*

Akt exists on three isoforms (1, 2 and 3) and the lab team mated mice in a study model using the progesterone receptor and the Cre-LoxP system; the mice PR-cre/+ come from Dr Franco De Mayo (Baylor College of Medicine) [43]. The mice are floxed for Akt1 and Akt2. For Akt3, the mice were KO total, and were given by the laboratory of Dr M. Birnbaum (University of Pennsylvania). All recombination's of Akt KO (simple and double) were realized in our laboratory [83]. Uteri were collected from all 7 mouse models (Wt, PR-Cre/Akt1, PR-Cre/Akt2, Akt3 KO, PR-Cre/AKT1-2, PR-Cre/Akt 1-3, and PR-Cre/Akt 2-3) from all 4 phases of the murine estrous cycle. Uteri were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS overnight (16 to 18h). Then, uteri were dehydrated and paraffinized [83].

## *Immunohistochemistry*

All primary antibodies who were used for immunohistochemistry (IHCs) are anti-FOXA2 (ab108422; 1/500; Abcam), anti-keratins 18 (ab32118; 1/25; Abcam) and anti-p-Akt (4060; 1/50; Cell Signaling). The anti-p-Akt detects levels of Akt 1, Akt 2 and Akt 3 when phosphorylated at the corresponding residues Ser473, which represents the fully activated Akt protein. The negative control is isotype mAb IgG (3900; Cell Signaling) and its dilution corresponds to the dilution of the primary antibody used. For immunocytochemistry, paraffin-embedded uterine tissues were sectioned at a thickness of 6 µm. Sections were then deparaffinized in xylene, placed in 100% and 95% ethanol baths and rehydrated with distilled water[83]. For the use of anti-FOXA2 and anti-keratins 18 antibodies, epitope reactivation was done by boiling slices for 30 min in sodium citrate solution (100mM sodium citrate, pH6, 5% Tween 20) [83]. In the case of p-Akt antibody, epitope reactivation was done under high pressure with a Crock-pot express crock XL pressure cooker (Sunbeam, Brampton, Ontario) for 15 minutes. Then, the sections were incubated for one hour at room temperature, in TBS containing 5% normal goat serum, to block non-specific binding of the antibodies. The sections were then incubated overnight at 4°C, with the primary antibody in TBST (Tris-buffered saline with 0.1% Tween® 20 detergent) containing 5% normal goat serum. Sections were then washed in TBST, incubated with the appropriate secondary antibody labelled with HRP. The detection was realised as recommended for Signal Stain® Boost Detection Solution (8125; 1X for anti-p-Akt, 0.5X with dH2O for anti-FOXA2 & anti-K18; Cell Signaling, Whitby, Ontario). Briefly, slides were incubated in Signal Stain® DAB (11725; 1mL of DAB diluent (11724) with a drop of Signal Stain® diaminobenzidine (DAB) Chromogen Concentrate; Cell Signaling Whitby, Ontario). Finally, the slides were stained with

hematoxylin and covered with coverslips[83]. In IHCs, the intensity of labelling may vary slightly from the amount of actual protein, and it demands that a person objectively qualifies the score of each glandes/uterus. IHCs technique is qualified as semi-quantitative.

### *Microscopy*

Uteri sections were photographed using the Optika B-290TB microscope for the detection of p-Akt (Optika Italy, North York, On). An Olympus IX70 microscope with LBD-IF lenses coupled with a Samsung Galaxy Grand Prime SM-G530W camera was used for the photo shooting of K18 and FOXA2.

Five mice were used by genotype, where two or more sections per mice uterus were photographed. In each uterus section, a minimum of 20 glands were photographed. Each picture of our figures has a magnification of 400 X. Each uterine gland was assigned a score from 0 to 3, where 0 (null), 1 (weak), 2 (medium) and 3 (strong). Then, the scores were normalized according to the following formula:  $(0 \times \text{number of glands score 0} + 1 \times \text{number of glands score 1} + 2 \times \text{number of glands score 2} + 3 \times \text{number of glands score 3}) / \text{total number of glands}$  [21]. The negative control mAb IgG was checked on each slide and if there were precipitates (means that the secondary antibody binds non-specifically), the slide was discarded and the IHC was repeated on another slide of the same part of the uterus.

### *Statistic analysis*

Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation. The data were analyzed with a One-way ANOVA normal test (PRISM version 8.0.1 application: Graph Pad, San Diego, CA) for each genotype. Subsequently, the Turkey multiple



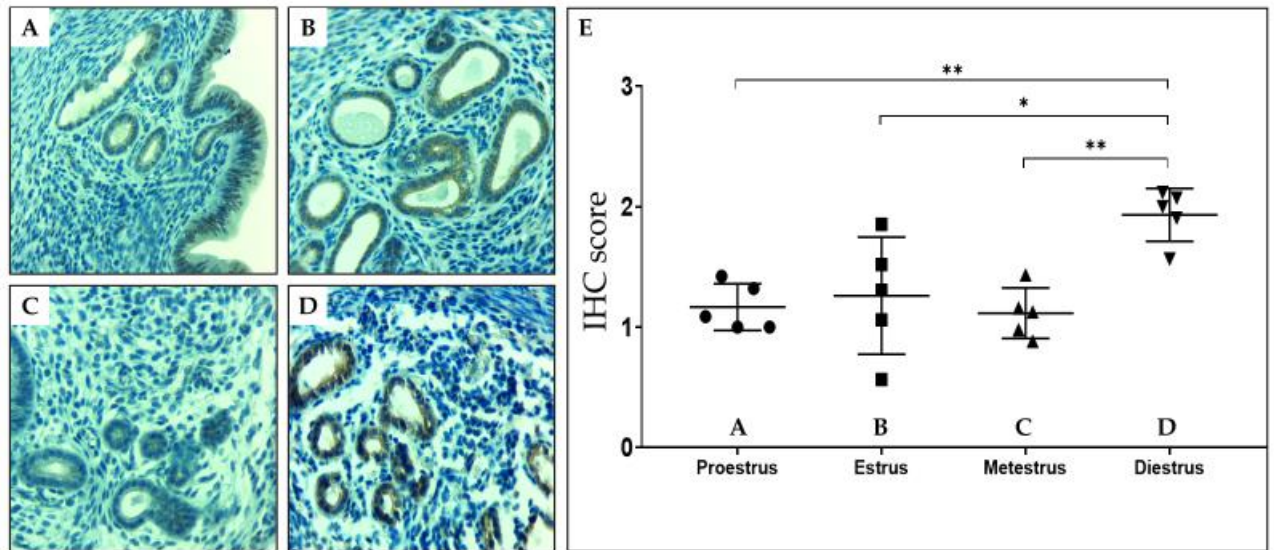
comparison test was performed. Differences were considered significant when  $p < 0.05$ . All genotype of the anti-keratin 18 antibody had to pass a Grubbs test ( $\alpha = 0.2$ ) with PRISM software to remove one aberrant data.

## Results

### *Variation in Akt phosphorylation in estrous cycle in Wild type mice genotype uterus*

In order to understand the effect of Akt inhibition, we first analysed the activity of Akt (p-Akt) in Wild type (Wt) mice through the 4 estrous phases. Our working hypothesis was that there are variations in the amount of the active form of Akt (p-Akt) in the uterine glands during the estrous cycle in the Wild type mice genotype. Our results showed that p-Akt is present in uterine glands at each state of the estrous cycle. Specifically, the presence of p-Akt is detected visually in the cytoplasm, mainly near the lumen of the uterine glands. However, the results revealed that there were variations in the amount of p-Akt in the glands during the cycle in Wt animal. Figure 1A to D show a representative distribution of p-AKT in the four phases of the estrous cycle. Figure 1D shows that there is a stronger staining for p-AKT in the diestrus phase of estrous cycle compared to the other estrous phase. Quantitative analysed of the results as described in material and methods showed that there was a greater level of p-Akt in glands of the diestrus phase (Figure 1 E). These results indicate that Akt is more active in the uterine gland during the diestrus phase of the estrous cycle. Figure 1E, diestrus D shows an IHC score with a mean of intensity of about two (2). Supplementary Figure S1 clearly shows that there is a greater level of p-Akt in diestrus when compared with the other three phases of the cycle. These results indicate as

expected that p-Akt play specific roles within the different phase of the estrous cycle.



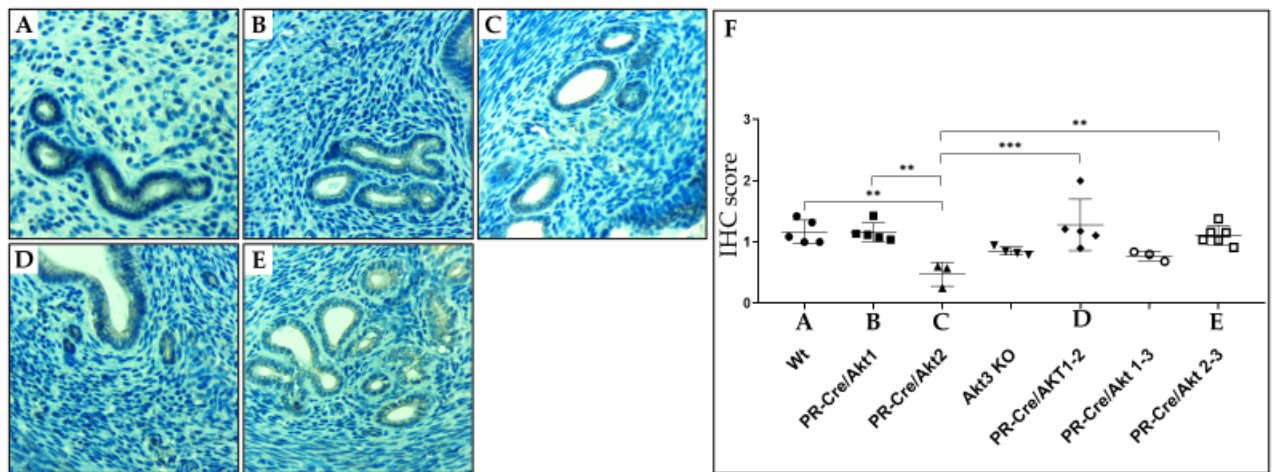
**FIG. 1.** IHC of phospho-Akt in the uterus of mice of the 4 phases of the estrous cycle on the Wt genotype. (A-D) Phospho-Akt immunostaining of Wt uterus on the four phases of the estrous cycle; proestrus (A), estrus (B), metestrus (C) and diestrus (D). (E) Phospho-Akt IHC scores of the estrus cycle. The signal quantities obtained are presented as the individual data of each mouse with the mean  $\pm$  standard deviation (n=5). ANOVA and Tukey tests were performed where  $p < 0.05 = *$ ;  $p < 0.01 = **$ .

### *Variation in Akt phosphorylation in proestrus cycle in all genotypes*

In order to better understand the role of p-Akt in estrous cycle, we took the advantage of using mice that do not express the different Akt isoform in uterine glands. The seven genotypes were compared in the four phases of the estrous cycles. Only phases with significative data are shown (others are presented in the appendix: Fig. S4 to Fig. S8).

Our hypothesis was that there will be a decrease in the level of p-Akt, but only during a crucial moment for the development of the uterine glands, like the proestrus phase. If the image of the Figure 2A to 2E are compared, the Figure 2C who represents PR-Cre/Akt2 genotype present a smaller signal. The quantitative analysis presented in Fig. 2F show that in proestrus a strong significant decrease in the level of p-Akt in the PR-Cre/Akt2 genotype, when compared to the Wt

control ( $p < 0.01$ ), is observed. Furthermore, p-Akt level in the PR-Cre/Akt 2 genotype is very low compared with the PR-Cre/Akt 1 ( $p < 0.01$ ), PR-Cre/Akt 1-2 ( $p < 0.001$ ) and the PR-Cre/Akt 2-3 ( $p < 0.01$ ) genotypes. There appears to be no significant difference phosphor-Akt in WT and the other single or double Akt KO. Of note, It is true that it is difficult to truly evaluate the amount of p-Akt PR-Cre/Akt 1-2 since there is a smaller number of glands in uterine of these animals [83]. The supplementary Figure S2 illustrates the variation of the presence of p-Akt in proestrus uterine glands.



**FIG. 2. Quantification of phospho-Akt protein in the uterus of mice of all Akt KO genotypes during the proestrus phase.** (A-F) Phospho-Akt immunostaining of uterus on the proestrus cycle; Wt (A), PR-Cre/Akt1 (B), PR-Cre/Akt2 (C), PR-Cre/Akt1-2 (D) and PR-Cre/Akt2-3 (E). (F) Phospho-Akt IHC scores of all genotype of the proestrus phase. The signal quantities obtained are presented as the individual data of each mouse with the mean  $\pm$  standard deviation ( $n \pm 5$ ). ANOVA and Tukey tests were performed where  $p < 0.01 = **$ ;  $p < 0.001 = ***$ .

#### *Decreased K18 quantity in the PR-Cre/Akt2 genotype in proestrus*

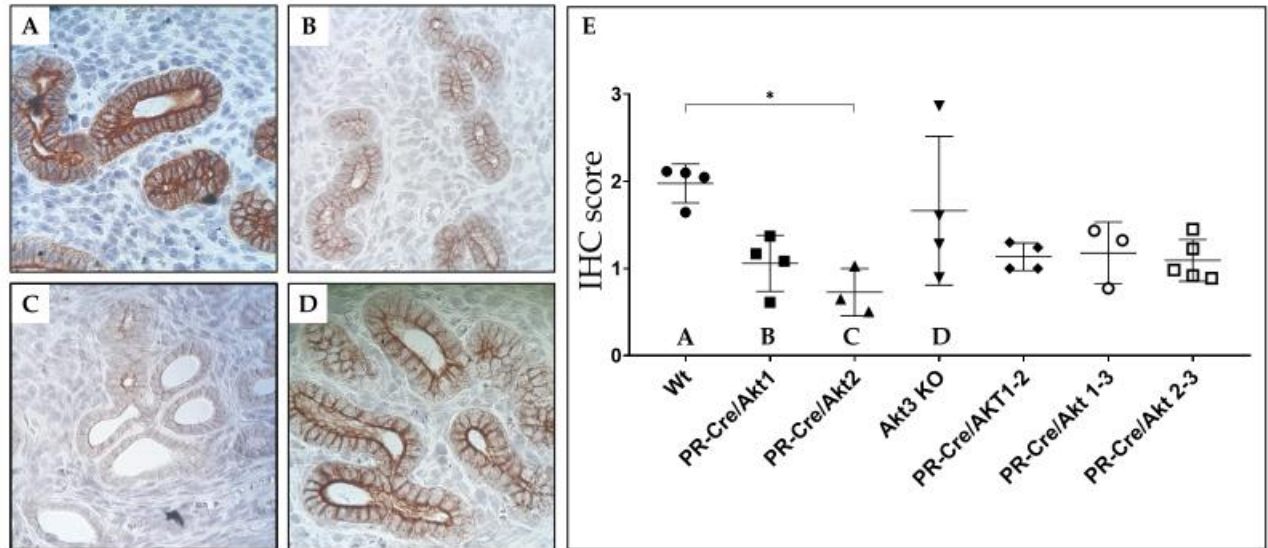
K18 form with K8 an heteropolymer that form part of the intermediate filaments structure in uterine glandular epithelium. As structuring protein, K8/K18 have been proposed to constitute a platform that plays a role in signaling molecule localisation [56]. On the four estrous phases, only the proestrus phase showed significant changes in K18 content. In proestrus stage, IHC staining shows that K18 staining is weaker in PR-Cre/Akt 2 (Figure 3C) compared to WT (Figure

3A). Quantitative analyses of the data show that in proestrus phase the level of keratin significantly decreased in the genotype PR-Cre/Akt 2 compared to the Wt control (Fig. 3E;  $p < 0.05$ ).

