

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

RÔLE DU GLUCOSE DANS L'ACTIVATION DE STAT3 PAR LA CYTOKINE
ONCOSTATINE M (OSM) DANS LES CELLULES ENDOMÉTRIALES
STROMALES

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

PAR
FARHAN HEYDARI

AVRIL 2024

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.

À ma mère : Zeynab
mon père : Gholamfaruq
mon frère : Mehran
ma sœur : Fatime
ma chérie : Sarah

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde gratitude envers ma famille et ma chérie Sarah, qui ont été les piliers de mon parcours académique. Leur soutien indéfectible, leurs encouragements constants et leur amour inconditionnel ont été des sources d'inspiration inestimables. Sans eux, cette réalisation ne serait pas possible.

Un immense merci à mon directeur de recherche, Carlos Reyes-Moreno, dont la guidance éclairée et l'expertise ont joué un rôle essentiel dans la réussite de ce mémoire. Sa patience, son dévouement et sa capacité à stimuler ma réflexion ont été des éléments déterminants dans le développement de mes compétences de recherche. Plus qu'un directeur de recherche, un ami.

Je souhaite également exprimer ma reconnaissance envers ma codirectrice, Céline Van Themsche, pour son appui constant et ses conseils avisés. Son expertise, ses idées innovantes et son enthousiasme ont contribué de manière significative à l'avancement de ce projet.

Je tiens à remercier Julie Girouard pour son précieux soutien, sa patience remarquable, et surtout pour son encouragement et son optimisme. En toutes circonstances, elle se montre présente pour nous remonter le moral lorsque les événements ne suivent pas le cours prévu.

Mes remerciements s'étendent également à tous les autres membres de mon laboratoire de recherche : Emmanuelle, Laurie, Marion, Nihad. Leur collaboration, leurs idées novatrices et leur atmosphère collaborative ont créé un environnement stimulant propice à la croissance académique et personnelle.

Enfin, je tiens à saluer chaleureusement tous les membres des autres laboratoires que j'ai eu le privilège de côtoyer.

RÉSUMÉ

Les cellules endométriales stromales sont un élément clé au sein de la fonction reproductive de l'endomètre. Elles jouent différentes fonctions physiologiques et métaboliques à différents stades du cycle menstruel, de la péri-implantation et de la grossesse. Chez l'humain, la fonction des cellules endométriales stromales est soumise à l'action des hormones, comme la progestérone, de nombreux ligands, comme l'OSM (*Oncostatine M*) et le LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*), et de plusieurs facteurs de transcription, comme STAT3 (*Signal Transducers and Activators of Transcription 3*). De plus, le métabolisme des cellules endométriales stromales est un processus complexe et essentiel à leur fonctionnement. En particulier au cours du cycle menstruel et en cas de grossesse, ces cellules doivent être dynamiques et réactives pour répondre aux besoins changeants de l'organisme. Il est proposé aussi que la fonction des cellules endométriales stromales ainsi que leur transformation en cellules déciduales exigent une augmentation de la glycolyse et de la production de lactate. Bien que des études antérieures aient mis en évidence l'implication de la protéine STAT3 dans la promotion du catabolisme glucidique, la compréhension complète du rôle spécifique de l'OSM dans la modulation du métabolisme des cellules endométriales stromales, notamment lors de stress glucidique, est encore à être investigué et documenté.

Dans cette étude, en utilisant une lignée de cellules endométriales stromales humaines immortalisées (cellules HIESC), notre objectif visait à démontrer que dans les cellules endométriales stromales, l'OSM pourrait intervenir, potentiellement via l'activation de STAT3, dans le maintien de l'activité glycolytique et de l'homéostasie énergétique, particulièrement lorsque ces cellules sont soumises à des conditions de stress métabolique.

Notre première analyse a démontré que les cytokines OSM, IFN γ et TGF- β 1 activent respectivement STAT3, STAT1 et SMAD2 en conditions normales de concentration en glucose. Nous avons ensuite établi que seulement la condition de privation en glucose et non celle hyper-glucidique (25 mM glucose) inhibe spécifiquement l'activation de la voie de signalisation OSM/STAT3, mais pas les voies TGF- β 1/SMAD2 ou IFN γ /STAT1. L'induction de STAT3 par LIF a été également inhibée en absence de glucose. Alors que la viabilité cellulaire est très peu affectée, l'activité métabolique et la production de lactate ont été fortement réduites en condition de privation en glucose par rapport à des conditions normo-glucidiques (5 mM glucose). Des analyses subséquentes dans des conditions de culture en absence ou en présence des faibles concentrations de glucose (0.25, 0.5, 0.75 et 1 mM glucose) ont confirmé que contrairement aux voies de signalisation TGF- β 1/SMAD2 ou IFN γ /STAT1, l'activation de la voie OSM/STAT3 est réduite de façon proportionnelle à la baisse de concentration en glucose. Ces observations suggèrent fortement que les médiateurs de la glycolyse seraient cruciaux pour activer les voies OSM/STAT3 et LIF/STAT3 dans les cellules HIESC, probablement en facilitant le couplage entre les récepteurs OSMR et LIFR avec STAT3 mais pas entre le récepteur de l'IFN γ (IFNGR) et STAT1, ou entre le récepteur de TGF- β 1 (TGF- β R1) et les protéines SMAD2/3. Par ailleurs, les données obtenues à l'aide de dosage de lactate et de l'ATP

suggèrent que l'effet de la privation de glucose sur l'induction de STAT3 phosphorylé par l'OSM serait en grande partie le résultat d'une baisse de l'activité métabolique et/ou glucidique et non d'une mortalité cellulaire. Finalement, nous avons démontré que l'OSM induit la production de lactate et de l'ATP en absence et à faibles concentrations de glucose.

L'ensemble de ces résultats démontrent pour la première fois que le glucose et la glycolyse sont nécessaires à l'activation de STAT3 par l'OSM qui à leur tour assurent le maintien du flux glycolytique et l'homéostasie énergétique, particulièrement en conditions de privation glucidique.

Mots-clés : Cellules endométriales stromales, Endomètre, Cytokine, Stress métabolique, Stress glucidique, Oncostatine M, Leukemia Inhibitory Factor, Transforming Growth Factor beta 1, Interféron gamma, Glucose, Lactate, ATP

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	III
RÉSUMÉ.....	IV
LISTE DES FIGURES	IX
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XI
LISTE DES SYMBOLES.....	XIV
CHAPITRE I	
INTRODUCTION.....	1
1.1 L'utérus et la biologie de la reproduction féminine.....	1
1.1.1 L'utérus.....	1
1.1.2 L'endomètre et ses cellules épithéliales et stromales	3
1.1.3 Les cellules endométriales durant le cycle menstruel.....	5
1.1.4 Les cellules endométriales durant la fécondation	8
1.1.5 Les cytokines reproductives.....	10
1.1.6 L'activité des voies de JAK/STAT dans l'endomètre	21
1.2 Le métabolisme énergétique dans l'endomètre et la fonction reproductive ...	24
1.2.1 Le métabolisme énergétique des cellules : fondements.....	24
1.2.2 Le métabolisme énergétique des cellules endométriales	25
1.3 Problématique, hypothèse et objectifs	29
1.3.1 Problématique de la recherche	29
1.3.2 Hypothèse	30
1.3.3 Objectifs.....	31
1.4 Modèle expérimental	32
CHAPITRE II	
APPROCHES EXPÉRIMENTALES ET MÉTHODOLOGIQUES	33
2.1 Cellules et réactifs.....	33
2.2 Culture cellulaire	34
2.3 Cinétique des différentes voies de signalisation dans les cellules HIESC en conditions normo-glucidiques	34
2.4 Impact de la concentration de glucose sur l'activation des différentes voies de signalisation dans les cellules HIESC.....	35

2.5	Essai de l'activité métabolique des cellules HIESC dans les conditions normo-glucidiques, de privation en glucose et hyper-glucidique (MTT assay).....	36
2.6	Impact des conditions normo-glucidiques, de privation en glucose et hyper-glucidique sur la production de lactate et d'ATP par les cellules HIESC	37
2.7	Essai d'exclusion au bleu de trypan.....	38
2.8	Impact de conditions de privation et restreintes en glucose sur l'activation des différentes voies de signalisation.....	39
2.9	Immunobuvardage de type Western	39
2.10	Dosage du lactate et de l'ATP dans des conditions de privation et restreintes en glucose	40
2.11	Analyses statistiques.....	41

CHAPITRE III

RÉSULTATS.....	42	
3.1	Cinétique des voies de signalisation OSM/STAT3, TGF- β 1/SMAD2 et IFN γ /STAT1 dans les cellules HIESC en conditions normo-glucidiques.....	42
3.2	Impact de la concentration de glucose sur l'activation des voies de signalisation OSM/STAT3, TGF- β 1/SMAD2 et IFN γ /STAT1 dans les cellules HIESC.....	48
3.3	Impact des conditions normo-glucidique, de privation en glucose et hyper-glucidique sur l'activité métabolique, la production de lactate et la viabilité des cellules HIESC	54
3.4	Impact de conditions de privation totale ou partielle en glucose sur l'activation des voies de signalisation OSM/STAT3, TGF- β 1/SMAD2 et IFN γ /STAT1 .	57
3.5	Étudier l'influence de l'activation de la voie OSM/STAT3 sur le métabolisme énergétique dans le contexte d'une privation totale ou partielle de glucose au sein des cellules HIESC.....	64

CHAPITRE IV

DISCUSSION, PERSPECTIVES ET CONCLUSION.....	67	
4.1	Interprétation des résultats.....	67
4.1.1	Cinétique des voies de signalisation OSM/STAT3, TGF- β 1/SMAD2 et IFN γ /STAT1 dans les cellules HIESC en conditions normo-glucidiques.....	67
4.1.2	Impact du glucose sur l'activation des voies de signalisation, l'activité métabolique, la production de lactate et la viabilité des cellules HIESC	69
4.1.3	Impact de conditions de privation totale ou partielle en glucose sur l'activation des voies de signalisation OSM/STAT3, TGF- β 1/SMAD2 et IFN γ /STAT1	75

4.1.4	Influence de l'activation de la voie OSM/STAT3 sur le métabolisme énergétique dans le contexte d'une privation totale ou partielle de glucose au sein des cellules HIESC	77
4.2	Les limites et perspectives du projet.....	82
4.3	Conclusion	83
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	84

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Anatomie du système reproducteur féminin.	2
1.2 Vue sur les cellules endométriales stromales.	4
1.3 Les cycles ovarien et utérin.	7
1.4 Le voyage d'un œuf fécondé chez une femme.	9
1.5 Formation de complexes de récepteurs de signalisation pour l'OSM.	17
1.6 Voies schématiques sur l'afflux de glucose en glycolyse.	29
3.1 Niveau relatif de phosphorylation de STAT3 lors du traitement par OSM.	43
3.2 Niveau relatif de phosphorylation de SMAD2 lors du traitement par TGF- β 1.	45
3.3 Niveau relatif de phosphorylation de STAT1 lors du traitement par IFN γ	47
3.4 Impact de la concentration de glucose dans le milieu de culture sur la modulation de la phosphorylation de STAT3 par l'OSM.	49
3.5 Impact de la concentration de glucose dans le milieu de culture sur la modulation de la phosphorylation de STAT3 par le TGF- β 1.	51
3.6 Impact de la concentration de glucose dans le milieu de culture sur la modulation de la phosphorylation de STAT3 par l'IFN γ	53
3.7 Mesure de l'impact de la concentration de glucose dans le milieu de culture sur l'activité métabolique (MTT) des cellules HIESC.	55
3.8 Impact de la concentration de glucose dans le milieu de culture sur la production de lactate par les cellules HIESC.	56
3.9 Impact de la concentration de glucose dans le milieu de culture sur la viabilité (mesurée par le test au bleu de trypan) des cellules HIESC.	57
3.10 Activation de la voie OSM/STAT3 en condition d'hypoglycose.	59
3.11 Activation de la voie TGF- β 1/SMAD2 en condition d'hypoglycose.	61
3.12 Activation de la voie IFN γ /STAT1 en condition d'hypoglycose.	63
3.13 Mesure de la production d'ATP des cellules HIESC en condition d'hypoglycose.	65
3.14 Mesure de la production de lactate des cellules HIESC en condition d'hypoglycose.	66
4.1 Impact de la concentration de glucose dans le milieu de culture sur la modulation de la phosphorylation de STAT3 induite par LIF.	71
4.2 Impact de la concentration de glucose dans le milieu de culture sur la viabilité des	

cellules HIESC, mesurée par le test d'exclusion à l'iodure de propidium (PI).....	74
4.3 Rôle de la boucle STAT3/HIF-1 α /PKM2 dans l'influx du glucose et le maintien de la glycolyse.....	77

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Acétyl-CoA	Acétyl-Coenzyme A
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
AKT	<i>Protein Kinase B</i>
ATP	Adénosine triphosphate
CCR	<i>Center of Cancer Research</i>
CEE	Cellules endométriales épithéliales
CES/ESC	Cellules endométriales stromales
CHUL	Centre hospitalier de l'Université Laval
CNTF	Facteur neurotrophique ciliaire
ECM	Matrice extracellulaire
ERK	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinase</i>
FBS	Sérum foetal bovin
FSH	Hormone de stimulation folliculaire
G6P	Glucose-6-phosphate
G6PDH	Phosphoénolpyruvate déshydrogénase
GAS	Sites activés par le gamma
GH	Hormone de croissance
GLUT	Transporteur de glucose
GP130	Glycoprotéine 130
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HIESC	Cellules endométriales stromales humaines immortalisées
HIF-1 α	Facteur inductible par l'hypoxie 1-alpha

HRP	Peroxydase de raifort
IFNGR	Récepteur de l'IFN γ
IFN γ	Interféron gamma
IgG	Immunoglobulines G
IL	Interleukine
IRM	Imagerie par résonance magnétique
JAK	Janus Kinase
LDH	Lactate déshydrogénase
LH	Hormone lutéinisante
LIF	Facteur inhibiteur de la leucémie
LIFR	Récepteur du LIF
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>
MCT4	Monocarboxylate transporteur 4
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NK	<i>Natural Killer</i>
OSM	Oncostatine M
OSMR	Récepteur de l'OSM
OXPHOS	Phosphorylation oxydative
p-SMAD	SMAD phosphorylé
p-STAT	STAT phosphorylé
P4	Progestérone
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PDH	Pyruvate déshydrogénase
PDK	Pyruvate déshydrogénase kinase

PEP	Phosphoénolpyruvate
PI	Iodure de propidium
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-Kinase</i>
PKM	Pyruvate kinase musculaire
PVDF	Polyfluorure de vinylidène
RIPA	Radio-immunoprécipitation
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute medium de type 1640
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SMAD	<i>Mothers against decapentaplegic homolog</i>
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
t-SMAD	SMAD total
t-STAT	STAT total
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor Beta</i>
TGF- β R	Récepteur du TGF- β
TYK	Tyrosine Kinase

LISTE DES SYMBOLES

g	Gramme
kDa	Kilo Dalton
L	Litre
M	Molaire
mL	Millilitre
mM	Milli molaire
n	Nano
ns	Non significative
α	Alpha
β	Bêta
γ	Gamma
μ	Micro

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 L'utérus et la biologie de la reproduction féminine

1.1.1 L'utérus

L'utérus, également connu sous le nom de matrice, est un organe essentiel au sein du système reproducteur féminin. Niché dans la cavité pelvienne, il assume un rôle vital dans le processus reproductif et la gestation (1). Au fil des années, la recherche sur l'utérus et ses fonctions a captivé l'attention des scientifiques, donnant lieu à des avancées substantielles dans notre appréhension de cet organe complexe.

La Figure 1.1 illustre la structure complexe du système reproducteur féminin, dans lequel l'utérus est représenté. L'utérus se présente sous la forme d'une structure musculaire creuse, ressemblant à une poire inversée, et se compose de trois couches majeures : l'endomètre, le myomètre et le périmètre (2). L'endomètre, couche la plus intérieure, revêt un rôle essentiel dans la régulation des menstruations et dans le processus de la grossesse, et c'est là que l'implantation de l'embryon se produit. Cette couche épaisse est composée de tissu glandulaire et vasculaire qui se prépare chaque mois à accueillir un ovule fécondé (3). Le myomètre est la couche musculaire moyenne de l'utérus. Il est composé de cellules musculaires lisses qui se contractent pendant le travail et l'accouchement. Le myomètre joue également un rôle dans l'expulsion du placenta après la naissance (4). Le périmètre, également appelé séreuse utérine, est la couche externe de l'utérus. Elle est constituée de tissu conjonctif dense et protège l'utérus contre les infections et les lésions (2).

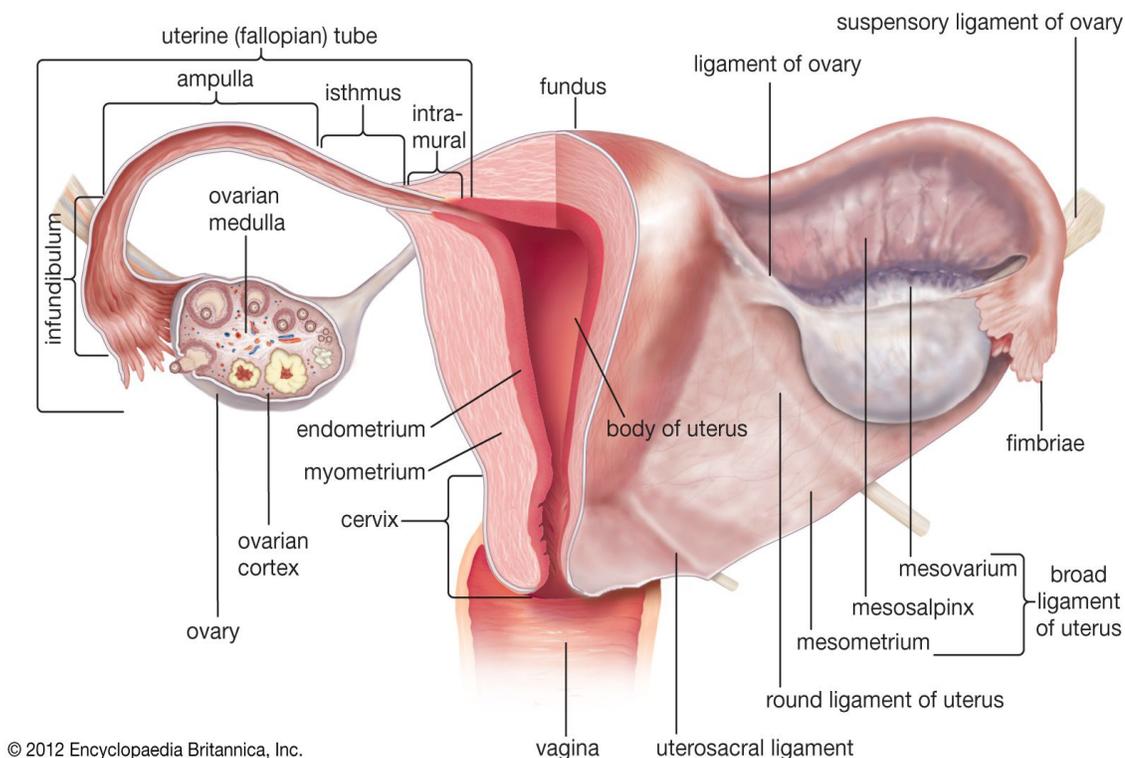


Figure 1.1 Anatomie du système reproducteur féminin.

L'utérus est un organe musculaire du système reproducteur féminin, situé entre la vessie et le rectum. Il est en forme de poire inversé. Il a pour rôle de nourrir et d'abriter l'œuf fécondé jusqu'à ce que l'enfant soit prêt pour l'accouchement. L'utérus est composé de trois couches tissulaires : 1) l'endomètre, la muqueuse interne ; 2) le myomètre, la couche musculaire composée de cellules musculaires lisses ; et 3) le périmètre, la fine couche externe composée de cellules épithéliales. La figure est tirée de l'*Encyclopedia Britannica* (5).

L'utérus est un organe dynamique qui subit des changements cycliques tout au long du cycle menstruel d'une femme, préparant ainsi l'utérus à accueillir un embryon en cas de fécondation. Ces changements sont régulés par des hormones, notamment les œstrogènes et la progestérone, qui influencent la croissance et la régénération de l'endomètre (6).

L'utérus remplit principalement la fonction cruciale de fournir un environnement propice à l'implantation d'un ovule fécondé et à l'accompagnement du développement du fœtus pendant la grossesse (1). Lorsqu'un ovule est fécondé par un spermatozoïde, il migre vers l'utérus et s'implante dans l'endomètre, où il se développe en fœtus (7). Après l'accouchement, l'utérus subit une involution, c'est-à-dire qu'il retrouve sa taille et sa forme

initiales. L'involution est stimulée par l'allaitement maternel et les contractions utérines (8).

L'utérus est également responsable de la contraction musculaire pendant les menstruations, ce qui permet à la couche fonctionnelle de l'endomètre de se détacher et de s'écouler hors du corps. Ce processus est appelé menstruation. En l'absence de la fécondation, l'endomètre est évacué lors des menstruations (9). L'utérus est alimenté en sang par les artères utérines qui fournissent l'oxygène et les nutriments nécessaires à la croissance du fœtus pendant la grossesse. Toutefois, certaines conditions médicales peuvent entraîner des problèmes de circulation sanguine dans l'utérus, ce qui peut affecter la fertilité et la santé reproductive (10).

Notre compréhension de l'utérus et de ses mécanismes s'est considérablement enrichie grâce aux progrès de l'imagerie médicale, tels que l'échographie et l'imagerie par résonance magnétique (IRM), qui permettent une visualisation détaillée de la structure utérine, y compris d'éventuelles anomalies comme des tumeurs par exemple (11). En outre, la recherche sur les hormones impliquées dans la régulation des fonctions des cellules qui composent l'utérus, comme les œstrogènes et la progestérone, a contribué à une meilleure appréhension des mécanismes complexes qui gouvernent au cours du cycle menstruel et la gestation (12).

1.1.2 L'endomètre et ses cellules épithéliales et stromales

L'endomètre consiste en deux couches : une basale et une fonctionnelle (Figure 1.2). La couche fonctionnelle est adjacente à la cavité utérine. Cette couche se développe à partir de cellules souches à la fin des menstruations. Au cours de la phase folliculaire du cycle menstruel, l'épaississement de l'endomètre est dû à la prolifération des cellules endométriales en réponse à l'œstrogène produit par les ovaires (13). Ensuite, lors de la phase lutéale, des modifications à cette couche seront induites par la progestérone provenant du corps jaune. L'endomètre devient alors un environnement optimal pour

l'implantation et la croissance d'un embryon. Sans embryon, cette couche se désintègre pour être évacuée lors des menstruations (14).

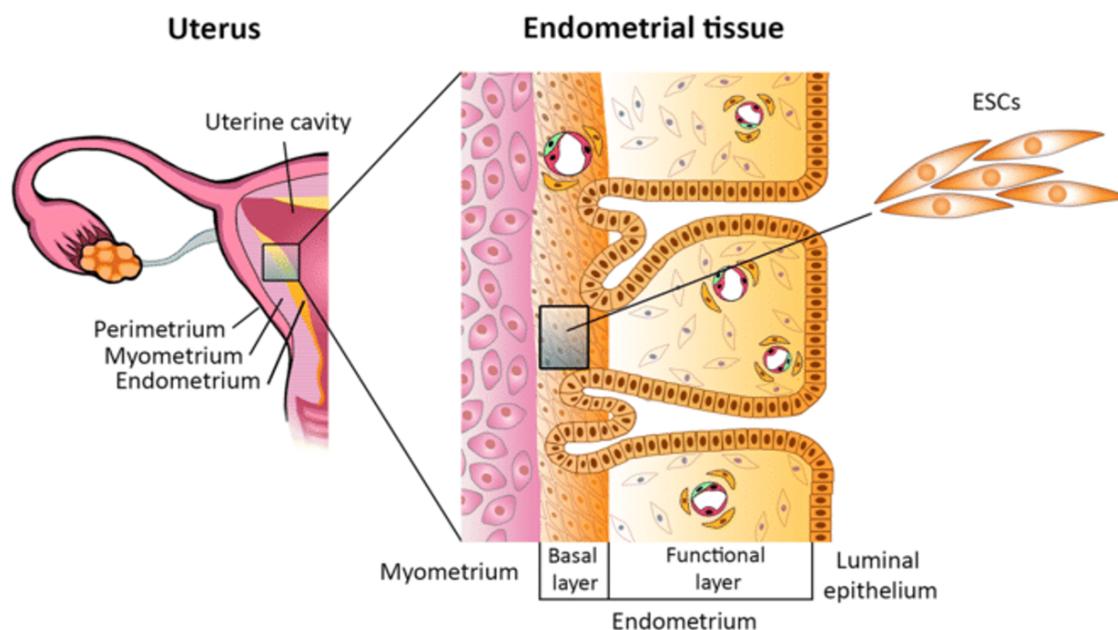


Figure 1.2 Vue sur le tissu endométrial et les cellules endométriales stromales au sein de l'utérus.

L'endomètre consiste en deux couches : 1) basale, qui se situe sous la couche fonctionnelle et adjacente au myomètre ; et 2) fonctionnelle, adjacente à la cavité utérine. La cavité utérine est l'espace à l'intérieur de l'utérus entre le canal cervical et les trompes de Fallope. Les cellules endométriales stromales sont présentes dans le tissu conjonctif de l'endomètre, alors que les cellules endométriales épithéliales sont des cellules qui tapissent la paroi interne de l'utérus. ESCs : Endometrial Stromal Cells. La figure est tirée de Deryabin P. et al., 2020. (15)

La couche basale se situe sous la couche fonctionnelle et adjacente au myomètre. Elle n'est jamais évacuée car les cellules souches qui s'y trouvent permettent de développer la couche fonctionnelle (13).

Les cellules endométriales épithéliales (CEE) sont des cellules qui tapissent l'endomètre, la paroi interne de l'utérus. Elles jouent un rôle essentiel dans le cycle menstruel et la grossesse (16). Elles subissent des changements morphologiques et fonctionnels tout au long du cycle menstruel en réponse aux hormones. Ces changements sont importants pour la préparation de l'implantation d'un embryon (17).

Les cellules endométriales stromales (CES) sont présentes dans les tissus conjonctifs qui forment les couches basale et fonctionnelle de l'endomètre. Elles soutiennent les cellules endométriales épithéliales et participent à la régulation de la réponse immunitaire et inflammatoire (12). Les CES sécrètent des facteurs de croissance et des cytokines favorisant la vascularisation de l'endomètre, ce qui est crucial pour soutenir la croissance de l'embryon (18). Elles sont également impliquées dans la production de collagène et de protéines de la matrice extracellulaire, contribuant ainsi à la structure et à la fonction de l'endomètre (19).

Les cellules endométriales épithéliales et stromales interagissent étroitement pour réguler la réponse immunitaire de l'endomètre et participent à la tolérance immunitaire nécessaire pour la survie et la protection de l'embryon (20). Elles jouent également un rôle dans la modulation de l'inflammation dans l'endomètre, ce qui est important pour la cicatrisation après la menstruation et la prévention des infections (21).

Des dysfonctionnements dans les cellules endométriales épithéliales et stromales peuvent entraîner des problèmes de fertilité et des troubles menstruels. Des études sont en cours pour comprendre ces dysfonctionnements et développer de nouvelles approches thérapeutiques (22). La recherche sur les CEE et CES est en constante évolution pour mieux comprendre leur rôle dans la santé reproductive et identifier de nouvelles cibles thérapeutiques (23).

1.1.3 Les cellules endométriales durant le cycle menstruel

Le cycle menstruel est un processus physiologique qui se produit chez les femmes en âge de procréer. Il se caractérise par des changements hormonaux et physiologiques qui se produisent chaque mois dans le corps d'une femme. Ce cycle est critique pour la reproduction et la fertilité (24).

Pendant le cycle menstruel, l'utérus se prépare à une éventuelle grossesse. Ce processus est régulé par les hormones produites par les ovaires, notamment les œstrogènes

et la progestérone, comme illustré à la Figure 1.3. Le cycle menstruel se divise en trois phases :

1. La phase folliculaire : durant cette phase, l'hormone folliculostimulante (FSH) stimule le développement des follicules dans les ovaires. Un follicule contient un ovule immature.
2. L'ovulation : c'est le moment où le follicule dominant libère un ovule mature dans la trompe de Fallope. C'est la période la plus fertile du cycle.
3. La phase lutéale : après l'ovulation, le follicule vide se transforme en corps jaune, qui produit de la progestérone en vue d'une éventuelle implantation d'embryon dans l'utérus.

Si la fécondation n'a pas lieu, le corps jaune se dégrade et les niveaux d'hormones diminuent, entraînant le début d'un nouveau cycle menstruel.

Il est important de prendre en compte que chaque femme peut avoir des variations dans la durée et les symptômes de son cycle menstruel. Certains facteurs tels que le stress, les changements hormonaux, les troubles de santé et les contraceptifs peuvent également influencer le cycle menstruel (24).

Tout au long du cycle menstruel, les cellules endométriales épithéliales subissent des changements. Pendant la phase menstruelle qui marque le début du cycle, les CEE subissent une desquamation, où la couche supérieure de l'endomètre est rejetée. Cela entraîne une baisse des niveaux d'œstrogène et de progestérone, ce qui provoque la menstruation (25).

Au cours de la phase proliférative, qui suit la menstruation, les CEE commencent à se régénérer et à se multiplier. Sous l'influence de l'œstrogène produit par les ovaires, les CEE se développent et se multiplient, formant une nouvelle couche d'endomètre (26).

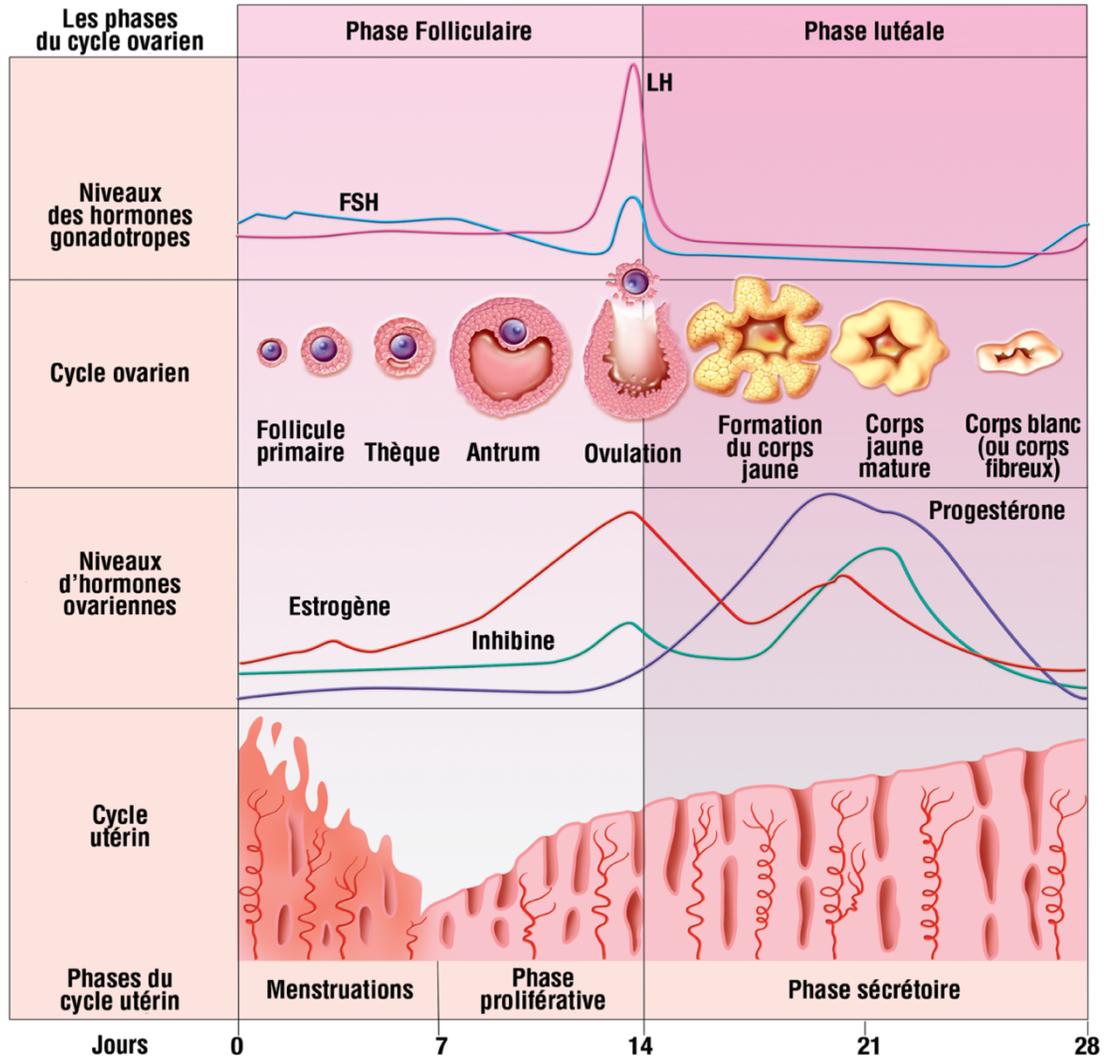


Figure 1.3 Les cycles ovarien et utérin.

Pour un cycle de 28 jours, la FSH et la LH sont à leur maximum vers le 14^{ème} jour, ce qui correspond au moment de l'ovulation. Les estrogènes ont un premier pic vers la fin de la phase folliculaire (phase proliférative du cycle menstruel) et un deuxième pic lors de la phase lutéale (phase sécrétoire du cycle menstruel). La progesterone a un pic lors de la phase lutéale (phase sécrétoire du cycle menstruel). La figure est tirée du mémoire de Merien M. 2021. (27)

La phase ovulatoire est marquée par la libération d'un ovule mature par l'ovaire. Les CEE continuent de se diviser et de proliférer pour préparer l'endomètre à la possible implantation d'un embryon (28).

Lors de la phase sécrétoire, les cellules endométriales épithéliales produisent des sécrétions riches en glycogène et en nutriments pour soutenir un éventuel embryon. Sous

l'influence de la progestérone produite par le corps jaune dans l'ovaire, les CEE deviennent plus glandulaires et développent des capacités sécrétoires accrues (28).

Si une implantation n'a pas lieu, les niveaux d'œstrogène et de progestérone diminuent, entraînant la phase menstruelle suivante et ainsi un nouveau cycle commence (29).

Les cellules endométriales épithéliales et stromales jouent également un rôle dans la modulation de l'inflammation dans l'endomètre, ce qui est important pour la cicatrisation après la menstruation et la prévention des infections (30).

Il convient de noter que ces changements sont régulés par des hormones, notamment l'œstrogène et la progestérone, et sont essentiels pour la fertilité et la fonction reproductive (31).

1.1.4 Les cellules endométriales durant la fécondation

La fécondation est le processus par lequel un spermatozoïde fusionne avec un ovule, formant ainsi un embryon qui, par la suite, donne naissance à un nouvel être vivant. Ce processus est crucial pour la reproduction des organismes sexués (32).

Lors de la fécondation, illustré à la Figure 1.4, c'est au cœur des trompes de Fallope qu'un spermatozoïde pénètre dans l'ovule, ce qui entraîne la fusion de leurs matériaux génétiques. C'est ainsi que naît le zygote diploïde unicellulaire, qui est la première cellule d'un nouvel individu. Ce dernier se développe dès sa création et poursuit sa croissance durant la migration pour former un embryon (33).

La fécondation est régulée par des mécanismes hormonaux et des interactions moléculaires spécifiques entre les spermatozoïdes et l'ovule. La fécondation marque le début du développement embryonnaire, elle est suivie de l'implantation de l'embryon dans l'utérus qui marque le début de la grossesse (34,35).

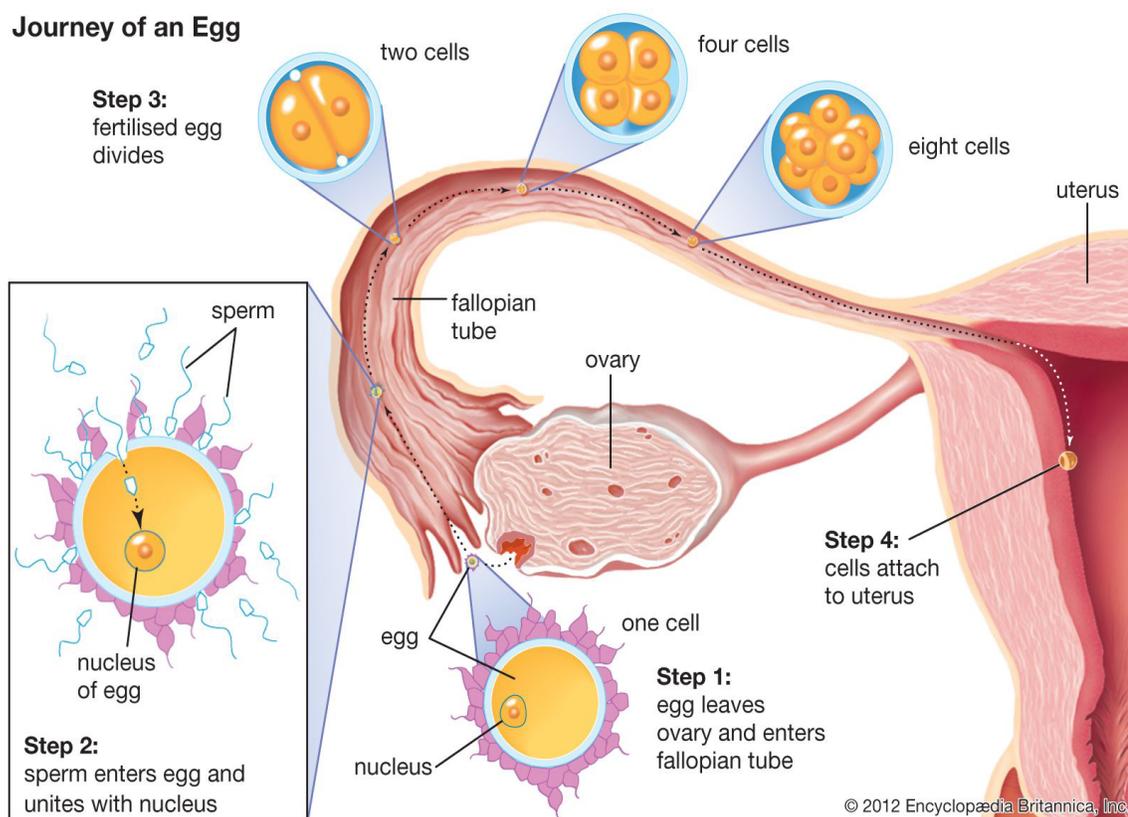


Figure 1.4 Le voyage d'un œuf fécondé chez une femme.

Chez les mammifères, les œufs sont libérés par les ovaires. Si un ovule rencontre un spermatozoïde, il peut être fécondé. L'ovule fécondé se déplace vers l'utérus, où il grandit et se développe en un nouvel individu. La figure est tirée de l'*Encyclopedia Britannica* (36).

Lors du processus de fécondation, les CEE subissent plusieurs modifications pour permettre l'implantation réussie d'un embryon. Ces changements sont influencés par des signaux hormonaux et des interactions entre l'embryon et l'endomètre. Les principales modifications observées sont :

- Réceptivité de l'endomètre : au cours de la phase de fécondabilité, l'endomètre subit des modifications dans sa composition et ses propriétés afin de devenir réceptif à l'implantation de l'embryon. Ces changements sont régulés par des hormones, notamment l'œstrogène et la progestérone (37).
- Adhérence et invasion : une fois que l'embryon atteint l'endomètre, il doit s'attacher et s'infiltrer dans les cellules endométriales épithéliales. Les cellules endométriales stromales subissent une différenciation appelé décidualisation. La

décidualisation facilite l'adhérence de l'embryon et permet son invasion dans la paroi de l'endomètre (38).

- Communication cellulaire : les CES communiquent avec l'embryon en libérant des signaux chimiques appelés cytokines et facteurs de croissance. Ces signaux aident à réguler la croissance et le développement de l'embryon, ainsi qu'à favoriser la formation du placenta (39).
- Angiogenèse : pendant la fécondation, les CEE jouent également un rôle dans la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, un processus appelé angiogenèse. Cela permet d'assurer un apport adéquat en nutriments et en oxygène à l'embryon en développement (40).

1.1.5 Les cytokines reproductives

1.1.5.1 Facteur inhibiteur de la leucémie

Le facteur inhibiteur de la leucémie (LIF) est le membre le plus pléiotrope de la famille des cytokines interleukine 6 (IL-6) qui comprend IL-11, OSM, CNTF et IL-6 (41) et est exprimé dans presque tous les types de tissus du corps (42). Bien que le LIF ait été nommé pour sa capacité à induire la différenciation des cellules leucémiques myéloïdes, des études du LIF dans d'autres maladies et des types de tumeurs solides ont montré qu'il a le potentiel de contribuer à de nombreuses autres pathologies (43).

Découverte et rôle du LIF :

Le LIF est une cytokine dont la première découverte remonte aux années 1980. Cette avancée scientifique résulte d'investigations visant à élucider les mécanismes de régulation de la leucémie.

Il a été identifié pour la première fois en 1987 par Gearing D.P. et al. (44). Une autre étude capitale pour la découverte du LIF a été rendue publique en 1988 par Gough N.M.

et al. (45). Cette recherche a permis l'identification et la caractérisation du gène du LIF chez l'être humain.

Depuis sa découverte, le LIF a fait l'objet d'études dans de nombreuses perspectives biologiques, notamment dans le contexte du développement embryonnaire, de la reproduction et de la régulation du système immunitaire (46). Il a été établi que le LIF joue un rôle essentiel dans la survie et la différenciation des cellules souches embryonnaires (47), ainsi que dans le processus de décidualisation de l'endomètre pendant la grossesse (48).

Le LIF est produit par de nombreux types cellulaires différents (49) et joue un rôle essentiel dans la régulation du développement du système nerveux (50), de la pluripotence des cellules souches (51), du métabolisme osseux (52) et de l'inflammation (53). Il a été identifié et purifié à l'origine sur la base de sa capacité à induire la différenciation des cellules M1 de la leucémie myéloïde de la souris (44). Il a ensuite été démontré qu'il était impliqué dans le maintien de la pluripotence et de la capacité d'auto-renouvellement des cellules souches embryonnaires (54) et dans l'augmentation des capacités d'auto-renouvellement des cellules souches neurales (50). En outre, il a été constaté que le LIF avait des effets sur les systèmes nerveux, reproducteur, squelettique, musculaire et endocrinien (41). Il a été démontré qu'il stimule la production et la survie des neurones et des oligodendrocytes, facilite l'implantation réussie des embryons, régule la formation et le remodelage osseux, régule la survie et la différenciation des myoblastes, favorise la différenciation des cellules musculaires lisses cardiaques et des adipocytes, et régule la sécrétion de l'hormone adrénocorticotrope (41). Outre ces activités, le LIF a également été signalé comme régulant l'inflammation, favorisant la différenciation des cellules T régulatrices et induisant la réponse de phase aiguë dans les hépatocytes (55).

Aspect moléculaire de l'action du LIF :

Le LIF signale via le récepteur de cytokine gp130. Le récepteur du LIF est une protéine transmembranaire composée de plusieurs domaines fonctionnels. Il est constitué

d'une partie extracellulaire qui est responsable de la liaison au LIF, d'une partie transmembranaire qui traverse la membrane cellulaire et d'une partie intracellulaire qui est impliquée dans la transmission du signal (41).

Le complexe de signalisation compétent de LIF est un hétérodimère (56) qui se compose d'une molécule de gp130 ainsi que d'une deuxième chaîne de récepteur appelée LIFR (récepteur LIF) (57) qui est architecturalement similaire à gp130 (58). Tout d'abord, le LIF se lie à faible affinité à gp130, puis recrute LIFR.

Les chaînes gp130 et LIFR sont constitutivement associées à des membres de la famille JAK (Janus Kinase) des tyrosine kinases (59). Ces kinases existent dans un état inactif dans des conditions basales, mais sont rapidement activées lorsque le LIF engage son récepteur (41). Il y a quatre membres de la famille JAK (JAK1, JAK2, JAK3, TYK2). Des expériences utilisant des composants surexprimés ont initialement montré que le récepteur LIF est capable de se lier à au moins trois des quatre membres de la famille JAK (JAK1, JAK2 et TYK2) (60). Cependant, des études knock-out ont révélé que la signalisation de LIF est fortement abrogée en l'absence de JAK1, mais pas de JAK2 ou de TYK2, ce qui suggère qu'il s'agit du membre dominant de la famille JAK dans des conditions physiologiques (61). À l'appui de cela, Ernst M. et al. ont montré l'activation de JAK1, JAK2 et TYK2 après une exposition à LIF, mais une cinétique d'activation significativement plus rapide pour JAK1, ce qui implique encore une fois qu'il s'agit de la kinase initialement ciblée par LIF (62). Ainsi, l'association de LIF avec son récepteur se traduit par une compétence catalytique de JAK1 qui initie ensuite une cascade de phosphorylation de la tyrosine qui stimule la voie de signalisation JAK/STAT (60). Ainsi, l'une des voies de signalisation les plus importantes activées par le LIF est la voie JAK-STAT (Janus Kinase-Signal Transducer and Activator of Transcription) (60). Une fois dans le noyau, les dimères de protéines STAT régulent l'expression des gènes cibles en se liant à des éléments de réponse spécifiques dans leur région promotrice. Cette régulation transcriptionnelle induite par le LIF peut influencer divers processus cellulaires, tels que la différenciation cellulaire, la prolifération, la survie cellulaire et l'inflammation (63).

En plus de la voie JAK-STAT, le LIF peut également activer d'autres voies de signalisation, telles que les voies MAPK/ERK (Mitogen-Activated Protein Kinase/Extracellular Signal-Regulated Kinase) (64), PI3K/AKT (Phosphatidylinositol 3-Kinase/Protein Kinase B) (65). Ces voies interviennent dans la régulation de divers processus cellulaires, notamment la croissance, la survie et la différenciation (66).

Tout comme le LIF, le récepteur du LIF est largement exprimé dans de nombreux tissus et joue un rôle important dans le développement embryonnaire, la différenciation cellulaire et la régulation de la pluripotence des cellules souches. Il participe également à la régulation de la réponse immunitaire et inflammatoire (41).

Des altérations dans la signalisation du LIF et de son récepteur ont été associées à diverses maladies, notamment le cancer (67), les maladies inflammatoires (68) et les troubles de la reproduction (69). Comprendre le fonctionnement du récepteur de LIF peut donc avoir des implications importantes pour le développement de thérapies ciblées.

LIF et implantation embryonnaire :

L'implantation embryonnaire est un processus complexe qui se produit lorsqu'un embryon en développement s'attache et s'implante dans la paroi de l'utérus. L'implantation se produit généralement environ 6 à 10 jours après la fécondation, lorsque l'embryon atteint le stade de blastocyste, qui est une structure composée de cellules différenciées. L'implantation nécessite une interaction précise entre l'embryon et l'endomètre. L'embryon sécrète des signaux moléculaires qui favorisent la réceptivité de l'endomètre et facilitent l'adhésion et l'invasion de l'embryon dans l'endomètre. Une fois que l'implantation est réussie, l'embryon commence à se développer et à former le placenta, qui est essentiel pour la fourniture de nutriments et d'oxygène au fœtus en croissance (70).

Dans l'endomètre des femmes fertiles, l'expression du LIF est limitée aux glandes endométriales pendant la phase sécrétoire mais n'est pas présente dans l'endomètre pendant la phase proliférative. Le récepteur LIFR et gp130 sont exprimés dans

l'épithélium luminal et glandulaire tout au long du cycle (71). LIF joue un rôle clé dans la préparation de l'endomètre pour l'implantation embryonnaire. Il favorise la croissance et la différenciation des cellules endométriales stromales en cellules déciduales, préparant ainsi l'utérus à recevoir l'embryon (72).

LIF stimule la production de facteurs de croissance et de cytokines dans l'endomètre, favorisant ainsi la vascularisation et la préparation de l'endomètre pour l'implantation. Il régule également l'expression de molécules d'adhésion cellulaire, facilitant ainsi l'interaction entre l'embryon et l'endomètre (72).

L'expression de LIF dans l'endomètre est étroitement régulée par des facteurs hormonaux, tels que les œstrogènes et la progestérone. Ces hormones influencent la production de LIF, assurant ainsi une fenêtre d'implantation optimale (72). Des dysfonctionnements dans la signalisation de LIF ont été associés à des problèmes d'implantation et d'infertilité. Par exemple, des niveaux anormalement bas de LIF peuvent entraîner un échec d'implantation chez la femme (73).

1.1.5.2 Oncostatine M

L'oncostatine M (OSM) est une cytokine multifonctionnelle qui appartient à la famille des IL-6. Parmi les membres de la famille, l'OSM est le plus étroitement lié au LIF et utilise en fait le récepteur LIF (LIFR) en plus de son récepteur spécifique chez l'humain (OSMR). Alors que l'OSM était à l'origine reconnu par son activité unique à inhiber la prolifération des cellules tumorales, l'accumulation de preuves indique maintenant que l'OSM présente de nombreuses activités biologiques uniques dans l'inflammation, l'hématopoïèse et le développement (74).

Découverte et rôle de l'OSM :

La découverte de l'OSM a été le fruit de recherches menées par des scientifiques dans le domaine de l'immunologie et de la biologie cellulaire. L'OSM a d'abord été purifié

et caractérisé biochimiquement sur la base de son activité antiproliférative sur la lignée cellulaire de mélanome humain A375 *in vitro* (75). Une fonction potentielle dans la régulation du cancer a été explorée et d'autres études ont clairement montré des actions pléiotropes dans les processus hématopoïétiques, d'altération des tissus squelettiques, métaboliques, immunologiques, de différenciation et de maladies inflammatoires (76).

Ainsi, OSM intervient dans divers processus biologiques, allant de l'inflammation à la différenciation cellulaire. Bien que son rôle précis soit encore en cours d'exploration, des études ont mis en évidence plusieurs fonctions clés de l'OSM dans le corps humain.

L'OSM joue un rôle dans la modulation de la réponse inflammatoire en stimulant la production d'autres médiateurs inflammatoires. Il est impliqué dans la régulation de divers processus immunitaires, y compris la régulation des réponses immunitaires cellulaires et humorales (77). L'OSM est connu pour son impact sur la différenciation cellulaire, en particulier dans le contexte du développement et de la régénération tissulaire. Il peut influencer la différenciation de divers types de cellules, notamment les cellules souches hématopoïétiques, les cellules musculaires et les cellules nerveuses (78). D'autres études ont également suggéré que l'OSM pourrait jouer un rôle dans la progression de certains cancers. Il peut stimuler la croissance cellulaire et la survie des cellules cancéreuses, ainsi que favoriser la métastase en influençant le microenvironnement tumoral (79). L'OSM participe à la régulation de la prolifération cellulaire dans divers tissus. Il peut agir comme un agent de croissance pour certains types de cellules, tout en inhibant la croissance d'autres types cellulaires, contribuant ainsi à maintenir l'équilibre cellulaire dans l'organisme (80).

L'OSM a aussi un effet inhibiteur sur la différenciation des adipocytes. Il est rapporté que l'OSM est exprimé de manière différentielle dans le tissu adipeux des patients hyperglycémiques atteints d'obésité par rapport aux patients normoglycémiques présentant un degré similaire d'obésité. De plus, OSM inhibe l'adipogenèse humaine, réduit l'expression de Glut4 (un transporteur de glucose dépendant de l'insuline) et induit un état inflammatoire dans les adipocytes humains. Il a également été démontré que l'OSM

réduit les marqueurs inflammatoires et diminue les niveaux de glucose basal chez les souris obèses (81).

De plus, OSM est impliqué dans une variété de maladies cardiaques humaines telles que la sténose aortique, l'infarctus du myocarde, la myocardite, la sarcoïdose cardiaque et diverses cardiomyopathies (82).

Aspect moléculaire de l'action de l'OSM :

L'OSM, tout comme le LIF, se lie au récepteur de cytokine gp130. À la différence du LIF, l'OSM peut agir en se liant à deux hétérodimères distincts de gp130, soit le LIFR ou le récepteur de l'OSM (OSMR) (64). L'hétérodimère entre gp130 et LIFR est appelé complexe récepteur de type I et celui entre gp130 et OSMR est appelé complexe récepteur de type II. Le récepteur de type I peut se lier à l'OSM ou au LIF, tandis que le récepteur de type II a plus d'affinité pour l'OSM (83).

La liaison de l'OSM à la gp130/OSMR ou à la gp130/LIFR induit l'activation des membres de la famille JAK (JAK1, JAK2 et TYK2) (60,84). Ainsi, la cascade de signalisation JAK induite par l'activation du récepteur OSM de type I est similaire à celle induite par le récepteur OSM de type II (85). Les membres de la famille JAK activés induisent à leur tour l'activation des facteurs de transcription STAT, principalement STAT3 (86). La Figure 1.5 illustre la voie de signalisation activé par l'OSM.

Alternativement, les récepteurs activés peuvent également activer d'autres voies de signalisation, notamment la voie de la MAPK/ERK (87) ou encore la voie PI3K/AKT (86,88).

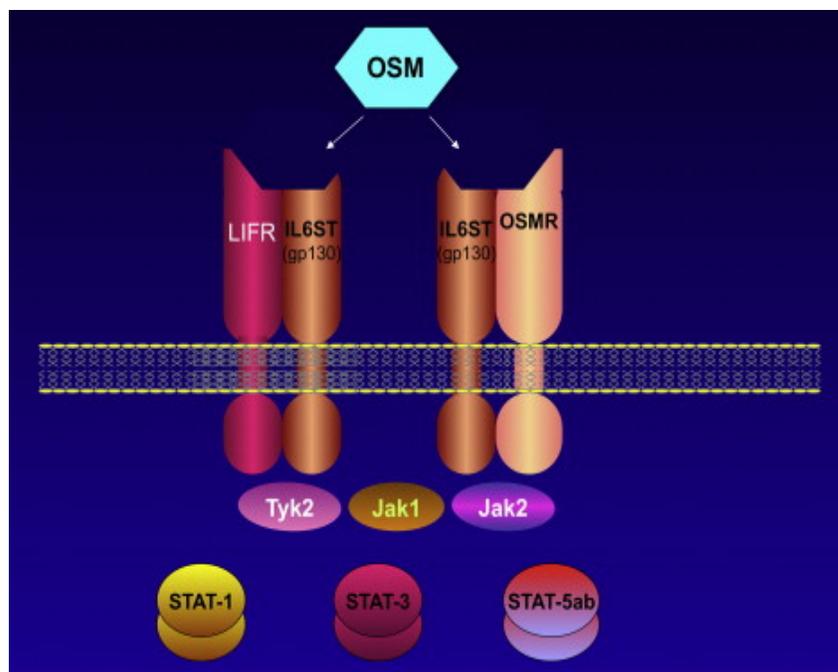


Figure 1.5 Formation de complexes de récepteurs de signalisation pour l'OSM. L'OSM active plusieurs cascades de signalisation. 1) OSM se lie à gp130, puis recrute LIFR pour former un complexe de type I. 2) OSM se lie à gp130, puis recrute sa sous-unité du complexe récepteur principal OSMR pour former un complexe de type II. Cela s'en suit de l'activation de la voie JAK/STAT. La figure est tirée du livre de Dembic Z. 2015 (89).

Ainsi, les voies de signalisation de l'OSM et du LIF présentent plusieurs similitudes dans leur mécanisme d'action, bien qu'elles puissent également présenter des différences subtiles en raison de leurs effets spécifiques. Ces deux cytokines ont leur récepteur gp130 en commun. Malgré qu'OSM active le complexe récepteur gp130/OSMR de type II, il peut également se lier au complexe récepteur gp130/LIFR type I. Cette similarité dans les récepteurs impliqués suggère une certaine convergence dans les voies de signalisation activées par ces deux cytokines (90).

Tant le LIF que l'OSM activent les kinases JAK et les facteurs de transcription STAT. Cette activation conduit à la modulation de divers processus cellulaires, y compris la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire (64).

Les voies de signalisation du LIF et de l'OSM régulent toutes deux la différenciation cellulaire dans plusieurs types de cellules, ce qui les rend importantes pour le

développement embryonnaire, la régénération tissulaire et d'autres processus de différenciation cellulaires. Tant le LIF que l'OSM jouent un rôle dans la modulation de la réponse inflammatoire en stimulant la production d'autres médiateurs inflammatoires, ce qui peut influencer la régulation de divers processus immunitaires (91).

OSM et implantation embryonnaire :

L'OSM est une cytokine dont le rôle dans l'implantation embryonnaire reste un domaine de recherche en cours. Bien que son rôle précis dans ce processus ne soit pas complètement élucidé, certaines études suggèrent qu'il peut contribuer à plusieurs aspects de l'implantation embryonnaire.

L'OSM peut jouer un rôle dans la préparation de l'endomètre à la réception de l'embryon. Il est suggéré que l'OSM pourrait être impliqué dans la régulation des changements morphologiques et biochimiques de l'endomètre, contribuant ainsi à créer un environnement propice à l'implantation de l'embryon (92).

D'autres études suggèrent que l'OSM pourrait favoriser l'adhérence et la fixation de l'embryon à l'endomètre en participant à la régulation des interactions entre les cellules embryonnaires et les cellules de l'endomètre. Cela pourrait faciliter l'ancrage initial de l'embryon dans l'endomètre (93).

L'OSM pourrait également jouer un rôle dans la régulation de la communication croisée entre l'embryon et l'endomètre. Cela pourrait inclure la modulation des voies de signalisation impliquées dans cette interaction cruciale, contribuant ainsi à un dialogue harmonieux entre l'embryon en développement et l'endomètre (94).

Notre laboratoire a récemment démontré que l'OSM joue un rôle important dans l'intégration de signaux pro-inflammatoires par les cellules trophoblastiques (95). Ces études démontrent que les cytokines pro-inflammatoires, comme l'interféron gamma (IFN γ), affectent la fonction hormonale et l'activité fusogénique des cellules

syncytiotrophoblastiques, deux processus nécessaires à l'implantation embryonnaire et la placentation (96). L'importance de l'OSM réside dans le fait qu'elle est en mesure de restaurer l'homéostasie cellulaire en s'opposant à l'effet de ces cytokines par des mécanismes dépendants et indépendants de l'activation de STAT3.

1.1.5.3 Transforming Growth Factor Beta

La famille de Transforming Growth Factor Beta (TGF- β), est une famille de cytokines impliquées dans la régulation de divers processus cellulaires, y compris la croissance cellulaire, la différenciation, la prolifération, et la réponse immunitaire. Il existe plusieurs isoformes de la famille TGF- β (comme TGF- β 1, TGF- β 2, et TGF- β 3), chacun ayant des rôles spécifiques dans différents tissus et contextes biologiques (97).

La découverte et rôle du TGF- β 1 :

En 1981, les scientifiques du Center of Cancer Research (CCR) (Bethesda, MD , États-Unis) ont découvert une molécule qui peut soit favoriser, soit inhiber la croissance cellulaire. En caractérisant en profondeur cette molécule, qu'ils ont appelé TGF- β , ils ont démontré comment différents contextes biologiques peuvent modifier l'effet d'une molécule de signalisation et ont révélé comment le TGF- β pourrait être exploité pour traiter le cancer (98,99).

Le TGF- β 1 est produit par de nombreuses cellules, y compris les cellules immunitaires, les cellules épithéliales et les cellules du tissu conjonctif (100).

Par la suite, il s'est avéré que le TGF- β 1 joue un rôle crucial dans divers processus biologiques, y compris la régulation de la croissance cellulaire, la différenciation, et la réponse immunitaire (100).

Il a été démontré qu'il joue un rôle dans la régulation de la différenciation cellulaire, contribuant à la spécialisation des cellules dans des types cellulaires spécifiques (100). Le

TGF- β 1 peut aussi moduler la réponse immunitaire en influençant l'activité des cellules immunitaires, parfois en agissant de manière anti-inflammatoire (101). De plus, le TGF- β 1 a la capacité d'inhiber la prolifération cellulaire dans de nombreux types cellulaires. Il peut agir comme un régulateur de la croissance cellulaire, contribuant ainsi à prévenir une croissance cellulaire excessive (102).

Aspect moléculaire de l'action du TGF- β 1 :

Le TGF- β 1 exerce ses effets en se liant à des récepteurs spécifiques à la surface des cellules cibles, déclenchant ainsi des voies de signalisation intracellulaires qui modulent l'activité génique et d'autres réponses cellulaires (100).

Tout d'abord, le TGF- β 1 est sécrété sous forme inactive et nécessite une activation pour être fonctionnel. Une fois activé, il se lie à son récepteur, le récepteur du TGF- β (TGF- β R), qui est un récepteur de type tyrosine kinase de la membrane cellulaire. La liaison du TGF- β 1 à son récepteur induit une autophosphorylation des récepteurs du TGF- β , activant ainsi leur activité kinase intrinsèque. Une fois les récepteurs phosphorylés, ils recrutent des protéines SMAD (protéines de signalisation) spécifiques, en particulier SMAD2 et SMAD3. Les SMADs recrutés sont phosphorylés par les récepteurs activés. Cette phosphorylation active les SMADs pour qu'ils puissent former des complexes SMAD. SMAD2 ou SMAD3 phosphorylés forment un complexe avec SMAD4. Ce complexe SMAD (par exemple, SMAD2/SMAD4 ou SMAD3/SMAD4) est transporté dans le noyau de la cellule. Une fois dans le noyau, le complexe SMAD agit comme un facteur de transcription. Il se lie à des séquences spécifiques d'ADN, régulant ainsi l'expression des gènes cibles. Certains gènes cibles sont impliqués dans la croissance cellulaire, la différenciation et la régulation de la matrice extracellulaire. De plus, le TGF- β 1 peut interagir avec d'autres voies de signalisation, y compris celles impliquées dans la régulation de la prolifération cellulaire et de la survie cellulaire (103).

TGF- β 1 et implantation embryonnaire :

Dans le contexte de l'endomètre et de la fonction reproductive, le TGF- β 1 peut influencer plusieurs aspects de la physiologie de cet organe et des processus reproductifs. Le TGF- β 1 peut influencer la prolifération et la différenciation des cellules de l'endomètre. Il participe à la régulation du renouvellement cellulaire et de la maturation des cellules, processus essentiels pour maintenir l'homéostasie dans l'endomètre (104). Le TGF- β 1 est également impliqué dans la modulation de la matrice extracellulaire (ECM) dans l'endomètre. Il peut réguler la production de composants de l'ECM, influençant ainsi la structure et la fonction de l'endomètre (105). Le TGF- β 1 participe à la régulation de la réponse inflammatoire dans l'endomètre. Il peut moduler l'activité des cellules immunitaires locales et influencer la tolérance immunitaire pendant le processus de l'implantation embryonnaire (106). Il peut aussi jouer un rôle dans la préparation de l'endomètre pour l'implantation embryonnaire. Il intervient dans la régulation des facteurs impliqués dans cette phase critique du processus reproductif (107). De plus, des déséquilibres dans l'expression ou l'action du TGF- β 1 ont été associés à certains troubles de la reproduction, tels que l'endométriose ou les complications de la grossesse (107). Le TGF- β 1 est un acteur important dans la régulation de l'homéostasie et de la fonction de l'endomètre, ainsi que dans la modulation des événements clés de la reproduction. Son rôle est complexe et dépend du contexte spécifique du cycle menstruel, de la grossesse, et d'autres facteurs hormonaux et environnementaux (108).

1.1.6 L'activité des voies de JAK/STAT dans l'endomètre

Les protéines STAT ont été initialement identifiées comme étant des facteurs de transcription cytoplasmique latents, qui n'ont été transloqués dans le noyau que lors de la phosphorylation et de la dimérisation médiée par les kinases JAK après leur activation induite par une cytokine (109). Une fois dans le noyau, les dimères STAT activés peuvent se lier à des motifs de reconnaissance de l'ADN consensuelle, appelés sites activés par le gamma (GAS), dans les promoteurs des gènes inductibles par la cytokine, ce qui entraîne une activation transcriptionnelle. La compréhension de la voie JAK-STAT a subi plusieurs modifications conceptuelles basées sur de nouvelles preuves de dimérisation, de

phosphorylation et de navette nucléaire-cytoplasmique (110). Contrairement aux notions antérieures, des études ont révélé que les STAT peuvent exister en tant que dimères stables et non phosphorylés en l'absence de stimulation des cytokines (111). Alors que les protéines STAT non phosphorylées passent constamment entre le cytoplasme et le noyau, la protéine STAT phosphorylée est retenue dans le noyau et n'est libérée qu'après la déphosphorylation par les phosphatases nucléaires (112). Par conséquent, la rétention nucléaire, et non la translocation, de la protéine STAT phosphorylée active est la caractéristique importante de l'activation de la STAT induite par les cytokines (110). La famille STAT des mammifères comprend STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b et STAT6 (113).

1.1.6.1 STAT3 dans l'endomètre et la fonction reproductive

Bien que le mécanisme moléculaire de la réceptivité utérine ne soit pas complètement clarifié, plusieurs molécules et voies ont été identifiées comme des régulateurs clés de l'implantation embryonnaire tels que la progestérone (P4), le LIF, le transducteur de signal et l'activateur de la transcription 3 (STAT3) (114).

STAT3 transduit les signaux des cytokines de la famille des IL-6, y compris l'IL-6, l'IL-11, le LIF, l'OSM et d'autres facteurs de croissance (115). Le LIF est crucial pour l'implantation embryonnaire et active la voie STAT3 utérine (116). Selon les ligands et les types de cellules, STAT3 exerce une variété de fonctions : par exemple, la prolifération/différenciation cellulaire et l'amplification/suppression des réponses inflammatoires (115).

L'épithélium utérin et le stroma sont deux composants principaux de l'endomètre, et leurs interactions sont impliquées dans le processus d'acquisition de la réceptivité (117). L'épithélium utérin et le stroma ont des fonctions indépendantes et mutuelles pour soutenir la réceptivité utérine et l'implantation embryonnaire (118,119). Bien que la littérature précédente ait démontré l'importance de STAT3 dans l'implantation d'embryons (120), le

rôle de STAT3 lors de stress métabolique, notamment lors de stress glucidique, n'est pas encore élucidé (94).