Interestingly, K18 tends to decrease in simple or double PR/Cre of Akt1 and Akt 2 uterine gland compared to Wt genotype mice. Indeed, the Figure 3B and 3C show a weaker signal compared to the Figure 3A, suggesting that Akt 1 and Akt 2 affect K18 protein level. Supplementary Figure S3 strongly helps to support the results obtained for Figure 3 by showing an n=3 of the photos for all significant results standing out. Figure 3E shows the data with the Gredds test used. Thus, compared to Wt genotype, PR-Cre/Akt 1 genotype has a p-value equal to 0,0609, PR-Cre/Akt 1-2 genotype has a p-value equal to 0.1018, PR-Cre/Akt 2-3 genotype has a p-value equal to 0.0552 and PR-Cre/Akt 1-3 genotype has a p-value equal to 0.1919. Although the PR-Cre/Akt 2-3 and PR-Cre/Akt 1 genotypes have a p-value slightly higher than 0.05, there is no significant difference with the Wt genotype and can't be studied further. However, future experiments with more samples or with another method of analysis such as a Western blot would be interesting to perform in future studies.

Finally, the Wt genotype set of glands shows a high h-score in Figure 3A. However, the uterine glands of the Wt genotype in Supplementary Figure S3 shows three IHCs with uterine glands' scores between 1 and 3, where the top IHC shows several glands with a score of 1. This means that even though there is an average score of more than 2, several uterine glands have a low score, and it is ultimately for this reason that there are not more genotypes with a significant difference from the Wt genotype. In addition, the uterine glands present in the PR-Cre/Akt 2 genotype IHCs in Figure 3C and Figure S3 are the only ones with

multiple glands with an average score of 0 compared to all other proestrus phase genotypes.



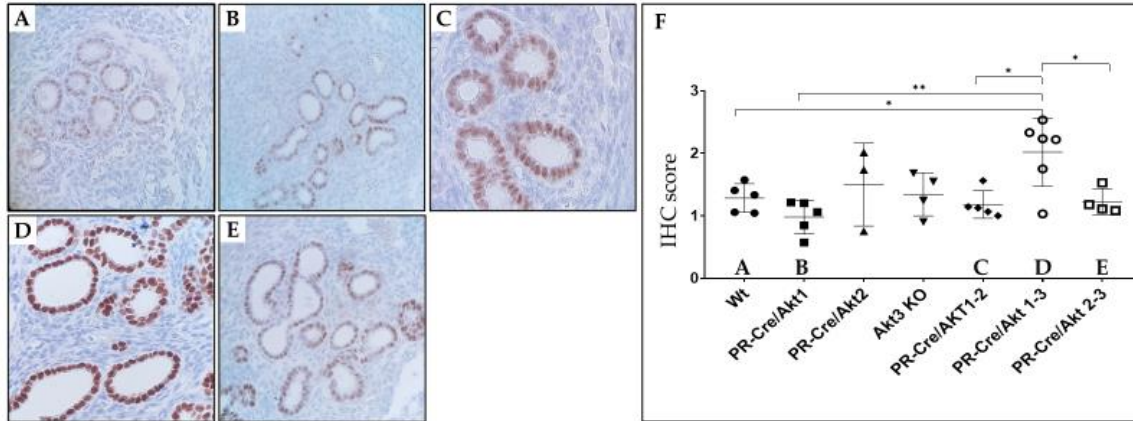
**FIG. 3. Quantification of K18 protein in the uterus of mice of all Akt KO genotypes during the proestrus phase. (A-B)** K18 immunostaining of uterus on the proestrus cycle; Wt (A), PR-Cre/Akt1 (B), PR-Cre/Akt2 (C) and Akt3 KO (D); representing the triangle on the mean). (E) K18 IHC scores of all genotype of the proestrus phase. The signal quantities obtained are presented as the individual data of each mouse with the mean  $\pm$  standard deviation ( $n \pm 5$ ). ANOVA and Tukey tests were performed where  $p < 0.05 = *$ . Grubbs test was performed to remove outliers ( $\alpha = 0.2$ ).

#### *Increased FOXA2 quantity in the PR-Cre/Akt1-3 genotype in diestrus*

FOXA2 is a transcription factor involved in the development and maintenance of uterine glands [67]. Different studies have shown that AKT activation, through its phosphorylation, regulates the action of the transcription factor FOXA2 [76]. In fact, p-Akt phosphorylate FOXA2: This results in the exclusion of the p-FOXA2 protein from the nucleus and p-FOXA2 becomes inactive [76]. In the uterus, total inhibition of FOXA2 causes a diminution in the number of uterine glands [67]. Akt can inhibit FOXA2 by phosphorylating it, so our hypothesis is that single or double inhibition of Akt will cause an increase in FOXA2 only in the estrous phase where FOXA2 will normally be excluded from the nucleus by Akt isoforms. Only the nuclear FOXA2 was use for the H-Scoring

of the IHCs of FOXA2. There was a significant increase in the quantity of FOXA2 during diestrus phase for the PR-Cre/Akt1-3 genotype compared to the Wt genotype (FIG. 4F;  $p < 0.05$ ). The Supplementary Figure S8 show that there was no significant difference between the Wt genotype and others genotypes for the quantity of FOXA2 during proestrus, estrus and metestrus. The Figure 4F shows that there is a greater amount of FOXA2 protein in the PR-Cre/Akt1-3 genotype (FIG. 4D.) compared to the PR-Cre/Akt1 ( $p < 0.01$ ; FIG. 4B.), PR-Cre/Akt1-2 ( $p < 0.05$ ; FIG. 4C.) and PR-Cre/Akt2-3 ( $p < 0.05$ ; FIG. 4E.) genotypes. Upon visual analysis of Figures 4A through 4E, there appears to be similar quantity of FOXA2 in Figures 4A, 4B and 4E compared to Figure 4C and Figure 4D. The amount of FOXA2 in Figure 4D is slightly higher in Figure S4 (Supplementary Figure S4). Finally, there is a marked visual contrast in signal quantity between the genotype Wt (Fig. 4A) and the PR-Cre/Akt 1-3 genotype (Fig. 4D), as well as the Figure 4F, helping to highlight an increase in FOXA2 in PR/Akt 1-3 compared to the Wt genotype. Visually, there appears to be a slight increase in FOXA2 level in PR-Cre/Akt 1-2 compared to Wt when Fig. 4C is compared with Fig. 4A. However, the observation in Figure S4, where several uterine glands of the PR-Cre/Akt 1-2 and Wt genotypes are present, shows that there is no significant visual difference between genotypes.





**FIG. 4. Quantification of FOXA2 protein in the uterus of mice of all Akt KO genotypes during the diestrus phase.** (A-E) FOXA2 immunostaining of uterus on the diestrus cycle; Wt (A), PR-Cre/Akt1 (B), PR-Cre/Akt1-2 (C) PR-Cre/Akt1-3 (D) and PR-Cre/Akt2-3 (E). (F) FOXA2 IHC scores of all genotype of the diestrus phase. The signal quantities obtained are presented as the individual data of each mouse with the mean  $\pm$  standard deviation ( $n \pm 5$ ). ANOVA and Tukey tests were performed where  $p < 0.05 = *$ ;  $p < 0.01 = **$ .

## Discussion

Akt proteins are involved in many cellular signaling pathways such as PI3K/Akt pathway, NF- $\kappa$ B pathway and mTOR pathway. However, their specific role in the estrous cycle is still misunderstood. The main aim of the present work was to better understand the importance of the three Akt isoforms on the estrous cycle. For this purpose, we used mice in which the expression of the different isoforms of Akt were exclusively inhibited on the cells with the progesterone receptor (PR) (except for isoform Akt 3 which is a total KO). Akt 3 null phenotype seem to be critical regarding the achievement of the normal organ size and manage the mass of the brain mouse (in relation to the number and size of cells) [84]. Thus, Akt 3 KO does not affect overall growth or carbohydrate metabolism like Akt 1 KO and Akt 2 KO. Finally, Akt 3 null phenotype is like the mouse Wt phenotype and does not affect the life of the mice [85].

Akt proteins are one of the most important proteins, whose three isoforms are related to cell survival and growth of a healthy adult. For example, mice embryos with a total double KO for Akt isoforms 1 and 3 die between 11 and 12

days [18]. Mice with both Akt 1 and Akt 2 knockout died few moments after birth and presented skeletal muscle atrophy, dwarfism, impeded adipogenesis, impaired skin development, and delayed bone development [19]. However, the combination Akt 2 and Akt 3 knockout generated viable mice with glucose balance problems and smaller size [20]. A study from Fortier (2011) say that Akt isoforms would be tissue-specific for their expression/activation, could be find in different localisation and/or compartmentalization, and that each isoforms had substrate specificity or distinct effectors [4]. In addition, their results suggest that there is a compensation phenomenon present when an isoform is KO.

Typically, knock-out of proteins that are activated by phosphorylation causes a complete stop of its production. However, Akt has three isoforms who seem to compensate each other in certain conditions [4, 86]. In addition, at least three articles state that it is possible that there is partial compensation in the Akt[87-89]. One study who used Westerns blot showed that there is a larger ratio of p-Akt versus total Akt on the endometriotic lesions' patient compare to normal control (healthy person) [41]. It is interesting to know that a higher expression of p-Akt can possibly cause a uteri related disease, but the study of endometriosis could be addressed in a future study. One study on rat has permitted to show a direct effect of Akt on the estrous cycle: p-Akt was expressed at diestrus, proestrus and metestrus but was less expressed at estrus [39]. They demonstrated that estradiol not only activates its phosphorylation, but also its protein expression. This resulted in protecting endothelial cells from entering apoptosis and promoting cell proliferation [39]. Thus, there will be a progression of the estrous cycle according to the variation of the quantities of the estradiol hormone. The estradiol and the progesterone are the two principals hormones who control the advance and cyclicity of the estrous cycle . In mice, there is a very low level of



estradiol in estrus and diestrus, a low level on metestrus and high level in proestrus[44]. Progesterone was expressed in mice in low quantity in proestrus and estrus, and in high quantity in diestrus. In addition, the quantity varied to low to medium from start to the end of the metestrus phase, which can be complicated to obtain reproducible data [44]. Estradiol is proved by many studies to activate PI3K when estradiol binds to the membrane estrogen receptor (mER), thus activating Akt [47-49]. Progesterone promoted the PI3K/Akt pathway activity [75, 90]. Consequently, both estradiol and progesterone most likely affect the PI3K/Akt pathway during the estrous cycle, but we do not know under what conditions progesterone activates Akt rather than estradiol and vice versa.

Analysis of our data show that the figure 1E and the diagram of the serum hormonal of the murine estrous cycle described by others [44] permit to say that there is a profile similar between our results on the level of p-Akt and their quantity of progesterone on the wild-type mice. Furthermore, our study only shows significantly greater level of p-Akt in diestrus compared to the other three phases of the cycle in the Wild Type genotype (Fig. 1). Thus, it is possible that Akt activation is a direct response to progesterone expression (probably ovarian-derived progesterone P4) in murine uterine glands. However, no study has clearly identified the roles of estradiol and progesterone in the distinctive activation of the three different isoforms of Akt, specifically in the four phases of the estrous cycle [47-49].

Finally, there is more mitosis in the glandular epithelial cells for the diestrus phase compared to the metestrus phase; however, the end result of the diestrus and proestrus phases is a decrease in the quantity of glandular cells paired with an increase in glandular functional activity [50]. Thus, the increase in p-Akt level

could be correlated with the increase in progesterone in diestrus, due to the need for increased mitosis in the diestrus phase.

Theoretically, inhibiting the expression of a kinase should cause the total loss of the kinase. However, when the six different genotypes are compared with the Wt genotype, for the 4 phases of the estrous cycle (Fig. S6), there is still a level of p-Akt like the Wt genotype, except for the genotype PR-Cre/Akt 2 in proestrus (Fig. 2 & Fig. S2). These observations lead us to ask ourselves two major questions: Firstly, why is there a significant decrease in p-Akt during Akt 2 inhibition exclusively in proestrus and secondly, why is there no decrease in p-Akt in PR-Cre/Akt 1-2 and PR-Cre/Akt 2-3 genotypes? Firstly, it is also possible that Akt 2 is the only isoform activated (p-Akt 2) in proestrus in the uterine glands, and that Akt 1 and Akt 3 will rather be activated at estrus, metestrus or diestrus phases.

A plausible answer to the second question is: it's possible that the inhibition of two isoforms (one of which is Akt isoform 2) activates a compensation phenomenon. We hypothesize that the Akt protein is too important for cell survival and growth of the organism that there is a dedicated mechanism which has been developed: compensation phenomenon. Therefore, the inhibition of two isoforms of Akt at the same time (one of which is Akt isoform 2) is probably necessary for compensation to occur, explaining why there is no decrease in the amount of p-Akt in the PR-Cre/Akt 1-2 and PR-Cre/Akt 2-3 genotypes in proestrus.

There is some controversy surrounding the effect of compensation on the three Akt isoforms. One study illustrates that there is no compensation when all three isoforms are single or double inhibited by siRNAs [91]. The authors of this study looked at whether inhibition results in a shift of the isoforms at the subcellular locations of the Akt [91]. A major finding of this paper is that they used an immortalized human breast cancer epithelial cell line (MDA-MB-231), which

has undergone numerous modifications in the survival and apoptosis pathways. This does not affect the fact that there is no subcellular shift in this cell type, but this result cannot be transposed to all normal cell types in the human body. Furthermore, several studies illustrate that there is no increase in messenger RNA levels and protein amount where there is compensation for Akt1<sup>-/-</sup>, Akt2<sup>-/-</sup>, Akt3<sup>-/-</sup> genotypes in mice [15, 87, 88], but these studies did not look at the level of Akt phosphorylation. However, although these studies exclude that there is increased compensation when an isoform is inhibited alone, these studies and another do not exclude that there is possibly partial compensation [87-89]. One study suggests compensation or overlap of isoforms when there is a double KO of Akt isoforms : They explain that although different isoforms control different cellular processes, they used phenotypic analyses to hypothesize compensation in double KO of Akt isoforms [86]. This study helps to explain our previous hypothesis as to why the amount of Akt phosphorylation in the PR-Cre/Akt 1-2 and PR-Cre/Akt 2-3 genotypes does not decrease after inhibition, explaining the need for a double KO. As another example, Fortier's (2011) study concluded based on several studies involving single and dual inhibition of Akt that "The relatively subtle phenotypes of mice lacking the different individual Akt isoforms as well as the viability of the animals suggest that for many functions, the Akt isoforms are able to compensate for each other" [4]. In addition, the authors of this study found a compensation phenomenon upon dual inhibition of Akt isoforms.

Finally, several questions remain unanswered on the phenomena of compensation after several studies on several cell types, the use of biochemical inhibitors and numerous knockouts on Akt isoforms. Several studies conclude that it is possible that there is a compensation phenomenon during single and/or double inhibition of Akt isoforms [4, 25, 86, 92]. Yet, the phenomenon of Akt

compensation is misunderstood. One conclusion remains: no study has yet looked at the effects of single and double inhibition in mouse uteri across the four phases of the estrous cycle. Therefore, it is possible that there is a compensation phenomenon exclusive to the development, growth, and survival of the uterus, one of the most important organs in terms of reproduction and survival.

Finally, the proestrus phase is recognized as one of the phases in which there is a greater functional activity of the uterine glands [50] and it is possible to link this finding to the metabolic activity that is related to the Akt isoform 2 [14-16]. Indeed, it can be hypothesized that the activation of p-Akt 2 causes a greater functional glandular activity in the proestrus phase: one of the consequences of the decrease in p-Akt 2 (Fig. 2) is the decrease in the quantity of keratin 18 (Fig. 3). Indeed, keratins 8/18 are involved in cell cycle progression, protein synthesis and cell growth [52], similar to the effects of p-Akt 2 metabolic activity.

The intermediates filaments protein K18 form with K8 an heteropolymer that form a cytoplasmic network that expand from the nucleus to the plasma membrane [52]. It has been shown that total inhibition of K8 and K18 through K8/18-depleted cells results in increased invasion and migration in epithelial cancers cells [93]. While their function are not fully understood, keratin 8/18 are believe to play roles in cell growth, progression of the cell cycle, protein synthesis, and in the inflammatory, immune system and protection again cell stress [52]. Keratins have been propose to serve as a signaling platform for several signaling pathways [56]. Thus, growth stimulation causes phosphorylation of K8/K18 by ERK1/2, and this leads to changes in the solubility, dynamics and organization of intermediate filaments in liver cells[94]. In addition, the K8/K18 pair controls the IRS1/PI3K/Akt PIP2-dependent pathway in hepatocytes [54]. There is a possibility that the K8/K18 protein can sequester certain proteins from the PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B

pathways [61]. Also, mice lacking a glycosylated K18 can render Akt 1 inactive [60]. In addition, cytoskeleton-controlled localization of Akt would give Akt a specific function depending on the situation of the cell [4]. Thus, the cytoskeleton would control Akt activation by manipulating its localization and sequestering it [4].

Two results from a paper by Fortier (2010) illustrate firstly, in epithelial carcinoma cells, an increase in protein level of the keratin pair K8/K18 is observed during an over-expression of Akt1. Secondly, the Akt 2 isoform can also up-regulates K18 and vimentin expression (through an increased mRNA stability) but does not affect K8 gene expression [62]. Keratins 8/18 have been propose to serve as a phosphate reservoir to resist stress kinase and can be reorganized to resist apoptosis[52]. More of it, it has been shown that a knockout of keratins 8 and 18 causes hyperactivation of the PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B pathway in epithelial cells[61]. In conclusion, these results show that there is a link between K8/K18 and Akt. However, the effects of inhibition of simple and double Akt isoforms on K18 during estrous cycle have not been studied to date.

One hypothesis would be that K18 interacts with only one isoform of Akt, being in response to the most active Akt isoform and when that Akt isoform is most active in the estrous cycle of mouse uteri. If the previous results on Akt phosphorylation are considered (Fig. 2 & supplementary Figure S2), there is a decrease in the amount of K18 when Akt isoform 2 is inhibited in sex cells compared to the Wt control (Fig. 3). The absence of p-Akt isoform 2 causes a decrease in K18 quantity in proestrus, but not in the other three phases. A study already demonstrates that Akt 2 upregulate K18, through an increased mRNA stability [62]. In conclusion, the decrease in the level of p-Akt 2 (Fig. 2) would cause a decrease in the stability of K18 mRNA, which would result in a decrease in K18

transcription and subsequently, a decrease in the level of K18 (Fig. 3) in the proestrus phase.

Finally, our results highlight the relationship of Akt and K18 proteins via the active form of Akt, p-Akt, which play many roles in a variety of epithelial cells. However, our results have one weakness and that is that the raw data of the amount of K18 was cleaned from possible outliers, due to one outlier presents on the Wt control genotype on the proestrus. The Gredds test which excludes a single outlier at one of the ends of the Gaussian bell probably gives a closer result to reality. However, even though the results have been cleaned of possible outliers, the images in Figures 3A, 3B and supplementary Figure S3 unequivocally illustrate a difference between the amount expressed in the PR-Cre/Akt2 genotype, which is very low, and its control Wt, which is high. Thus, it helps to make these specific results more convincing and justify them.

Forkhead box protein A2 (FOXA2) is a transcription factor protein that has many functions in the different phases of the mammalian life cycle, both at the beginning and during the formation of the organs, and during adult life for homeostasis and metabolism [95]. For instance, FOXA2 can alter chromatin structure to create a gene regulatory element. This transcription factor helps the adhesion of other transcription factors when opening the highly condensed chromatin and this affects the receptor for estrogen, androgens, and glucocorticoids [67]. The presence of insulin leads to inhibition of FOXA2 because insulin can activate the PI3K/Akt pathway via a phosphorylation-dependent manner[76]. Concisely, other factors can regulate the activation or inhibition of FOXA2 [76].

FOXA2 differs from proteins of the same family such as FOXA1 and FOXA3 by being present exclusively in the epithelium of the uterus [36]. Specifically,

FOXA2 appears to control uterine gland development in mouse uteri. Furthermore, neonatal FOXA2-deleted mice did not have gland in their uteri [96]. FOXA2 is also necessary for uterine decidualization and there is no possibility of decidualization, and implantation in mutant mice without FOXA2 [36,37]. Thus, these examples help to prove that FOXA2 has a multitude of key roles both in the development and maintenance of glands, and in their activities related to embryo implantation. So, the goal of this experiment is to see if conditional Akt KO affect FOXA2 through estrous cycle. Our hypothesis is that a single or double inhibition of Akt will cause an increase in FOXA2 only in the estrous phase where FOXA2 will normally be excluded from the nucleus by Akt isoforms, since p-Akt can inhibit FOXA2 [76, 97]. There is no significant difference in the proestrus, estrus and metestrus phases, as shown in Supplementary Figure S8. Our results show that there was an increase in FOXA2 quantity in the PR-Cre/Akt 1-3 genotype in the diestrus estrous cycle (Fig. 4 & Fig. S4), compared with the Wt genotype. There three plausible explanations for these results. Firstly, it is possible that there is a high expression of FOXA2 only in diestrus and that the absence of the proteins Akt 1 and Akt 3 that would normally inhibit FOXA2 would no longer do so. However, the analysis of the amount of FOXA2 in the four phases of the estrous cycle does not show any significant difference in Wt control mice (supplementary Fig. S8), so there is no increase in the amount of FOXA2 in diestrus. This explanation is therefore unlikely. Secondly, it is possible that there is too little estradiol in the diestrus phase (where there is one of the lowest expressions of estradiol in the estrous cycle in mice [44]) to activate Akt phosphorylation, and thus inhibit FOXA2, explaining the increase in FOXA2.

Thirdly, we assume that estradiol activates mainly Akt 2 in proestrus where there is a high expression of estradiol (Fig. 2). Thus, another hypothesis would be

that progesterone activates rather Akt 1 and Akt 3 in diestrus where progesterone is strongly expressed [44] and an increase in p-Akt exclusively in diestrus was observed in Figure 1. Thus, the absence of these two isoforms would allow an overexpression of FOXA2, normally counteracted by a high level of p-Akt in diestrus. To note, p-Akt phosphorylate FOXA2 and p-FOXA2 is excluded from the nucleus [76]. In our IHC analyses, only the level of FOXA2 that is nuclear is calculated.

In conclusion, the third explanation is preferred: an increase in the amount of FOXA2 exclusively in diestrus and in the absence of Akt 1 and Akt 3 would be caused by an increase in p-Akt exclusively in diestrus (Fig. 1) and the particularity that double KO of Akt 1 and Akt 3 must arrive at the same time.

## Conclusion

The overall results of this study are a decrease in p-Akt and K18 levels in proestrus upon inhibition of Akt 2, as well as an increase in FOXA2's level in diestrus upon dual conditional inhibition of Akt 1 and Akt 3. All the results of immunohistochemistry of murine uteri of the 4 estrous phases selectively deficient in single or double for the three isoforms of Akt helped us to understand the consequences of Akt inhibition through these three effector proteins essential to the development and maintenance of uterine glands during the estrous cycle.

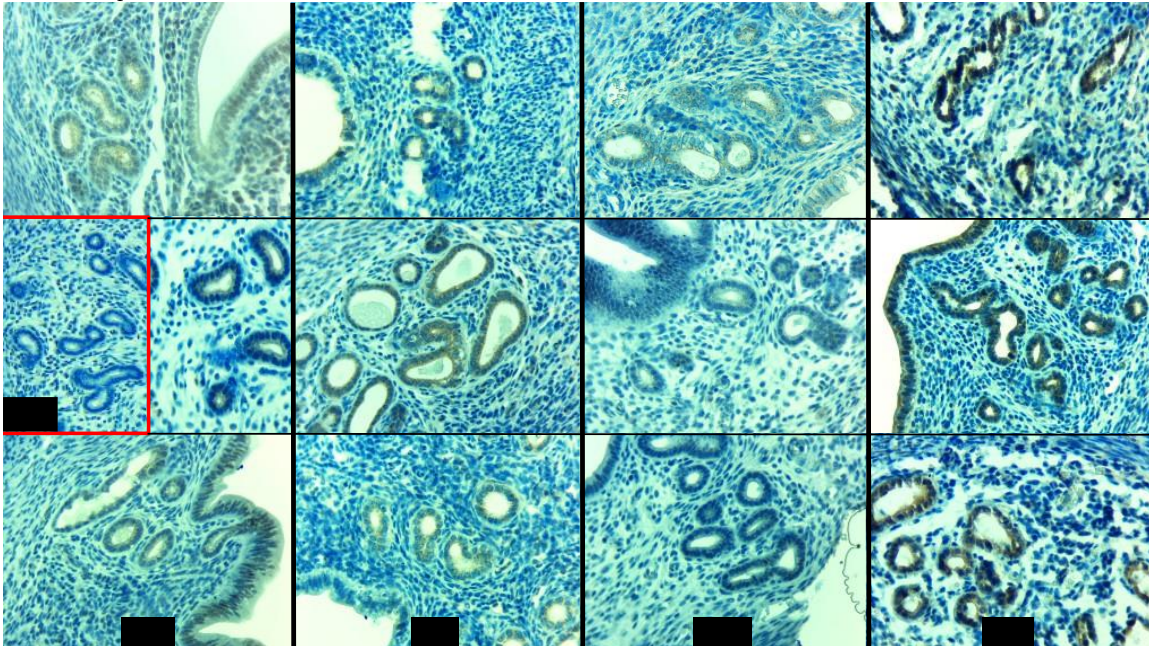
One of the next steps to better characterize the unique mouse models is the blood analysis through ELISA of progesterone and estradiol levels in all genotypes and estrous cycles. This will permit to know if the inhibition of Akt affects his own pathway through retro-activation. Another step would be to quantify each Akt's isoforms in our 28 genotypes via Western blots or IHCs. This would allow us to understand how the compensation phenomenon acts according to single or double



inhibitions and will help prove the truthfulness of the compensation phenomenon. These experiences would undoubtedly allow to help explain why the inhibition of Akt increase FOXA2 and the decrease of p-Akt and K18. Furthermore, we could then make the direct link between progesterone and estradiol expression, and Akt activation. Also, we could specifically link each expression of an Akt isoform to an effector protein such as K18 and FOXA2, and it would also be possible to link all these to the different estrous cycles. Finally, this study helped us to better understand the effects of Akt inhibition on our effectors of interest and through the estrous cycle.

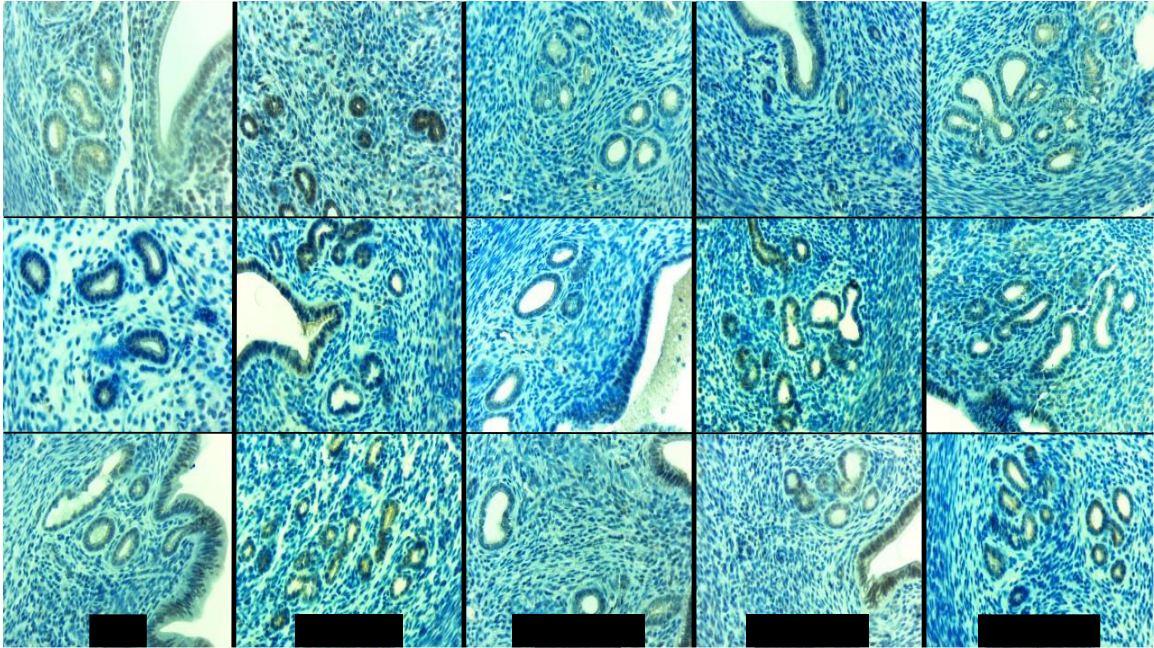
## Appendix

**\*\*\*Note:** For Supplementary Figures S1 to S4, only Supplementary Figure S1 shows a single image of a negative control. However, all negative controls were checked for all experiments performed, and the experiment repeated if the negative control was positive.