1.1.6.2 STAT1 dans l'endomètre et la fonction reproductive

Le facteur de transcription STAT1 est impliqué dans la transduction de signaux issus de cytokines de type I (favorisant le développement d'une forte réponse immunitaire cellulaire) et de type II (favorisant une forte réponse immunitaire humorale) (121), notamment l'IFN γ (122). Bien que le STAT1 soit généralement associé à des rôles dans la réponse immunitaire et la défense antivirale (123), il peut également jouer un rôle dans l'endomètre et la fonction reproductive (124).

L'IFN γ est une cytokine importante impliquée dans la réponse immunitaire, notamment la réponse inflammatoire (125). Dans le contexte de l'endomètre et de la fonction reproductive, l'IFN γ peut exercer divers effets qui influencent la physiologie de cet organe et la régulation de la reproduction. Il peut notamment avoir un effet sur :

- La réponse immunitaire dans l'endomètre : l'IFN γ est produit par diverses cellules immunitaires, y compris les lymphocytes T et les cellules Natural Killer (NK). Il peut jouer un rôle dans la modulation de la réponse immunitaire de l'endomètre, influençant ainsi la défense contre les infections et participant à la surveillance immunitaire (126).
- La régulation du cycle menstruel : l'expression d'IFN γ dans l'endomètre peut varier au cours du cycle menstruel. Des niveaux accrus d'IFN γ peuvent être observés dans la phase lutéale, ce qui suggère un rôle potentiel dans la préparation de l'endomètre pour une éventuelle implantation (127).
- La reproduction : l'IFN γ peut avoir des effets sur la fonction des cellules de l'endomètre, y compris les cellules stromales et épithéliales. Il a été suggéré que l'IFN γ peut influencer la différenciation des cellules de l'endomètre et jouer un rôle dans la régulation de l'implantation embryonnaire (128).

- Les troubles de la reproduction : des déséquilibres dans l'expression ou l'action de l'IFN γ ont été associés à certains troubles de la reproduction, tels que l'infertilité ou les complications de la grossesse (128).

Plusieurs études ont suggéré que le STAT1 peut être régulé dans l'endomètre en réponse à des signaux hormonaux et cytokiniques (129). Son expression peut varier tout au long du cycle menstruel et pendant la grossesse (130). Le STAT1 peut influencer la réponse immunitaire de l'endomètre et participer à la modulation de la réponse inflammatoire (131).

En ce qui concerne la fonction reproductive, le STAT1 peut jouer un rôle dans la régulation de la prolifération cellulaire, de la différenciation et de l'apoptose dans l'endomètre (124). Il peut également interagir avec d'autres facteurs de transcription et protéines impliqués dans la régulation des processus reproductifs (132).

1.2 Le métabolisme énergétique dans l'endomètre et la fonction reproductive

1.2.1 Le métabolisme énergétique des cellules : fondements

Le métabolisme des cellules est un processus complexe qui englobe toutes les réactions chimiques qui se produisent à l'intérieur d'une cellule pour maintenir la vie et soutenir ses fonctions. Il comprend la transformation des nutriments en énergie, la synthèse de molécules essentielles, la régulation des voies métaboliques et l'élimination des déchets (133).

Une des principales fonctions du métabolisme cellulaire est la production d'énergie. Les cellules utilisent des nutriments tels que les glucides, les lipides et les protéines comme sources d'énergie. Ces nutriments sont dégradés par des réactions chimiques pour libérer de l'énergie sous forme d'adénosine triphosphate (ATP), qui est la principale molécule utilisée par la cellule pour effectuer ses fonctions (133).

Le métabolisme cellulaire comprend également la synthèse de molécules essentielles à la croissance et au fonctionnement de la cellule. Par exemple, les cellules utilisent des précurseurs métaboliques pour synthétiser des protéines, des acides nucléiques, des lipides et d'autres molécules nécessaires à leur survie. Ces processus de synthèse sont régulés de manière précise pour maintenir l'équilibre et la fonctionnalité de la cellule (134).

La régulation des voies métaboliques est un aspect clé du métabolisme cellulaire. Les cellules doivent s'adapter aux changements de l'environnement et aux besoins métaboliques en régulant l'activité des enzymes et des voies métaboliques. Cette régulation peut se faire par des mécanismes tels que l'allostérie, la phosphorylation et la déphosphorylation des enzymes, ainsi que par des signaux cellulaires et hormonaux (135).

Enfin, le métabolisme cellulaire comprend également l'élimination des déchets produits par les réactions métaboliques. Les cellules doivent éliminer les produits métaboliques indésirables et toxiques pour maintenir leur fonctionnement optimal. Cela peut se faire par des processus tels que l'excrétion, la dégradation et le recyclage des déchets cellulaires (136).

1.2.2 Le métabolisme énergétique des cellules endométriales

Le métabolisme des cellules endométriales épithéliales et stromales est un processus complexe qui sous-tend de nombreuses fonctions biologiques essentielles au bon fonctionnement de l'endomètre, en particulier dans le contexte du cycle menstruel et de la reproduction. Ces cellules doivent être dynamiques et réactives pour répondre aux besoins changeants de l'organisme tout au long du cycle menstruel et lors de grossesse (137).

Les CEE nécessitent une quantité importante d'énergie pour maintenir leurs fonctions cellulaires essentielles, telles que la synthèse de protéines, la signalisation cellulaire et la régulation du cycle cellulaire. Elles dépendent principalement du

métabolisme énergétique aérobie, qui se produit dans les mitochondries, pour la production d'ATP (138).

Les glucides constituent une source importante de carburant pour les CEE. Elles peuvent métaboliser le glucose par glycolyse pour générer de l'énergie, ou bien par la voie des pentoses phosphates pour produire des précurseurs de la biosynthèse des nucléotides et des acides gras, nécessaires à la prolifération cellulaire et à la synthèse des composants cellulaires (139).

Les acides aminés sont essentiels à la synthèse des protéines, des enzymes et des petites molécules, incluant les hormones dérivées des amines bioactives. Les CEE peuvent métaboliser les acides aminés pour la synthèse des protéines structurales, des enzymes impliquées dans la signalisation cellulaire et la régulation du cycle cellulaire, ainsi que pour la production de métabolites intermédiaires nécessaires à d'autres voies métaboliques (140).

Les lipides sont importants pour la structure cellulaire, la signalisation et le stockage d'énergie. Les CEE peuvent métaboliser les lipides en utilisant des voies telles que la bêta-oxydation pour la production d'ATP, la synthèse de membranes cellulaires et la production de médiateurs lipidiques impliqués dans la régulation de divers processus cellulaires, y compris l'inflammation et la signalisation hormonale (141).

Les hormones telles que les œstrogènes et la progestérone exercent une influence significative sur le métabolisme des cellules endométriales épithéliales et stromales, régulant ainsi leur prolifération, leur différenciation et d'autres fonctions cellulaires. Ces hormones modulent les voies métaboliques spécifiques pour répondre aux besoins du cycle menstruel et de la grossesse (142).

La compréhension approfondie du métabolisme des cellules endométriales épithéliales et stromales est cruciale pour élucider les mécanismes sous-jacents à la régulation du cycle menstruel, à l'implantation embryonnaire et à d'autres processus

biologiques essentiels à la reproduction humaine. Des recherches continues sont nécessaires pour explorer davantage ces mécanismes et leur implication dans la physiologie et la pathologie de l'endomètre.

1.2.2.1 Le métabolisme du glucose dans les cellules endométriales

Le glucose est un substrat métabolique essentiel pour la plupart des cellules. Parce que les molécules de glucose sont polaires, elles ont besoin de protéines de transport spéciales pour traverser les membranes biologiques. Le transport du glucose à travers les membranes cellulaires se fait par diffusion facilitée et est catalysé par les transporteurs de glucose appartenant à l'une des superfamilles de transporteurs de glucose (GLUT), qui sont des protéines membranaires que l'on trouve dans la plupart des cellules de mammifères (143). La famille GLUT comprend huit isoformes, GLUT1-GLUT8, caractérisés par la présence de 12 hélices transmembranaires et de plusieurs motifs de séquences conservés (144). Ainsi, contrairement aux protéines de transport actives qui nécessitent l'ATP pour fonctionner et sont limitées par un faible rapport ATP/ADP, les protéines de transport à diffusion facilitées peuvent fonctionner sans consommer d'énergie. Les différentes isoformes des transporteurs de glucose jouent des rôles distincts dans le métabolisme du glucose, tel que défini par les modèles d'expression tissulaire, la spécificité du substrat, la cinétique de transport et l'expression différentielle dans diverses situations physiologiques (145). De plus, il a été rapporté que les cellules endométriales épithéliales expriment GLUT1, GLUT3, GLUT8, GLUT9, GLUT10 et GLUT12 (143,146).

Une fois le glucose à l'intérieur de la cellule, il va rapidement être utilisé pour générer du glucose-6-phosphate (G6P). Après une série de réactions catalytiques, la plupart des G6P sont convertis en phosphoénolpyruvate (PEP), qui est le substrat du pyruvate kinase musculaire 2 (PKM2) tétramérique. PKM2, plutôt que PKM1, possède une propriété ajustable en formant une pyruvate kinase dimérique, ce qui affaiblit son activité catalytique et provoque l'accumulation de métabolites en amont (147). Par exemple, lorsque la PKM2 dimérique est prédominante, la synthèse des nucléotides est

améliorée, car davantage de G6P est disponible pour la voie des phosphates pentoses (148), qui est directement contrôlée par la G6P déshydrogénase (G6PDH) (149). Les cellules oxydatives s'appuient principalement sur la phosphorylation oxydative pour acquérir de l'énergie, de sorte que le pyruvate est destiné à entrer dans la mitochondrie où l'oxygène est consommé. Le pyruvate est oxydé par le pyruvate déshydrogénase (PDH) pour former de l'acétyl-CoA, qui est ensuite impliqué dans le cycle de l'acide tricarboxylique (cycle de Krebs). Cependant, les cellules glycolytiques activent le pyruvate déshydrogénase kinase (PDK), qui phosphoryle la sous-unité E1 de la PDH (PDHE1) pour compromettre l'activité catalytique de la PDH (150). Ainsi, l'oxydation du pyruvate est atténuée, et la plupart du pyruvate se transforme en lactate par le lactate déshydrogénase A (LDHA). En outre, le monocarboxylate transporteur 4 (MCT4) est également induit pour exporter le lactate (151). Un niveau élevé de lactate dans le milieu extracellulaire conduit à la prolifération des cellules endométriales indifférenciées. La Figure 1.6 illustre la voie de l'influx de glucose dans la glycolyse.

La perte précoce de la grossesse est souvent due à des anomalies chromosomiques fœtales, à une sécrétion/action hormonale maternelle irrégulière ou à un soutien nutritionnel inapproprié de l'endomètre utérin ou des embryons (152). La plupart des pertes de grossesse chez la femme surviennent avant ou pendant l'implantation d'embryons, lorsqu'il y a une forte demande de glucose. Le glucose, une source majeure d'énergie métabolique, est crucial pour la décidualisation de l'endomètre et le développement embryonnaire (153). Des concentrations élevées de glucose peuvent être toxiques pour les embryons, ce qui suggère qu'il existe un besoin optimal en glucose pour la préimplantation et la survie des embryons (154). De plus, l'implantation embryonnaire est un processus synchronisé entre un blastocyste activé et un endomètre réceptif nécessitant une concentration de glucose maintenue dans une plage étroite pour optimiser la décidualisation de l'endomètre et le développement de l'embryon. Sinon, des niveaux de glucose trop élevés (hyperglucose) ou trop bas (hypoglucose) pourraient gravement nuire à son développement (152).

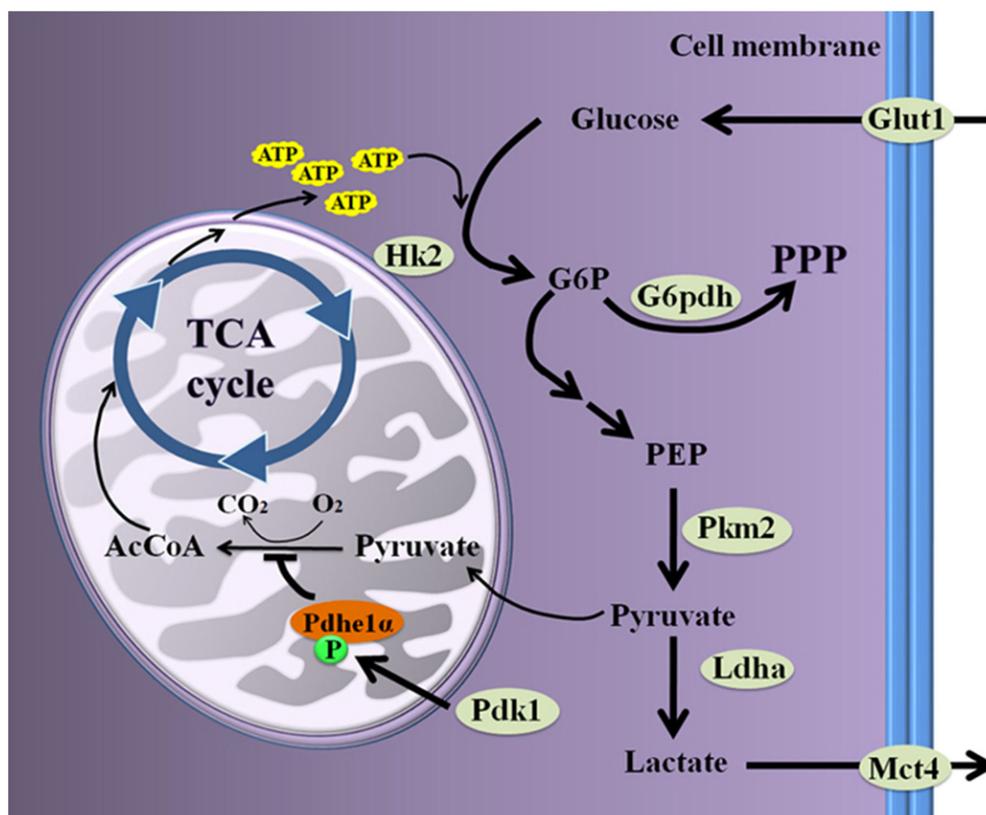


Figure 1.6 Voies schématisées sur l'afflux de glucose en glycolyse.

PEP : phosphoénolpyruvate, AcCoA : Acétyl-Coenzyme A, Cycle TCA : cycle de Krebs. La figure est tirée de Zuo R.J. et al., 2015. (155)

1.3 Problématique, hypothèse et objectifs

1.3.1 Problématique de la recherche

Bien que des études antérieures aient mis en évidence l'implication de la protéine STAT3 dans la promotion du catabolisme glucidique, la compréhension complète du rôle spécifique de l'oncostatine M (OSM) dans la modulation du métabolisme des cellules endométriales stromales et déciduales, notamment lors de stress glucidique, soit une hyperglycémie ou une hypoglycémie, demeure encore lacunaire. Étant donné l'importance cruciale de l'endomètre dans la physiologie reproductive féminine, une investigation approfondie du mécanisme précis par lequel l'OSM influence la reprogrammation métabolique de ces cellules lors de stress glucidique revêt une pertinence significative

pour une gamme de domaines, allant de la santé reproductive à la compréhension fondamentale des processus cellulaires régulateurs.

La résolution de cette problématique pourrait potentiellement éclairer des perspectives thérapeutiques novatrices pour des conditions liées à la santé reproductive féminine, telles que l'endométriose et les complications liées à la grossesse, en fournissant des informations clés sur la manière dont l'OSM peut être ciblée pour réguler efficacement le métabolisme des cellules endométriales stromales. Une telle exploration approfondie pourrait également ouvrir de nouvelles voies de recherche dans le domaine de la biologie de l'endomètre et contribuer à la compréhension plus large des mécanismes cellulaires impliqués dans la régulation métabolique et hormonale au sein de l'utérus.

1.3.2 Hypothèse

Il est postulé que dans les cellules endométriales stromales, l'OSM pourrait intervenir, potentiellement via l'activation de la protéine STAT3, dans le maintien de l'activité glycolytique et de l'homéostasie énergétique, particulièrement lorsque ces cellules sont soumises à des conditions de stress métabolique. La compréhension approfondie des mécanismes moléculaires sous-jacents à cette hypothèse pourrait offrir des perspectives novatrices sur les mécanismes de réponse adaptative des cellules endométriales stromales aux perturbations métaboliques, jetant ainsi une lumière nouvelle sur la façon dont l'OSM et STAT3 interagissent pour maintenir l'équilibre énergétique dans ces cellules cruciales du microenvironnement endométrial.

L'exploration de cette hypothèse revêt une importance particulière dans la mesure où elle pourrait apporter des éclaircissements significatifs sur la manière dont les mécanismes de régulation métabolique des cellules endométriales stromales pourraient être ciblés dans le cadre de thérapies potentielles visant à atténuer les déséquilibres métaboliques associés à des troubles endométriaux courants, tels que l'endométriose et d'autres pathologies liées à la reproduction féminine. De plus, une telle exploration pourrait potentiellement ouvrir de nouvelles perspectives dans la compréhension des

mécanismes adaptatifs cellulaires dans d'autres contextes physiologiques et pathologiques, en dehors du microenvironnement endométrial.

1.3.3 Objectifs

L'objectif général de cette étude est d'explorer l'interrelation fonctionnelle entre les cytokines à la fois gestationnelles et inflammatoires, telles que l'OSM, le TGF- β 1 et l'IFN γ , avec les métabolismes glucidique et énergétique des cellules endométriales stromales humaines immortalisées HIESC.

Les objectifs spécifiques de cette étude sont les suivants :

1. Déterminer la capacité des cytokines OSM, TGF- β 1 et IFN γ à activer leur voie canonique respective dans les cellules endométriales stromales en conditions normales de concentration en glucose.
2. Déterminer si l'activation des voies de signalisation OSM/STAT3, TGF- β 1/SMAD2 et IFN γ /STAT1 dépend de la concentration de glucose au sein des cellules HIESC.
3. Comparer l'effet des conditions normo-glucidique, de privation en glucose et hyper-glucidique sur l'activité métabolique, la production de lactate et la viabilité dans les cellules HIESC.
4. Évaluer l'effet de conditions de privation totale ou partielle en glucose sur l'activation des voies de signalisation OSM/STAT3, TGF- β 1/SMAD2 et IFN γ /STAT1.
5. Étudier l'influence de l'activation de la voie OSM/STAT3 sur le métabolisme énergétique dans le contexte d'une privation totale ou partielle de glucose au sein des cellules HIESC.

1.4 Modèle expérimental

Le modèle cellulaire utilisé dans cette étude est dérivé d'une lignée de cellules HIESC. Elles ont été immortalisées grâce à l'expression de l'antigène T large du virus SV40. Ces cellules, conservées dans le laboratoire du Dr Michel A. Fortier du Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université Laval (CHUL), ont été rigoureusement caractérisées pour leur stabilité génétique, leur homogénéité phénotypique et leur fidélité à reproduire les caractéristiques clés des cellules endométriales stromales primaires *in vivo*.

Le choix de ce modèle cellulaire repose sur sa pertinence biologique et sa représentativité significative des processus métaboliques et des voies de signalisation associées à l'endomètre humain. De plus, la lignée HIESC a fait l'objet d'études approfondies dans le domaine de la recherche endométriale (156,157), et son utilisation dans cette étude vise à assurer une continuité significative avec les connaissances antérieures tout en permettant une exploration approfondie des effets spécifiques de la voie OSM/STAT3 sur le métabolisme énergétique au sein de ces cellules.

CHAPITRE II

APPROCHES EXPÉRIMENTALES ET MÉTHODOLOGIQUES

2.1 Cellules et réactifs

La lignée cellulaire endométrial stromal humaine immortalisée (HIESC) provient du laboratoire de Dr. Michel A. Fortier, chercheur au Centre de recherche du Centre Hospitalier de l'Université Laval (CHUL, Québec, QC, Canada). Les milieux de culture et les réactifs utilisés pour la culture cellulaire proviennent de Wisent Bioproducts (Saint-Bruno, QC, Canada). Cela comprend le milieu de culture RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute medium de type 1640, #350-000-CL), le sérum fœtal bovin (FBS, #090-110), le pyruvate de sodium (#600-110-EL), la trypsine (#325-042-CL), le glucose (#609-036-EL), et les solutions de Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, #311-512-CL), de gentamicine sulfate à 50 mg/mL (#450-135-XL), de Phosphate-Buffered Saline (PBS, #311-010-CL), et de HEPES à 1 M (N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane sulfonic acid, #330-050-EL). Les cytokines utilisées pour la signalisation cellulaire : LIF (#300-05, 19.7 kDa), OSM (#300-10, 25.7 kDa), TGF- β 1 (#100-21, 25 kDa) et IFN γ (#300-02, 16.8 kDa) proviennent de PeproTech (Cranbury, NJ, États-Unis). Les anticorps primaires ciblant spécifiquement phospho-STAT1 (p-STAT1, Tyr701, #9167, 84-91 kDa), STAT1 total (t-STAT1, #9172, 84-91 kDa), phospho-STAT3 (p-STAT3, Tyr705, #9145, 79-86 kDa), STAT3 total (t-STAT3, #4904, 79-86 kDa), phospho-SMAD2 (p-SMAD2, Ser465/467, #18338, 60 kDa) et SMAD2 total (t-SMAD2, #5339, 60 kDa) ont été obtenus de Cell Signaling Technology (Danvers, MA, États-Unis). Les anticorps primaire p-STAT3 et t-STAT3 ont été utilisés à une dilution de 1 :2 000, tandis que les anticorps primaires p-STAT1, t-STAT1, p-SMAD2 et t-SMAD2 à une dilution de 1 :1 000. L'anticorps secondaire (anti-Rabbit IgG, #6515), conjugués à la peroxydase de raifort (HRP), a été fourni par BioRad (Mississauga, ON, Canada). Cet anticorps secondaire, utilisé à une dilution de 1 :4 000, est d'origine caprine et cible spécifiquement les IgG de lapin. Pour les lyses cellulaires, le tampon RIPA (#89900), enrichi en inhibiteurs de

protéases a été utilisé. Ce dernier ainsi que la solution de chimiluminescence (SuperSignal West Femto, #34095) utilisée pour détecter le signal émis par la HRP provient de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, États-Unis). La solution de bleu de trypan 0,4 % (#15250061) provient de Gibco (Grand Island, NY, États-Unis). Le composé MTT (#475989) provient de Sigma Chemical Company (Oakville, ON, Canada). Le kit de dosage de l'ATP (#700410) provient de Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, États-Unis) et celui du lactate (#J5021) de Promega Corporation (Madison, WI, États-Unis).

2.2 Culture cellulaire

Les cellules HIESC ont été entretenues dans le milieu de culture RPMI-1640 enrichi avec du FBS à une concentration de 10 %, 50 µg/mL de gentamicine, 1 mM de pyruvate de sodium et 10 mM de HEPES. Les cellules ont été incubées dans un milieu humide à 37°C avec 5 % de CO₂. Lors de chaque passage, les cellules étaient lavées avec du HBSS, puis décollées avec la trypsine. Les passages cellulaires ont été réalisés lorsqu'une confluence de 70 à 80 % était atteinte, suivis d'une dilution à un rapport de 1 pour 2 (5:10). Les cellules ainsi diluées ont été conservées pendant un maximum de 10 passages, après quoi, elles étaient remplacées par d'autres cellules, à plus bas passage, conservées dans de l'azote liquide.

2.3 Cinétique des différentes voies de signalisation dans les cellules HIESC en conditions normo-glucidiques

Les cellules ont été mises en culture dans des plaques de 24-puits (75 000 cellules/puits). Après 24 heures d'incubation, elles ont été sevrées durant 3 heures dans un milieu de culture dépourvu de FBS, permettant ainsi d'éliminer l'impact du FBS sur l'activation des différentes voies de signalisation au sein des cellules. Par la suite, les cellules ont été traitées avec différentes cytokines cibles, notamment LIF, OSM, TGF-β1 à une concentration de 25 ng/mL et IFNγ à une concentration de 10 ng/mL, et cela pendant différentes périodes (5, 15, 30, 45, 60, 90 minutes). À la fin des traitements avec les cytokines à l'étude, les cellules ont été directement collectées dans 200 µL de tampon de

lyse préchauffé contenant 1 % de SDS (v/v), ainsi que des inhibiteurs de protéases et de phosphatases. L'utilisation du tampon de lyse préchauffé accélère le processus de lyse cellulaire, permettant ainsi de respecter les intervalles de temps spécifiques pour évaluer la signalisation. En outre, ce tampon de lyse contient du bleu de bromophénol pour faciliter la visualisation des échantillons lors de la migration, dispensant ainsi la nécessité d'une dosette préalable des échantillons avant leur application sur le gel. Il est à noter que pour toutes les expérimentations présentées dans ce mémoire, la concentration des diverses cytokines utilisées a été choisie après plusieurs tests de type dose-réponse réalisées au préalable au laboratoire du Dr. Reyes-Moreno. Ces tests par Western Blot ont permis de mesurer le niveau de phosphorylation des principales cibles en aval de chaque cytokine. Pour OSM par exemple, c'est la phosphorylation de STAT3 qui a été déterminée, avec une réponse optimale entre 5 et 30 minutes de stimulation avec 25 ng/mL de cytokine (95).

2.4 Impact de la concentration de glucose sur l'activation des différentes voies de signalisation dans les cellules HIESC

Pour évaluer l'impact du glucose sur l'activation de différentes voies de signalisation dans les cellules HIESC par les cytokines cibles, les cellules ont été prétraitées avec différentes concentrations de glucose, créant ainsi des conditions normo-glucidique, de privation en glucose ou hyper-glucidique. Pour ce faire, les cellules ont d'abord été mises en culture dans des plaques de 24-puits (75 000 cellules/puits). À la fin de l'incubation de 24 heures, les cellules ont été sevrées durant 3 heures dans un milieu de culture dépourvu de glucose et de FBS, permettant ainsi d'éliminer l'impact du FBS sur l'activation des différentes voies de signalisation au sein des cellules. Et l'absence de glucose visait à ramener le catabolisme du glucose à un même niveau au sein de toutes les cellules HIESC. Les cellules ont ensuite été prétraitées dans un milieu de culture contenant 2,5 % de FBS avec des concentrations de 5 mM (condition normo-glucidique), 0 mM (condition de privation) et 25 mM de glucose (condition hyper-glucidique) et cela pendant 48 heures. Une fois le prétraitement terminé, les cellules ont été traitées avec différentes cytokines cibles, notamment LIF, OSM, TGF- β 1 à une concentration de 25 ng/mL et IFN γ

à une concentration de 10 ng/mL, et cela pendant 15 et 30 minutes. À la fin des traitements avec les cytokines à l'étude, les cellules ont été directement collectées dans 200 µL de tampon de lyse préchauffé contenant 1 % de SDS (v/v), ainsi que des inhibiteurs de protéases et de phosphatases.

2.5 Essai de l'activité métabolique des cellules HIESC dans les conditions normo-glucidiques, de privation en glucose et hyper-glucidique (MTT assay)

L'activité métabolique a été évaluée via la réduction du réactif MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl-2H-tétrazolium). La réduction intracellulaire du MTT est médiée par les enzymes oxydoréductases et déshydrogénases et les donneurs d'électrons (principalement NADPH) à différentes étapes des voies glycolytiques vers la chaîne de transport d'électrons mitochondriale (158). Le test MTT est un outil commun pour mesurer autant l'activité mitochondriale/métabolique des cellules que la prolifération/viabilité cellulaire et la cytotoxicité des médicaments (159,160). Pour ce faire, les cellules ont d'abord été mises en culture dans des plaques de 96-puits (12 500 cellules/puits). À la fin de l'incubation de 24 heures, les cellules ont été sevrées durant 3 heures dans un milieu de culture dépourvu de glucose et de FBS. Les cellules ont ensuite été prétraitées dans un milieu de culture contenant 2,5 % de FBS avec des concentrations de 5, 0 et 25 mM de glucose pendant 24 heures. Ensuite, le composé MTT a été ajouté à chaque puits, de manière à obtenir une concentration finale de 0,5 mg/mL, et la plaque a été incubée pendant 3 heures à 37°C. Durant l'incubation, les cellules vivantes réduisent le MTT en cristaux de formazan pourpre, non solubles en milieu aqueux. Après 3 heures d'incubation, le surnageant a été aspiré et 100 µL d'une solution de solubilisation acide à base d'isopropanol a été ajoutée dans chaque puits, permettant de solubiliser les cristaux et produire une solution homogène dont l'intensité de coloration pourpre a été quantifiée par colorimétrie à l'aide du spectrophotomètre Synergy HT de BioTek (Winooski, VT, États-Unis) en utilisant une longueur d'onde à 590 nm. Dans cet essai, la densité optique est proportionnelle à l'activité métabolique de l'ensemble des cellules vivantes dans chaque puit (161).

2.6 Impact des conditions normo-glucidiques, de privation en glucose et hyper-glucidique sur la production de lactate et d'ATP par les cellules HIESC

L'activité glycolytique des cellules HIESC a été déterminée à l'aide d'un test bioluminescent dans lequel le lactate déshydrogénase (LDH) utilise le lactate extracellulaire, issu de la glycolyse, et le NAD^+ pour produire du pyruvate et du NADH. En présence de NADH, un substrat pro-luciférine réductase est converti par la réductase en luciférine, qui est ensuite utilisée dans une réaction de luciférase pour produire de la lumière (162). La production d'ATP par les cellules HIESC a été déterminée à l'aide d'un test bioluminescent dans lequel la luciférase utilise la luciférine et l'ATP pour produire de l'oxyluciférine et de la lumière. La lumière émise dans cette réaction est directement proportionnelle à la concentration d'ATP (163). Pour mesurer la production de lactate et d'ATP, les cellules ont d'abord été mises en culture dans des plaques de 24-puits (75 000 cellules/puits). À la fin de l'incubation de 24 heures, les cellules ont été sevrées durant 3 heures dans un milieu de culture dépourvu de glucose et de FBS. Les cellules ont ensuite été prétraitées dans un milieu de culture contenant 2,5 % de FBS avec des concentrations de 5, 0 et 25 mM de glucose pendant 24 heures. Pour le dosage du lactate à la fin du prétraitement au glucose, la solution de LDH a été préparée selon les instructions et les réactifs fournis par le kit de dosage provenant de Promega Corporation. Pour commencer, 10 μL est prélevé de chaque puits et transféré dans un autre puits d'une nouvelle plaque. Ce volume subi une dilution de 1:50 dans du HBSS (10 μL + 490 μL HBSS). Ensuite, 50 μL de la dilution est transféré dans un autre puits d'une plaque de 96-puits à fond sombre (non transparente) ainsi que 50 μL de la solution LDH. La plaque est agitée 30 secondes, puis est placée dans un lieu sans lumière durant environ 60 minutes à température ambiante. À la fin du temps d'incubation, une lecture de la plaque a été faite à l'aide du spectrophotomètre Synergy HT de BioTek. Comme conseillé par le fabricant, toutes les manipulations ont été faites dans un lieu avec peu de lumière. Les volumes utilisées ont respecté les instructions notées dans le guide fourni par Promega Corporation. Pour le dosage de l'ATP à la fin du prétraitement au glucose, un tampon de lyse et un tampon de détection ont été préparés selon les instructions et les réactifs fournis par le kit de dosage provenant de Cayman Chemical. Étant donné que les cellules adhèrent dans le fond des puits, le contenu des puits est prélevé. Les cellules adhérentes sont lavées une fois avec

du HBSS et lysées avec le tampon de lyse préparé préalablement. Par la suite, 10 μL de cellule lysée est prélevé et placé dans un autre puits d'une nouvelle plaque de 96-puits à fond sombre (non transparente) pour permettre la lecture de la plaque. Finalement, 100 μL de tampon de détection est ajouté à chaque puits et la plaque est placée dans un lieu sans lumière durant environ 30 minutes à température ambiante. À la fin du temps d'incubation, une lecture de la plaque a été faite à l'aide de l'appareil Synergy HT de BioTek. Comme conseillé par le fabricant, toutes les manipulations ont été faites dans un lieu avec peu de lumière. Les volumes utilisés ont respecté les instructions notées dans le guide fourni par Cayman Chemical.

2.7 Essai d'exclusion au bleu de trypan

Pour évaluer la viabilité des cellules HIESC en fonction de la concentration de glucose disponible, des tests d'exclusion au bleu de Trypan ont été réalisés. Le bleu de trypan est un colorant soluble dans l'eau, utilisé pour le test d'exclusion de colorant pour la viabilité des cellules. Il permet de distinguer les cellules vivantes et non vivantes, en s'infiltrant dans les membranes plasmiques endommagées des cellules non vivantes, les faisant apparaître en bleu (164). Pour le test d'exclusion au bleu de trypan, les cellules ont été mises en culture dans des plaques de 24-puits (75 000 cellules/puits). À la fin de l'incubation de 24 heures, les cellules ont été sevrées durant 3 heures dans un milieu de culture dépourvu de glucose et de FBS. Les cellules ont ensuite été prétraitées dans un milieu de culture contenant 2,5 % de FBS avec des concentrations de 5, 0 et 25 mM de glucose pendant 24 heures. À la fin du prétraitement au glucose, les cellules sont lavées avec du HBSS et décollées du fond de la plaque avec 100 μL de trypsine. Puis, elles ont été transférées dans des tubes de 1 mL avec 100 μL de RPMI-1640 contenant 10 % de FBS. Par la suite, les tubes contenant les cellules ont été centrifugés pendant 3 minutes à une vitesse de 3 000 tours par minute. Ensuite, le surnageant est aspiré et les cellules sont diluées avec 20 μL de RPMI-1640 à 10 % de FBS et 20 μL de bleu de trypan 0,4 %. Finalement, un volume de 10 μL de la dilution est placé sur un hémacytomètre pour procéder à un comptage des cellules vivantes et mortes au microscope. Il est important de noter que les cellules doivent être comptées dans les 3 à 5 minutes suivant le mélange avec

le bleu de trypan, car des périodes d'incubation plus longues entraîneront la mort cellulaire et une réduction du nombre de cellules vivantes (164).