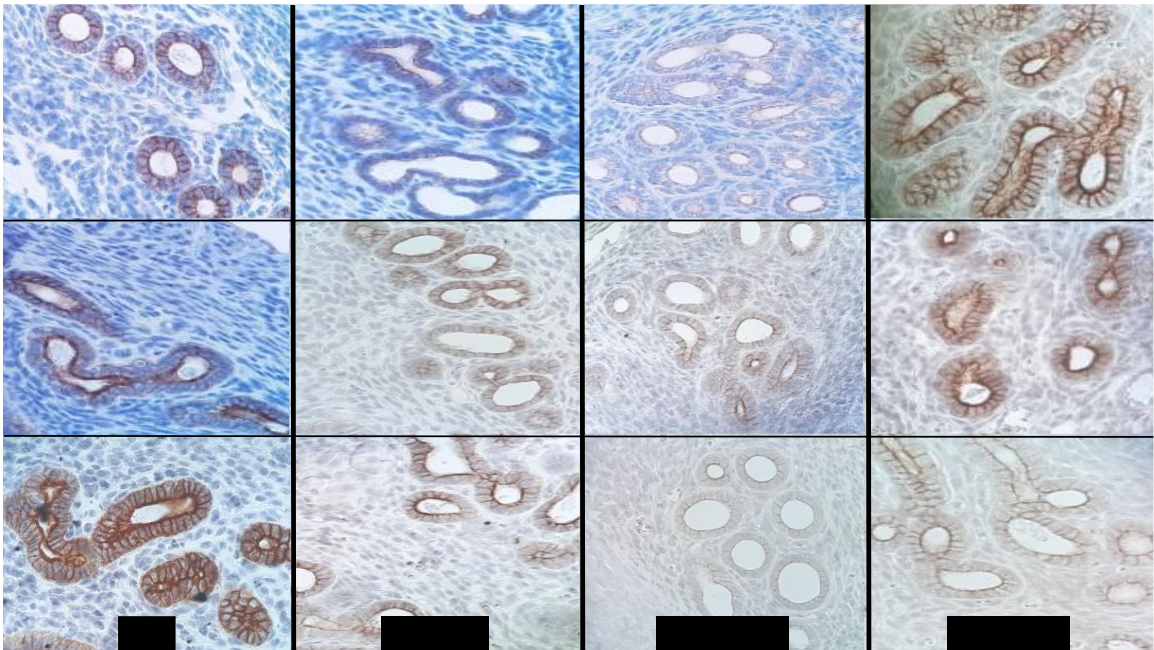


**Supplemental Figure S1. IHC of p-Akt in the uterus of mice of the 4 phases of the estrous cycle on the Wt genotype.** P-Akt immunostaining of Wt uterus on the four phases of the estrous cycle; proestrus, estrus, metestrus and diestrus (3 photos in column per estrous cycle).



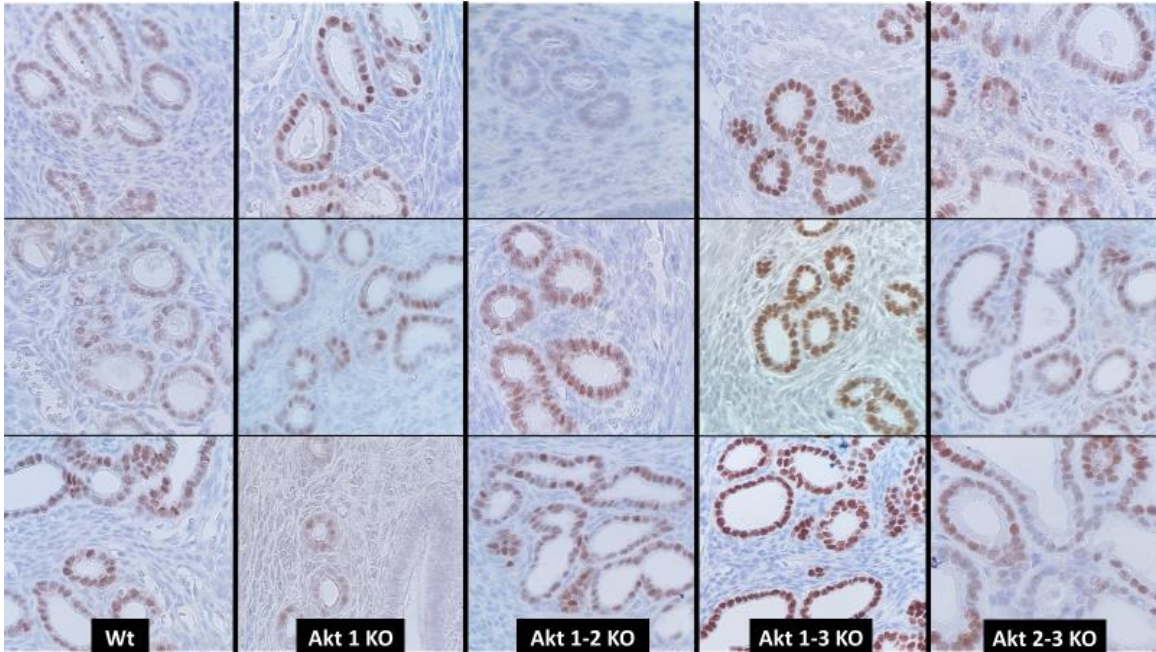


**Supplemental Figure S2. IHC of p-Akt protein in the uterus of mice of all Akt KO genotypes during the proestrus phase.** P-Akt immunostaining of uterus on the proestrus cycle; Wt, PR-Cre/Akt1, PR-Cre/Akt2, PR-Cre/Akt1-2 and PR-Cre/Akt2-3 (3 photos in column per genotype).

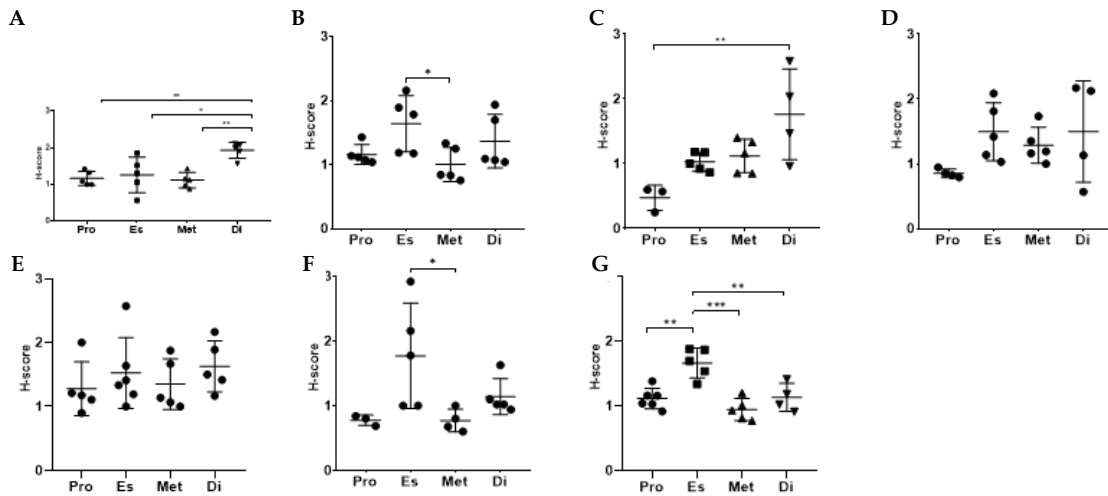


**Supplemental Figure S3. IHC of K18 protein in the uterus of mice of all Akt KO genotypes during the proestrus phase.** K18 immunostaining of uterus on the proestrus cycle; Wt, PR-Cre/Akt1, PR-Cre/Akt2 and Akt3 KO (3 photos in column per genotype).

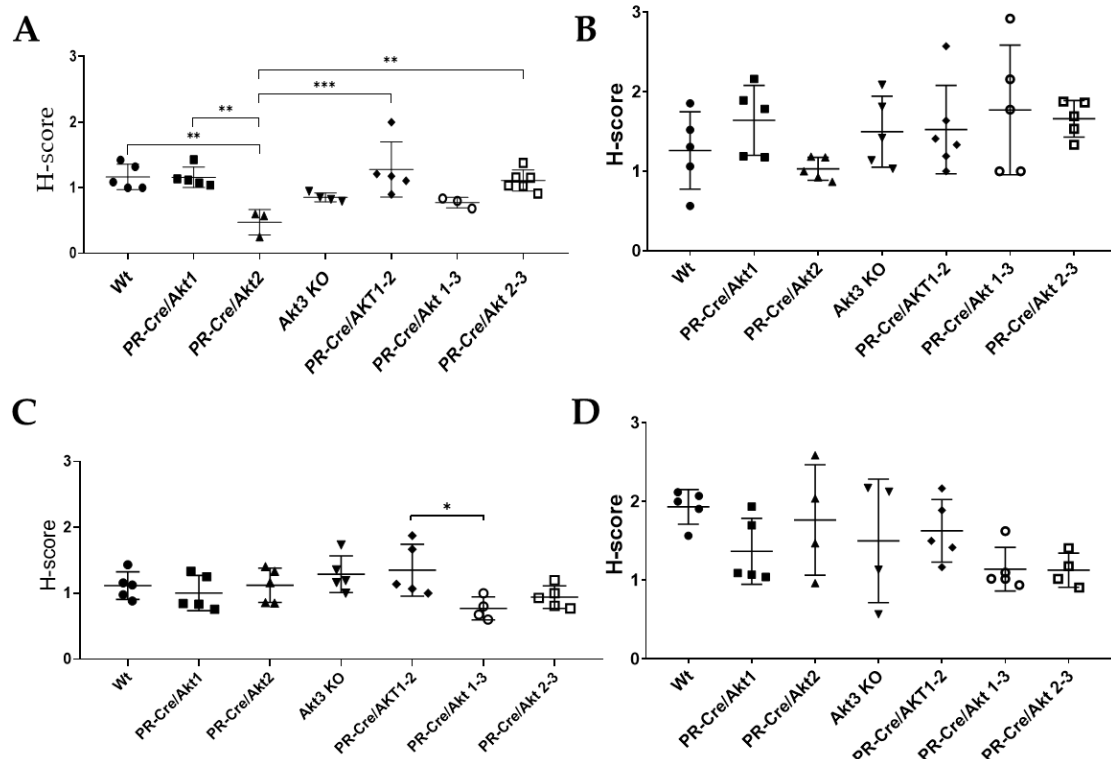




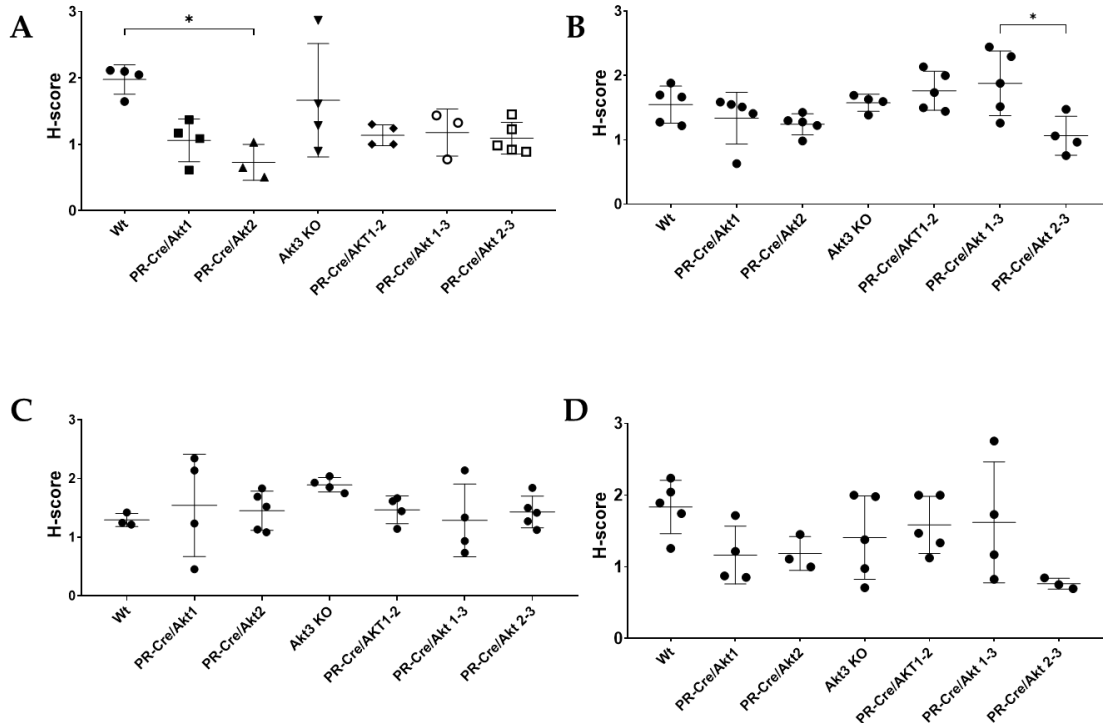
**Supplemental Figure S4. IHC of FOXA2 protein in the uterus of mice of all Akt KO genotypes during the diestrus phase.** FOXA2 immunostaining of uterus on the diestrus cycle; Wt, PR-Cre/Akt1, PR-Cre/Akt1-2 PR-Cre/Akt1-3 and PR-Cre/Akt2-3 (3 photos in column per genotype).



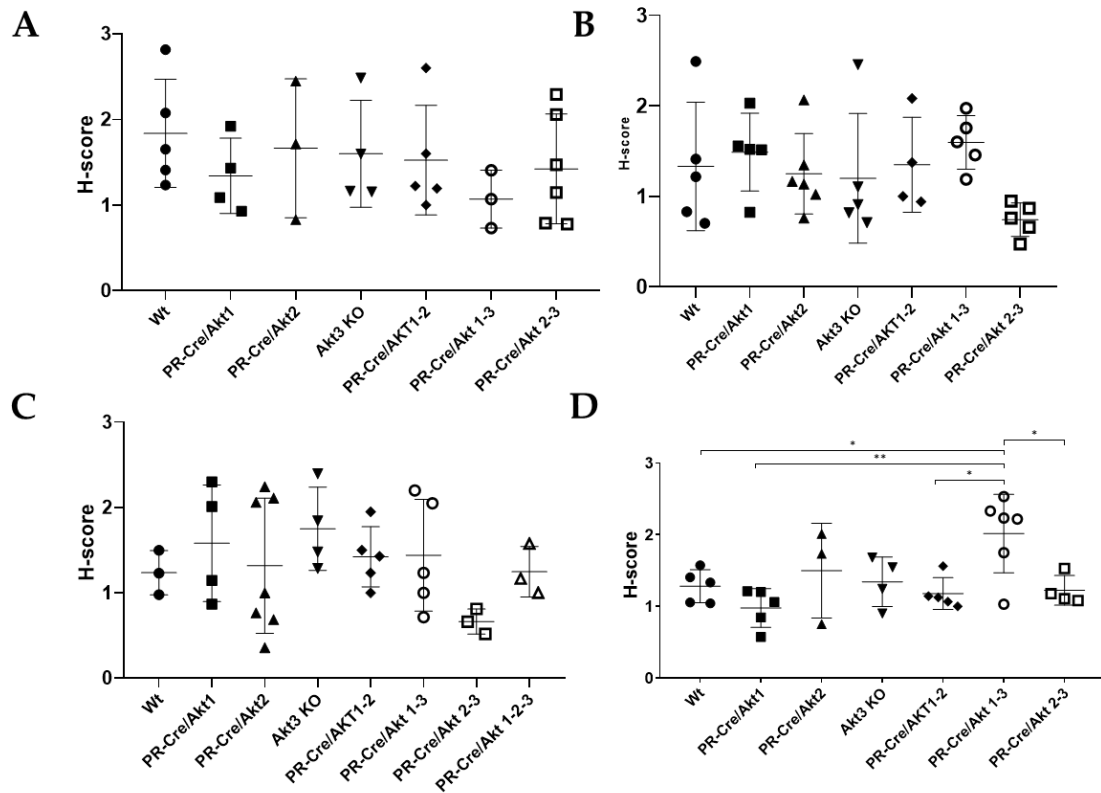
**Supplemental Figure S5. Quantification of p-Akt in the uterus of mice of the 4 phases of the estrous cycle.** (A-F) P-Akt IHC scores of uterus on the four phases of the estrous cycle; Wt (A), PR-Cre/Akt1 (B), PR-Cre/Akt2 (C), Akt3 KO (D), PR-Cre/Akt1-2 (E), PR-Cre/Akt1-3 (F) and PR-Cre/Akt2-3 (G). The signal quantities obtained are presented as the individual data of each mouse with the mean  $\pm$  standard deviation (n=5). ANOVA and Tukey tests were performed where  $p < 0.05 = *$ ;  $p < 0.01 = **$ ;  $p < 0.01 = **$ ;  $p < 0.001 = ***$ .



**Supplemental Figure S6. Quantification of p-Akt protein in the uterus of mice of all Akt KO genotypes during the four oestral cycle. (A-D) P-Akt IHC scores of all genotypes per phase; proestrus (A), estrus (B), metestrus (C) and diestrus (D). The signal quantities obtained are presented as the individual data of each mouse with the mean  $\pm$  standard deviation ( $n \pm 5$ ). ANOVA and Tukey tests were performed where  $p < 0.05 = *$ ;  $p < 0.01 = **$  and  $p < 0.001 = ***$ .**



**Supplemental Figure S7. Quantification of K18 protein in the uterus of mice of all Akt KO genotypes during the four oestral cycle. (A-D) K18 IHC scores of all genotypes per phase; proestrus (A), estrus (B), metestrus (C) and diestrus (D). The signal quantities obtained are presented as the individual data of each mouse with the mean  $\pm$  standard deviation ( $n \pm 5$ ). ANOVA and Tukey tests were performed where  $p < 0.05 = *$ . Grubbs test was performed to remove outliers ( $\alpha = 0.2$ ).**



**Supplemental Figure S8. Quantification of FOXA2 protein in the uterus of mice of all Akt KO genotypes during the four oestral cycle.** (A-D) FOXA2 IHC scores of all genotypes per phase; proestrus (A), estrus (B), metestrus (C) and diestrus (D). The signal quantities obtained are presented as the individual data of each mouse with the mean  $\pm$  standard deviation ( $n \pm 5$ ). ANOVA and Tukey tests were performed where  $p < 0.05 = *$ ;  $p < 0.01 = **$ ;  $p < 0.001 = ***$ .

## References

4. Fortier, A.M., E. Asselin, and M. Cadrin, *Functional specificity of Akt isoforms in cancer progression*. *Biomol Concepts*, 2011. **2**(1-2): p. 1-11.
5. Chin, Y.R. and A. Toker, *Function of Akt/PKB signaling to cell motility, invasion and the tumor stroma in cancer*. *Cellular Signalling*, 2009. **21**(4): p. 470-476.
6. Toker, A. and M. Yoeli-Lerner, *Akt Signaling and Cancer: Surviving but not Moving On*. *Cancer Research*, 2006. **66**(8): p. 3963-3966.
7. Datta, S.R., A. Brunet, and M.E. Greenberg, *Cellular survival: a play in three Akts*. *Genes Dev*, 1999. **13**(22): p. 2905-27.
12. Chen, W.S., et al., *Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene*. *Genes Dev*, 2001. **15**(17): p. 2203-8.
13. Cho, H., et al., *Akt1/PKB $\alpha$  Is Required for Normal Growth but Dispensable for Maintenance of Glucose Homeostasis in Mice\**. *Journal of Biological Chemistry*, 2001. **276**(42): p. 38349-38352.
14. Cho, H., et al., *Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta)*. *Science*, 2001. **292**(5522): p. 1728-31.

15. Garofalo, R.S., et al., *Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB beta*. J Clin Invest, 2003. **112**(2): p. 197-208.
16. Frankish, H., *Akt2-deficient mice show symptoms of type 2 diabetes*. The Lancet, 2001. **357**(9270): p. 1771.
17. Easton, R.M., et al., *Role for Akt3/Protein Kinase B in Attainment of Normal Brain Size*. Molecular and Cellular Biology, 2005. **25**(5): p. 1869-1878.
18. Yang, Z.Z., et al., *Dosage-dependent effects of Akt1/protein kinase Balpha (PKBalpha) and Akt3/PKBgamma on thymus, skin, and cardiovascular and nervous system development in mice*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(23): p. 10407-18.
19. Peng, X.D., et al., *Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2*. Genes Dev, 2003. **17**(11): p. 1352-65.
20. Dummler, B., et al., *Life with a single isoform of Akt: mice lacking Akt2 and Akt3 are viable but display impaired glucose homeostasis and growth deficiencies*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(21): p. 8042-51.
23. Vanhaesebroeck, B. and D.R. Alessi, *The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB*. Biochem J, 2000. **346 Pt 3**(Pt 3): p. 561-76.
25. Ersahin, T., N. Tuncbag, and R. Cetin-Atalay, *The PI3K/AKT/mTOR interactive pathway*. Mol Biosyst, 2015. **11**(7): p. 1946-54.
36. Levenga, J., et al., *AKT isoforms have distinct hippocampal expression and roles in synaptic plasticity*. Elife, 2017. **6**.
37. Hinz, N. and M. Jücker, *Distinct functions of AKT isoforms in breast cancer: a comprehensive review*. Cell Commun Signal, 2019. **17**(1): p. 154.
39. Dery, M.-C., et al., *Regulation of Akt expression and phosphorylation by 17 $\beta$ -estradiol in the rat uterus during estrous cycle*. Reproductive Biology and Endocrinology, 2003. **1**(1): p. 47.
41. Cinar, O., et al., *Differential regulation of Akt phosphorylation in endometriosis*. Reprod Biomed Online, 2009. **19**(6): p. 864-71.
43. Soyal, S.M., et al., *Cre-mediated recombination in cell lineages that express the progesterone receptor*. Genesis, 2005. **41**(2): p. 58-66.
44. Croy, B.A., et al., *The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy*. 2014.
47. Guo, R.X., et al., *17 beta-estradiol activates PI3K/Akt signaling pathway by estrogen receptor (ER)-dependent and ER-independent mechanisms in endometrial cancer cells*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2006. **99**(1): p. 9-18.
48. Stoica, G.E., et al., *Estradiol Rapidly Activates Akt via the ErbB2 Signaling Pathway*. Molecular Endocrinology, 2003. **17**(5): p. 818-830.
49. Guzeloglu Kayisli, O., et al., *In Vivo and In Vitro Regulation of Akt Activation in Human Endometrial Cells Is Estrogen Dependent*. Biology of Reproduction, 2004. **71**(3): p. 714-721.
50. Allen, E., *The oestrous cycle in the mouse*. American Journal of Anatomy. **30**: p. 297-371.
52. Jacob, J.T., et al., *Types I and II Keratin Intermediate Filaments*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2018. **10**(4).

54. Roux, A., et al., *Keratin 8/18 regulation of insulin receptor signaling and trafficking in hepatocytes through a concerted phosphoinositide-dependent Akt and Rab5 modulation*. The FASEB Journal, 2017. **31**(8): p. 3555-3573.
56. Eriksson, J.E., et al., *Introducing intermediate filaments: from discovery to disease*. The Journal of Clinical Investigation, 2009. **119**(7): p. 1763-1771.
60. Ku, N.O., et al., *Cytoskeletal keratin glycosylation protects epithelial tissue from injury*. Nat Cell Biol, 2010. **12**(9): p. 876-85.
61. Lamontagne, S., *Association entre les protéines de filaments intermédiaires de kératines 8 et 18 et des protéines de la voie de signalisation P13K/AKT/NF-KB dans différentes lignées cellulaires tumorales*, U.d.Q.à. Trois-Rivières, Editor. 2017. p. 61
62. Fortier, A.M., et al., *Akt isoforms regulate intermediate filament protein levels in epithelial carcinoma cells*. FEBS Lett, 2010. **584**(5): p. 984-8.
67. Jeong, J.W., et al., *Foxa2 is essential for mouse endometrial gland development and fertility*. Biol Reprod, 2010. **83**(3): p. 396-403.
72. Falangola, M.F., et al., *Histological co-localization of iron in Abeta plaques of PS/APP transgenic mice*. Neurochem Res, 2005. **30**(2): p. 201-5.
74. Kazi, A.A., K.H. Molitoris, and R.D. Koos, *Estrogen rapidly activates the PI3K/AKT pathway and hypoxia-inducible factor 1 and induces vascular endothelial growth factor A expression in luminal epithelial cells of the rat uterus*. Biol Reprod, 2009. **81**(2): p. 378-87.
75. Yu, P., et al., *Progesterone modulates endothelial progenitor cell (EPC) viability through the CXCL12/CXCR4/PI3K/Akt signalling pathway*. Cell Prolif, 2016. **49**(1): p. 48-57.
76. Wolfrum, C., et al., *Insulin regulates the activity of forkhead transcription factor Hnf-3beta/Foxa-2 by Akt-mediated phosphorylation and nuclear/cytosolic localization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(20): p. 11624-9.
77. Miricescu, D., et al., *PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in Breast Cancer: From Molecular Landscape to Clinical Aspects*. Int J Mol Sci, 2020. **22**(1).
78. Dobbin, Z.C. and C.N. Landen, *The importance of the PI3K/AKT/MTOR pathway in the progression of ovarian cancer*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(4): p. 8213-27.
79. Nicholson, K.M. and N.G. Anderson, *The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy*. Cellular Signalling, 2002. **14**(5): p. 381-395.
80. Yatabe, Y., et al., *Best Practices Recommendations for Diagnostic Immunohistochemistry in Lung Cancer*. J Thorac Oncol, 2019. **14**(3): p. 377-407.
81. Wolff, A.C., et al., *American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer*. Archives of Pathology & Laboratory Medicine, 2007. **131**(1): p. 18-43.
82. Kim, S.-W., J. Roh, and C.-S. Park, *Immunohistochemistry for Pathologists: Protocols, Pitfalls, and Tips*. Journal of pathology and translational medicine, 2016. **50**(6): p. 411-418.
83. Laurence Tardif, P.A., Dadou Lokengo, Sophie Parent, Eric Asselin *Effect of Akt1, Akt2 and Akt3 specific endometrial deletion and their combinations in the mouse uterus*. 2021.



84. Easton, R.M., et al., *Role for Akt3/protein kinase Bgamma in attainment of normal brain size*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(5): p. 1869-78.
85. Tschopp, O., et al., *Essential role of protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis*. Development, 2005. **132**(13): p. 2943-54.
86. Gonzalez, E. and T.E. McGraw, *The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer*. Cell cycle (Georgetown, Tex.), 2009. **8**(16): p. 2502-2508.
87. Yang, Z.-Z., et al., *Protein kinase B alpha/Akt1 regulates placental development and fetal growth*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(34): p. 32124-32131.
88. Brand, Y., et al., *All Akt Isoforms (Akt1, Akt2, Akt3) Are Involved in Normal Hearing, but Only Akt2 and Akt3 Are Involved in Auditory Hair Cell Survival in the Mammalian Inner Ear*. PLOS ONE, 2015. **10**(3): p. e0121599.
89. Yu, H., T. Littlewood, and M. Bennett, *Akt isoforms in vascular disease*. Vascular Pharmacology, 2015. **71**: p. 57-64.
90. Zheng, S., et al., *Progesterone enhances vascular endothelial cell migration via activation of focal adhesion kinase*. J Cell Mol Med, 2012. **16**(2): p. 296-305.
91. Santi, S.A. and H. Lee, *The Akt isoforms are present at distinct subcellular locations*. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2010. **298**(3): p. C580-C591.
92. Levenga, J., et al., *AKT isoforms have distinct hippocampal expression and roles in synaptic plasticity*. bioRxiv, 2017: p. 168336.
93. Fortier, A.M., E. Asselin, and M. Cadrin, *Keratin 8 and 18 loss in epithelial cancer cells increases collective cell migration and cisplatin sensitivity through claudin1 up-regulation*. J Biol Chem, 2013. **288**(16): p. 11555-71.
94. Ku, N.O. and M.B. Omary, *A disease- and phosphorylation-related nonmechanical function for keratin 8*. J Cell Biol, 2006. **174**(1): p. 115-25.
95. Sun, L., X.J. Tang, and F.M. Luo, *Forkhead box protein A2 and T helper type 2-mediated pulmonary inflammation*. World J Methodol, 2015. **5**(4): p. 223-9.
96. Kelleher, A.M., et al., *Forkhead box a2 (FOXA2) is essential for uterine function and fertility*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2017. **114**(6): p. E1018-E1026.
97. Howell, J.J. and M. Stoffel, *Nuclear export-independent inhibition of Foxa2 by insulin*. J Biol Chem, 2009. **284**(37): p. 24816-24.

### III - DISCUSSION

Les interactions qui s'effectuent entre le cycle œstral et les trois isoformes d'Akt sont très complexes et nos connaissances concernant leurs liens sont aussi très limitées. La plupart des études s'intéresse uniquement à une ou deux isoformes d'Akt dans un type cellulaire et ne font pas de recherche sur les trois isoformes en même temps. De plus, un grand nombre d'études utilise une technique *in vitro* afin de faciliter la reproductibilité des expériences. Hélas, même si des cellules sont traitées avec différentes hormones, le cycle œstral ne peut être reproduit fidèlement *in vitro*. En effet, les conditions normales des unités fonctionnelles de l'utérus, aussi appelées glandes utérines, sont modulées par une variation des quantités des facteurs de croissance, des hormones, des cytokines ainsi que d'autres facteurs qui contrôlent les changements des phases du cycle œstral.

Ainsi, le but principal de notre étude est d'élargir notre réseau de connaissances d'Akt au cours du cycle oestral en utilisant un modèle Akt KO conditionnel de deux isoformes et un modèle Akt 3 KO total. Afin de mieux pallier les nombreux effets néfastes d'une inhibition complète simple et/ou double des isoformes d'Akt, de nouveaux modèles de souris ont été créés dans notre laboratoire. Pour nos études de l'ovaire et de l'utérus, nous avons transformé des souris dans lesquelles l'expression des différentes isoformes d'Akt a été inhibée exclusivement dans les cellules exprimant le récepteur à la progestérone (PR). Des souris PR-Cre ont été données à notre laboratoire par Dr Franco De Mayo (Baylor College of Medicine) [43]. Les souris PR-cre sont des souris qui utilisent le système Cre-LoxP. Ce système permet d'inhiber un gène choisi ayant deux insert LoxP dans sa séquence génomique [43]. Ainsi, lors de l'expression de la protéine couplée à l'enzyme Cre, le gène ayant les inserts LoxP sera inhibé [43], comme les gènes

Akt 1 et Akt 2 dans cette étude (voir Figure 4). Dans notre cas, le récepteur à la progestérone est lié à l'enzyme Cre (PR-Cre)[43]. Ainsi, seules les cellules possédant le récepteur à la progestérone (par exemple les cellules des ovaires et de l'utérus) auront les gènes Akt 1 et Akt 2 inactifs. Cela a permis de créer une combinaison de nouveaux génotypes qui sont viables et qui peuvent se reproduire. Il y a donc six nouveaux génotypes plus un contrôle Wt qui peuvent être étudiés dans le cycle œstral, soit les génotypes PR-Cre/Akt1, PR-Cre/Akt2, Akt3 KO, PR-Cre/AKT1-2, PR-Cre/Akt 1-3 et PR-Cre/Akt 2-3 (représentés dans la Figure 4) dans chacune des phases proestrus, estrus, metestrus et diestrus. Notre modèle de souris PR-Cre/Akt se caractérise par l'inhibition sélective des isoformes 1, 2 et/ou 3 d'Akt dans les cellules des organes exprimant le récepteur à la progestérone, comme les glandes mammaires, les ovaires et l'utérus [43].