2.8 Impact de conditions de privation et restreintes en glucose sur l'activation des différentes voies de signalisation

Pour évaluer l'impact de faible concentration de glucose sur l'activation de différentes voies de signalisation dans les cellules HIESC par les cytokines cibles, les cellules ont été prétraitées avec différentes concentrations de glucose, créant ainsi différentes conditions de privation et restreintes en glucose. Pour ce faire, les cellules ont d'abord été mises en culture dans des plaques de 24-puits (75 000 cellules/puits). À la fin de l'incubation de 24 heures, les cellules ont été sevrées durant 3 heures dans un milieu de culture dépourvu de glucose et de FBS. Les cellules ont ensuite été prétraitées pendant 48 heures dans un milieu de culture contenant 2,5 % de FBS et des conditions normo-glucidiques (5 mM de glucose) et de privation totale ou partielle de glucose (1, 0.75, 0.5, 0.25 et 0 mM de glucose). Une fois le prétraitement terminé, les cellules ont été stimulées pendant 30 minutes avec différentes cytokines cibles, notamment LIF, OSM et TGF- β 1 à une concentration de 25 ng/mL et IFN γ à une concentration de 10 ng/mL. À la fin des traitements avec les cytokines à l'étude, les cellules ont été directement collectées dans 200 μ L de tampon de lyse préchauffé contenant 1 % de SDS (v/v), ainsi que des inhibiteurs de protéases et de phosphatases.

2.9 Immunobuvardage de type Western

Après avoir été récoltées à la suite des études de signalisation, les cellules ont été placées dans un tampon de lyse de radio-immunoprécipitation (RIPA) enrichi en inhibiteurs de protéases. Afin de garantir des lysats cellulaires homogènes, du β -mercaptoéthanol à une concentration finale de 10 % (v/v) a été ajouté à chaque échantillon. Par la suite, les échantillons ont subi une dénaturation par la chaleur à 95 °C avant de procéder à l'analyse par immunobuvardage de type western. Des quantités égales de protéines ont été chargées sur des gels polyacrylamide à 12 %, puis soumises à une

électrophorèse en conditions dénaturantes. Par la suite, les protéines ont été transférées sur des membranes de PVDF. Les membranes ont été lavées avec une solution de PBS 1X + Tween (1 % v/v), puis bloquées avec la même solution à laquelle du lait en poudre a été ajouté à une concentration finale de 5 % (p/v). Par la suite, les différents anticorps primaires ont été ajoutés individuellement, pendant 24 heures à 4°C. Ensuite, les membranes ont été lavées avec la solution de PBS 1X + Tween (1 % v/v), puis l'anticorps secondaire approprié (anti-Rabbit), associé à la solution de blocage, a été ajouté pendant 60 minutes. La détection des protéines a été effectuée à l'aide de la réaction de chimiluminescence en utilisant le SuperSignal West Femto, avec l'appareil d'imagerie FluorChem FC2 Imager d'Alpha Innotech (San Leandro, CA, États-Unis). L'expression relative des protéines à l'étude a été évaluée lors des analyses densitométriques à l'aide du logiciel ImageJ (165). En utilisant la protéine totale comme référence, les données ont été présentées en calculant le rapport de la protéine d'intérêt phosphorylée sur la protéine totale, offrant ainsi une mesure comparative de l'activation/phosphorylation des protéines de signalisation (p-STAT1, p-STAT3 et p-SMAD2).

2.10 Dosage du lactate et de l'ATP dans des conditions de privation et restreintes en glucose

Dans cette série d'expériences, la production d'ATP par les cellules HIESC a été mesurée après un prétraitement en condition normo-glucidique (témoin) et à différentes conditions de privation et restreintes en glucose, suivi d'une activation avec la cytokine cible OSM. Pour ce faire, les cellules ont été mises en culture dans des plaques de 24-puits (75 000 cellules/puits). À la fin de l'incubation de 24 heures, les cellules ont été sevrées durant 3 heures dans un milieu de culture dépourvu de glucose et de FBS. Les cellules ont ensuite été prétraitées pendant 48 heures dans un milieu de culture contenant 2,5 % de FBS et des conditions normo-glucidiques (5 mM de glucose) et de privation totale ou partielle de glucose (1, 0.75, 0.5, 0.25 et 0 mM de glucose). À la fin du prétraitement au glucose, les cellules ont été activées avec l'OSM à 25 ng/mL pendant 6 heures. Une fois l'activation avec OSM finie, les dosages du lactate et de l'ATP ont été réalisés comme indiqué à la sous-section 2.6.

2.11 Analyses statistiques

Les résultats exposés sont les moyennes de pas moins de trois expériences indépendantes, présentées avec leur écart type. Le nombre de répétitions est précisé dans la légende de chaque figure, le cas échéant. Toutes les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel Prism 10 de GraphPad (San Diego, CA, États-Unis). Les données présentant une distribution normale ont été soumises à une analyse de variance à un facteur (one-way ANOVA) ou à deux facteurs (two-way ANOVA), suivie d'un test de comparaisons multiples Tukey ou d'un test post hoc de Bonferroni, pour les valeurs appariées, avec un intervalle de confiance de 95 %. Les différences statistiquement significatives ont été considérées pour les valeurs de $p < 0,05$.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 Cinétique des voies de signalisation OSM/STAT3, TGF- β 1/SMAD2 et IFN γ /STAT1 dans les cellules HIESC en conditions normo-glucidiques

Cette première étude vise à déterminer la cinétique de signalisation induite dans les cellules HIESC par l'OSM, le TGF- β 1 ou l'IFN γ en mesurant les niveaux d'activation de STAT3, de SMAD2 et de STAT1, respectivement, en condition normo-glucidique (5 mM glucose).

Pour évaluer l'impact de l'exposition à l'OSM sur les cellules HIESC, nous avons procédé à des expériences de cinétique puis à une immunodétection par immunobuvardage de type western, de STAT3 phosphorylée et totale. Les résultats présentés à la Figure 3.1A montrent que la détection du signal de la protéine STAT3 totale (t-STAT3) est relativement constante sur toute la membrane et pour chaque temps de traitement avec OSM.

Nous avons procédé à une analyse quantitative et normalisé la quantité de STAT3 phosphorylée (p-STAT3) sur la quantité totale de la protéine STAT3 (t-STAT3) pour chaque temps de traitement avec OSM. Nos résultats (Figure 3.1B) montrent qu'un traitement avec OSM (à une concentration de 25 ng/mL) augmente le niveau de base de STAT3 phosphorylée dans les cellules HIESC. Cette augmentation est significative dès les 5 premières minutes d'exposition à OSM et est encore significative après 90 minutes de traitement avec la cytokine. Cependant, le niveau de p-STAT3 diminue progressivement après 45 min de stimulation, avec un niveau d'activation de p-STAT3 presque 6 fois plus faible à t = 90 min par rapport à t = 5 min. Nous concluons que dans les cellules HIESC, l'exposition à OSM augmente l'activation de la protéine de signalisation STAT3.

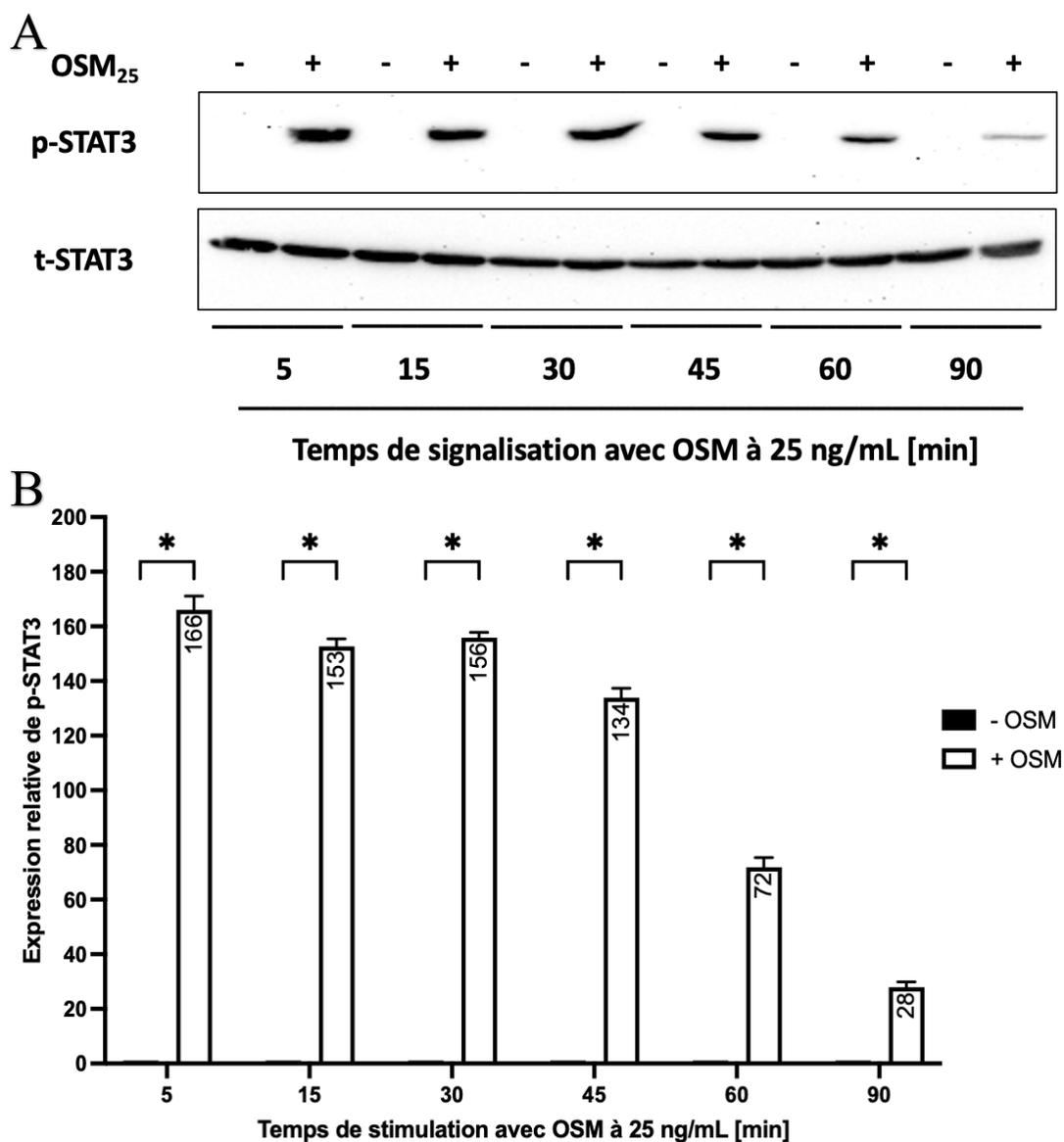


Figure 3.1 Niveau relatif de phosphorylation de STAT3 lors du traitement par OSM. **A** : un western blot représentatif analysant les niveaux relatifs de STAT3 phosphorylée et de STAT3 totale dans les cellules HIESC stimulées avec l'OSM à 25 ng/mL pendant 5, 15, 30, 45, 60 et 90 minutes. **B** : analyse densitométrique et statistique (two-way ANOVA) du western blot. Les résultats sont une moyenne \pm écart type de trois expériences indépendantes. * $p < 0,05$

Pour évaluer l'impact de l'exposition au TGF- β 1 sur les cellules HIESC, nous avons procédé à des expériences de cinétique puis à une immunodétection par immunobuvardage de type western, de SMAD2 phosphorylée et totale. Les résultats présentés à la Figure 3.2A montrent que la détection du signal de la protéine SMAD2

totale (t-SMAD2) est relativement constante sur toute la membrane et pour chaque temps de traitement avec TGF- β 1.

Nous avons procédé à une quantification et relativisé la quantité de SMAD2 phosphorylée sur la quantité totale de la protéine SMAD2 pour chaque temps de traitement avec TGF- β 1. Nos résultats (Figure 3.2B) montrent qu'un traitement avec TGF- β 1 (à une concentration de 25 ng/mL) augmente le niveau de base de SMAD2 phosphorylée dans les cellules HIESC. Cette augmentation n'est pas significative dans les 5 premières minutes d'exposition à TGF- β 1 mais dès 15 minutes d'exposition, l'augmentation est clairement significative avec un niveau optimal d'expression de p-SMAD2 à $t = 60$ min. L'augmentation du niveau de base de SMAD2 phosphorylée est encore significative après 90 minutes de traitement avec la cytokine mais diminué de plus de 50 % par rapport à $t = 60$ min. Nous concluons que dans les cellules HIESC, l'exposition à TGF- β 1 augmente l'activation de la protéine de signalisation SMAD2.

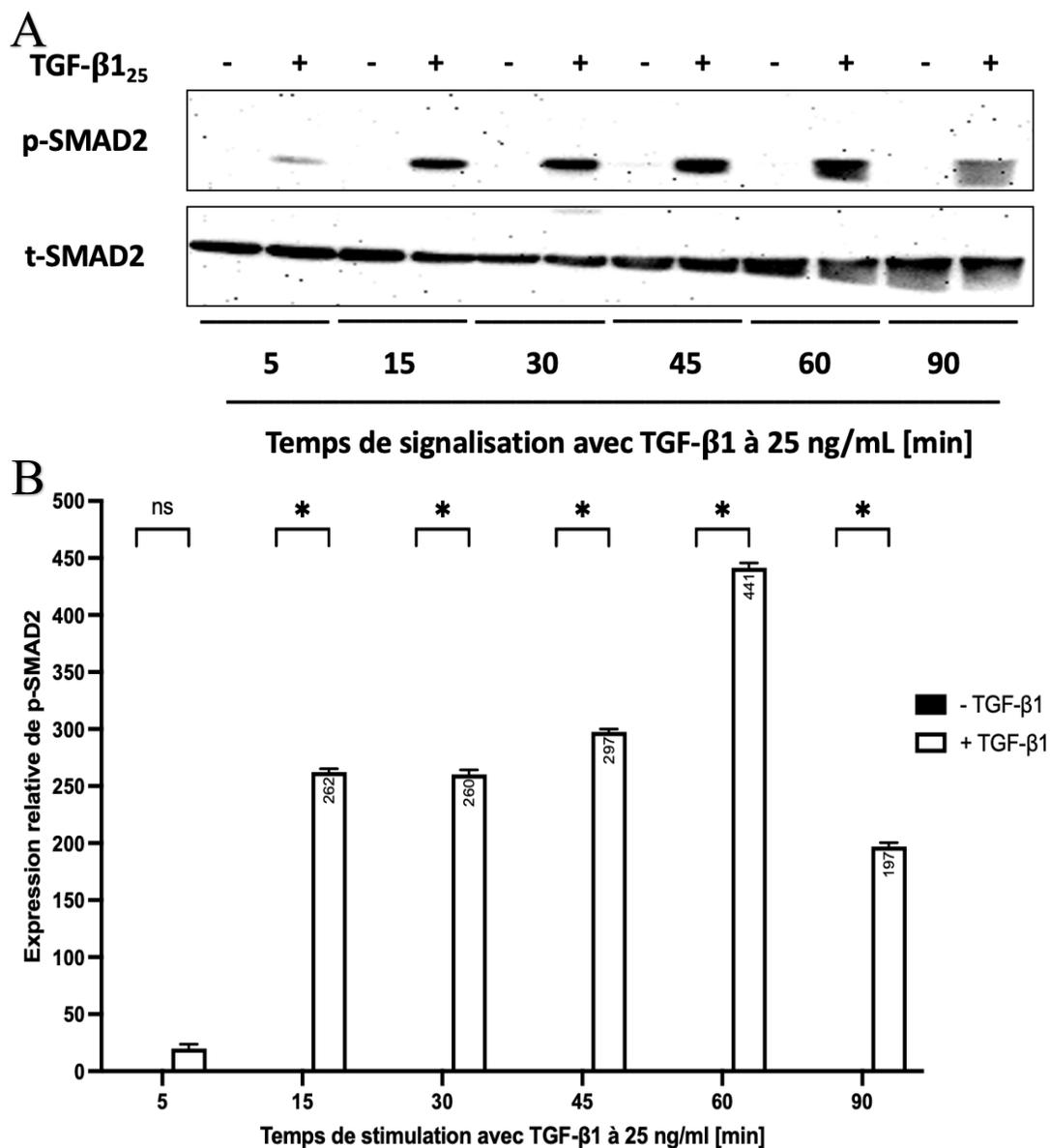


Figure 3.2 Niveau relatif de phosphorylation de SMAD2 lors du traitement par TGF- β 1.

A : un western blot représentatif analysant les niveaux relatifs de SMAD2 phosphorylée et de SMAD2 totale dans les cellules HIESC stimulées avec le TGF- β 1 à 25 ng/mL pendant 5, 15, 30, 45, 60 et 90 minutes. **B** : analyse densitométrique et statistique (two-way ANOVA) du western blot. Les résultats sont une moyenne +/- écart type de trois expériences indépendantes. * $p < 0,05$

Pour évaluer l'impact de l'exposition à l'IFN γ sur les cellules HIESC, nous avons procédé à des expériences de cinétique puis à une immunodétection par immunobuvardage de type western, de STAT1 phosphorylée et totale. Les résultats présentés à la Figure 3.3A montrent que la détection du signal de la protéine STAT1 totale

(t-STAT1) est relativement constante sur toute la membrane et pour chaque temps de traitement avec IFN γ .

Nous avons procédé à une quantification et relativisé la quantité de STAT1 phosphorylée sur la quantité totale de la protéine STAT1 pour chaque temps de traitement avec IFN γ . Nos résultats (Figure 3.3B) montrent qu'un traitement avec IFN γ (à une concentration de 10 ng/mL) augmente le niveau de base de STAT1 phosphorylée dans les cellules HIESC. Cette augmentation est significative dès les 5 premières minutes d'exposition à IFN γ et est encore significative après 90 minutes de traitement avec la cytokine. Cette fois, les niveaux d'expression de p-STAT1 semblent demeurer stables même à $t = 90$ min. Des temps d'exposition à l'IFN γ plus longs seraient nécessaires pour établir à quel moment les niveaux d'activation diminuent de façon significative. Nous concluons que dans les cellules HIESC, l'exposition à IFN γ augmente l'activation de la protéine de signalisation STAT1.

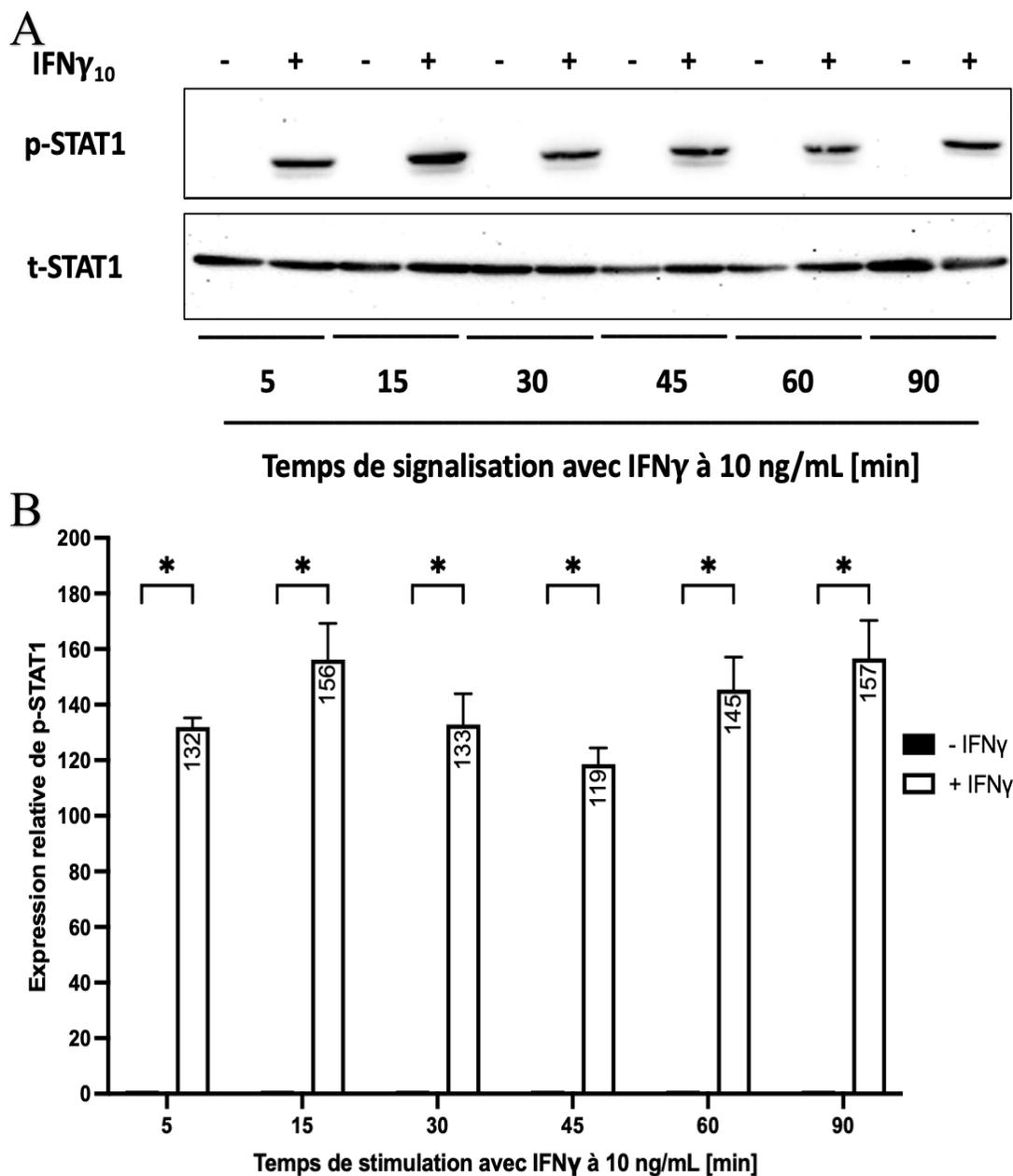


Figure 3.3 Niveau relatif de phosphorylation de STAT1 lors du traitement par IFN γ . **A** : un western blot représentatif analysant les niveaux relatifs de STAT1 phosphorylée et de STAT1 totale dans les cellules HIESC stimulées avec l'IFN γ à 10 ng/mL pendant 5, 15, 30, 45, 60 et 90 minutes. **B** : analyse densitométrique et statistique (two-way ANOVA) du western blot. Les résultats sont une moyenne \pm écart type de trois expériences indépendantes. * $p < 0,05$

3.2 Impact de la concentration de glucose sur l'activation des voies de signalisation OSM/STAT3, TGF- β 1/SMAD2 et IFN γ /STAT1 dans les cellules HIESC

Cette étude vise à élucider comment les conditions de privation en glucose et hyper-glucidique (25 mM glucose) influencent spécifiquement l'activation des voies de signalisations OSM/STAT3, TGF- β 1/SMAD2 et IFN γ /STAT1 par rapport à des conditions normo-glucidiques (5 mM glucose).

Pour déterminer si l'impact de l'OSM sur l'activation de STAT3 dans les cellules HIESC est fonction de la concentration de glucose disponible, nous avons pré-incubé les cellules avec des concentrations de glucose de 5 mM (modèle de concentration physiologique, normo-glucidique), 0 mM (condition de privation) et 25 mM (condition hyper-glucidique) pendant 48 h, avant de commencer le traitement avec l'OSM pendant 15 et 30 min. Les résultats présentés à la Figure 3.4A montrent que la détection du signal de la protéine STAT3 totale (t-STAT3) est relativement constante sur toute la membrane et cela pour chaque concentration de glucose et chaque temps de traitement avec OSM.

Nous avons procédé à une quantification et relativisé la quantité de STAT3 phosphorylée sur la quantité totale de la protéine STAT3 pour chaque concentration de glucose et chaque temps de traitement avec OSM. Nos résultats (Figure 3.4B) montrent pour la première fois qu'en absence de glucose, il y a une perte du signal de STAT3 phosphorylée que ce soit après une activation de 15 ou 30 min avec l'OSM. Autrement dit, il y a une perte d'activation de STAT3 par la cytokine OSM en condition de privation de glucose qui est significative déjà après 15 min de stimulation. En comparant les conditions normo-glucidique et hyper-glucidique, nos résultats montrent qu'il n'y a pas de différence significative dans les niveaux d'activation de STAT3 phosphorylée. Nous concluons que dans les cellules HIESC, en absence de glucose, la voie de signalisation OSM/STAT3 subie une perte de signal.

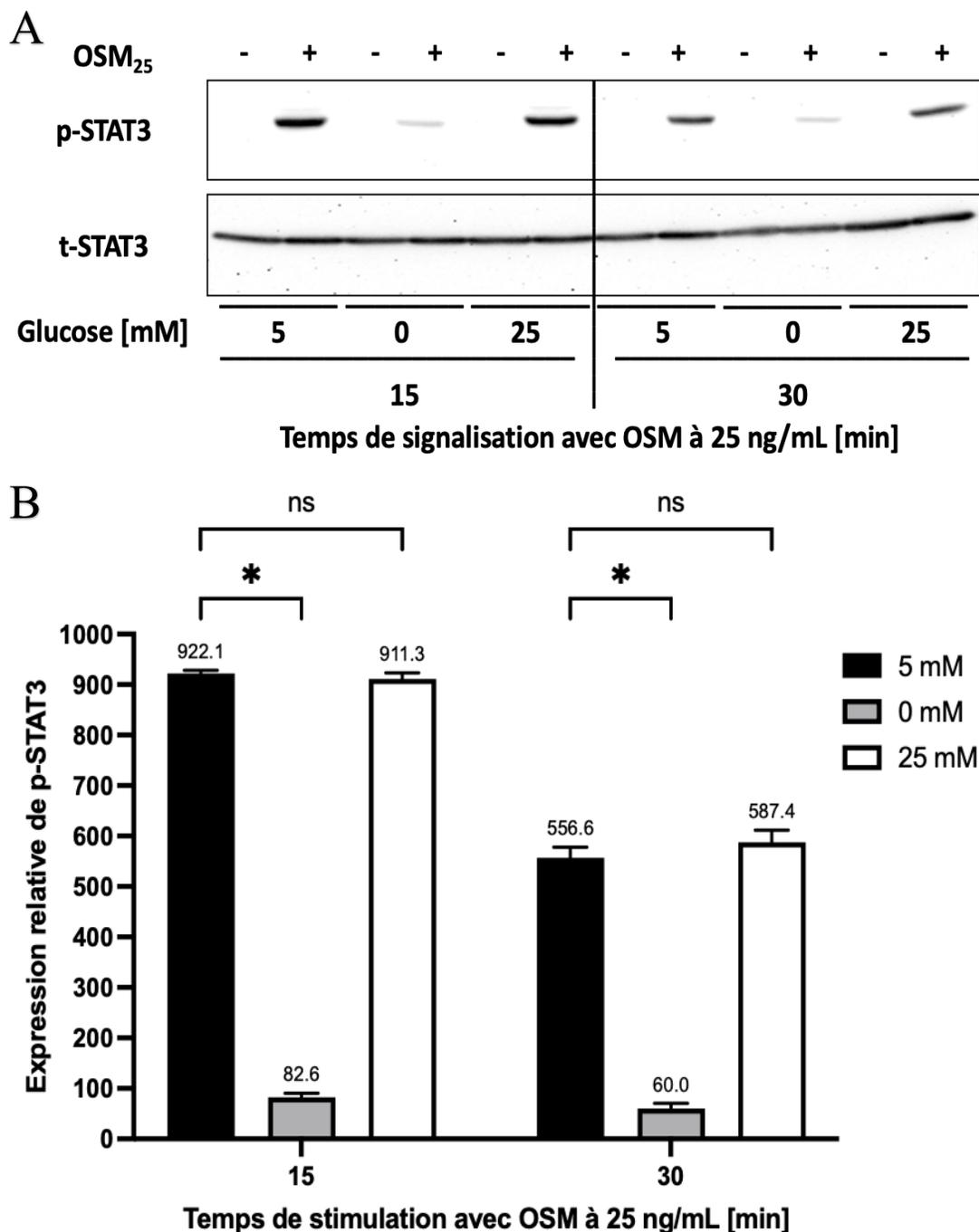


Figure 3.4 Impact de la concentration de glucose dans le milieu de culture sur la modulation de la phosphorylation de STAT3 par l'OSM.

A : un western blot représentatif analysant les niveaux relatifs de STAT3 phosphorylée et de STAT3 totale dans les cellules HIESC prétraitées avec des concentrations de 5, 0 et 25 mM de glucose pendant 48h, puis stimulées avec l'OSM à 25 ng/mL pendant 15 et 30 minutes. **B** : analyse densitométrique et statistique (two-way ANOVA) du western blot. Les résultats sont une moyenne +/- écart type de trois expériences indépendantes. * $p < 0,05$

Pour déterminer si l'impact du TGF- β 1 sur l'activation de SMAD2 dans les cellules HIESC est également fonction de la concentration de glucose disponible, nous avons pré-incubé les cellules dans des conditions normo-glucidique (5 mM), de privation en glucose et hyper-glucidique (25 mM) pendant 48 h, avant de commencer le traitement avec le TGF- β 1 pendant 15 et 30 min. Les résultats présentés à la Figure 3.5A montrent que la détection du signal de la protéine SMAD2 totale (t-SMAD2) est relativement constante sur toute la membrane et cela pour chaque concentration de glucose et chaque temps de traitement avec TGF- β 1.

Nous avons procédé à une quantification et relativisé la quantité de SMAD2 phosphorylée sur la quantité totale de la protéine SMAD2 pour chaque concentration de glucose et chaque temps de traitement avec TGF- β 1. Nos résultats (Figure 3.5B) montrent qu'en condition de privation en glucose, il n'y a pas de différence significative dans le signal de SMAD2 induit par le TGF- β 1 que ce soit après 15 ou 30 min. En condition hyper-glucidique, il n'y a également pas de différence significative dans le signal de SMAD2 induit par la TGF- β 1 après 15 ou 30 min. Nous concluons que dans les cellules HIESC, la quasi-perte de signal observée avec OSM (Figure 3.4) ne se reproduit pas avec p-SMAD2 en réponse à une stimulation avec TGF- β 1.

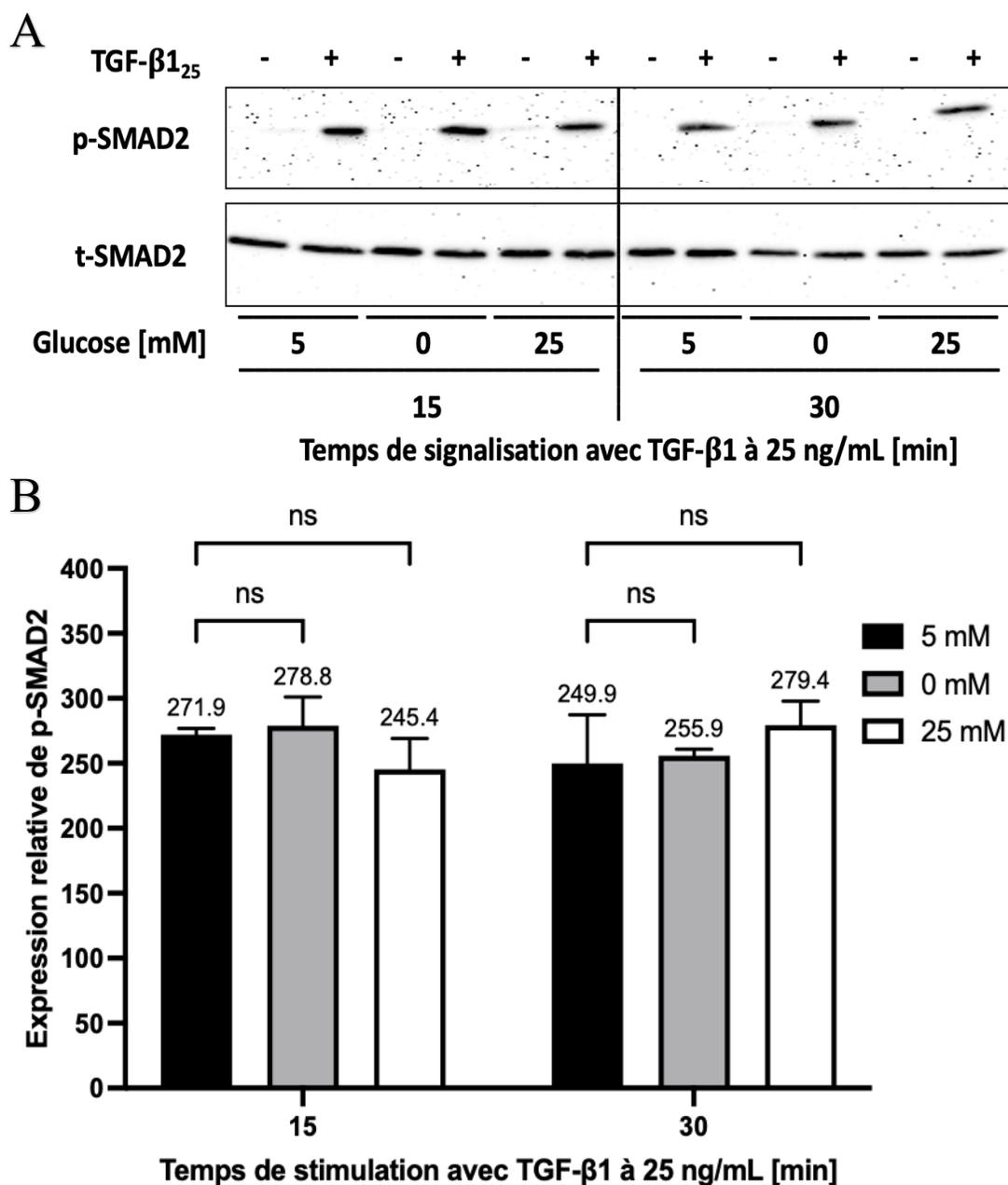


Figure 3.5 Impact de la concentration de glucose dans le milieu de culture sur la modulation de la phosphorylation de STAT3 par le TGF- β 1.

A : un western blot représentatif analysant les niveaux relatifs de SMAD2 phosphorylée et de SMAD2 totale dans les cellules HIESC prétraitées avec des concentrations de 5, 0 et 25 mM de glucose pendant 48h, puis stimulées avec TGF- β 1 à 25 ng/mL pendant 15 et 30 minutes. **B** : analyse densitométrique et statistique (two-way ANOVA) du western blot. Les résultats sont une moyenne +/- écart type de trois expériences indépendantes. * $p < 0,05$

Nous avons ensuite vérifié si la capacité de l'IFN γ à activer STAT1 dans les cellules HIESC variait en fonction de la concentration de glucose disponible, comme celle de

l'OSM à activer STAT3. Les résultats présentés à la Figure 3.6A montrent que la détection du signal de la protéine STAT1 totale (t-STAT1) est relativement constante et cela pour chaque concentration de glucose et chaque temps de traitement avec IFN γ .

Nous avons procédé à une quantification et relativisé la quantité de STAT1 phosphorylée sur la quantité totale de la protéine STAT1 pour chaque concentration de glucose et chaque temps de traitement avec IFN γ . Tout comme pour la voie TGF- β 1/SMAD2, nos résultats (Figure 3.6B) montrent qu'en condition de privation en glucose, il n'y a pas de différence significative dans le signal de STAT1 induit par l'IFN γ que ce soit après 15 ou 30 min. En condition hyper-glucidique, il n'y a pas non plus de différence significative dans le signal de STAT1 induit par l'IFN γ après 15 ou 30 min. Dans l'ensemble, ces résultats sont assez similaires à ceux observés avec TGF- β 1 (Figure 3.5). Nous concluons que dans les cellules HIESC, la quasi-perte de signal observée avec OSM (Figure 3.4) ne se reproduit pas non plus avec p-STAT1 dans la voie IFN γ /STAT1.

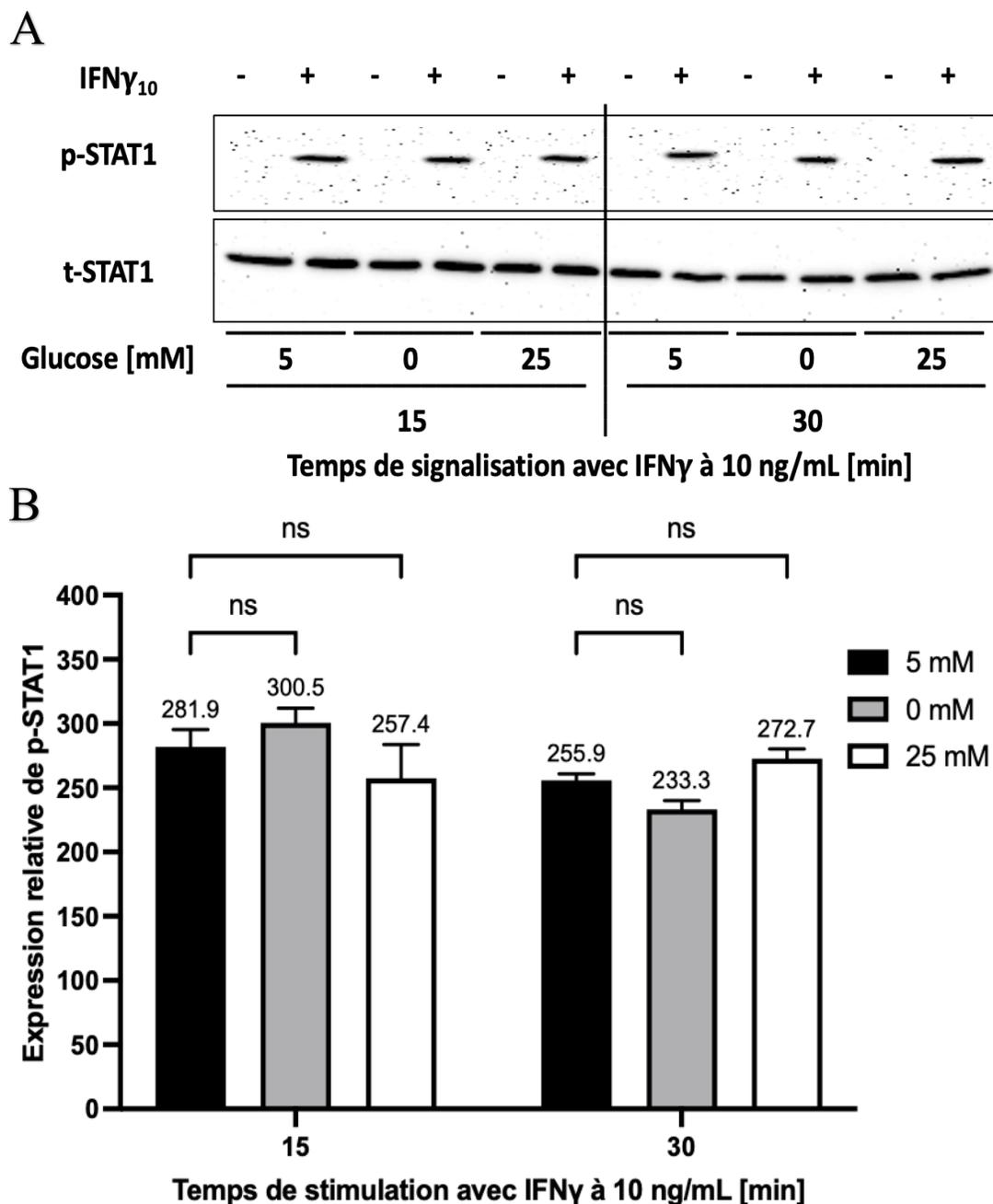


Figure 3.6 Impact de la concentration de glucose dans le milieu de culture sur la modulation de la phosphorylation de STAT3 par l'IFN γ .

A : un western blot représentatif analysant les niveaux relatifs de STAT1 phosphorylée et de STAT1 totale dans les cellules H1ESC prétraitées avec des concentrations de 5, 0 et 25 mM de glucose pendant 48h, puis stimulées avec l'IFN γ à 10 ng/mL pendant 15 et 30 minutes. **B** : analyse densitométrique et statistique (two-way ANOVA) du western blot. Les résultats sont une moyenne +/- écart type de trois expériences indépendantes. * $p < 0,05$

L'ensemble de ces résultats démontrent que dans les cellules HIESC, la perte d'activation se produit particulièrement pour le signal de la protéine STAT3 phosphorylée induit par OSM en condition de privation en glucose alors que les voies de signalisation TGF- β 1/SMAD2 et IFN γ /STAT1 ne sont pas affectées en absence de glucose.

3.3 Impact des conditions normo-glucidique, de privation en glucose et hyper-glucidique sur l'activité métabolique, la production de lactate et la viabilité des cellules HIESC

Le but de cette étude est de mesurer les activités métabolique et glycolytique des cellules HIESC soumises pendant 48 heures à des conditions normo-glucidique (5 mM), de privation en glucose et hyper-glucidique (25 mM) et vérifier si les changements observés seraient imputés à une mortalité cellulaire.

Les résultats de l'activité métabolique des cellules HIESC en fonction de la concentration de glucose sont présentés à la Figure 3.7. Ces résultats nous montrent clairement qu'en absence de glucose, l'activité métabolique des cellules HIESC diminue fortement. Ainsi, en absence de glucose, une diminution significative de plus de 80 % de l'activité métabolique est observée. En parallèle, lorsque les cellules sont en condition hyper-glucidique, seulement une très légère augmentation de l'activité métabolique est observée. Cette augmentation d'environ 3 % n'est pas significative. Nous concluons que dans les cellules HIESC, en absence de glucose, l'activité métabolique subie une forte diminution.

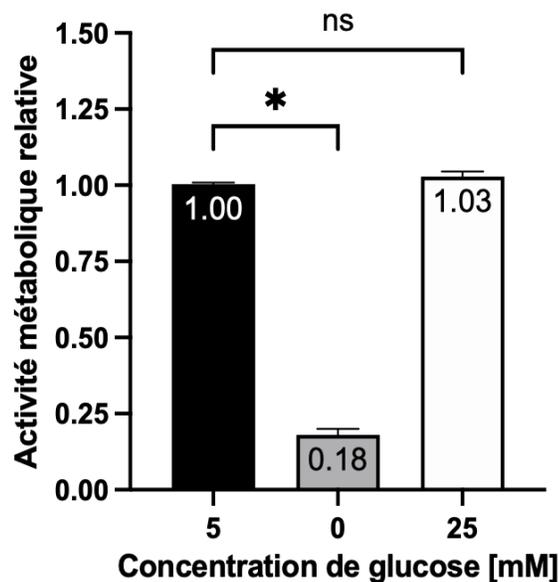


Figure 3.7 Mesure de l'impact de la concentration de glucose dans le milieu de culture sur l'activité métabolique (MTT) des cellules HIESC.

L'activité métabolique a été mesurée après un prétraitement de 24h avec du glucose à 5, 0 et 25 mM. La mesure de l'activité métabolique de la condition de base (5 mM de glucose) a été placée sur 1.0 pour mieux visualiser les variations de l'activité métabolique des conditions sans glucose et hyper-glucidique lors de l'analyse statistique (one-way ANOVA). Les résultats sont une moyenne +/- écart type de trois expériences indépendantes. * $p < 0,05$

Les résultats quant à la production de lactate par les cellules HIESC en fonction de la concentration de glucose sont présentés à la Figure 3.8. Le résultat sur la production de lactate dans les cellules HIESC suit la même tendance que l'activité métabolique. C'est-à-dire qu'une très forte diminution est observée en absence de glucose, soit plus de 80 %. En ce qui concerne la condition hyper-glucidique, c'est également semblable avec une légère augmentation qui n'est pas significative. Nous concluons que dans les cellules HIESC, en absence de glucose, la production de lactate subie une forte diminution.

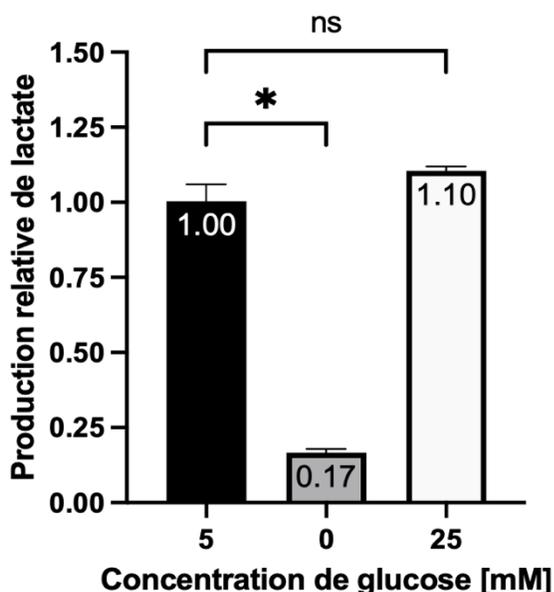


Figure 3.8 Impact de la concentration de glucose dans le milieu de culture sur la production de lactate par les cellules HIESC.

La production de lactate a été mesurée après un prétraitement de 24h avec du glucose à 5, 0 et 25 mM. La mesure de l'activité métabolique de la condition de base (5 mM de glucose) a été placée sur 1.0 pour mieux visualiser les variations de l'activité métabolique des conditions sans glucose et hyper-glucidique lors de l'analyse statistique (one-way ANOVA). Les résultats sont une moyenne +/- écart type de trois expériences indépendantes. * $p < 0,05$

En complément, afin de vérifier si les changements observés au niveau des activités métabolique et glycolytique seraient imputés à une mortalité cellulaire, nous avons évalué la viabilité des cellules HIESC (par le test d'exclusion du bleu de Trypan) en fonction de la concentration de glucose disponible. Les résultats sont présentés à la Figure 3.9. Premièrement, en condition normo-glucidique, le décompte cellulaire par champ a été évalué à environ 104 cellules vivantes et environ 5 cellules mortes, ce qui correspond à un taux de viabilité de 95 %. En condition de privation en glucose, bien que le nombre des cellules vivantes diminue d'environ 10 % par rapport à la condition normo-glucidique, le taux de viabilité reste similaire et a été évalué à 94 %. En condition hyper-glucidique, bien qu'il y ait moins de cellules mortes, il n'y a pas de différence significative dans le nombre de cellules vivantes en comparaison avec la condition normo-glucidique. Nous concluons que dans les cellules HIESC, en absence de glucose, il n'y a pas d'augmentation de la mortalité cellulaire.

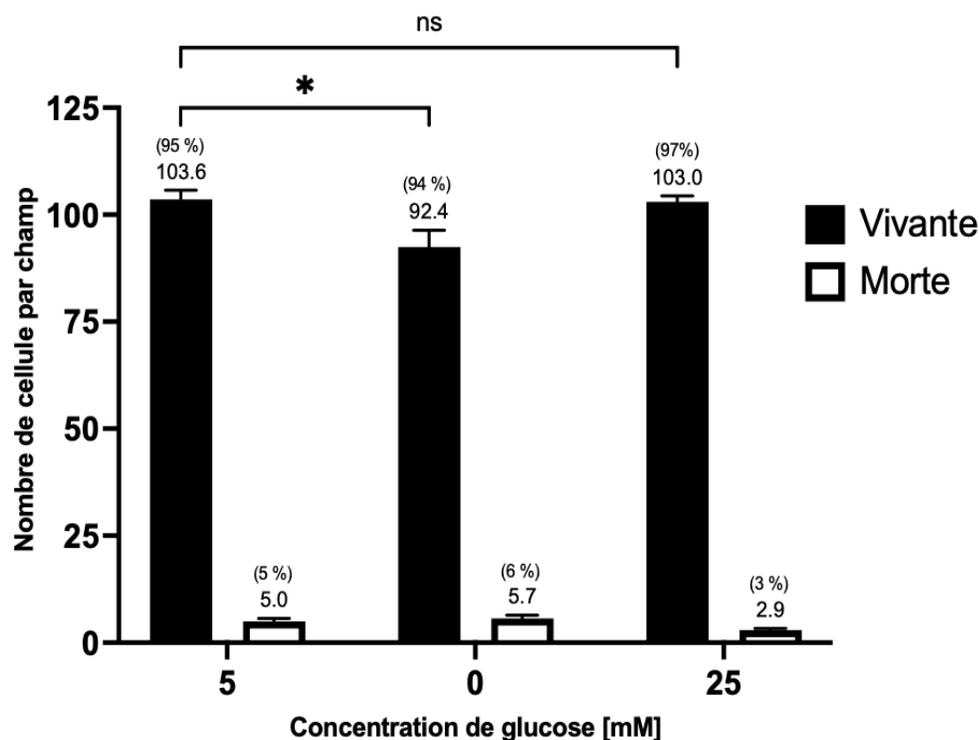


Figure 3.9 Impact de la concentration de glucose dans le milieu de culture sur la viabilité (mesurée par le test au bleu de trypan) des cellules HIESC.

Le test de viabilité a été faite après un prétraitement de 24h avec du glucose à 5, 0 et 25 mM. Pour chaque condition, les cellules vivantes et mortes dans chaque puits ont été compté au microscope et une moyenne est faite, suivi de l'analyse statistique (two-way ANOVA). Les résultats sont une moyenne +/- écart type de trois expériences indépendantes. * $p < 0,05$

Avec ces derniers résultats, nous pouvons avancer avec certitude qu'il n'y a pas de différence significative entre les conditions normo-glucidique et hyper-glucidique dans les activités métabolique et glycolytique des cellules HIESC. C'est pour cette raison que nous avons décidé de nous concentrer davantage sur les conditions de privation en glucose et hypo-glucidique et d'analyser les effets du glucose à des concentrations variant entre 0 et 5 mM.

3.4 Impact de conditions de privation totale ou partielle en glucose sur l'activation des voies de signalisation OSM/STAT3, TGF- β 1/SMAD2 et IFN γ /STAT1

L'objectif de cette étude est de vérifier si, par rapport à une condition normo-glucidique (5 mM glucose), les conditions de culture en absence (0 mM glucose) ou en

présence des faibles concentrations de glucose (0.25, 0.5, 0.75 et 1 mM glucose) ont un impact sur l'activation des voies de signalisation OSM/STAT3, TGF- β 1/SMAD2 et IFN γ /STAT1 dans les cellules HIESC.

Nous avons commencé par effectuer une analyse sur la capacité de l'OSM à induire la phosphorylation de STAT3. Pour ce faire, nous avons réalisé une dose-réponse de la concentration disponible de glucose à laquelle les cellules étaient exposées pendant 48 heures avant leur traitement avec l'OSM. Les résultats présentés à la Figure 3.10A montrent que la détection du signal de la protéine STAT3 totale est relativement constante sur toute la membrane et cela pour chaque concentration de glucose traitée avec OSM.

Nous avons procédé à une quantification et relativisé la quantité de STAT3 phosphorylée sur la quantité totale de la protéine STAT3 pour chaque concentration de glucose traitée avec OSM. Nos résultats (Figure 3.10B) confirment, une fois de plus, l'absence de signal de p-STAT3 en absence de glucose. Mais cette fois, nous observons clairement que plus la concentration de glucose augmente, plus l'intensité du signal de STAT3 phosphorylée augmente. Autrement dit, l'intensité du signal de STAT3 phosphorylée subit une augmentation significative proportionnellement à la concentration de glucose. Nous avons comparé chaque concentration de glucose avec la concentration de base normo-glucidique (5 mM de glucose). Les résultats montrent que pour les concentrations de 0.75 et 1 mM de glucose, il n'y a pas de différence significative dans l'activation de STAT3 (p-STAT3). Alors que pour les concentrations de 0.5, 0.25 et 0 mM de glucose, nous observons une différence significative en comparant avec la condition normo-glucidique. Nous concluons que dans les cellules HIESC, à des faibles concentrations de glucose, l'activation de la voie OSM/STAT3 est réduite de façon proportionnelle à la concentration de glucose dans le milieu.

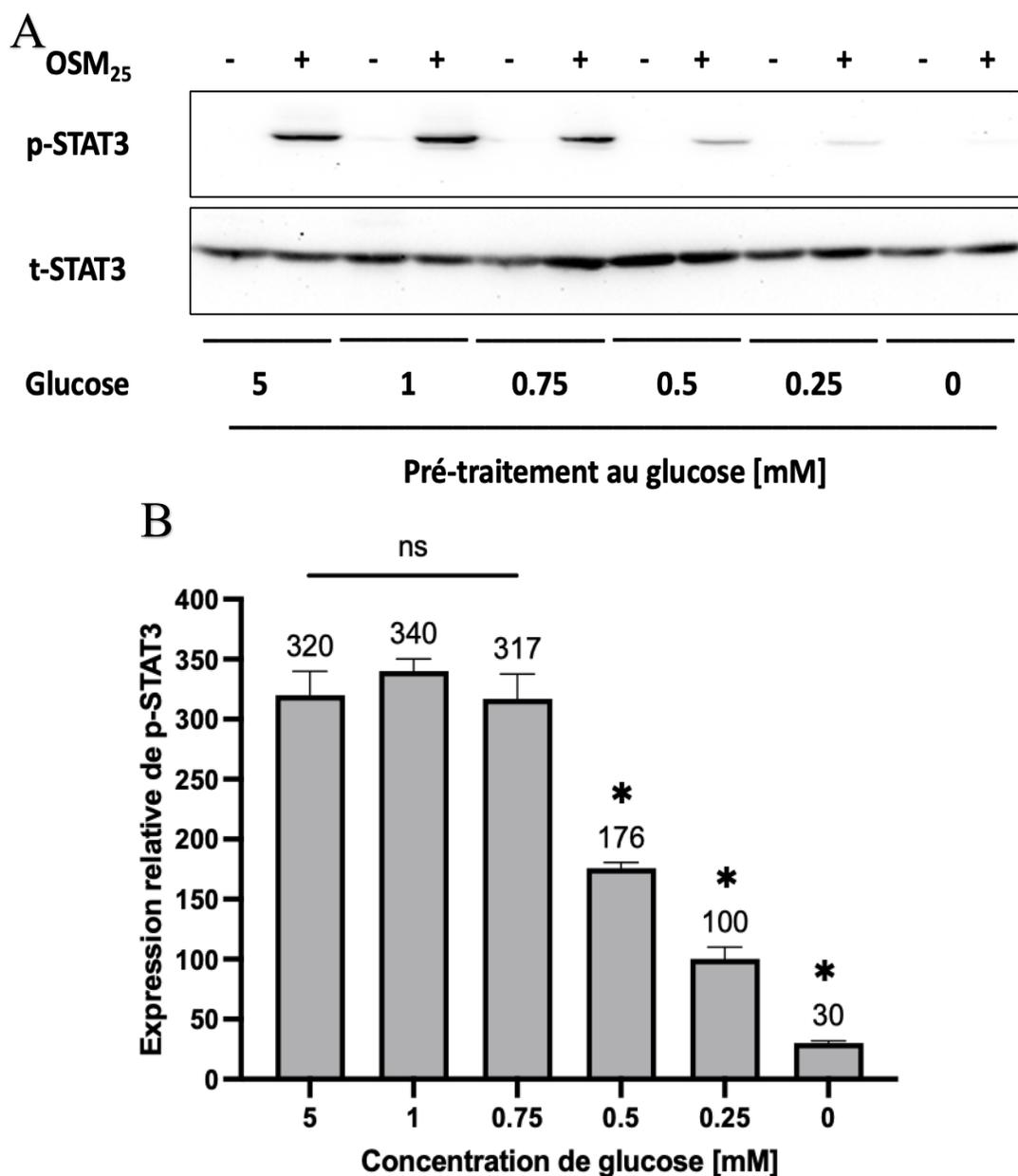


Figure 3.10 Activation de la voie OSM/STAT3 en condition d'hypoglycose.

A : un western blot représentatif analysant les niveaux relatifs de STAT3 phosphorylée et de STAT3 totale dans les cellules HIESC prétraitées avec des concentrations de 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1 et 5 mM de glucose pendant 48h, puis stimulées avec l'OSM à 25 ng/mL pendant 30 minutes. **B** : analyse densitométrique et statistique (one-way ANOVA) du western blot. Les résultats sont une moyenne +/- écart type de trois expériences indépendantes. * $p < 0,05$

Nous avons ensuite déterminé si cette diminution progressive de la capacité de l'OSM à activer STAT3 avec une baisse de la concentration de glucose se reproduisait dans d'autres voies de signalisation, comme les voies TGF- β 1/SMAD2 (Figure 3.11) ou

encore IFN γ /STAT1 (Figure 3.12). Les résultats présentés à la Figure 3.11A montrent que la détection du signal de la protéine SMAD2 totale est relativement constante sur toute la membrane et cela pour chaque concentration de glucose traitée avec TGF- β 1.

Nous avons procédé à une quantification et relativisé la quantité de SMAD2 phosphorylée sur la quantité totale de la protéine SMAD2 pour chaque concentration de glucose traitée avec TGF- β 1. Nos résultats (Figure 3.11B) montrent clairement qu'il n'y a pas de variation significative du signal de SMAD2 phosphorylée (p-SMAD2), et cela peu importe la concentration de glucose. Nous avons comparé chaque concentration de glucose avec la concentration de base (5 mM de glucose). Les données montrent que, pour chaque concentration de glucose, il n'y a pas de différence significative dans le signal de p-SMAD2. Nous concluons que dans les cellules HIESC, l'activation de la voie TGF- β 1/SMAD2 n'est pas liée à la quantité de glucose disponible dans le milieu.

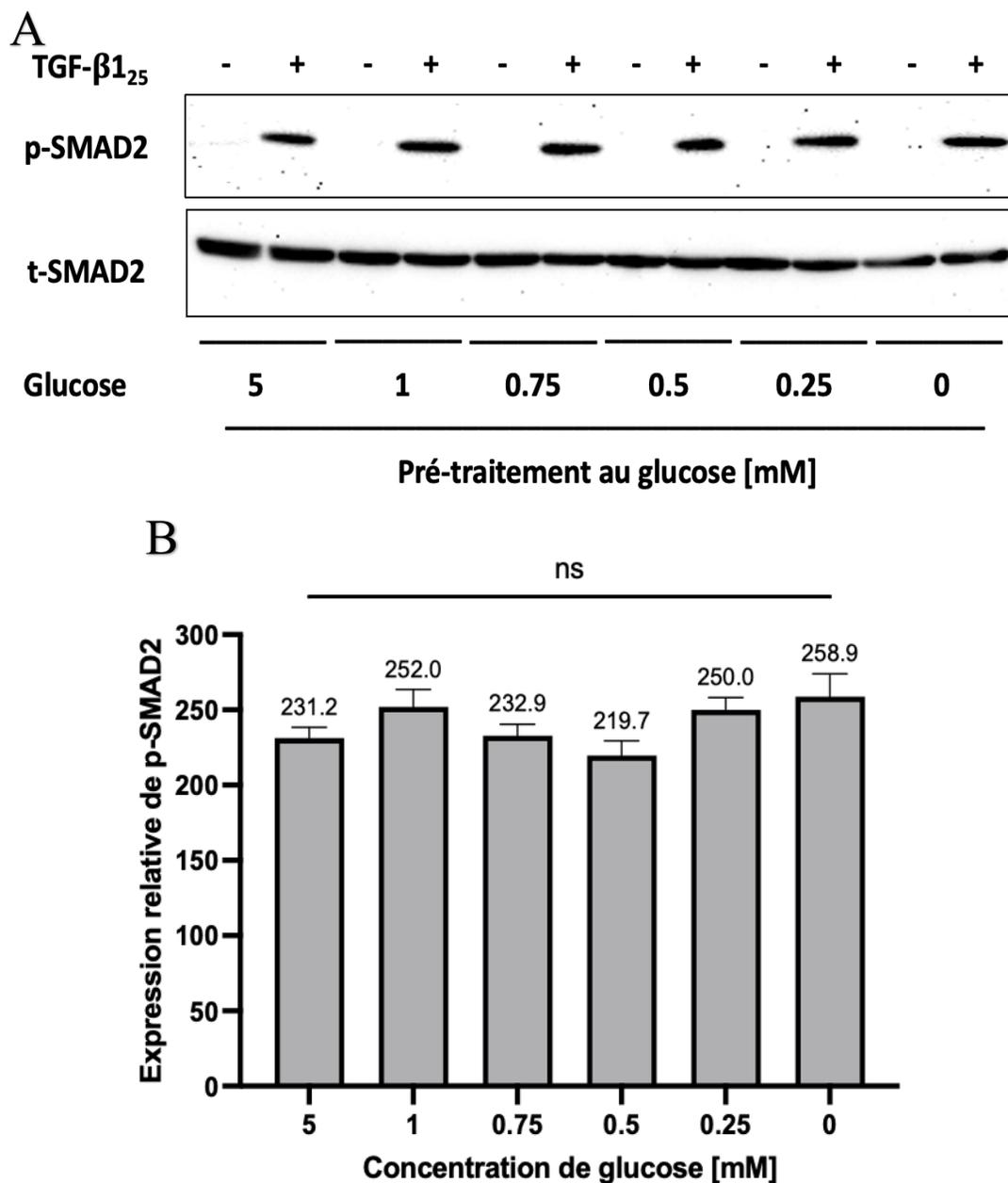


Figure 3.11 Activation de la voie TGF- β 1/SMAD2 en condition d'hypoglycose.

A : un western blot représentatif analysant les niveaux relatifs de SMAD2 phosphorylée et de SMAD2 totale dans les cellules HIESC prétraitées avec des concentrations de 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1 et 5 mM de glucose pendant 48h, puis stimulées avec TGF- β 1 à 25 ng/mL pendant 30 minutes. **B** : analyse densitométrique et statistique (one-way ANOVA) du western blot. Les résultats sont une moyenne +/- écart type de trois expériences indépendantes. * $p < 0,05$

Les résultats présentés à la Figure 3.12A montrent que la détection du signal de la protéine STAT1 totale est relativement constante sur toute la membrane et cela pour chaque concentration de glucose traitée avec IFN γ .

Nous avons procédé à une quantification et relativisé la quantité de STAT1 phosphorylée sur la quantité totale de la protéine STAT1 pour chaque concentration de glucose traitée avec IFN γ . Tout comme pour la voie TGF- β 1/SMAD2, les résultats (Figure 3.12B) montrent qu'il n'y a pas de diminution du signal de STAT1 phosphorylée proportionnellement à la concentration de glucose. Nous avons comparé chaque concentration de glucose avec la concentration de base (5 mM de glucose). Selon les résultats obtenus pour chaque concentration de glucose, il n'y a pas de différence significative dans le signal de p-STAT1. Dans l'ensemble, ces résultats sont assez similaires à celui avec TGF- β 1 (Figure 3.11). Nous concluons que dans les cellules HIESC, l'activation de la voie IFN γ /STAT1 n'est pas liée à la quantité de glucose disponible dans le milieu.

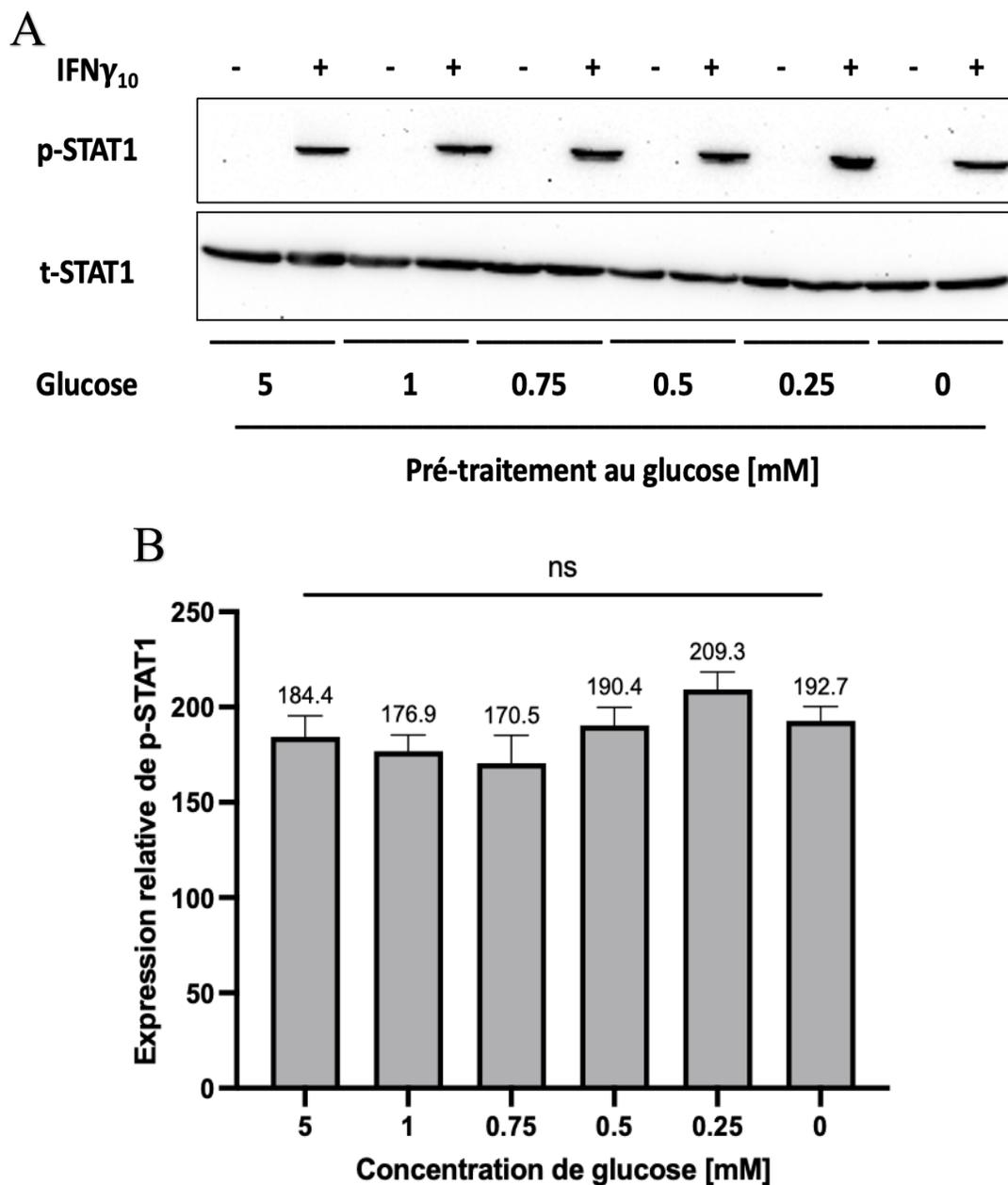


Figure 3.12 Activation de la voie IFN γ /STAT1 en condition d'hypoglycose.