Est-ce que notre modèle PR-Cre/Akt a un impact sur notre étude et les résultats présentés? Plusieurs impacts sont à prévoir sur la fonction ovarienne et par conséquent, le cycle œstral et la fonction utérine comme les glandes utérines. Les plus grands impacts et observables sont la diminution de la fertilité chez la souris femelle (diminution de la taille de la portée) et l'infertilité chez les souris PR-Cre/Akt 1-2-3 [98]. De plus, les souris PR-Cre/Akt 1-2 ont moins de glandes endométriales comparativement aux souris Wt [83, 98]. Cependant, la réponse simple à cette question est que l'utilisation de PR-Cre n'a pas d'impact majeur sur notre étude, puisque les souris sont fertiles [98] et le niveau de p-Akt<sub>total</sub> ne varie pas significativement dans aucun des génotypes/phases étudiés, à l'exception du génotype PR-Cre/Akt 2 en proestrus dans le (Fig. 2 et S2 de l'article). De plus, les glandes utérines ont réussi à se développer dans en quantité normale à l'exception de génotype PR-Cre/Akt 1-2 [83]. Finalement, les résultats des Figures 2 et S2 de l'article nous ont permis d'émettre l'hypothèse que les isoformes d'Akt se

compenseraient entre elles lors de l'inhibition simple et double de celles-ci, réduisant considérablement l'impact de leurs délétions sur le modèle utilisant le système PR-Cre.

Afin d'élargir nos connaissances sur les effets d'Akt dans le cycle œstral, nous avons étudié les trois protéines p-Akt, K18 et FOXA2 afin de mieux comprendre le rôle des différentes isoformes d'Akt. Ces protéines ont été sélectionnées parce qu'elles sont fortement affectées par l'activité des isoformes d'Akt et parce qu'elles sont impliquées dans la régulation, le développement et/ou la croissance des glandes utérines.

### 3.1 Les variations des quantités de p-Akt dans les glandes utérines

Il est observé dans la Figure 1 de l'article un faible niveau de p-Akt en proestrus et metestrus, un niveau moyen en estrus et un fort niveau en diestrus (tous les résultats dans le génotype Wt). Pour la quantité de progestérone dans la Figure 5, il y a un faible niveau en proestrus et estrus, un niveau moyen en metestrus et un fort niveau en diestrus. En comparant les variations des quantités de progestérone et de p-Akt à travers les quatre phases œstrales, le niveau de p-Akt (Fig. 1 de l'article) est similaire au niveau de la progestérone (Fig. 5) dans les souris de type sauvage ou « Wild type » (Wt). De plus, notre étude démontre un niveau significativement plus grand de p-Akt uniquement en diestrus, comparé aux trois autres phases du cycle dans le génotype Wild Type (Fig. 1 de l'article). Donc, il est possible que l'activation d'Akt soit une réponse directe de l'action de la progestérone (probablement de la progestérone P4 d'origine ovarienne) dans les glandes utérines murines [75]. Il y a dans la phase diestrus davantage de mitose des cellules épithéliales glandulaires comparativement à la phase metestrus; cependant, le résultat final des phases diestrus et proestrus est une diminution de

la quantité des cellules glandulaires et une augmentation de l'activité fonctionnelle glandulaire [50]. Ainsi, la hausse du niveau de p-Akt pourrait être corrélée à la hausse de progestérone en diestrus, en raison du besoin de l'augmentation de la mitose dans la phase diestrus.

Lors de l'application du protocole d'IHCs de la protéine p-Akt sur les utérus murins entre les différents génotypes du même cycle, les résultats des analyses du « ordinary one-way ANOVA » sont : premièrement, une diminution significative du niveau de p-Akt dans le génotype PR-Cre/Akt 2 comparativement au génotype Wt dans la phase proestrus (Fig. 2 de l'article); deuxièmement, les trois autres phases œstrales ne présentent pas de différences significatives entre les sept génotypes (Fig. S6 de l'article). Cependant, il devrait y avoir un plus grand nombre de génotypes dont la quantité de p-Akt devrait diminuer, puisque l'absence d'une protéine par inhibition totale (KO) empêche l'apparition de sa forme phosphorylée (Fig. S6 de l'article). En conclusion, dans l'ensemble des génotypes et lorsque les génotypes sont comparés dans la même phase du cycle, il y a une diminution de p-Akt exclusivement lors de l'inhibition KO conditionnelle d'Akt 2 dans la phase proestrus (Fig. 2 de l'article). Alors, même si une ou deux isoformes d'Akt sont absentes, l'isoforme qui n'est pas inhibée est alors suractivée, ce qui correspond à un phénomène de compensation. Un article a décrit la compensation comme suit : « La compensation est définie comme un mécanisme transnational, automatique et/ou volontaire par lequel une atypicité génétique, neuronale, cognitive et/ou comportementale est contrecarrée par des processus corporels internes et des facteurs environnementaux »[99]. Ainsi, la définition de compensation peut être résumée pour notre étude comme l'absence d'une ou deux isoformes entraînant la suractivation ou la surexpression et suractivation de

l'isoforme restante, permettant alors de conserver une activité cellulaire semblable à son niveau initial; soit que la quantité de p-Akt ne varie pas.

Dans notre étude, il semble y avoir un phénomène de compensation dans plusieurs génotypes (Figure S6 de l'article), à l'exception du génotype PR-Cre/Akt 2 en proestrus (Figure 2F de l'article). Une hypothèse expliquant ce résultat est que l'isoforme 2 pourrait être l'une des isoformes les plus actives (peut-être la seule isoforme active en proestrus) dans la phase proestrus et qu'Akt 2 ne peut pas être compensé. Pour reformuler, Akt 2 serait majoritairement activé en proestrus, alors que Akt 1 et/ou Akt 3 participent aux autres phases. Il y a deux questions qui nécessitent une réponse : Premièrement, Pourquoi y a-t-il une diminution significative de p-Akt lors d'une inhibition d'Akt 2 exclusivement en proestrus et deuxièmement, pourquoi n'y a-t-il pas une diminution de p-Akt dans les génotypes PR-Cre/Akt 1-2 et PR-Cre/Akt 2-3 en proestrus? Premièrement, il a été énoncé précédemment que la progestérone active Akt [75, 90] et il y a un plus petit niveau de p-Akt en proestrus, comparativement à la phase diestrus (Fig 1E de l'article). Il est possible qu'une faible concentration de progestérone ne puisse pas permettre l'activation des autres isoformes d'Akt. Finalement, il est aussi possible que Akt 2 soit l'unique isoforme activée et en quantité détectable en proestrus dans les glandes utérines.

Une réponse plausible pour la deuxième question repose sur le phénomène de compensation : il semble qu'il faille l'inhibition de deux isoformes où il est possible que le phénomène de compensation survienne suivant la diminution d'une certaine quantité des trois isoformes d'Akt phosphorylé et qu'il varie en réponse à la quantité des hormones exprimées. Dans la souris, les protéines Akt 1 et Akt 2 ne peuvent pas être inhibées totalement dans toutes les cellules, car la souris ne peut y survivre, comme il est énoncé dans l'introduction. Il est donc

possible que la protéine Akt est trop importante pour la survie de l'organisme et explique pourquoi il y a un phénomène de compensation chez la protéine Akt.

Il y a une certaine controverse entourant l'effet de compensation sur les 3 isoformes d'Akt. Certaines études sont en accord avec le phénomène de compensation et d'autres sont en désaccord. Par exemple, une étude montre qu'il n'y a pas de compensation lorsque les trois isoformes sont inhibées de façon simple ou double par des siARNs. Les auteurs de l'article ont observé que l'inhibition n'entraîne pas un déplacement des isoformes au niveau des localisations subcellulaires des isoformes d'Akt[91]. Ensuite, plusieurs études illustrent qu'il n'y a pas d'augmentation des niveaux de l'ARN messager et de la quantité de protéines où il y a compensation lors de l'inhibition individuelle et complète des gènes Akt1, Akt2 et Akt3 chez les souris [15, 87, 88]. Cependant, bien que ces études excluent qu'il y ait une augmentation de la compensation lorsqu'une isoforme est inhibée seule, deux des études citées précédemment et une autre étude n'excluent pas qu'il ait possiblement de la compensation partielle [87-89]; le mécanisme d'action du phénomène de compensation agirait possiblement sur le contrôle de la phosphorylation et/ou sur les niveaux de pan-Akt, selon les hypothèses tirées des résultats de notre étude. Les auteurs de cette étude expliquent que malgré le fait que différentes isoformes contrôlent différents processus cellulaires, ils ont utilisé des analyses phénotypiques afin d'émettre une hypothèse de compensation uniquement lors d'une double inhibition des isoformes d'Akt [86].

Finalement, trois études concluent qu'il est possible qu'il y ait de la compensation partielle [87-89] et trois autres études concluent qu'il est possible qu'il y ait un phénomène de compensation complète lors de l'inhibition simple et double des isoformes d'Akt [4, 25, 86]. En se basant sur plusieurs études

impliquant l'inhibition simple et double d'Akt, l'étude de Fortier (2011) et l'étude de Gonzalez (2009) ont conclu avec l'aide d'analyses phénotypiques qu'il y avait un phénomène de compensation lors de l'inhibition double chez la souris [4, 86]. L'étude de Ersahin (2015) se concentre sur l'étude des relations des voies de signalisation PI3K/AKT/mTOR et RAF/MEK/ERK dans un contexte d'hyperactivité ou de modifications lors de cancers. Les auteurs de l'étude ont constaté qu'il y avait une compensation entre ces deux voies via l'interaction des molécules effectrices corégulées par Akt et ERK [25].

En conclusion, la diminution du niveau de p-Akt en dans le génotype PR-Cre/Akt 2 lors de la phase proestrus (Fig. 2F de l'article) serait due à la possibilité qu'Akt 2 soit la seule isoforme exprimée en proestrus et due à l'importance d'Akt 2 dans la survie des glandes utérines. La phase proestrus est reconnu comme une des phases où il y a une plus grande activité fonctionnelle des glandes utérines [50] et il est possible de relier ce constat à l'activité métabolique qui est relié à l'isoforme 2 d'Akt (décrit dans le Tableau 1). En effet, il peut être émis comme hypothèse que l'activation de p-Akt 2 cause une plus grande activité fonctionnelle dans la phase proestrus et qu'une des conséquences de la diminution de p-Akt 2 (Fig. 2 de l'article) est la diminution de la quantité de kératine 18 (Fig. 3 de l'article). En effet, les kératines 8/18 sont impliqués dans la progression du cycle cellulaire, la synthèse protéique et croissance cellulaire [52], similaire aux effets de l'activité métabolique de p-Akt 2.

L'absence de diminution de p-Akt observée dans les autres génotypes/cycles où les isoformes d'Akt sont inhibées serait principalement due à un phénomène de compensation (Figure S6 de l'article). De plus, l'absence de diminution dans les génotypes PR-Cre/Akt 1-2 et PR-Cre/Akt 2-3 de la phase



proestrus serait causée par à une double inhibition des isoformes d'Akt en même temps afin d'activer le phénomène de compensation.

### 3.2 Les variations de K18 dans les glandes utérines

La protéine kératine 18 forme avec la kératine 8 les filaments intermédiaires qui font partie du cytosquelette cellulaire. Les kératines forment des réseaux dans tout le cytoplasme de la cellule et sont principalement localisées à la surface de la membrane et sont impliquées dans l'adhésion cellule-matrice et cellule-cellule. Ils se trouvent aussi en périphérie du noyau[52]. Les kératines sont une famille de protéines essentielles dans de nombreux processus régulateurs des tissus épithéliaux : progression du cycle cellulaire, synthèse protéique, croissance et interaction avec des médiateurs immunitaires et inflammatoires (visant une protection des cellules contre des stress toxiques et mécaniques) [52]. Plusieurs questions fondamentales sur les mécanismes d'actions des kératines K8/K18 demandent des réponses. En effet, l'ensemble des mécanismes d'activation, des stimuli et des protéines effectrices reliées à K8/K18 n'ont pas encore été élucidés. Par conséquent, ces mécanismes sont encore moins connus en ce qui concerne les glandes utérines. Il est cependant connu que la phosphorylation de K18 cause une résistance de l'apoptose et permet de résister au stress des kinases en agissant comme réservoir de phosphate [52]. De plus, il est possible que la paire de protéines K8/K18 puisse séquestrer des protéines de la voie PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B [61]. De plus, il a été mentionné plus tôt dans l'introduction que Akt 1 et Akt 2 peuvent augmenter l'expression de K18. Les voies de signalisation Akt et K8/K18 interagissent entre elles, mais leurs interactions sont encore peu comprises. L'hypothèse émise expliquant les interactions entre K8/K18, les trois isoformes d'Akt et le cycle œstral est la suivante :

En effet, il y a une baisse significative du niveau de K18 dans le génotype PR-Cre/Akt 2 comparativement au contrôle « Wild type » dans la phase proestrus (Figure 3E de l'article). Un article de Fortier (2010) démontre qu'une surexpression d'Akt 1 augmente la quantité de K8/K18, alors que l'activation (sans suractivation) de l'isoforme Akt 2 peut aussi augmenter l'expression protéique de K18 [62]. Ainsi, l'hypothèse retenue est que lors de l'activation d'Akt 2 dans le cycle œstral, il va y avoir augmentation l'expression protéique de K18, mais dans notre étude, l'inhibition conditionnelle d'Akt 2 devrait causer une baisse du niveau de K18, lorsqu'Akt 2 est normalement activé dans le cycle œstral. Nos résultats démontrent en effet que l'absence de l'isoforme 2 d'Akt cause une baisse de l'expression de K18 en proestrus, mais aucunement dans les trois autres phases œstrales. L'explication plausible de ce résultat est que l'activation de l'isoforme 2 d'Akt (p-Akt 2), en condition normale et lors de la phase proestrus, viendrait augmenter l'expression protéique de K18. En effet, un article de Fortier (2010) démontre que l'isoforme Akt 2 peut aussi augmenter l'expression protéique de K18 et ce via le mécanisme suivant : Akt 2 viendrait augmentant la stabilité de l'ARNm de K18 [62]. Ainsi, la baisse commune du niveau de K18 et de p-Akt dans le même cycle et lors de l'inhibition de la même isoforme démontre que l'inhibition conditionnelle d'Akt 2 (p-Akt2) empêche l'augmentation de stabilité l'ARNm de K18 et par le fait même, nuit à la traduction de K18.

Cependant, nos résultats de K18 ont une faiblesse statistique comparée aux résultats de p-Akt et de FOXA2. En effet, les résultats de K18 (données brutes) n'avaient pas de différence significative, soit un  $p \leq 0.05$ . Cependant, l'analyse visuelle de la Fig. 3 et de la Figure supplémentaire S3 illustre une différence visuelle très significative entre le contrôle Wt et le génotype PR-Cre/Akt 2. Le test de Gredds utilisé afin de déterminer la présence d'une donnée aberrante a été

utilisé. Ce test de Gredds peut exclure une seule donnée possiblement aberrante à une des deux extrémités de la cloche gaussienne, si le test juge la donnée trop éloignée des autres dans la cloche gaussienne. Cependant, si les données ne sont pas trop dispersées dans la cloche gaussienne, aucune donnée n'est retirée. Dans le contrôle Wt de la Figure 3 de l'article de ce mémoire, il y avait une donnée aberrante qui a été retirée via le test de Gredds. Cela a causé un  $p=0.01$  entre le génotype Wt et le génotype PR-Cre/Akt2. Finalement, le test de Gredds peut retirer une donnée que ce test considère aberrante, mais les données restantes ont dans notre cas une différence très significative et l'analyse visuelle confirme avec beaucoup de confiance les résultats obtenus. Une recommandation pour une prochaine étude serait d'augmenter le nombre d'échantillons pour chaque génotype pour l'analyse de K18. En conclusion, la diminution du niveau de p-Akt 2 (Fig. 2 de l'article) causerait une baisse dans la stabilité l'ARNm de K18, ce qui causerait une baisse de la transcription de K18 et une baisse du niveau K18 (Fig. 3 de l'article) et cela dans la phase proestrus.