A : un western blot représentatif analysant les niveaux relatifs de STAT1 phosphorylée et de STAT1 totale dans les cellules HIESC prétraitées avec des concentrations de 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1 et 5 mM de glucose pendant 48h, puis stimulées avec IFN γ à 10 ng/mL pendant 30 minutes. **B** : analyse densitométrique et statistique (one-way ANOVA) du western blot. Les résultats sont une moyenne +/- écart type de trois expériences indépendantes. * $p < 0,05$

3.5 Étudier l'influence de l'activation de la voie OSM/STAT3 sur le métabolisme énergétique dans le contexte d'une privation totale ou partielle de glucose au sein des cellules HIESC

Cette série d'expériences vise à vérifier si l'activation de la voie de signalisation OSM/STAT3 participe à la régulation de la production d'ATP et à la préservation de la glycolyse dans des conditions de privation et restreintes en glucose (0.25, 0.5, 0.75 et 1 mM glucose) par rapport à une condition normo-glucidique (5 mM glucose). Les quantités d'ATP et de lactate ont été mesurées après une stimulation en absence (témoin) ou en présence d'OSM pendant 6 h. Les résultats correspondants à la production d'ATP sont présentés à la Figure 3.13 et ceux relatifs à la production de lactate sont présentés à la Figure 3.14.

La Figure 3.13 montre que plus la concentration de glucose diminue de 5 à 0 mM, plus la production d'ATP diminue. Dans les conditions sans stimulation avec de l'OSM pendant 6 heures, les quantités d'ATP par condition à 5 et 1 mM de glucose ont été évaluées à 16 et 12 μM , respectivement. À partir de 0.75 mM de glucose, la quantité d'ATP diminue à 7 μM pour atteindre un minimum de 2 μM à 0 mM de glucose.

Lorsque les cellules ont été stimulées avec de l'OSM pendant 6 h, la production d'ATP augmente de façon significative par rapport aux cellules non stimulées, et ce peu importe la concentration de glucose. Ainsi, la quantité d'ATP par condition passe de 16 μM à 52 μM à 5 mM de glucose et de 12 μM à 41 μM à 1 mM de glucose. À noter, la production d'ATP augmente de manière significative même à des concentrations de 0.25 et 0 mM de glucose, où les quantités d'ATP sont d'environ 3 à 4 fois supérieures par rapport aux cellules non stimulées. Une autre observation importante est que cette variation suit la même tendance que le signal de p-STAT3 observé à la Figure 3.10.

Dans l'ensemble, OSM augmente la production d'ATP dans les cellules HIESC, et cela pour chacune des concentrations de glucose. Nous concluons que dans les cellules HIESC, la production d'ATP, en absence ou en présence d'OSM, est proportionnelle à la concentration de glucose dans le milieu.

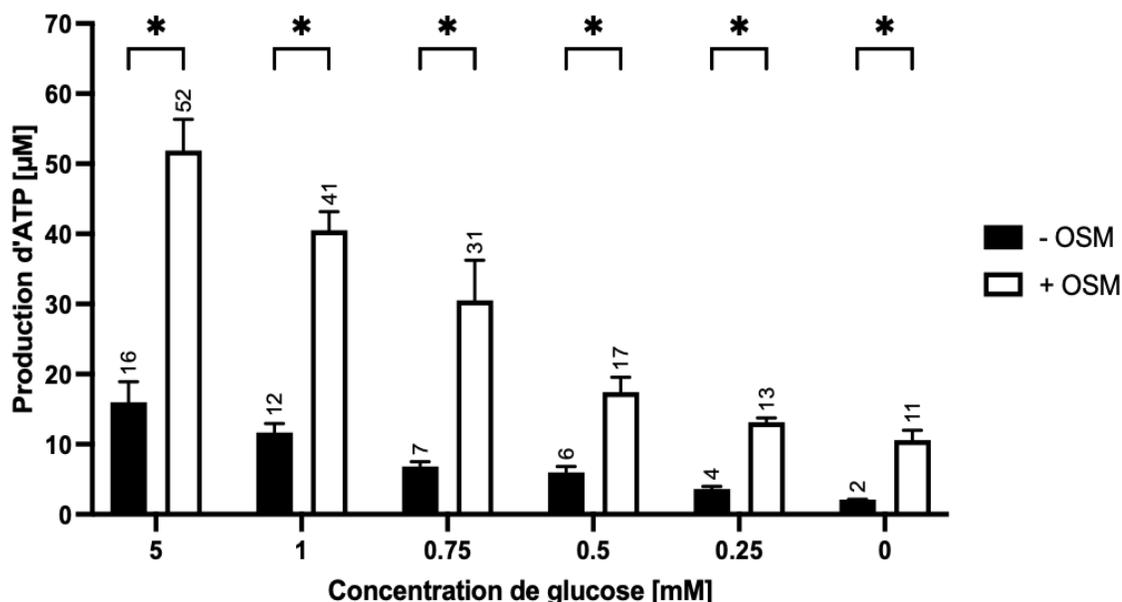


Figure 3.13 Mesure de la production d'ATP des cellules HIESC en condition d'hypoglycose.

La production d'ATP a été mesurée après un prétraitement de 48h avec du glucose à 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1 et 5 mM, puis stimulé ou pas avec de l'OSM à 25 ng/mL pendant 6h. Par la suite, une analyse statistique (two-way ANOVA) a été réalisée. Les résultats sont une moyenne +/- écart type de trois expériences indépendantes. * $p < 0,05$

Les résultats présentés à la Figure 3.14 montrent que sans stimulation avec de l'OSM, plus la concentration de glucose diminue, plus la production de lactate diminue. Cela suit la même tendance que la production d'ATP observée à la Figure 3.13. Ainsi, la quantité de lactate produit par les cellules HIESC est d'environ 1208 μM en condition normo-glucidique (5 mM de glucose) et diminue graduellement en fonction de la diminution de la concentration de glucose, passant de 929 μM à 1 mM de glucose à une production de lactate presque nulle à 0 mM de glucose.

Lorsque que les cellules ont été stimulées avec de l'OSM, nous observons encore une fois la même tendance que le signal de p-STAT3 à la Figure 3.10 et la production d'ATP à la Figure 3.13. Cependant, l'effet de l'OSM sur la production de lactate commence à être significatif à partir de 0.75 mM de glucose, avec une augmentation de la quantité de lactate par puits passant de 666 μM à 1009 μM à 0.75 mM de glucose et de

469 μM à 710 μM à 0.5 mM de glucose. Il est important de noter que la production de lactate augmente de manière significative même à une concentration de 0.25 mM de glucose et en absence de glucose (0 mM), passant de 270 μM à 495 μM à 0.25 mM de glucose et de 2 μM à 161 μM à 0 mM de glucose.

Dans l'ensemble, OSM augmente la production de lactate des cellules HIESC à des faibles concentrations de glucose (inférieur à 1 mM). Ce résultat est très similaire à celui sur la production d'ATP (Figure 3.13). Nous concluons que dans les cellules HIESC, la production de lactate, en absence ou en présence d'OSM, est proportionnelle à la concentration de glucose dans le milieu.

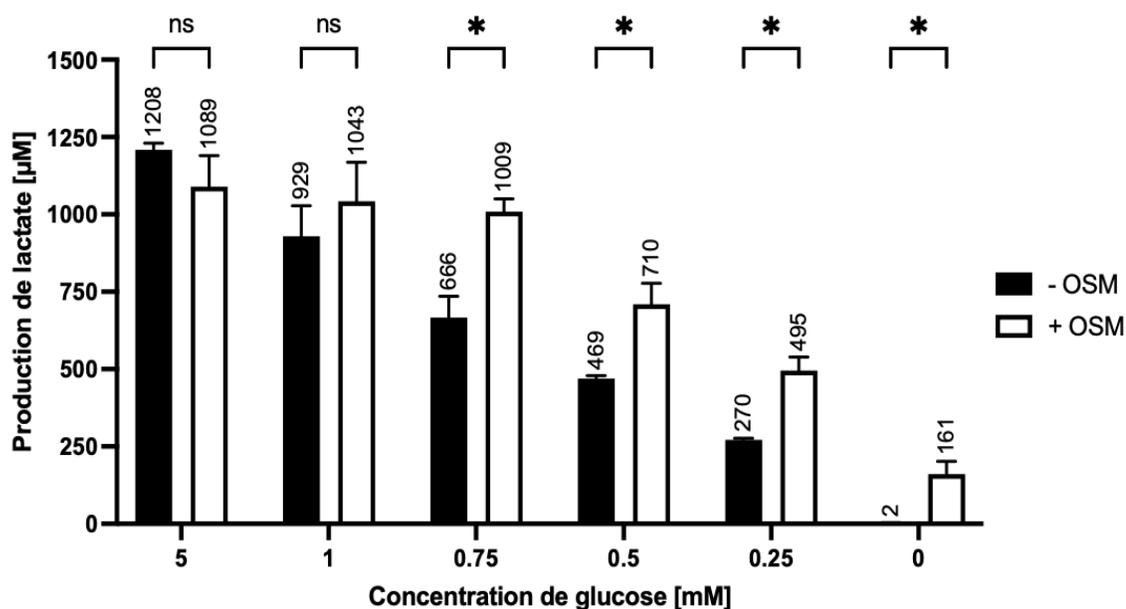


Figure 3.14 Mesure de la production de lactate des cellules HIESC en condition d'hypoglycose.

La production de lactate a été mesurée après un prétraitement de 48h avec du glucose à 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1 et 5 mM, puis stimulé ou pas avec de l'OSM à 25 ng/mL pendant 6h. Par la suite, une analyse statistique (two-way ANOVA) a été réalisée. Les résultats sont une moyenne +/- écart type de trois expériences indépendantes. * $p < 0,05$

CHAPITRE IV

DISCUSSION, PERSPECTIVES ET CONCLUSION

4.1 Interprétation des résultats

4.1.1 Cinétique des voies de signalisation OSM/STAT3, TGF- β 1/SMAD2 et IFN γ /STAT1 dans les cellules HIESC en conditions normo-glucidiques

Notre premier objectif était de déterminer la capacité des cytokines OSM, TGF- β 1 et IFN γ à activer leur voie canonique respective dans les cellules endométriales stromales en conditions normales de concentration en glucose. Après l'analyse de nos résultats, nous avons constaté que chaque cytokine à l'étude induit sa voie de signalisation dans les cellules HIESC. En effet, le signal observé sur la membrane ainsi que l'analyse densitométrique démontrent bien cette capacité des cytokines à induire leur voie de signalisation respective dans les cellules HIESC. À noter, les concentrations des cytokines utilisées étaient celles déterminées comme optimales par des études préalables (95,166,167) et en cours (données non publiées).

La capacité de chaque cytokine à induire sa voie de signalisation diffère. En effet, certaines induisent un signal dès les 5 premières minutes de stimulation, comme l'OSM, tandis que pour d'autres, il faut attendre après 15 minutes (comme l'IFN γ) voire après 60 minutes (comme le TGF- β 1) pour induire un signal maximal.

Nous avons également rapporté des différences notables en ce qui concerne le temps durant lequel le signal reste actif de façon optimale. Pour la voie OSM/STAT3, le signal commence à diminuer après 60 minutes d'activation alors que pour la voie TGF- β 1/SMAD2, c'est après 90 minutes d'activation. Cependant, l'induction de la voie IFN γ /STAT1 demeure élevée et soutenue même après 90 minutes de stimulation (temps maximal de notre expérience). Comme ce n'était pas l'objectif de notre étude, nous

n'avons pas investigué plus loin pour connaître à quel moment le signal commence à diminuer.

Nos résultats concernant l'activation de STAT3 (p-STAT3) dans les cellules endométriales stromales humaines sont en accord avec ceux rapportés dans la littérature (168,169). En conditions normales de glucose, les niveaux de phosphorylation de STAT3 induits par LIF ou IL-11, par exemple, sont augmentés après 5 minutes de stimulation, soutenus pendant 45 minutes avec une réduction graduelle à 60 minutes de stimulation. Nos études précédentes ont également démontré une cinétique de signalisation similaire de la voie OSM/STAT3 dans les cellules trophoblastiques humaines (95).

Concernant l'activation de SMAD2 (et SMAD3), l'effet du TGF- β 1 dans les cellules endométriales stromales humaines a aussi été rapporté avec une augmentation maximale de l'induction de p-SMAD2 et p-SMAD3 de 2 à 3 fois supérieure par rapport au témoin après 5 à 30 minutes de traitement (170). Cette divergence avec nos résultats s'explique probablement, d'une part, par le fait qu'il s'agit des cultures primaires produites à partir des portions de tissus endométriaux qui ont été prélevées sur des femmes préménopausées ayant subi une hystérectomie pour des raisons médicales, excluant le cancer de l'endomètre. D'autre part, les études de signalisation rapportées ont été effectuées à des doses de 1 et 5 ng/mL alors que, dans nos études, les cellules HIESC ont été stimulées à une dose de 25 ng/mL.

Quant à l'induction de p-STAT1 par l'IFN γ , nos résultats sont aussi en conformité avec ceux rapportés dans la littérature. Au fait, une première étude utilisant des cultures primaires des cellules endométriales stromales humaines a démontré que l'activation de STAT1 est optimale après 20 minutes de stimulation aux mêmes doses utilisées dans nos études, soit à 10 ng/mL (171). Une autre étude a démontré que la présence de p-STAT1 induit par l'IFN γ dans les cellules endométriales stromales humaines peut être décelable même après 48 heures de stimulation à des doses variant de 1 à 10 ng/mL (172). Dans ces deux études, les cultures primaires des cellules endométriales stromales ont été produites

à partir des échantillons de tissus endométriaux des patientes préménopausées ayant subi une hystérectomie pour des raisons médicales bénignes.

4.1.2 Impact du glucose sur l'activation des voies de signalisation, l'activité métabolique, la production de lactate et la viabilité des cellules HIESC

Une fois que nous avons établi la cinétique de signalisation pour chaque cytokine, nous avons pris en compte les temps optimaux d'activation, qui s'avèrent être 15 et 30 minutes, pour déterminer si l'activation des voies de signalisation OSM/STAT3, TGF- β 1/SMAD2 et IFN γ /STAT1 dépend de la concentration de glucose au sein des cellules HIESC. Nous avons commencé par déterminer les changements dans les voies de signalisations à l'étude lors d'une privation de glucose (0 mM) et une condition hyper-glucidique (25 mM) par rapport à une concentration normale de glucose (5 mM).

Après l'analyse de nos résultats, nous avons constaté que la voie OSM/STAT3 est impactée par ces changements. En effet, en condition de 0 mM de glucose, le signal de p-STAT3 induit par l'OSM subi une diminution significative d'environ 90 % autant à 15 qu'à 30 minutes de stimulation par rapport à une condition normo-glucidique. Cependant, nous avons également constaté que les voies de signalisation TGF- β 1/SMAD2 et IFN γ /STAT1 ne sont pas affectées par les changements dans la concentration de glucose, autant en condition hyper-glucidique qu'en absence de glucose.

De façon intéressante, nos résultats supportent d'autres études revendiquant que le glucose joue un rôle permissif dans l'activation de STAT3 induite par la leptine (173), une hormone dérivée des adipocytes qui exerce, principalement via STAT3, des actions pléiotropes sur l'équilibre énergétique, l'homéostasie du glucose et la reproduction (174,175). Au niveau de la fonction reproductrice, la leptine est considérée comme un indicateur essentiel de la suffisance en nutriments/énergie, condition préalable à la capacité de féconder chez la femme. Par exemple, chez les femmes présentant une diminution extrême de l'adiposité corporelle (*i.e.*, femmes anorexigènes ou athlètes féminines d'élite), la quasi-disparition de la leptine de la circulation est la principale cause

de l'arrêt du cycle menstruel. Cela est dû en grande partie à la sécrétion insuffisante de gonadotrophines (LH et FSH) par l'hypophyse à cause de l'absence de leptine et l'activation de STAT3 (176). Par ailleurs, la suppression neuronale de STAT3 est connue pour rendre les souris mâles et femelles hyperphagiques, obèses, diabétiques et infertiles (177).

Dans ce contexte, il a été démontré que dans les cellules neuronales, la voie de signalisation JAK2/STAT3 induite par la leptine est augmentée en condition hyperglucidique (25 mM) par rapport à une condition normo-glucidique (173). Intéressant à noter, ces études montrent que la glycolyse semble être nécessaire pour la signalisation de la leptine au niveau central, puisque la privation de glucose ou le blocage de la glycolyse suppriment la capacité de la leptine à augmenter la phosphorylation de JAK2 et de STAT3 dans les neurones PC12 de rat et les neurones hypothalamiques murins GT1-7. De plus, dans la même logique que nos études, il a été établi que la capacité de l'hormone de croissance (GH) à stimuler la voie JAK2/STAT5 n'est pas affectée par les changements dans la concentration de glucose, suggérant que l'activation de STAT3 est spécifiquement dépendante de la présence de glucose et l'activation de la glycolyse.

Pour mieux supporter cette dernière hypothèse, nous avons récemment vérifié si la voie LIF/STAT3 subie également une diminution en absence de glucose (Figure 4.1). L'étude de signalisation a été réalisée dans les mêmes conditions en utilisant une dose optimale de LIF, soit 25 ng/mL. Nos résultats démontrent que la signalisation de LIF, une autre cytokine de la famille des IL-6 activant p-STAT3, est également affectée par une absence de glucose, mais pas du tout à 5 ou 25 mM glucose. Ces observations soulèvent la possibilité que l'activation de STAT3 est dépendante de la présence de glucose et suggèrent fortement que les médiateurs de la glycolyse seraient cruciaux pour activer les voies OSM/STAT3 et LIF/STAT3 dans les cellules HIESC, probablement en facilitant le couplage entre les récepteurs OSMR et LIFR avec STAT3 mais pas entre le récepteur de l'IFN γ (IFNGR) et STAT1, ou entre le récepteur de TGF- β 1 (TGF- β R1) et les protéines SMAD2/3.

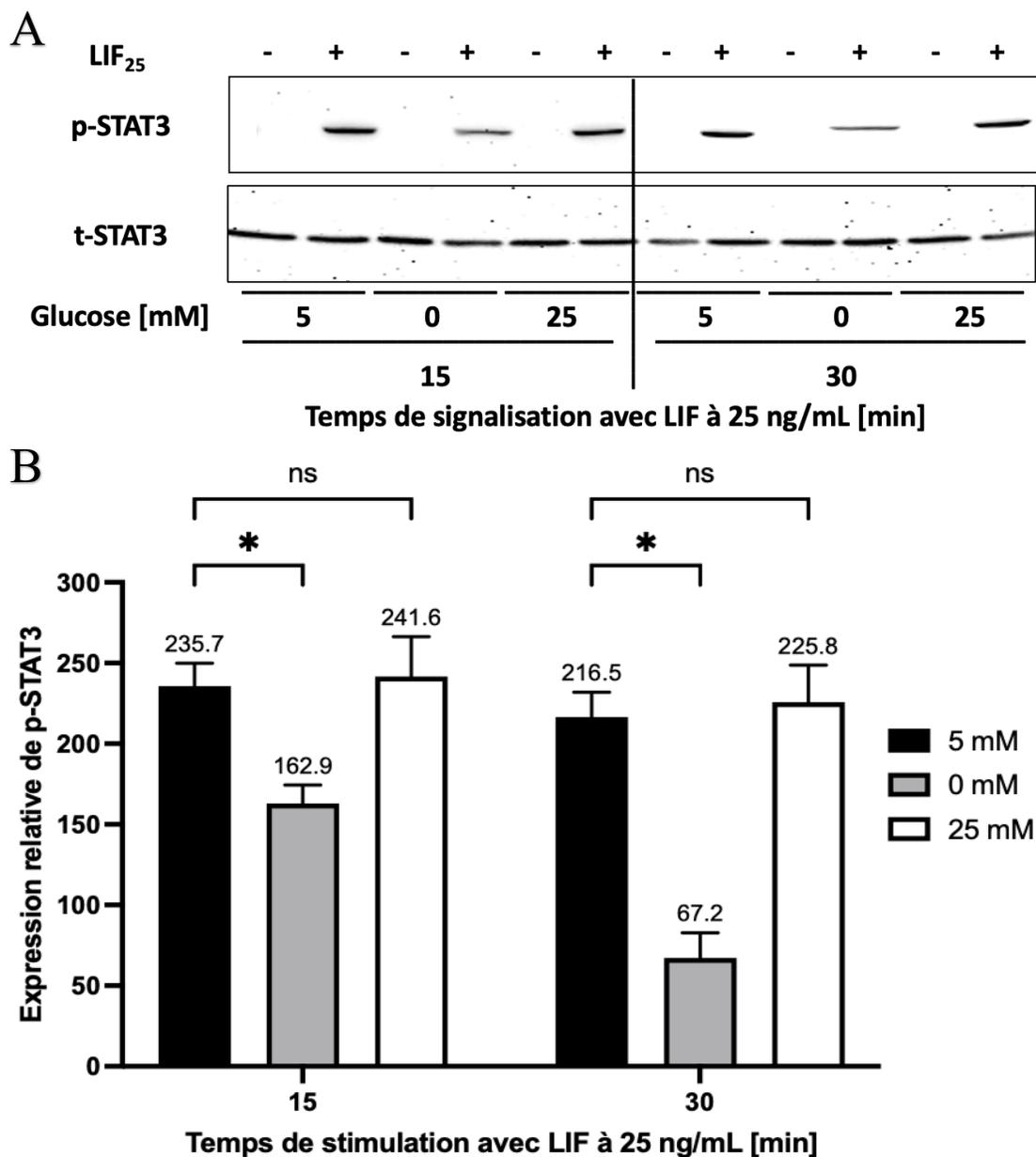


Figure 4.1 Impact de la concentration de glucose dans le milieu de culture sur la modulation de la phosphorylation de STAT3 induite par LIF.

A : un western blot représentatif analysant les niveaux relatifs de STAT3 phosphorylée et de STAT3 totale dans les cellules H1ESC prétraitées avec des concentrations de 5, 0 et 25 mM de glucose pendant 48h, puis stimulées avec LIF à 25 ng/mL pendant 15 et 30 minutes. **B** : analyse densitométrique et statistique (two-way ANOVA) du western blot. Les résultats sont une moyenne +/- écart type de trois expériences indépendantes. * $p < 0,05$

Par ailleurs, il a déjà été établi que la privation de glucose, une faible concentration en glucose (< 5 mM) ou l'inhibition de la glycolyse diminue l'activité métabolique et la

prolifération cellulaire tout en induisant un arrêt du cycle cellulaire et donc la sensibilité à l'apoptose des cellules endométriales cancéreuses, tandis qu'un taux élevé de glucose (> 25 mM) augmente leur activité glycolytique, stimule leur prolifération et leur capacité d'adhésion et d'invasion (178–180). Subséquemment, l'objectif suivant était de déterminer si la perte de signal de p-STAT3 en absence de glucose était associée à une perturbation au niveau des activités métabolique ou glycolytique ou encore à la viabilité des cellules HIESC.

En premier lieu, nous avons mesuré l'activité métabolique des cellules HIESC via un test de MTT. Avant tout, il faut préciser que le test de MTT est un essai biologique basé sur la mesure de la réduction du réactif MTT en cristaux de formazan par les déshydrogénases cellulaires, qui est aujourd'hui souvent reconnu comme « le test de référence » pour l'évaluation de la cytotoxicité des molécules ou conditions agissant sur la viabilité et la prolifération cellulaire (160). Cependant, le test MTT détermine avant tout l'activité métabolique cellulaire, car il repose principalement sur l'activité des déshydrogénases mitochondriales, en particulier la succinate déshydrogénase (181). Par conséquent, cette méthode n'est pas vraiment adaptée pour distinguer la suppression métabolique de la viabilité cellulaire réduite, car une activité métabolique cellulaire réduite ne conduit pas nécessairement à une baisse de la viabilité ou de la prolifération cellulaire. Ainsi, nos résultats des tests MTT montrent que l'activité métabolique des cellules HIESC n'est pas affectée en condition hyper-glucidique mais seulement en absence de glucose avec une diminution significative de plus de 80 % par rapport à une condition normo-glucidique.

Pour valider que nos observations correspondent à une baisse de l'activité mitochondriale/métabolique et non pas à une mortalité des cellules, nous avons procédé à d'autres tests. D'abord, nous avons mesuré la production de lactate par les cellules HIESC. Les résultats obtenus sont similaires à ceux des tests de MTT, avec une baisse de la production de lactate d'environ 80 % par rapport à une condition normo-glucidique. Ce qui prouve qu'en absence de glucose, les cellules HIESC ont des activités glycolytique et métabolique fortement réduites.

Ensuite, nous avons procédé à un comptage des cellules vivantes et mortes via le test d'exclusion au bleu de trypan. Nos résultats montrent une baisse significative du nombre de cellules vivantes en absence de glucose. Certes, nous avons une baisse du nombre de cellules vivantes mais ce n'est que d'environ 10 %, ce qui n'est pas représentatif de la baisse de 80 % des activités métabolique et glucidique. Il est important de noter que l'exclusion des colorants est une technique simple et rapide qui mesure la viabilité cellulaire, mais elle est soumise au problème que la viabilité est déterminée indirectement à partir de l'intégrité de la membrane cellulaire. Ainsi, il est possible que la viabilité d'une cellule ait été compromise (mesurée par sa capacité à croître ou à fonctionner) même si son intégrité membranaire est maintenue, au moins transitoirement. Inversement, l'intégrité de la membrane cellulaire peut être anormale, mais la cellule peut être capable de se réparer et de devenir entièrement viable. Une méthode plus sophistiquée de mesurer la viabilité cellulaire consiste à déterminer l'exclusion des colorants par cytométrie en flux (164). Ainsi, afin de valider les résultats des essais au bleu de trypan, nous avons procédé tout dernièrement à la mesure de l'exclusion avec l'iodure de propidium par analyse cytométrique en flux (Figure 4.2). Cette analyse montre qu'il y a bien une baisse du nombre de cellules à 0 mM de glucose (283 évènements) d'environ 9 % par rapport à 5 mM de glucose (303 évènements), mais que l'absence de glucose n'induit pas de variation significative dans le nombre des cellules HIESC mortes (PI positives).

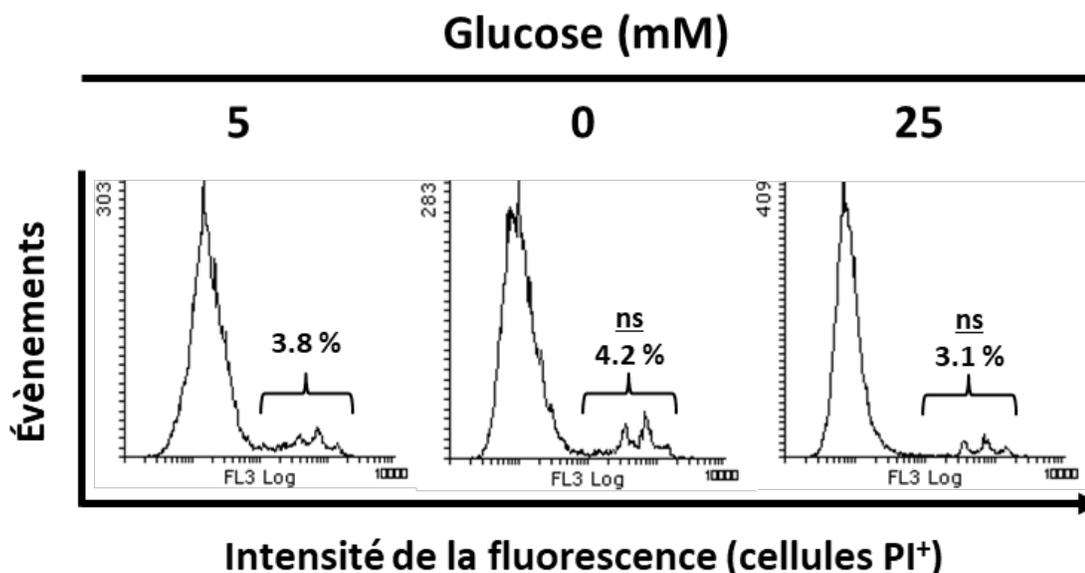


Figure 4.2 Impact de la concentration de glucose dans le milieu de culture sur la viabilité des cellules HIESC, mesurée par le test d'exclusion à l'iodure de propidium (PI). Le test de viabilité a été faite après un prétraitement de 24h avec du glucose à 5, 0 et 25 mM. Pour chaque condition, les cellules dans chaque puits ont été remises en suspension dans 100 μ L de tampon de coloration pour cytométrie en flux. Juste avant l'analyse, 5 μ L de solution de coloration à 10 μ g/mL dans du PBS ont été ajoutés à chaque échantillon. L'analyse statistique (two-way ANOVA et post-test de Bonferroni) avec les valeurs moyennes de trois expériences indépendantes démontre qu'il n'y pas de différence significative (ns) par rapport au contrôle (5 mM de glucose).

Ces derniers résultats sont appuyés par ceux d'autres études qui ont déjà démontré que des conditions nulles ou faibles en glucose résultent en une baisse de l'activité métabolique des cellules endométriales cancéreuses (178–180). Cependant, contrairement à notre modèle des cellules endométriales stromales immortalisées (HIESC), la privation de glucose diminue fortement la prolifération cellulaire et la viabilité des cellules endométriales cancéreuses. À cet égard, il est possible que les cellules endométriales cancéreuses, généralement d'origine épithéliale, soient hautement dépendantes du catabolisme glucidique (178), alors que la reprogrammation métabolique dans les cellules HIESC les empêcherait d'entrer dans les voies de mort cellulaire, tout en démontrant une activité déshydrogénase mitochondriale réduite et donc une réduction du signal MTT.

Ces différentes expériences suggèrent fortement que la perte de signal de p-STAT3 observée est associée à une réduction des activités métabolique et glucidique dans les

cellules HIESC qui ne serait pas causée par une mortalité des cellules en culture ou une baisse importante du nombre des cellules vivantes en absence de glucose. À retenir que dans tous ces expériences, nous n'avons pas observé de différences significatives entre une condition normale en glucose et la condition hyper-glucidique. C'est pour cette raison que pour la suite du projet, nous nous sommes concentrés sur les conditions restreintes en glucose.

4.1.3 Impact de conditions de privation totale ou partielle en glucose sur l'activation des voies de signalisation OSM/STAT3, TGF- β 1/SMAD2 et IFN γ /STAT1

Nos études concernant l'effet de conditions restreintes en glucose sur l'activation des voies de signalisation démontrent que la voie OSM/STAT3 est la seule à subir une diminution du signal de p-STAT3 proportionnellement à la concentration de glucose à partir d'un certain seuil (0.75 mM), alors que les voies TGF- β 1/SMAD2 et IFN γ /STAT1 ne sont pas impactées, même en absence de glucose. Ainsi, si la concentration de glucose passe en dessous de 0.75 mM, l'intensité du signal de p-STAT3 diminue de manière significative. Donc, le degré d'activation de STAT3 serait dépendant de la concentration de glucose.

Une des explications possibles est la dépendance relative des cellules endométriales stromales au métabolisme des glucides, des lipides et des acides aminés pour leur fonction au cours du cycle menstruel et l'implantation embryonnaire (182). En effet, les cellules endométriales sont capables de reprogrammer leurs voies métaboliques pour s'adapter aux défis environnementaux et préserver leur survie et leur fonction. Ainsi, elles peuvent inverser leur préférence pour le métabolisme glycolytique par rapport à la phosphorylation oxydative mitochondriale (OXPHOS) pour produire de l'énergie essentielle à leur croissance, leur fonction et leur différenciation (182,183).

Pour mieux comprendre le mécanisme par lequel le glucose et les médiateurs de la glycolyse seraient impliqués dans l'activation de STAT3, via OSM ou LIF, dans les cellules HIESC, nous travaillons actuellement sur le scénario proposé par Demaria M. et

Poli V., 2012 (184). Ces études ont montré que dans les cellules stromales fibroblastiques et les cellules épithéliales cancéreuses, STAT3 constitutivement actif induit une augmentation des niveaux de protéine HIF-1 α , un régulateur transcriptionnel clé de la glycolyse aérobie et anaérobie (185). Il a été proposé également que HIF-1 α fasse partie d'une « boucle de rétroaction » déclenchant et renforçant un changement métabolique vers la glycolyse aérobie similaire à l'effet Warburg (185,186). Le modèle de boucle de rétroaction (Figure 4.3) propose que HIF-1 α induise la transcription du gène codant pour l'isoforme M2 de la pyruvate kinase (PKM2) qui à son tour induirait la phosphorylation de STAT3 (187). Au fait, la pyruvate kinase (PK) est l'enzyme qui catalyse la dernière étape de la glycolyse en transférant le phosphate du phosphoénolpyruvate (PEP) à l'ADP pour générer de l'ATP et du pyruvate, qui peut ensuite être converti en lactate dans le cytosol via la LDHA, ou en acétyl-CoA dans la mitochondrie via la PDH, pour entrer dans le cycle de Krebs (Figure 4.3). Ainsi, nos études actuelles avec les cellules HIESC visent à démontrer si en absence ou à des faibles concentrations de glucose, l'expression de PKM2 serait réduite, ce qui diminuerait la phosphorylation de STAT3. Ainsi, la diminution du signal de p-STAT3 en absence ou à faibles concentrations de glucose pourrait être causée par une diminution de l'activité de PKM2.

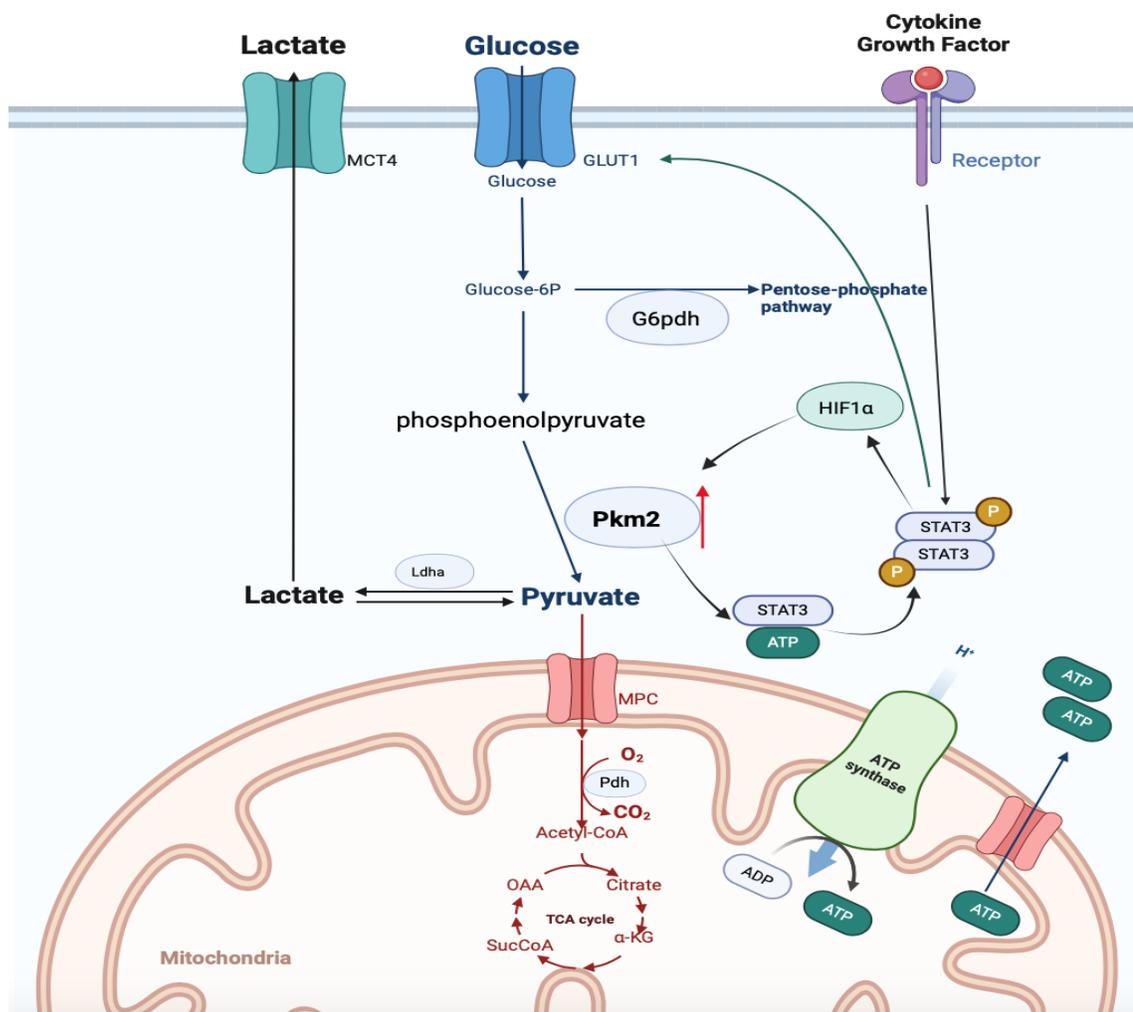


Figure 4.3 Rôle de la boucle STAT3/HIF-1 α /PKM2 dans l'influx du glucose et le maintien de la glycolyse.

HIF-1 α induit la transcription du gène codant pour l'isoforme M2 de la pyruvate kinase (PKM2), cela augmente l'expression de PKM2 qui à son tour induit la phosphorylation de STAT3. À son tour, STAT3 phosphorylé induit une augmentation des niveaux de protéine HIF-1 α . Le pyruvate peut entrer dans la mitochondrie pour produire de l'ATP ou peut être converti en lactate par la LDHA. La figure a été réalisée à l'aide de BioRender.com.

4.1.4 Influence de l'activation de la voie OSM/STAT3 sur le métabolisme énergétique dans le contexte d'une privation totale ou partielle de glucose au sein des cellules HIESC

Finalement, afin de déterminer si la voie de signalisation OSM/STAT3 participe à la régulation du métabolisme énergétique, les quantités d'ATP et de lactate ont été mesurées après une stimulation en absence (témoin) ou en présence d'OSM pendant

6 heures dans les cellules HIESC préincubées dans des conditions normo-glucidique (5 mM) et restreintes en glucose (0.25, 0.5, 0.75 et 1 mM).

Ces analyses ont amené à deux découvertes majeures. La première est que dans les cellules HIESC, la production d'ATP est liée à la concentration de glucose disponible dans le milieu, avec des taux de production stables à 5 et 1 mM de glucose (12-16 μ M), mais qui diminuent graduellement entre 0.75 mM (7 μ M) et 0 mM de glucose (2 μ M). Quant à la production de lactate, elle suit la même tendance que la production d'ATP, avec une diminution en fonction du niveau de restriction en glucose et une production pratiquement nulle en absence de glucose. Ce dernier résultat n'est pas étonnant puisque le lactate peut être produit à partir de la conversion du glucose en pyruvate par la LDHA (Figure 4.3) et ce, quelle que soit la disponibilité en oxygène (148).

Plus important encore, nos études ont démontré que l'OSM augmente de façon significative la production d'ATP et de lactate dans les cellules HIESC. Pour l'ATP, cet effet stimulateur de l'OSM se produit pour chacune des concentrations de glucose, alors que l'effet sur la production de lactate commence à être significatif à partir de 0.75 mM de glucose. De façon inattendue, l'induction des productions en ATP et en lactate par les cellules HIESC se produit à des concentrations de glucose inférieures à 1 mM et même en absence de glucose.

Note essentielle, l'induction des productions en ATP et en lactate en réponse à l'OSM suit la même tendance que le signal de p-STAT3 suggérant un rôle clé pour STAT3 comme médiateur dans la régulation des métabolismes glucidiques et énergétiques des cellules HIESC.

Nos résultats mettant en relation OSM et le métabolisme énergétique des cellules HIESC pourraient être expliqués à partir de récentes observations suggérant des corrélations importantes entre l'activation de STAT3 et le métabolisme cellulaire, particulièrement dans le flux glycolytique des cellules cancéreuses (185,188). Au fait, de plus en plus de preuves suggèrent que STAT3 joue un rôle direct dans la modulation de

la biologie des cellules cancéreuses, grâce à son implication autant dans le métabolisme énergétique que le métabolisme du glucose et des lipides (189). Ainsi, en assurant le catabolisme du glucose et la médiation de la synthèse des acides gras et de la bêta-oxydation, STAT3 favoriserait l'utilisation des ressources disponibles et soutiendrait la survie cellulaire dans des conditions de stress métabolique.

Ceci pourrait expliquer pourquoi les cellules HIESC stimulées avec l'OSM produisent davantage d'ATP et de lactate que les cellules témoins. Il faut rappeler ici que la glycolyse aérobie est un moyen inefficace de générer de l'ATP et ne produit que deux ATP par molécule de glucose, alors que plus de 30 molécules d'ATP supplémentaires sont produites à partir d'une molécule de glucose par le cycle de l'acide tricarboxylique (cycle de Krebs) et la machinerie OXPHOS (148).

Il est donc possible de concevoir qu'en absence de stimulation avec OSM, les cellules HIESC puissent préserver leur survie en utilisant la glycolyse aérobie pour tirer l'énergie de la conversion du glucose en pyruvate puis en lactate, même en conditions restreintes en glucose.

D'autre part, l'OSM, via l'induction de p-STAT3 pourrait également reprogrammer le métabolisme cellulaire et contribuer à transporter le pyruvate, issu à la fin de la glycolyse, vers la mitochondrie où il sera converti en acétyl-CoA pour ensuite entrer dans le cycle de l'acide tricarboxylique et produire davantage de molécules d'ATP via l'ATP synthase du système OXPHOS (Figure 4.3).

Les augmentations induites par l'OSM dans la production d'ATP et de lactate en situation hypo-glucidique pourraient aussi être expliquées par l'étude de Demaria M. et Poli V., 2012 (184). Ces études ont en fait démontré que l'activation de STAT3 pourrait avoir un effet positif sur l'expression du transporteur de glucose GLUT1, via l'intermédiaire de HIF-1 α . En favorisant ainsi le transport du glucose à l'intérieur de la cellule, ceci aurait comme impact d'augmenter l'activité métabolique, notamment la production de lactate et d'ATP des cellules (Figure 4.3). D'autre part, HIF-1 α induit par

p-STAT3 pourrait augmenter l'expression de PKM2. Il y aura ainsi plus de protéines PKM2, qui vont à leur tour utiliser le stock de glucose dans la cellule pour convertir le PEP en pyruvate. Ainsi, l'augmentation de PKM2 irait de pair avec une augmentation du pyruvate. Par la suite le pyruvate va être converti soit en lactate, soit en acétyl-CoA pour enfin de ligne produire de l'ATP.

Mais l'élément le plus inattendu de notre étude est que nos analyses montrent que même en absence de glucose, l'OSM induit une production importante de lactate. Ceci pourrait être expliqué par l'induction de diverses voies métaboliques génératrices des molécules de pyruvate, notamment la glycogénolyse et le catabolisme des acides aminés.

En effet, la régulation endométriale de la synthèse du glycogène est l'un des processus métaboliques les plus essentiels en préparation à l'implantation et au début de la grossesse (190). Il est bien établi que les cellules endométriales stromales et épithéliales sont capables de stocker de quantités substantielles de glucose sous forme de glycogène, surtout en réponse à l'insuline ou la progestérone (191). Ainsi, la capacité à activer la glycogénogenèse dans les cellules stromales et épithéliales de l'endomètre permet une augmentation soutenue mais cyclique du glycogène pendant la phase de sécrétion du cycle menstruel, ainsi qu'un approvisionnement persistant de glucose provenant de la glycogénolyse au cours de l'implantation du blastocyste et pendant la gestation (190,192). Le glucose disponible pourrait être métabolisé par la voie de la glycolyse, produisant non seulement du pyruvate et de l'ATP mais également du lactate.

Par ailleurs, des études récentes ont mis en évidence l'importance du lactate dans le processus de décidualisation des cellules endométriales stromales et l'implantation du blastocyste. Une première étude chez la souris a démontré que la voie de la glycolyse est essentielle à la décidualisation et que le lactate produit par les cellules déciduales est essentiel pour la prolifération des cellules endométriales stromales indifférenciées (155). D'autre part, il a été établi que chez le blastocyste de souris et humain, plus de 50 % du glucose consommé n'est pas oxydé mais réduit en lactate en présence d'oxygène (193). De nombreuses fonctions ont été proposées pour le lactate produit à l'interface foeto-

maternelle, notamment dans la dégradation des tissus pour faciliter l'implantation, dans la signalisation pour promouvoir l'angiogenèse et dans la modulation immunitaire pour prévenir le rejet maternel (194). Donc, le fait que l'OSM puisse réguler l'activité métabolique et la production de lactate en particulier revêt un rôle physiologique certain étant donné l'importance de p-STAT3 dans les cellules utérines stromales pour leur prolifération, leur différenciation en cellules déciduales et leur soutien à la réceptivité et l'attachement de l'embryon (94,195,196).

Il a été observé que le liquide utérin humain contenait une concentration relativement importante en acides aminés (3.54 mM), dont le glutamate s'est avéré présent à la concentration la plus élevée, suivi de l'alanine et de la glutamine (197). Transportés vers les cellules utérines, endométriales et embryonnaires, les acides aminés jouent un certain nombre de rôles physiologiques au cours de l'implantation et la grossesse et peuvent être utilisés, entre autres, comme source d'énergie en situation de stress énergétique (198). Chez les blastocystes murins, par exemple, un milieu pauvre en glucose et en nutriments réduit à la fois les taux d'oxydation du glucose et du pyruvate, la viabilité et la compétence développementale des blastocystes après transfert *in vivo* (199). Cependant, l'ajout d'acides aminés au milieu de culture suffit pour réduire significativement la perte de viabilité des blastocystes en restaurant l'activité glycolytique, la production de lactate et la capacité oxydative des blastocystes. Ces résultats suggèrent que l'embryon pourrait utiliser des réserves d'énergie endogènes, vraisemblablement du glycogène, qui peuvent être nécessaires lors de l'implantation pour maintenir une production d'énergie adéquate. Il est aussi plausible que les acides aminés soient utilisés comme source d'énergie pour maintenir la capacité oxydative et donc augmenter les niveaux d'ATP. En effet, de nombreux acides aminés peuvent être oxydés par une conversion en une étape en intermédiaires du cycle de l'acide tricarboxylique. Il a déjà été démontré que les acides aminés tels que la glutamine et l'alanine peuvent être utilisés par les embryons au stade pré-implantatoire comme source d'énergie (200). Il est donc possible aussi qu'en absence de glucose, les cellules HIESC puissent utiliser les acides aminés et les produits de leur catabolisme pour générer du pyruvate, de lactate et de l'ATP, surtout en réponse à l'OSM et l'activation de STAT3.

4.2 Les limites et perspectives du projet

Notre étude présente certaines limites qui doivent être prises en compte. Tout d'abord, les conclusions sont basées sur des expériences *in vitro*. En fait, comme pour la majorité des études sur la reproduction humaine, cela est principalement dû à des restrictions éthiques et à une disponibilité limitée des tissus humains. Néanmoins, les données *in vitro* sont compatibles avec les études et les observations *in vitro* et *in vivo* précédentes. Deuxièmement, les expériences ont été menées sur des cellules endométriales stromales non différenciées en cellules déciduales. Des expériences en cours visent à valider les conclusions de nos études sur les cellules différenciées en cellules déciduales. De plus, à l'avenir, nous vérifierons si ces mécanismes fonctionnent réellement *in vivo*.

Malgré les connaissances actuelles sur la fonction du LIF ou OSM durant la gestation, le processus de différenciation des cellules endométriales stromales en cellules déciduales est encore peu documenté. Notre étude a fourni des informations indispensables sur les mécanismes sous-jacents à ces observations, et en particulier sur le rôle de LIF ou OSM dans le changement des voies métaboliques. En outre, notre étude pourrait jeter les bases d'un vaste éventail de découvertes futures. Par exemple, nous en savons peu sur la base moléculaire des activités inflammatoires et métaboliques du LIF, de l'OSM, du TGF- β 1 et de l'IFN γ . Comprendre le rôle régulateur de ces facteurs gestationnels est essentiel à la fois pour déchiffrer comment elles agissent pour contrôler le métabolisme et les réponses inflammatoires et pour découvrir les principaux régulateurs moléculaires des processus impliqués dans la résolution de l'inflammation dans l'utérus en gestation. En fait, comme observé dans des modèles murins de stress inflammatoire, une activation persistante et non régulée des voies inflammatoires est associée à un dysfonctionnement de la décidue et au développement de conditions pathologiques chez d'autres mammifères, y compris les animaux de la ferme (166). Enfin, la suite de notre étude représenterait une avancée considérable sur la compréhension des mécanismes moléculaires associés à des complications de grossesse résultant d'une mauvaise

décidualisation. Ainsi, le développement éventuel des outils de diagnostic et thérapeutique pour corriger l'infertilité résultant d'un défaut de décidualisation pourra donner de l'espoir aux familles canadiennes touchées par ces complications.

4.3 Conclusion

Notre étude a montré que les cytokines OSM, TGF- β 1 et IFN γ sont capables d'induire la phosphorylation de STAT3, de SMAD2 ou de STAT1 dans les cellules HIESC. En outre, l'activation de STAT3 par l'OSM dans les cellules HIESC est affectée par le stress métabolique, en particulier le stress glucidique. Nous avons également démontré que la voie LIF/STAT3 est affectée par l'absence de glucose. Ainsi, la diminution importante et la privation de glucose diminuent grandement l'induction de p-STAT3. Le niveau de production de lactate est également affecté en absence de glucose. Ainsi, l'effet de la privation de glucose sur l'induction de STAT3 phosphorylé par l'OSM serait en grande partie le résultat d'une baisse de l'activité métabolique et/ou glucidique et non d'une mortalité cellulaire. Par la suite, nous avons démontré que le degré d'activation de STAT3 est dépendant de la concentration de glucose. En revanche, les voies TGF- β 1/SMAD2 et IFN γ /STAT1 ne sont pas affectées par le stress glucidique. Finalement, nous avons démontré que l'OSM induit la production de lactate et de l'ATP en absence et à faibles concentrations de glucose. Dans l'ensemble, ces résultats sont importants pour mieux comprendre la régulation de l'activité métabolique des cellules endométriales stromales.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Brosens JJ, Salker MS, Teklenburg G, Nautiyal J, Salter S, Lucas ES, et al. Uterine selection of human embryos at implantation. *Sci Rep.* 6 févr 2014;4:3894.
2. Ameer MA, Fagan SE, Sosa-Stanley JN, Peterson DC. Anatomy, Abdomen and Pelvis: Uterus. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [cité 9 févr 2024]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470297/>
3. Izanloo A, Fathi M, Izanloo S, Vosooghinia H, Hashemian A, Sadrzadeh SM, et al. Efficacy of Conversational Hypnosis and Propofol in Reducing Adverse Effects of Endoscopy. *Anesth Pain Med.* oct 2015;5(5):e27695.
4. Jordans IPM, Vissers J, Leeuw RA de, Hehenkamp WJK, Twisk JWR, Groot CJM de, et al. Change of the residual myometrial thickness during pregnancy in women who underwent laparoscopic niche resection compared with controls without niche surgery: a prospective comparative cohort study. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* [Internet]. 1 déc 2022 [cité 9 févr 2024];227(6):901.e1-901.e12. Disponible sur: [https://www.ajog.org/article/S0002-9378\(22\)00551-8/fulltext](https://www.ajog.org/article/S0002-9378(22)00551-8/fulltext)
5. Uterus | Definition, Function, & Anatomy | Britannica [Internet]. 2024 [cité 16 févr 2024]. Disponible sur: <https://www.britannica.com/science/uterus>
6. Christensen A, Bentley GE, Cabrera R, Ortega HH, Perfito N, Wu TJ, et al. Hormonal Regulation of Female Reproduction. *Horm Metab Res* [Internet]. juill 2012 [cité 9 févr 2024];44(8):587-91. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3647363/>
7. Blanco-Breindel MF, Singh M, Kahn J. Endometrial Receptivity. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [cité 9 févr 2024]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK587449/>
8. Paliulyte V, Drasutiene GS, Ramasauskaite D, Bartkeviciene D, Zakareviciene J, Kurmanavicius J. Physiological Uterine Involution in Primiparous and Multiparous Women: Ultrasound Study. *Obstet Gynecol Int.* 2017;2017:6739345.
9. Thiyyagarajan DK, Basit H, Jeanmonod R. Physiology, Menstrual Cycle. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [cité 9 févr 2024]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500020/>
10. Human Placenta Project: How Does the Placenta Form? | NICHD - Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development [Internet]. 2023 [cité 9 févr 2024]. Disponible sur:

<https://www.nichd.nih.gov/research/supported/human-placenta-project/how-does-placenta-form>

11. Moro F, Zannoni GF, Arciuolo D, Pasciuto T, Amoroso S, Mascilini F, et al. Imaging in gynecological disease (11): clinical and ultrasound features of mucinous ovarian tumors. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology* [Internet]. 2017 [cité 9 févr 2024];50(2):261-70. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/uog.17222>
12. Maybin JA, Critchley HOD. Menstrual physiology: implications for endometrial pathology and beyond. *Hum Reprod Update* [Internet]. nov 2015 [cité 9 févr 2024];21(6):748-61. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4594618/>
13. Gargett CE, Schwab KE, Zillwood RM, Nguyen HPT, Wu D. Isolation and culture of epithelial progenitors and mesenchymal stem cells from human endometrium. *Biol Reprod*. juin 2009;80(6):1136-45.
14. Mesen TB, Young SL. Progesterone and the Luteal Phase. *Obstet Gynecol Clin North Am* [Internet]. mars 2015 [cité 21 févr 2024];42(1):135-51. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4436586/>
15. Deryabin P, Griukova A, Nikolsky N, Borodkina A. The link between endometrial stromal cell senescence and decidualization in female fertility: the art of balance. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 1 avr 2020 [cité 12 mars 2024];77(7):1357-70. Disponible sur: <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03374-0>
16. Morelli SS, Yi P, Goldsmith LT. Endometrial Stem Cells and Reproduction. *Obstetrics and Gynecology International* [Internet]. 12 janv 2012 [cité 9 févr 2024];2012:e851367. Disponible sur: <https://www.hindawi.com/journals/ogi/2012/851367/>
17. Bhartiya D. An update on endometrial stem cells and progenitors. *Human Reproduction Update* [Internet]. 1 juin 2016 [cité 9 févr 2024];22(4):529-30. Disponible sur: <https://doi.org/10.1093/humupd/dmw010>
18. Rogers PA, Gargett CE. Endometrial angiogenesis. *Angiogenesis*. 1998;2(4):287-94.
19. O'Connor BB, Pope BD, Peters MM, Ris-Stalpers C, Parker KK. The role of extracellular matrix in normal and pathological pregnancy: Future applications of microphysiological systems in reproductive medicine. *Exp Biol Med (Maywood)* [Internet]. juill 2020 [cité 9 févr 2024];245(13):1163-74. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7400725/>
20. Vallvé-Juanico J, Houshdaran S, Giudice LC. The endometrial immune environment of women with endometriosis. *Hum Reprod Update*. 11 sept 2019;25(5):564-91.

21. Lindsay CV, Potter JA, Grimshaw AA, Abrahams VM, Tong M. Endometrial responses to bacterial and viral infection: a scoping review. *Human Reproduction Update* [Internet]. 1 oct 2023 [cité 9 févr 2024];29(5):675-93. Disponible sur: <https://doi.org/10.1093/humupd/dmad013>
22. Macer ML, Taylor HS. Endometriosis and Infertility: A review of the pathogenesis and treatment of endometriosis-associated infertility. *Obstet Gynecol Clin North Am* [Internet]. déc 2012 [cité 9 févr 2024];39(4):535-49. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3538128/>
23. Metwally M, Walters S, Chatters R. The Current Role of Induced Endometrial Trauma (Endometrial Scratch) in Women Undergoing Infertility Treatment. *Seminars in Reproductive Medicine* [Internet]. 2022 [cité 9 févr 2024];39(05/06):e1-4. Disponible sur: https://journals.scholarsportal.info/details/15268004/v39i05-06/e1_tcroiesiwuit.xml
24. Ménopause [Internet]. [cité 13 févr 2024]. Disponible sur: <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/menopause>
25. Shen HH, Zhang T, Yang HL, Lai ZZ, Zhou WJ, Mei J, et al. Ovarian hormones-autophagy-immunity axis in menstruation and endometriosis. *Theranostics* [Internet]. 19 janv 2021 [cité 13 févr 2024];11(7):3512-26. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7847674/>
26. Yu J, Berga SL, Johnston-MacAnanny EB, Sidell N, Bagchi IC, Bagchi MK, et al. Endometrial Stromal Decidualization Responds Reversibly to Hormone Stimulation and Withdrawal. *Endocrinology* [Internet]. juin 2016 [cité 13 févr 2024];157(6):2432-46. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4891781/>
27. MERIEN M. L'influence du cycle menstruel sur l'équilibre postural de la femme [Internet]. Association IFPEK; 2021. Disponible sur: https://ifpek.centredoc.org/doc_num.php?explnum_id=2062
28. Okada H, Tsuzuki T, Murata H. Decidualization of the human endometrium. *Reprod Med Biol* [Internet]. 1 févr 2018 [cité 13 févr 2024];17(3):220-7. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6046526/>
29. Gellersen B, Brosens JJ. Cyclic Decidualization of the Human Endometrium in Reproductive Health and Failure. *Endocrine Reviews* [Internet]. 1 déc 2014 [cité 20 avr 2022];35(6):851-905. Disponible sur: <https://academic.oup.com/edrv/article/35/6/851/2354669>
30. Queckbörner S, Syk Lundberg E, Gemzell-Danielsson K, Davies LC. Endometrial stromal cells exhibit a distinct phenotypic and immunomodulatory profile. *Stem Cell Research & Therapy* [Internet]. 6 janv 2020 [cité 13 févr 2024];11(1):15. Disponible sur: <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1496-2>

31. Kumar P, Magon N. Hormones in pregnancy. *Niger Med J* [Internet]. 2012 [cité 13 févr 2024];53(4):179-83. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3640235/>
32. Bianchi E, Wright GJ. Find and fuse: Unsolved mysteries in sperm-egg recognition. *PLoS Biol.* nov 2020;18(11):e3000953.
33. Gilbert SF, Gilbert SF. *Developmental Biology*. 6th éd. Sinauer Associates; 2000.
34. Uzman A. *Molecular Cell Biology* (4th edition) Harvey Lodish, Arnold Berk, S. Lawrence Zipursky, Paul Matsudaira, David Baltimore and James Darnell; Freeman & Co., New York, NY, 2000, 1084 pp., list price \$102.25, ISBN 0-7167-3136-3. *Biochemistry and Molecular Biology Education* [Internet]. 2001 [cité 13 févr 2024];29(3):126-8. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1470817501000236>
35. *Biology, 8th Edition - Neil A. Campbell; Jane B. Reece; Lisa A. Urry; Michael L. Cain; Steven A. Wasserman; Peter V. Minorsky; Robert B. Jackson*: 9780805368444 - AbeBooks [Internet]. [cité 13 févr 2024]. Disponible sur: <https://www.abebooks.com/9780805368444/Biology-8th-Edition-Neil-Campbell-0805368442/plp>
36. Monroy A. Fertilization | Steps, Process, & Facts | Britannica [Internet]. 2024 [cité 16 févr 2024]. Disponible sur: <https://www.britannica.com/science/fertilization-reproduction>
37. Weimar CHE, Macklon NS, Post Uiterweer ED, Brosens JJ, Gellersen B. The motile and invasive capacity of human endometrial stromal cells: implications for normal and impaired reproductive function. *Hum Reprod Update*. 2013;19(5):542-57.
38. Ng SW, Norwitz GA, Pavlicev M, Tilburgs T, Simón C, Norwitz ER. Endometrial Decidualization: The Primary Driver of Pregnancy Health. *Int J Mol Sci* [Internet]. 8 juin 2020 [cité 13 févr 2024];21(11):4092. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7312091/>
39. Makieva S, Giacomini E, Ottolina J, Sanchez AM, Papaleo E, Viganò P. Inside the Endometrial Cell Signaling Subway: Mind the Gap(s). *Int J Mol Sci* [Internet]. 21 août 2018 [cité 13 févr 2024];19(9):2477. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6164241/>
40. Risau W, Sariola H, Zerwes HG, Sasse J, Eklom P, Kemler R, et al. Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies. *Development*. mars 1988;102(3):471-8.
41. Nicola NA, Babon JJ. Leukemia inhibitory factor (LIF). *Cytokine Growth Factor Rev.* oct 2015;26(5):533-44.

42. Tonk ECM, Piersma AH, Van Loveren H. 5.13 - Reproductive and Developmental Immunology. In: McQueen CA, éditeur. *Comprehensive Toxicology (Second Edition)* [Internet]. Oxford: Elsevier; 2010 [cité 13 févr 2024]. p. 249-69. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978008046884600614X>
43. Jorgensen MM, de la Puente P. Leukemia Inhibitory Factor: An Important Cytokine in Pathologies and Cancer. *Biomolecules* [Internet]. févr 2022 [cité 13 févr 2024];12(2):217. Disponible sur: <https://www.mdpi.com/2218-273X/12/2/217>
44. Gearing DP, Gough NM, King JA, Hilton DJ, Nicola NA, Simpson RJ, et al. Molecular cloning and expression of cDNA encoding a murine myeloid leukaemia inhibitory factor (LIF). *EMBO J*. 20 déc 1987;6(13):3995-4002.
45. Williams RL, Hilton DJ, Pease S, Willson TA, Stewart CL, Gearing DP, et al. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature*. 15 déc 1988;336(6200):684-7.
46. Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Köntgen F, et al. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature*. 3 sept 1992;359(6390):76-9.
47. Nichols J, Smith A. Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell*. 5 juin 2009;4(6):487-92.
48. Dimitriadis E, Robb L, Salamonsen LA. Interleukin 11 advances progesterone-induced decidualization of human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod*. juill 2002;8(7):636-43.
49. Lorenzo J. Chapter 9 - The Effects of Immune Cell Products (Cytokines and Hematopoietic Cell Growth Factors) on Bone Cells. In: Lorenzo J, Horowitz MC, Choi Y, Takayanagi H, Schett G, éditeurs. *Osteoimmunology (Second Edition)* [Internet]. San Diego: Academic Press; 2016 [cité 13 févr 2024]. p. 143-67. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128005712000098>
50. Oshima K, Teo DTW, Senn P, Starlinger V, Heller S. LIF promotes neurogenesis and maintains neural precursors in cell populations derived from spiral ganglion stem cells. *BMC Dev Biol* [Internet]. 12 oct 2007 [cité 13 févr 2024];7:112. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2080640/>
51. Hirai H, Firpo M, Kikyo N. Establishment of leukemia inhibitory factor (LIF)-independent iPS cells with potentiated Oct4. *Stem Cell Research* [Internet]. 1 nov 2015 [cité 13 févr 2024];15(3):469-80. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1873506115001154>
52. Poulton IJ, McGregor NE, Pompolo S, Walker EC, Sims NA. Contrasting roles of leukemia inhibitory factor in murine bone development and remodeling involve region-specific changes in vascularization. *Journal of Bone and Mineral Research*

- [Internet]. 2012 [cité 13 févr 2024];27(3):586-95. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jbmr.1485>
53. Banner LR, Patterson PH, Allchorne A, Poole S, Woolf CJ. Leukemia Inhibitory Factor Is an Anti-Inflammatory and Analgesic Cytokine. *J Neurosci* [Internet]. 15 juill 1998 [cité 13 févr 2024];18(14):5456-62. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6793494/>
 54. Murray P, Edgar D. The regulation of embryonic stem cell differentiation by leukaemia inhibitory factor (LIF). *Differentiation*. oct 2001;68(4-5):227-34.
 55. Lysy PA, Smets F, Najimi M, Sokal EM. Leukemia inhibitory factor contributes to hepatocyte-like differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Differentiation*. déc 2008;76(10):1057-67.
 56. Skiniotis G, Lupardus P, Martick M, Walz T, Garcia KC. Structural organization of a full-length gp130/LIF-R cytokine receptor transmembrane complex. *Mol Cell* [Internet]. 5 sept 2008 [cité 13 févr 2024];31(5):737-48. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2607196/>
 57. Gearing DP, Thut CJ, VandeBos T, Gimpel SD, Delaney PB, King J, et al. Leukemia inhibitory factor receptor is structurally related to the IL-6 signal transducer, gp130. *EMBO J* [Internet]. oct 1991 [cité 13 févr 2024];10(10):2839-48. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC452994/>
 58. Xu Y, Kershaw NJ, Luo CS, Soo P, Pocock MJ, Czabotar PE, et al. Crystal Structure of the Entire Ectodomain of gp130: INSIGHTS INTO THE MOLECULAR ASSEMBLY OF THE TALL CYTOKINE RECEPTOR COMPLEXES*. *The Journal of Biological Chemistry* [Internet]. 7 juill 2010 [cité 13 févr 2024];285(28):21214. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2898449/>
 59. Wilks AF. Two putative protein-tyrosine kinases identified by application of the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. mars 1989 [cité 13 févr 2024];86(5):1603-7. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC286746/>
 60. Stahl N, Boulton TG, Farruggella T, Ip NY, Davis S, Witthuhn BA, et al. Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components. *Science*. 7 janv 1994;263(5143):92-5.
 61. Rodig SJ, Meraz MA, White JM, Lampe PA, Riley JK, Arthur CD, et al. Disruption of the Jak1 gene demonstrates obligatory and nonredundant roles of the Jaks in cytokine-induced biologic responses. *Cell*. 1 mai 1998;93(3):373-83.
 62. Ernst M, Oates A, Dunn AR. Gp130-mediated signal transduction in embryonic stem cells involves activation of Jak and Ras/mitogen-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem*. 22 nov 1996;271(47):30136-43.