### 3.3 Les variations de FOXA2 dans les glandes utérines

*Foxa2* est un gène qui code pour un facteur de transcription dont le rôle est important lors des multiples phases des cycles de vie des mammifères, tant lors de l'organogenèse que pour le maintien du métabolisme et de l'homéostasie [95]. Le rôle le plus important de FOXA2 est d'ouvrir la chromatine hautement condensée afin de permettre la régulation de plusieurs gènes. Cette ouverture permet plus largement le contrôle du développement des glandes utérines chez les souris en transformant l'épithélium luminal en épithélium glandulaire [67]. En plus d'aider à ouvrir la chromatine fortement condensée, FOXA2 aide la liaison d'autres facteurs de transcription et interagit avec plusieurs récepteurs des cellules

sexuelles tels que les récepteurs aux androgènes, à l'œstrogène et aux glucocorticoïdes [67]. Lorsque l'insuline active Akt (entraînant sa phosphorylation), p-Akt inhibe FOXA2[76]. Il n'est pas exclu qu'il y ait d'autres stimuli qui puissent inhiber FOXA2 par la voie Akt autre que l'insuline. Concrètement, p-Akt inhibe FOXA2 en le phosphorylant; il en résulte une exclusion du noyau et il y a ainsi un arrêt de l'expression des gènes régulés par FOXA2 [76].

Il y a un lien clair entre Akt et FOXA2, mais quel est le lien entre FOXA2 et le cycle œstral? FOXA2 est la pierre angulaire du contrôle du développement des glandes chez l'utérus murin. Ce facteur de transcription se lie à ses cibles situées sur la chromatine pour venir les inhiber ou les activer et ainsi contrôler leurs fonctions durant la cyclicité des phases œstrales [95]. Afin de connaître les liens exacts entre FOXA2 et les gènes auquel se lient afin de les contrôler, dans une étude récente, Filant et Spencer (2014) ont créé une carte du génome entier relatant tous les différents sites de liaison entre FOXA2 et ses cibles-gènes [100]. Dans l'ensemble des gènes des glandes endothéliales exprimés dans les utérus néonataux, ils ont identifié 469 liens enrichis avec FOXA2 reliés principalement aux voies WNT, au cycle cellulaire, aux jonctions cellulaires et aux adhésions focales. Chez les utérus adultes, il y a 3730 sites de liaisons entre FOXA2 et des gènes impliqués dans le métabolisme, les adhésions focales et les voies WNT [100]. Finalement, la transcription de ces gènes est impliquée dans le dynamisme engendré par les passages des différentes phases du cycle œstral, plus précisément dans le développement et le fonctionnement normal des glandes utérines. Afin d'illustrer l'importance de FOXA2 dans le développement du fonctionnement de glandes utérines, une équipe a supprimé FOXA2 au stade de développement néonatal; le résultat est une absence de glandes utérines [96].

Notre étude de la relation entre FOXA2 et Akt a pour but de démontrer si l'inhibition conditionnelle des isoformes d'Akt affecte FOXA2 au cours du cycle œstral. Notre hypothèse est qu'une simple ou double inhibition sélective des isoformes d'Akt entraînera une augmentation de FOXA2 uniquement dans la phase œstrale où FOXA2 sera normalement exclu du noyau par les isoformes de l'Akt, puisque p-Akt peut inhiber FOXA2 [76, 97]. À noter que pendant l'analyse des IHCs de FOXA2, seulement le niveau de FOXA2 nucléaire est « calculé » pour le h-score. Ainsi, nos résultats démontrent une augmentation significative du niveau de FOXA2 (dans le noyau) dans le génotype PR-Cre/Akt 1-3 dans le cycle œstral de diestrus (Fig. 4F de l'article). À noter, nos résultats concordent avec la littérature, l'inhibition d'Akt et p-Akt devrait augmenter la quantité de FOXA2 nucléaire, puisqu'il n'y a plus de protéines pour exclure FOXA2 du noyau.

Il y a trois hypothèses envisageables qui peuvent expliquer ces résultats. En premier lieu, il est possible qu'il y ait un fort niveau de FOXA2 uniquement en diestrus et que l'absence des protéines Akt 1 et Akt 3, qui normalement inhiberait FOXA2, ne le fasse plus. Cependant, l'analyse de quantité de FOXA2 dans les quatre phases du cycle œstral ne comporte pas de différence significative chez les souris contrôles Wt (données non illustrées, car non significatives), donc il n'y a pas d'augmentation de la quantité de FOXA2 en diestrus.

En second lieu, il y a dans la phase diestrus une des plus faibles expressions d'œstradiol du cycle œstral chez la souris [44]. Comme l'œstradiol est la principale hormone activant p-Akt comme énoncé plus tôt, il est possible qu'il y ait une quantité d'œstradiol trop minime pour activer la phosphorylation d'Akt, et ainsi inhiber FOXA2, expliquant la hausse du niveau de FOXA2. Par ailleurs, il faut prendre en compte le fait qu'aucune étude n'a identifié exactement quelle isoforme est activée par la phosphorylation ou encore s'il y a une, deux ou trois isoformes

activées en même temps. Ici, il semble qu'il faille inhiber deux isoformes en même temps (l'isoforme 1 et 3) afin d'observer une augmentation de la quantité de FOXA2 en diestrus. Donc, il est possible que la combinaison des deux isoformes vienne phosphoryler FOXA2 et l'exclure du noyau ou FOXA2 est inactif en conditions normales (exclusivement en diestrus).

En troisième lieu, il y a une autre hormone permettant l'activation d'Akt et c'est la progestérone. Cette hormone est exprimée fortement, et ce, uniquement en diestrus [44]. Nos résultats de ce mémoire illustrent que l'estradiol active principalement Akt 2 en proestrus où il y a une forte expression d'estradiol. Ainsi, une autre hypothèse serait que la progestérone active plutôt Akt 1 et Akt 3 en diestrus où la progestérone est fortement exprimée. Cependant, il a été observé dans la Figure 1 de l'article une augmentation de la quantité de p-Akt exclusivement en diestrus (il est possible qu'il y ait une augmentation exclusivement de p-Akt 1 et p-Akt 3 en diestrus). Donc, l'absence de ces deux isoformes permettrait un plus grand niveau de FOXA2 nucléaire, qui pourrait aussi être décrite comme une absence d'exclusion du FOXA2 nucléaire. Il sera difficile de prouver la véracité de ces hypothèses et des investigations supplémentaires seront nécessaires. Pour conclure, la troisième hypothèse est privilégiée : une augmentation de la quantité de FOXA2 nucléaire exclusivement en diestrus et en l'absence d'Akt 1 et Akt 3 serait causée par une augmentation de p-Akt exclusivement en diestrus (Fig. 1) et la particularité que le double KO d'Akt 1 et d'Akt 3 doit arriver en même temps.

Finalement, FOXA2 est impliquée dans le développement et le fonctionnement normal des glandes utérines, où le KO de FOXA2 cause ultimement une absence de glandes utérines [96]. La phase diestrus se caractérise par une augmentation de la mitose des cellules épithéliales glandulaires

comparativement à la phase metestrus. Les effets finaux des phases diestrus et proestrus sont une diminution de la quantité des cellules glandulaires et une augmentation de l'activité fonctionnelle glandulaire [50]. Plus spécifiquement, la phase diestrus est caractérisée par une étape de mitose et une seconde étape de développement fonctionnelle des glandes utérines (tout au long de la phase diestrus et qui se poursuit dans la phase proestrus). Ainsi, une augmentation de la quantité de p-Akt en diestrus observé dans la Figure 1 de l'article (possiblement p-Akt 1 et p-Akt 3) coïnciderait avec la mitose et le développement glandulaire de la phase diestrus. Finalement, l'inhibition de p-Akt 1 et de p-Akt 3 causerait une augmentation du niveau de FOXA2 nucléaire exclusivement en diestrus (Figure 4 de l'article), puisqu'il y a normalement une augmentation de p-Akt qui viendrait inhiber FOXA2 en l'excluant du noyau.

#### IV - CONCLUSION

Les résultats finaux de ce mémoire sont les suivants : Il y a un plus fort niveau de p-Akt en diestrus comparativement aux trois autres phases œstrales dans le génotype Wt, il y a une diminution de p-Akt et K18 en proestrus lors de l'inhibition d'Akt 2, ainsi qu'une augmentation de FOXA2 en diestrus lors de la

double inhibition d'Akt 1 et Akt 3. Ces résultats sont résumés dans la Figure 7.

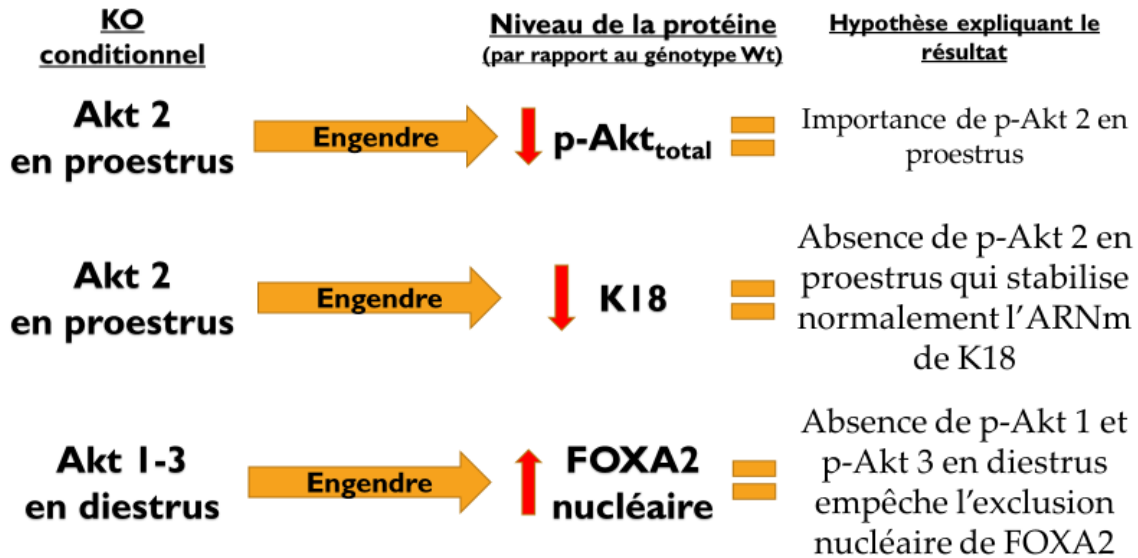


Figure 7: Conclusions majeures de ce mémoire.

L'ensemble de ces résultats a été obtenu à l'aide de la technique de l'immunohistochimie sur les utérus murins des quatre phases œstrales des souris sélectivement déficientes pour une ou deux des trois isoformes d'Akt. Les travaux de ce mémoire nous ont permis d'avoir la connaissance des différents niveaux dans le cycle œstral des trois protéines clés dans les glandes utérines cause une meilleure connaissance de la régulation de Akt et pourrait peut-être mener vers l'élaboration de nouvelles thérapies ciblées pour réduire l'infertilité (parce qu'une augmentation du niveau de p-Akt est associée à la maladie de l'endométriose, qui peut mène à de l'infertilité [41])

## V - PERSPECTIVES

L'une des prochaines étapes pour mieux caractériser nos modèles uniques de souris est l'analyse sanguine par ELISA des niveaux de progestérone et d'œstradiol dans tous les génotypes et cycles œstraux. Une autre étape consisterait



à quantifier individuellement les trois isoformes d'Akt dans nos 28 génotypes par Western blot et par IHCs. Ceci nous permettrait de comprendre comment le phénomène de compensation agit en fonction des inhibitions simples ou doubles et d'éprouver la véracité du phénomène de compensation. Ces expériences permettraient sans doute d'aider à expliquer pourquoi l'inhibition d'Akt augmente la quantité de FOXA2 et diminue les quantités de p-Akt et de K18. De plus, nous pourrions alors faire le lien direct entre l'expression de la progestérone et de l'estradiol, et l'activation d'Akt. Nous pourrions également relier spécifiquement chaque expression d'une isoforme d'Akt à une protéine effectrice telles que K18 et FOXA2, et il serait également possible de relier tout cela aux différents cycles œstraux. Enfin, cette étude nous a permis de mieux comprendre les effets de l'inhibition d'Akt sur nos effecteurs d'intérêt et à travers le cycle œstral.

## VI - RÉFÉRENCES

1. Croy, B.A., et al., *The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy*. 2014.
2. Hemmings, B.A. and D.F. Restuccia, *PI3K-PKB/Akt pathway*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(9): p. a011189.
3. Fabi, F. and E. Asselin, *Expression, activation, and role of AKT isoforms in the uterus*. REPRODUCTION, 2014. **148**(5): p. R85-R95.
4. Fortier, A.M., E. Asselin, and M. Cadrin, *Functional specificity of Akt isoforms in cancer progression*. Biomol Concepts, 2011. **2**(1-2): p. 1-11.
5. Chin, Y.R. and A. Toker, *Function of Akt/PKB signaling to cell motility, invasion and the tumor stroma in cancer*. Cellular Signalling, 2009. **21**(4): p. 470-476.
6. Toker, A. and M. Yoeli-Lerner, *Akt Signaling and Cancer: Surviving but not Moving On*. Cancer Research, 2006. **66**(8): p. 3963-3966.
7. Datta, S.R., A. Brunet, and M.E. Greenberg, *Cellular survival: a play in three Akts*. Genes Dev, 1999. **13**(22): p. 2905-27.
8. Furelaud, G., *L'invalidation d'un gène : le knock-out*. 26.06.02.
9. Wang, Q., X. Chen, and N. Hay, *Akt as a target for cancer therapy: more is not always better (lessons from studies in mice)*. British Journal of Cancer, 2017. **117**(2): p. 159-163.
10. Bellacosa, A., et al., *A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region*. Science, 1991. **254**(5029): p. 274-7.

11. Bechtel, B., *The Study That Launched 50,000 Papers (and Counting)*. Fox Chase Cancer Center Forward, 2016.
12. Chen, W.S., et al., *Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene*. *Genes Dev*, 2001. **15**(17): p. 2203-8.
13. Cho, H., et al., *Akt1/PKB $\alpha$  Is Required for Normal Growth but Dispensable for Maintenance of Glucose Homeostasis in Mice\**. *Journal of Biological Chemistry*, 2001. **276**(42): p. 38349-38352.
14. Cho, H., et al., *Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta)*. *Science*, 2001. **292**(5522): p. 1728-31.
15. Garofalo, R.S., et al., *Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB beta*. *J Clin Invest*, 2003. **112**(2): p. 197-208.
16. Frankish, H., *Akt2-deficient mice show symptoms of type 2 diabetes*. *The Lancet*, 2001. **357**(9270): p. 1771.
17. Easton, R.M., et al., *Role for Akt3/Protein Kinase B in Attainment of Normal Brain Size*. *Molecular and Cellular Biology*, 2005. **25**(5): p. 1869-1878.
18. Yang, Z.Z., et al., *Dosage-dependent effects of Akt1/protein kinase B $\alpha$  (PKB $\alpha$ ) and Akt3/PKB $\gamma$  on thymus, skin, and cardiovascular and nervous system development in mice*. *Mol Cell Biol*, 2005. **25**(23): p. 10407-18.
19. Peng, X.D., et al., *Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2*. *Genes Dev*, 2003. **17**(11): p. 1352-65.
20. Dummler, B., et al., *Life with a single isoform of Akt: mice lacking Akt2 and Akt3 are viable but display impaired glucose homeostasis and growth deficiencies*. *Mol Cell Biol*, 2006. **26**(21): p. 8042-51.
21. Cho, H., et al., *Akt1/PKB $\alpha$  Is Required for Normal Growth but Dispensable for Maintenance of Glucose Homeostasis in Mice\**. *Journal of Biological Chemistry*, 2001. **276**(42): p. 38349-38352.
22. Hollander, M.C., et al., *Akt1 deletion prevents lung tumorigenesis by mutant K-ras*. *Oncogene*, 2011. **30**(15): p. 1812-21.
23. Vanhaesebroeck, B. and D.R. Alessi, *The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB*. *Biochem J*, 2000. **346 Pt 3**(Pt 3): p. 561-76.
24. Lee, R.S., et al., *Relative Expression Levels Rather Than Specific Activity Plays the Major Role in Determining *In Vivo* AKT Isoform Substrate Specificity*. *Enzyme Research*, 2011. **2011**: p. 720985.
25. Ersahin, T., N. Tuncbag, and R. Cetin-Atalay, *The PI3K/AKT/mTOR interactive pathway*. *Mol Biosyst*, 2015. **11**(7): p. 1946-54.
26. Alessi, D.R., *Discovery of PDK1, one of the missing links in insulin signal transduction. Colworth Medal Lecture*. *Biochem Soc Trans*, 2001. **29**(Pt 2): p. 1-14.
27. Brazil, D.P. and B.A. Hemmings, *Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow*. *Trends Biochem Sci*, 2001. **26**(11): p. 657-64.
28. Jhanwar-Uniyal, M., et al., *Diverse signaling mechanisms of mTOR complexes: mTORC1 and mTORC2 in forming a formidable relationship*. *Adv Biol Regul*, 2019. **72**: p. 51-62.

29. Alessi, D.R., et al., *Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1*. *Embo j*, 1996. **15**(23): p. 6541-51.
30. Sarbassov, D.D., et al., *Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex*. *Science*, 2005. **307**(5712): p. 1098-101.
31. Jacinto, E., et al., *SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity*. *Cell*, 2006. **127**(1): p. 125-37.
32. VADLAKONDA, L., et al., *The Paradox of Akt-mTOR Interactions*. *Frontiers in Oncology*, 2013. **3**(165).
33. Brunet, A., et al., *Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor*. *Cell*, 1999. **96**(6): p. 857-68.
34. Wright, G.L., et al., *VEGF stimulation of mitochondrial biogenesis: requirement of AKT3 kinase*. *Faseb j*, 2008. **22**(9): p. 3264-75.
35. Moriya, C., et al., *Expression of matrix metalloproteinase-13 is controlled by IL-13 via PI3K/Akt3 and PKC- $\delta$  in normal human dermal fibroblasts*. *J Invest Dermatol*, 2011. **131**(3): p. 655-61.
36. Levenga, J., et al., *AKT isoforms have distinct hippocampal expression and roles in synaptic plasticity*. *Elife*, 2017. **6**.
37. Hinz, N. and M. Jücker, *Distinct functions of AKT isoforms in breast cancer: a comprehensive review*. *Cell Commun Signal*, 2019. **17**(1): p. 154.
38. Cunha, G.R., et al., *Reproductive tract biology: Of mice and men*. *Differentiation*, 2019. **110**: p. 49-63.
39. Dery, M.-C., et al., *Regulation of Akt expression and phosphorylation by 17 $\beta$ -estradiol in the rat uterus during estrous cycle*. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2003. **1**(1): p. 47.
40. Veillette, A., et al., *Regulation of the PI3-K/Akt Survival Pathway in the Rat Endometrium1*. *Biology of Reproduction*, 2013. **88**(3).
41. Cinar, O., et al., *Differential regulation of Akt phosphorylation in endometriosis*. *Reprod Biomed Online*, 2009. **19**(6): p. 864-71.
42. Dery, M.C., et al., *Regulation of Akt expression and phosphorylation by 17beta-estradiol in the rat uterus during estrous cycle*. *Reprod Biol Endocrinol*, 2003. **1**: p. 47.
43. Soyal, S.M., et al., *Cre-mediated recombination in cell lineages that express the progesterone receptor*. *Genesis*, 2005. **41**(2): p. 58-66.
44. Croy, B.A., et al., *The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy*. 2014.
45. McLaughlin, J.E. *Female Reproductive Endocrinology*. sep 2022; Available from: <https://www.merckmanuals.com/en-ca/professional/gynecology-and-obstetrics/female-reproductive-endocrinology/female-reproductive-endocrinology>.
46. Farkas, S., et al., *Estradiol and Estrogen-like Alternative Therapies in Use: The Importance of the Selective and Non-Classical Actions*. *Biomedicines*, 2022. **10**(4): p. 861.
47. Guo, R.X., et al., *17 beta-estradiol activates PI3K/Akt signaling pathway by estrogen receptor (ER)-dependent and ER-independent mechanisms in endometrial cancer cells*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2006. **99**(1): p. 9-18.

48. Stoica, G.E., et al., *Estradiol Rapidly Activates Akt via the ErbB2 Signaling Pathway*. *Molecular Endocrinology*, 2003. **17**(5): p. 818-830.
49. Guzeloglu Kayisli, O., et al., *In Vivo and In Vitro Regulation of Akt Activation in Human Endometrial Cells Is Estrogen Dependent*. *Biology of Reproduction*, 2004. **71**(3): p. 714-721.
50. Allen, E., *The oestrous cycle in the mouse*. *American Journal of Anatomy*. **30**: p. 297-371.
51. Filant, J. and T.E. Spencer, *Uterine glands: biological roles in conceptus implantation, uterine receptivity and decidualization*. *Int J Dev Biol*, 2014. **58**(2-4): p. 107-16.
52. Jacob, J.T., et al., *Types I and II Keratin Intermediate Filaments*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2018. **10**(4).
53. Schweizer, J., et al., *New consensus nomenclature for mammalian keratins*. *J Cell Biol*, 2006. **174**(2): p. 169-74.
54. Roux, A., et al., *Keratin 8/18 regulation of insulin receptor signaling and trafficking in hepatocytes through a concerted phosphoinositide-dependent Akt and Rab5 modulation*. *The FASEB Journal*, 2017. **31**(8): p. 3555-3573.
55. Vijayaraj, P., et al., *Keratins regulate protein biosynthesis through localization of GLUT1 and -3 upstream of AMP kinase and Raptor*. *J Cell Biol*, 2009. **187**(2): p. 175-84.
56. Eriksson, J.E., et al., *Introducing intermediate filaments: from discovery to disease*. *The Journal of Clinical Investigation*, 2009. **119**(7): p. 1763-1771.
57. Lim, Y., et al., *Keratin 8/18 Regulate the Akt Signaling Pathway*. *Int J Mol Sci*, 2021. **22**(17).
58. Homberg, M. and T.M. Magin, *Beyond expectations: novel insights into epidermal keratin function and regulation*. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2014. **311**: p. 265-306.
59. Snider, N.T. and M.B. Omary, *Post-translational modifications of intermediate filament proteins: mechanisms and functions*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014. **15**(3): p. 163-77.
60. Ku, N.O., et al., *Cytoskeletal keratin glycosylation protects epithelial tissue from injury*. *Nat Cell Biol*, 2010. **12**(9): p. 876-85.
61. Lamontagne, S., *Association entre les protéines de filaments intermédiaires de kératines 8 et 18 et des protéines de la voie de signalisation P13K/AKT/NF-KB dans différentes lignées cellulaires tumorales*, U.d.Q.à. Trois-Rivières, Editor. 2017. p. 61
62. Fortier, A.M., et al., *Akt isoforms regulate intermediate filament protein levels in epithelial carcinoma cells*. *FEBS Lett*, 2010. **584**(5): p. 984-8.
63. Trask, D.K., et al., *Keratins as markers that distinguish normal and tumor-derived mammary epithelial cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**(6): p. 2319-23.
64. Laissue, P., *The forkhead-box family of transcription factors: key molecular players in colorectal cancer pathogenesis*. *Molecular Cancer*, 2019. **18**(1): p. 5.
65. Friedman, J.R. and K.H. Kaestner, *The Foxa family of transcription factors in development and metabolism*. *Cell Mol Life Sci*, 2006. **63**(19-20): p. 2317-28.
66. Besnard, V., et al., *Immunohistochemical localization of Foxa1 and Foxa2 in mouse embryos and adult tissues*. *Gene Expr Patterns*, 2004. **5**(2): p. 193-208.
67. Jeong, J.W., et al., *Foxa2 is essential for mouse endometrial gland development and fertility*. *Biol Reprod*, 2010. **83**(3): p. 396-403.

68. Odom, D.T., et al., *Core transcriptional regulatory circuitry in human hepatocytes*. Mol Syst Biol, 2006. **2**: p. 2006.0017.
69. Zaret, K.S. and J.S. Carroll, *Pioneer transcription factors: establishing competence for gene expression*. Genes Dev, 2011. **25**(21): p. 2227-41.
70. Cirillo, L.A., et al., *Opening of Compacted Chromatin by Early Developmental Transcription Factors HNF3 (FoxA) and GATA-4*. Molecular Cell, 2002. **9**(2): p. 279-289.
71. Bartol, F.F., et al., *Uterine differentiation as a foundation for subsequent fertility*. J Reprod Fertil Suppl, 1999. **54**: p. 287-302.
72. Falangola, M.F., et al., *Histological co-localization of iron in Abeta plaques of PS/APP transgenic mice*. Neurochem Res, 2005. **30**(2): p. 201-5.
73. Joe Myers, M.S., CT(ASCP). *Overview of Heat-Induced Epitope Retrieval (HIER) Techniques and Devices*. [cited 2021 avril 21]; Available from: [http://www.ihcworld.com/\\_protocols/epitope\\_retrieval/overview.htm](http://www.ihcworld.com/_protocols/epitope_retrieval/overview.htm).
74. Kazi, A.A., K.H. Molitoris, and R.D. Koos, *Estrogen rapidly activates the PI3K/AKT pathway and hypoxia-inducible factor 1 and induces vascular endothelial growth factor A expression in luminal epithelial cells of the rat uterus*. Biol Reprod, 2009. **81**(2): p. 378-87.
75. Yu, P., et al., *Progesterone modulates endothelial progenitor cell (EPC) viability through the CXCL12/CXCR4/PI3K/Akt signalling pathway*. Cell Prolif, 2016. **49**(1): p. 48-57.
76. Wolfrum, C., et al., *Insulin regulates the activity of forkhead transcription factor Hnf-3beta/Foxa-2 by Akt-mediated phosphorylation and nuclear/cytosolic localization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(20): p. 11624-9.
77. Miricescu, D., et al., *PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in Breast Cancer: From Molecular Landscape to Clinical Aspects*. Int J Mol Sci, 2020. **22**(1).
78. Dobbin, Z.C. and C.N. Landen, *The importance of the PI3K/AKT/MTOR pathway in the progression of ovarian cancer*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(4): p. 8213-27.
79. Nicholson, K.M. and N.G. Anderson, *The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy*. Cellular Signalling, 2002. **14**(5): p. 381-395.
80. Yatabe, Y., et al., *Best Practices Recommendations for Diagnostic Immunohistochemistry in Lung Cancer*. J Thorac Oncol, 2019. **14**(3): p. 377-407.
81. Wolff, A.C., et al., *American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer*. Archives of Pathology & Laboratory Medicine, 2007. **131**(1): p. 18-43.
82. Kim, S.-W., J. Roh, and C.-S. Park, *Immunohistochemistry for Pathologists: Protocols, Pitfalls, and Tips*. Journal of pathology and translational medicine, 2016. **50**(6): p. 411-418.
83. Laurence Tardif, P.A., Dadou Lokengo, Sophie Parent, Eric Asselin *Effect of Akt1, Akt2 and Akt3 specific endometrial deletion and their combinations in the mouse uterus*. 2021.
84. Easton, R.M., et al., *Role for Akt3/protein kinase Bgamma in attainment of normal brain size*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(5): p. 1869-78.

85. Tschopp, O., et al., *Essential role of protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis*. *Development*, 2005. **132**(13): p. 2943-54.
86. Gonzalez, E. and T.E. McGraw, *The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer*. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 2009. **8**(16): p. 2502-2508.
87. Yang, Z.-Z., et al., *Protein kinase B alpha/Akt1 regulates placental development and fetal growth*. *Journal of Biological Chemistry*, 2003. **278**(34): p. 32124-32131.
88. Brand, Y., et al., *All Akt Isoforms (Akt1, Akt2, Akt3) Are Involved in Normal Hearing, but Only Akt2 and Akt3 Are Involved in Auditory Hair Cell Survival in the Mammalian Inner Ear*. *PLOS ONE*, 2015. **10**(3): p. e0121599.
89. Yu, H., T. Littlewood, and M. Bennett, *Akt isoforms in vascular disease*. *Vascular Pharmacology*, 2015. **71**: p. 57-64.
90. Zheng, S., et al., *Progesterone enhances vascular endothelial cell migration via activation of focal adhesion kinase*. *J Cell Mol Med*, 2012. **16**(2): p. 296-305.
91. Santi, S.A. and H. Lee, *The Akt isoforms are present at distinct subcellular locations*. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2010. **298**(3): p. C580-C591.
92. Levenga, J., et al., *AKT isoforms have distinct hippocampal expression and roles in synaptic plasticity*. *bioRxiv*, 2017: p. 168336.
93. Fortier, A.M., E. Asselin, and M. Cadrin, *Keratin 8 and 18 loss in epithelial cancer cells increases collective cell migration and cisplatin sensitivity through claudin1 up-regulation*. *J Biol Chem*, 2013. **288**(16): p. 11555-71.
94. Ku, N.O. and M.B. Omary, *A disease- and phosphorylation-related nonmechanical function for keratin 8*. *J Cell Biol*, 2006. **174**(1): p. 115-25.
95. Sun, L., X.J. Tang, and F.M. Luo, *Forkhead box protein A2 and T helper type 2-mediated pulmonary inflammation*. *World J Methodol*, 2015. **5**(4): p. 223-9.
96. Kelleher, A.M., et al., *Forkhead box a2 (FOXA2) is essential for uterine function and fertility*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2017. **114**(6): p. E1018-E1026.
97. Howell, J.J. and M. Stoffel, *Nuclear export-independent inhibition of Foxa2 by insulin*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(37): p. 24816-24.
98. Adam, P., et al., *Redundant roles of AKT1 and AKT2 in fertility, estrous cyclicity and endometrial gland development*. *Reproduction*, 2023: p. REP-22-0353.
99. Livingston, L.A., S.M. Kumarendran, and P. Shah, *Definition: Compensation*. *Cortex*, 2021. **134**: p. 365.
100. Filant, J., J.P. Lydon, and T.E. Spencer, *Integrated chromatin immunoprecipitation sequencing and microarray analysis identifies FOXA2 target genes in the glands of the mouse uterus*. *Faseb j*, 2014. **28**(1): p. 230-43.