63. Haan S, Kortylewski M, Behrmann I, Müller-Esterl W, Heinrich PC, Schaper F. Cytoplasmic STAT proteins associate prior to activation. *Biochem J* [Internet]. 1 févr 2000 [cité 13 févr 2024];345(Pt 3):417-21. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1220772/>
64. Thoma B, Bird TA, Friend DJ, Gearing DP, Dower SK. Oncostatin M and leukemia inhibitory factor trigger overlapping and different signals through partially shared receptor complexes. *J Biol Chem*. 25 févr 1994;269(8):6215-22.
65. Oh H, Fujio Y, Kunisada K, Hirota H, Matsui H, Kishimoto T, et al. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase through glycoprotein 130 induces protein kinase B and p70 S6 kinase phosphorylation in cardiac myocytes. *J Biol Chem*. 17 avr 1998;273(16):9703-10.
66. Niwa H, Ogawa K, Shimosato D, Adachi K. A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature* [Internet]. juill 2009 [cité 13 févr 2024];460(7251):118-22. Disponible sur: <https://www.nature.com/articles/nature08113>
67. Christianson J, Oxford JT, Jorcyk CL. Emerging Perspectives on Leukemia Inhibitory Factor and its Receptor in Cancer. *Front Oncol* [Internet]. 29 juill 2021 [cité 13 févr 2024];11:693724. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8358831/>
68. Zhu M, Oishi K, Lee SC, Patterson PH. Studies using leukemia inhibitory factor (LIF) knockout mice and a LIF adenoviral vector demonstrate a key anti-inflammatory role for this cytokine in cutaneous inflammation. *J Immunol*. 1 févr 2001;166(3):2049-54.
69. Cheng J, Rosario G, Cohen TV, Hu J, Stewart CL. Tissue-Specific Ablation of the LIF Receptor in the Murine Uterine Epithelium Results in Implantation Failure. *Endocrinology*. 1 juin 2017;158(6):1916-28.
70. Kim SM, Kim JS. A Review of Mechanisms of Implantation. *Dev Reprod* [Internet]. déc 2017 [cité 13 févr 2024];21(4):351-9. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5769129/>
71. Cullinan EB, Abbondanzo SJ, Anderson PS, Pollard JW, Lessey BA, Stewart CL. Leukemia inhibitory factor (LIF) and LIF receptor expression in human endometrium suggests a potential autocrine/paracrine function in regulating embryo implantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [Internet]. 2 avr 1996 [cité 21 févr 2024];93(7):3115-20. Disponible sur: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.93.7.3115>
72. Salleh N, Giribabu N. Leukemia Inhibitory Factor: Roles in Embryo Implantation and in Nonhormonal Contraception. *ScientificWorldJournal* [Internet]. 2014 [cité 13 févr 2024];2014:201514. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4131495/>

73. Hambartsoumian E. Endometrial Leukemia Inhibitory Factor (LIF) as a Possible Cause of Unexplained Infertility and Multiple Failures of Implantation. *American Journal of Reproductive Immunology* [Internet]. 1998 [cité 1 mai 2023];39(2):137-43. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1600-0897.1998.tb00345.x>
74. Tanaka M, Miyajima A. Oncostatin M, a multifunctional cytokine. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2003;149:39-52.
75. Zarling JM, Shoyab M, Marquardt H, Hanson MB, Lioubin MN, Todaro GJ. Oncostatin M: a growth regulator produced by differentiated histiocytic lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. déc 1986 [cité 13 févr 2024];83(24):9739-43. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC387216/>
76. Richards CD. The Enigmatic Cytokine Oncostatin M and Roles in Disease. *ISRN Inflamm* [Internet]. 8 déc 2013 [cité 13 févr 2024];2013:512103. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3870656/>
77. Wahl A, Wallace P. Oncostatin M in the anti-inflammatory response. *Ann Rheum Dis* [Internet]. nov 2001 [cité 13 févr 2024];60(Suppl 3):iii75-80. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1766674/>
78. Yanai N, Obinata M. Oncostatin m regulates mesenchymal cell differentiation and enhances hematopoietic supportive activity of bone marrow stromal cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2001;37(10):698-704.
79. Masjedi A, Hajizadeh F, Beigi Dargani F, Beyzai B, Aksoun M, Hojjat-Farsangi M, et al. Oncostatin M: A mysterious cytokine in cancers. *Int Immunopharmacol.* janv 2021;90:107158.
80. Beigel F, Friedrich M, Probst C, Sotlar K, Göke B, Diegelmann J, et al. Oncostatin M Mediates STAT3-Dependent Intestinal Epithelial Restitution via Increased Cell Proliferation, Decreased Apoptosis and Upregulation of SERPIN Family Members. *PLOS ONE* [Internet]. 7 avr 2014 [cité 13 févr 2024];9(4):e93498. Disponible sur: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0093498>
81. Piquer-Garcia I, Campderros L, Taxerås SD, Gavaldà-Navarro A, Pardo R, Vila M, et al. A Role for Oncostatin M in the Impairment of Glucose Homeostasis in Obesity. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* [Internet]. 1 mars 2020 [cité 13 févr 2024];105(3):e337-48. Disponible sur: <https://doi.org/10.1210/clinem/dgz090>
82. Kubin T, Gajawada P, Bramlage P, Hein S, Berge B, Cetinkaya A, et al. The Role of Oncostatin M and Its Receptor Complexes in Cardiomyocyte Protection, Regeneration, and Failure. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. janv 2022 [cité 13 févr 2024];23(3):1811. Disponible sur: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/3/1811>

83. Whittemore LA, Song K, Li X, Aghajanian J, Davies M, Girgenrath S, et al. Inhibition of myostatin in adult mice increases skeletal muscle mass and strength. *Biochem Biophys Res Commun*. 24 janv 2003;300(4):965-71.
84. Boulton TG, Zhong Z, Wen Z, Darnell JE, Stahl N, Yancopoulos GD. STAT3 activation by cytokines utilizing gp130 and related transducers involves a secondary modification requiring an H7-sensitive kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [Internet]. 18 juill 1995 [cité 13 févr 2024];92(15):6915-9. Disponible sur: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.92.15.6915>
85. Auguste P, Guillet C, Fourcin M, Olivier C, Veziers J, Pouplard-Barthelaix A, et al. Signaling of Type II Oncostatin M Receptor*. *Journal of Biological Chemistry* [Internet]. 20 juin 1997 [cité 13 févr 2024];272(25):15760-4. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925818393943>
86. Dey G, Radhakrishnan A, Syed N, Thomas JK, Nadig A, Srikumar K, et al. Signaling network of Oncostatin M pathway. *J Cell Commun Signal* [Internet]. juin 2013 [cité 13 févr 2024];7(2):103-8. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3660694/>
87. Lee SJ, Drabik K, Van Wagoner NJ, Lee S, Choi C, Dong Y, et al. ICAM-1-induced expression of proinflammatory cytokines in astrocytes: involvement of extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways. *J Immunol*. 15 oct 2000;165(8):4658-66.
88. Arita K, South AP, Hans-Filho G, Sakuma TH, Lai-Cheong J, Clements S, et al. Oncostatin M receptor-beta mutations underlie familial primary localized cutaneous amyloidosis. *Am J Hum Genet*. janv 2008;82(1):73-80.
89. Dembic Z. Chapter 6 - Cytokines of the Immune System: Interleukins. In: Dembic Z, éditeur. *The Cytokines of the Immune System* [Internet]. Amsterdam: Academic Press; 2015 [cité 12 mars 2024]. p. 143-239. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124199989000067>
90. Adrian-Segarra J, Schindler N, Gajawada P, Lörchner H, Braun T, Pöling J. The AB loop and D-helix in binding site III of human Oncostatin M (OSM) are required for OSM receptor activation. *Journal of Biological Chemistry*. 6 mars 2018;293:jbc.RA118.001920.
91. Lörchner H, Adrian-Segarra JM, Waechter C, Wagner R, Góes ME, Brachmann N, et al. Concomitant Activation of OSM and LIF Receptor by a Dual-Specific hOSM Variant Confers Cardioprotection after Myocardial Infarction in Mice. *Int J Mol Sci* [Internet]. 29 déc 2021 [cité 13 févr 2024];23(1):353. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8745562/>
92. Fu T, Zheng HT, Zhang HY, Chen ZC, Li B, Yang ZM. Oncostatin M expression in the mouse uterus during early pregnancy promotes embryo implantation and decidualization. *FEBS Lett*. août 2019;593(15):2040-50.

93. Aho J, O'Connor M, Hughes ED, Saunders TL, Tsang M, Ni J, et al. Human Oncostatin M is functionally equivalent to mouse LIF in supporting mouse ES cell pluripotency & germline competency.
94. Hiraoka T, Hirota Y, Fukui Y, Gebril M, Kaku T, Aikawa S, et al. Differential roles of uterine epithelial and stromal STAT3 coordinate uterine receptivity and embryo attachment. *Sci Rep* [Internet]. 23 sept 2020 [cité 13 févr 2024];10(1):15523. Disponible sur: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-72640-0>
95. Ravelojaona M, Girouard J, Kana Tsapi ES, Chambers M, Vaillancourt C, Van Themsche C, et al. Oncostatin M and STAT3 Signaling Pathways Support Human Trophoblast Differentiation by Inhibiting Inflammatory Stress in Response to IFN γ and GM-CSF. *Cells* [Internet]. janv 2024 [cité 13 févr 2024];13(3):229. Disponible sur: <https://www.mdpi.com/2073-4409/13/3/229>
96. Piccinni MP, Raghupathy R, Saito S, Szekeres-Bartho J. Cytokines, Hormones and Cellular Regulatory Mechanisms Favoring Successful Reproduction. *Front Immunol* [Internet]. 28 juill 2021 [cité 14 févr 2024];12:717808. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8355694/>
97. Poniatowski ŁA, Wojdasiewicz P, Gasik R, Szukiewicz D. Transforming Growth Factor Beta Family: Insight into the Role of Growth Factors in Regulation of Fracture Healing Biology and Potential Clinical Applications. *Mediators Inflamm* [Internet]. 2015 [cité 15 févr 2024];2015:137823. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4325469/>
98. Moses HL, Branum EL, Proper JA, Robinson RA. Transforming growth factor production by chemically transformed cells. *Cancer Res*. juill 1981;41(7):2842-8.
99. Roberts AB, Anzano MA, Lamb LC, Smith JM, Sporn MB. New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. sept 1981;78(9):5339-43.
100. Li MO, Flavell RA. TGF- β : A Master of All T Cell Trades. *Cell* [Internet]. 8 août 2008 [cité 15 févr 2024];134(3):392-404. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3677783/>
101. Sanjabi S, Zenewicz LA, Kamanaka M, Flavell RA. Anti- and Pro-inflammatory Roles of TGF- β , IL-10, and IL-22 In Immunity and Autoimmunity. *Curr Opin Pharmacol* [Internet]. août 2009 [cité 15 févr 2024];9(4):447-53. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2755239/>
102. Zhang Y, Alexander PB, Wang XF. TGF- β Family Signaling in the Control of Cell Proliferation and Survival. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. avr 2017 [cité 15 févr 2024];9(4):a022145. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5378054/>

103. Tzavlaki K, Moustakas A. TGF- β Signaling. *Biomolecules* [Internet]. 23 mars 2020 [cité 15 févr 2024];10(3):487. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7175140/>
104. Liu Z, Yi L, Du M, Gong G, Zhu Y. Overexpression of TGF- β enhances the migration and invasive ability of ectopic endometrial cells via ERK/MAPK signaling pathway. *Exp Ther Med* [Internet]. juin 2019 [cité 15 févr 2024];17(6):4457-64. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6509355/>
105. Omwandho COA, Konrad L, Halis G, Oehmke F, Tinneberg HR. Role of TGF- β s in normal human endometrium and endometriosis. *Human Reproduction* [Internet]. 1 janv 2010 [cité 15 févr 2024];25(1):101-9. Disponible sur: <https://doi.org/10.1093/humrep/dep382>
106. Sanjabi S, Oh SA, Li MO. Regulation of the Immune Response by TGF- β : From Conception to Autoimmunity and Infection. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. juin 2017 [cité 15 févr 2024];9(6):a022236. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5453394/>
107. Wen B, Liao H, Lin W, Li Z, Ma X, Xu Q, et al. The Role of TGF- β during Pregnancy and Pregnancy Complications. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. janv 2023 [cité 15 févr 2024];24(23):16882. Disponible sur: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/23/16882>
108. Monsivais D, Matzuk MM, Pangas SA. The TGF- β Family in the Reproductive Tract. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. oct 2017 [cité 15 févr 2024];9(10):a022251. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5554737/>
109. Darnell JE, Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*. 3 juin 1994;264(5164):1415-21.
110. Mitchell TJ, John S. Signal transducer and activator of transcription (STAT) signalling and T-cell lymphomas. *Immunology* [Internet]. mars 2005 [cité 13 févr 2024];114(3):301-12. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1782085/>
111. Braunstein J, Brutsaert S, Olson R, Schindler C. STATs dimerize in the absence of phosphorylation. *J Biol Chem*. 5 sept 2003;278(36):34133-40.
112. Marg A, Shan Y, Meyer T, Meissner T, Brandenburg M, Vinkemeier U. Nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins Nup153 and Nup214 and CRM1-dependent nuclear export control the subcellular distribution of latent Stat1. *J Cell Biol*. 21 juin 2004;165(6):823-33.
113. Levy DE, Darnell JE. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol*. sept 2002;3(9):651-62.

114. Dey SK, Lim H, Das SK, Reese J, Paria BC, Daikoku T, et al. Molecular cues to implantation. *Endocr Rev.* juin 2004;25(3):341-73.
115. Hillmer EJ, Zhang H, Li HS, Watowich SS. STAT3 signaling in immunity. *Cytokine Growth Factor Rev.* oct 2016;31:1-15.
116. Cheng JG, Chen JR, Hernandez L, Alvord WG, Stewart CL. Dual control of LIF expression and LIF receptor function regulate Stat3 activation at the onset of uterine receptivity and embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 17 juill 2001;98(15):8680-5.
117. Wang X, Li X, Wang T, Wu SP, Jeong JW, Kim TH, et al. SOX17 regulates uterine epithelial-stromal cross-talk acting via a distal enhancer upstream of *Ihh*. *Nat Commun.* 24 oct 2018;9(1):4421.
118. Fukui Y, Hirota Y, Matsuo M, Gebril M, Akaeda S, Hiraoka T, et al. Uterine receptivity, embryo attachment, and embryo invasion: Multistep processes in embryo implantation. *Reprod Med Biol.* juill 2019;18(3):234-40.
119. Yuan J, Aikawa S, Deng W, Bartos A, Walz G, Grahammer F, et al. Primary decidual zone formation requires Scribble for pregnancy success in mice. *Nat Commun.* 28 nov 2019;10(1):5425.
120. Sun X, Bartos A, Whitsett JA, Dey SK. Uterine deletion of Gp130 or Stat3 shows implantation failure with increased estrogenic responses. *Mol Endocrinol.* sept 2013;27(9):1492-501.
121. Lucey DR, Clerici M, Shearer GM. Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic, and inflammatory diseases. *Clin Microbiol Rev.* oct 1996;9(4):532-62.
122. Krause CD, He W, Kotenko S, Pestka S. Modulation of the activation of Stat1 by the interferon-gamma receptor complex. *Cell Res.* janv 2006;16(1):113-23.
123. Tolomeo M, Cavalli A, Cascio A. STAT1 and Its Crucial Role in the Control of Viral Infections. *Int J Mol Sci* [Internet]. 7 avr 2022 [cité 13 févr 2024];23(8):4095. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9028532/>
124. Pereira de Sousa FL, Chaiwangyen W, Morales-Prieto DM, Ospina-Prieto S, Weber M, Photini SM, et al. Involvement of STAT1 in proliferation and invasiveness of trophoblastic cells. *Reproductive Biology* [Internet]. 1 sept 2017 [cité 13 févr 2024];17(3):218-24. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1642431X17300116>
125. Zhang J. Yin and yang interplay of IFN-gamma in inflammation and autoimmune disease. *J Clin Invest.* avr 2007;117(4):871-3.

126. Ivashkiv LB. IFN γ : signalling, epigenetics and roles in immunity, metabolism, disease and cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol* [Internet]. sept 2018 [cité 13 févr 2024];18(9):545-58. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6340644/>
127. Murphy SP, Tayade C, Ashkar AA, Hatta K, Zhang J, Croy BA. Interferon Gamma in Successful Pregnancies. *Biol Reprod* [Internet]. mai 2009 [cité 13 févr 2024];80(5):848-59. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2849832/>
128. Park Y, Han SJ. Interferon Signaling in the Endometrium and in Endometriosis. *Biomolecules* [Internet]. 25 oct 2022 [cité 13 févr 2024];12(11):1554. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9687697/>
129. Vitorino Carvalho A, Eozenou C, Healey GD, Forde N, Reinaud P, Chebrou M, et al. Analysis of STAT1 expression and biological activity reveals interferon-tau-dependent STAT1-regulated SOCS genes in the bovine endometrium. *Reprod Fertil Dev*. mars 2016;28(4):459-74.
130. Wang Y, Han X, Zhang L, Cao N, Cao L, Yang L. Early Pregnancy Induces Expression of STAT1, OAS1 and CXCL10 in Ovine Spleen. *Animals (Basel)* [Internet]. 30 oct 2019 [cité 13 févr 2024];9(11):882. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6912697/>
131. Kaplan MH. STAT signaling in inflammation. *JAKSTAT* [Internet]. 1 janv 2013 [cité 13 févr 2024];2(1):e24198. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3670277/>
132. Wang W, Lopez McDonald MC, Kim C, Ma M, Pan Z (Tommy), Kaufmann C, et al. The complementary roles of STAT3 and STAT1 in cancer biology: insights into tumor pathogenesis and therapeutic strategies. *Frontiers in Immunology* [Internet]. 2023 [cité 13 févr 2024];14. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2023.1265818>
133. Métabolisme. In: Wikipédia [Internet]. 2024 [cité 13 févr 2024]. Disponible sur: [https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=M%C3%A9tabolisme&oldid=211902356#cite_note-10.1016/S0065-2911\(08\)60018-1-1](https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=M%C3%A9tabolisme&oldid=211902356#cite_note-10.1016/S0065-2911(08)60018-1-1)
134. Cooper GM. Metabolic Energy. In: *The Cell: A Molecular Approach* 2nd edition [Internet]. Sinauer Associates; 2000 [cité 13 févr 2024]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9903/>
135. Cell Metabolism | Learn Science at Scitable [Internet]. [cité 13 févr 2024]. Disponible sur: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/cell-metabolism-14026182/>

136. Biology LibreTexts [Internet]. 2016 [cité 13 févr 2024]. Unit 4: Cell Metabolism. Disponible sur: [https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Introductory_and_General_Biology/Biology_\(Kimball\)/04%3A_Cell_Metabolism](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Introductory_and_General_Biology/Biology_(Kimball)/04%3A_Cell_Metabolism)
137. Sternberg AK, Buck VU, Classen-Linke I, Leube RE. How Mechanical Forces Change the Human Endometrium during the Menstrual Cycle in Preparation for Embryo Implantation. *Cells*. 6 août 2021;10(8):2008.
138. Ryu MJ, Seo BJ, Choi YJ, Han MJ, Choi Y, Chung MK, et al. Mitochondrial and Metabolic Dynamics of Endometrial Stromal Cells During the Endometrial Cycle. *Stem Cells Dev*. 24 sept 2020;
139. Vrhovac Madunić I, Karin-Kujundžić V, Madunić J, Šola IM, Šerman L. Endometrial Glucose Transporters in Health and Disease. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 6 sept 2021 [cité 13 févr 2024];9:703671. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8450505/>
140. França MR, da Silva MIS, Pugliesi G, Van Hoeck V, Binelli M. Evidence of endometrial amino acid metabolism and transport modulation by peri-ovulatory endocrine profiles driving uterine receptivity. *J Anim Sci Biotechnol* [Internet]. 15 juin 2017 [cité 13 févr 2024];8:54. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5472857/>
141. Zhang S, Han X. The Regulatory Role of Lipid Metabolism in Endometrial Cancer. *J Oncol* [Internet]. 29 août 2022 [cité 13 févr 2024];2022:6458877. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9444396/>
142. Gurpide E, Fleming H, Fridman O, Hausknecht V, Holinka C. Receptors, enzymes, and hormonal responses of endometrial cells. *Prog Clin Biol Res*. 1981;74:427-46.
143. Kido T, Murata H, Nishigaki A, Tsubokura H, Komiya S, Kida N, et al. Glucose transporter 1 is important for the glycolytic metabolism of human endometrial stromal cells in hypoxic environment. *Heliyon* [Internet]. 1 juin 2020 [cité 13 févr 2024];6(6):e03985. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405844020308306>
144. Joost HG, Bell GI, Best JD, Birnbaum MJ, Charron MJ, Chen YT, et al. Nomenclature of the GLUT/SLC2A family of sugar/polyol transport facilitators. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* [Internet]. avr 2002 [cité 13 févr 2024];282(4):E974-6. Disponible sur: <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/ajpendo.00407.2001>
145. Thorens B. Glucose transporters in the regulation of intestinal, renal, and liver glucose fluxes. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* [Internet]. avr 1996 [cité 13 févr 2024];270(4):G541-53. Disponible sur: <https://journals.physiology.org/doi/abs/10.1152/ajpgi.1996.270.4.G541>

146. Frolova A, Flessner L, Chi M, Kim ST, Foyouzi-Yousefi N, Moley KH. Facilitative Glucose Transporter Type 1 Is Differentially Regulated by Progesterone and Estrogen in Murine and Human Endometrial Stromal Cells. *Endocrinology* [Internet]. 1 mars 2009 [cité 13 févr 2024];150(3):1512-20. Disponible sur: <https://doi.org/10.1210/en.2008-1081>
147. Christofk HR, Vander Heiden MG, Wu N, Asara JM, Cantley LC. Pyruvate kinase M2 is a phosphotyrosine-binding protein. *Nature*. 13 mars 2008;452(7184):181-6.
148. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* [Internet]. 22 mai 2009 [cité 26 févr 2022];324(5930):1029-33. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2849637/>
149. Jiang P, Du W, Wang X, Mancuso A, Gao X, Wu M, et al. p53 regulates biosynthesis through direct inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Nat Cell Biol*. mars 2011;13(3):310-6.
150. Kaplon J, Zheng L, Meissl K, Chaneton B, Selivanov VA, Mackay G, et al. A key role for mitochondrial gatekeeper pyruvate dehydrogenase in oncogene-induced senescence. *Nature*. 6 juin 2013;498(7452):109-12.
151. Doherty JR, Cleveland JL. Targeting lactate metabolism for cancer therapeutics. *J Clin Invest*. sept 2013;123(9):3685-92.
152. Dean M. Glycogen in the uterus and fallopian tubes is an important source of glucose during early pregnancy†. *Biol Reprod*. 1 août 2019;101(2):297-305.
153. Pantaleon M, Kaye PL. Glucose transporters in preimplantation development. *Rev Reprod*. mai 1998;3(2):77-81.
154. Diamond MP, Pettway ZY, Logan J, Moley K, Vaughn W, DeCherney AH. Dose-response effects of glucose, insulin, and glucagon on mouse pre-embryo development. *Metabolism*. juin 1991;40(6):566-70.
155. Zuo RJ, Gu XW, Qi QR, Wang TS, Zhao XY, Liu JL, et al. Warburg-like Glycolysis and Lactate Shuttle in Mouse Decidua during Early Pregnancy. *Journal of Biological Chemistry* [Internet]. août 2015 [cité 20 avr 2022];290(35):21280-91. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925820448999>
156. Chapdelaine P, Kang J, Boucher-Kovalik S, Caron N, Tremblay J, Fortier M. Decidualization and maintenance of a functional prostaglandin system in human endometrial cell lines following transformation with SV40 large T antigen. *Molecular human reproduction*. 1 juin 2006;12:309-19.
157. Abu Shehab M, Biggar K, Kakadia JH, Dhruv M, Jain B, Nandi P, et al. Inhibition of decidual IGF-1 signaling in response to hypoxia and leucine deprivation is

- mediated by mTOR and AAR pathways and increased IGFBP-1 phosphorylation. *Mol Cell Endocrinol.* 15 juill 2020;512:110865.
158. Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev.* 2005;11:127-52.
 159. Stockert JC, Horobin RW, Colombo LL, Blázquez-Castro A. Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochem.* avr 2018;120(3):159-67.
 160. Ghasemi M, Turnbull T, Sebastian S, Kempson I. The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *Int J Mol Sci* [Internet]. 26 nov 2021 [cité 12 mars 2024];22(23):12827. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8657538/>
 161. Fortin L. Evaluation de l'activité antitumorale de dab-1, un anti-inflammatoire dérivé de l'acide aminobenzoïque sur les cellules du cancer du sein [Internet]. UQTR; 2023. Disponible sur: <https://depot-e.uqtr.ca/id/eprint/10824/>
 162. Forkasiewicz A, Dorociak M, Stach K, Szelachowski P, Tabola R, Augoff K. The usefulness of lactate dehydrogenase measurements in current oncological practice. *Cellular & Molecular Biology Letters* [Internet]. 9 juin 2020 [cité 12 mars 2024];25(1):35. Disponible sur: <https://doi.org/10.1186/s11658-020-00228-7>
 163. ATP Detection Assay Kit - Luminescence [Internet]. [cité 12 mars 2024]. Disponible sur: <https://www.caymanchem.com/product/700410>
 164. Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current protocols in immunology* [Internet]. 11 nov 2015 [cité 12 mars 2024];111:A3.B.1. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6716531/>
 165. Hartig SM. Basic Image Analysis and Manipulation in ImageJ. *Current Protocols in Molecular Biology* [Internet]. 2013 [cité 12 mars 2024];102(1):14.15.1-14.15.12. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/0471142727.mb1415s102>
 166. Dallagi A, Girouard J, Hamelin-Morrisette J, Dadzie R, Laurent L, Vaillancourt C, et al. The activating effect of IFN- γ on monocytes/macrophages is regulated by the LIF-trophoblast-IL-10 axis via Stat1 inhibition and Stat3 activation. *Cell Mol Immunol.* mai 2015;12(3):326-41.
 167. Hamelin-Morrisette J, A D, J G, M R, Y O, C V, et al. Leukemia inhibitory factor regulates the activation of inflammatory signals in macrophages and trophoblast cells. *Molecular immunology* [Internet]. avr 2020 [cité 20 oct 2022];120. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32045772/>
 168. Yen CF, Liao SK, Huang SJ, Tabak S, Arcuri F, Lee CL, et al. Decreased Endometrial Expression of Leukemia Inhibitory Factor Receptor Disrupts the

STAT3 Signaling in Adenomyosis During the Implantation Window. *Reprod Sci.* août 2017;24(8):1176-86.

169. Dimitriadis E, Stoikos C, Tan YL, Salamonsen LA. Interleukin 11 Signaling Components Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) and Suppressor of Cytokine Signaling 3 (SOCS3) Regulate Human Endometrial Stromal Cell Differentiation. *Endocrinology* [Internet]. 1 août 2006 [cité 13 mars 2024];147(8):3809-17. Disponible sur: <https://doi.org/10.1210/en.2006-0264>
170. Luo X, Xu J, Chegini N. The Expression of Smads in Human Endometrium and Regulation and Induction in Endometrial Epithelial and Stromal Cells by Transforming Growth Factor- β . *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* [Internet]. 1 oct 2003 [cité 13 mars 2024];88(10):4967-76. Disponible sur: <https://doi.org/10.1210/jc.2003-030276>
171. Fluhr H, Spratte J, Heidrich S, Ehrhardt J, Steinmüller F, Zygmunt M. Heparin inhibits interferon- γ signaling in human endometrial stromal cells by interference with the cellular binding of interferon- γ . *Fertility and Sterility* [Internet]. 15 mars 2011 [cité 13 mars 2024];95(4):1272-7. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028210006990>
172. Christian M, Marangos P, Mak I, McVey J, Barker F, White J, et al. Interferon- γ Modulates Prolactin and Tissue Factor Expression in Differentiating Human Endometrial Stromal Cells*. *Endocrinology* [Internet]. 1 juill 2001 [cité 13 mars 2024];142(7):3142-51. Disponible sur: <https://doi.org/10.1210/endo.142.7.8231>
173. Su H, Jiang L, Carter-Su C, Rui L. Glucose Enhances Leptin Signaling through Modulation of AMPK Activity. *PLOS ONE* [Internet]. 16 févr 2012 [cité 13 mars 2024];7(2):e31636. Disponible sur: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0031636>
174. Ahima RS, Flier JS. Leptin. *Annu Rev Physiol.* 2000;62:413-37.
175. Buettner C, Poci A, Muse ED, Etgen AM, Myers MG, Rossetti L. Critical role of STAT3 in leptin's metabolic actions. *Cell Metab.* juill 2006;4(1):49-60.
176. Welt CK, Chan JL, Bullen J, Murphy R, Smith P, DePaoli AM, et al. Recombinant human leptin in women with hypothalamic amenorrhea. *N Engl J Med.* 2 sept 2004;351(10):987-97.
177. Gao Q, Wolfgang MJ, Neschen S, Morino K, Horvath TL, Shulman GI, et al. Disruption of neural signal transducer and activator of transcription 3 causes obesity, diabetes, infertility, and thermal dysregulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 30 mars 2004;101(13):4661-6.
178. Li J, Yang H, Zhang L, Zhang S, Dai Y. Metabolic reprogramming and interventions in endometrial carcinoma. *Biomedicine & Pharmacotherapy* [Internet]. 1 mai 2023

- [cité 13 mars 2024];161:114526. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332223003141>
179. Han J, Zhang L, Guo H, Wysham WZ, Roque DR, Willson AK, et al. Glucose promotes cell proliferation, glucose uptake and invasion in endometrial cancer cells via AMPK/mTOR/S6 and MAPK signaling. *Gynecologic Oncology* [Internet]. 1 sept 2015 [cité 13 mars 2024];138(3):668-75. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0090825815300573>
 180. Wallbillich JJ, Josyula S, Saini U, Zingarelli RA, Dorayappan KDP, Riley MK, et al. High Glucose-Mediated STAT3 Activation in Endometrial Cancer Is Inhibited by Metformin: Therapeutic Implications for Endometrial Cancer. *PLoS One* [Internet]. 23 janv 2017 [cité 1 mai 2023];12(1):e0170318. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5256996/>
 181. Rai Y, Pathak R, Kumari N, Sah DK, Pandey S, Kalra N, et al. Mitochondrial biogenesis and metabolic hyperactivation limits the application of MTT assay in the estimation of radiation induced growth inhibition. *Sci Rep* [Internet]. 24 janv 2018 [cité 13 mars 2024];8(1):1531. Disponible sur: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-19930-w>
 182. Meng X, Chen C, Qian J, Cui L, Wang S. Energy metabolism and maternal-fetal tolerance working in decidualization. *Front Immunol*. 2023;14:1203719.
 183. Tsai JH, Chi MMY, Schulte MB, Moley KH. The Fatty Acid Beta-Oxidation Pathway Is Important for Decidualization of Endometrial Stromal Cells in Both Humans and Mice. *Biology of Reproduction* [Internet]. 1 févr 2014 [cité 26 févr 2022];90(2). Disponible sur: <https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod.113.113217>
 184. Demaria M, Poli V. PKM2, STAT3 and HIF-1 α : The Warburg's vicious circle. *JAK-STAT* [Internet]. juill 2012 [cité 27 sept 2022];1(3):194-6. Disponible sur: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/jkst.20662>
 185. Demaria M, Giorgi C, Lebedzinska M, Esposito G, D'Angeli L, Bartoli A, et al. A STAT3-mediated metabolic switch is involved in tumour transformation and STAT3 addiction. *Aging (Albany NY)*. nov 2010;2(11):823-42.
 186. Demaria M, Poli V. From the nucleus to the mitochondria and back: the odyssey of a multitask STAT3. *Cell Cycle*. 1 oct 2011;10(19):3221-2.
 187. Gao X, Wang H, Yang JJ, Liu X, Liu ZR. Pyruvate kinase M2 regulates gene transcription by acting as a protein kinase. *Mol Cell*. 9 mars 2012;45(5):598-609.
 188. Demaria M, Camporeale A, Poli V. STAT3 and metabolism: How many ways to use a single molecule? *International Journal of Cancer* [Internet]. 2014 [cité 13 mars 2024];135(9):1997-2003. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ijc.28767>

189. Tošić I, Frank DA. STAT3 as a mediator of oncogenic cellular metabolism: Pathogenic and therapeutic implications. *Neoplasia*. déc 2021;23(12):1167-78.
190. Rajan A, Parijatham BO, Srivastava V. A Correlative Study of Endometrial Glycogen Content in Female Infertility. *Journal of Pharmaceutical Research International* [Internet]. 11 avr 2021 [cité 13 mars 2024];97-109. Disponible sur: <https://journaljpri.com/index.php/JPRI/article/view/2237>
191. Flannery CA, Choe GH, Cooke KM, Fleming AG, Radford CC, Kodaman PH, et al. Insulin Regulates Glycogen Synthesis in Human Endometrial Glands Through Increased GYS2. *J Clin Endocrinol Metab*. 1 août 2018;103(8):2843-50.
192. Milwidsky A, Palti Z, Gutman A. Glycogen metabolism of the human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab*. oct 1980;51(4):765-70.
193. Gott AL, Hardy K, Winston RML, Leese HJ. Non-invasive measurement of pyruvate and glucose uptake and lactate production by single human preimplantation embryos. *Human Reproduction* [Internet]. 1 janv 1990 [cité 13 mars 2024];5(1):104-8. Disponible sur: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a137028>
194. Gardner DK. Lactate production by the mammalian blastocyst: manipulating the microenvironment for uterine implantation and invasion? *Bioessays*. avr 2015;37(4):364-71.
195. Jiang Y, Liao Y, He H, Xin Q, Tu Z, Kong S, et al. FoxM1 Directs STAT3 Expression Essential for Human Endometrial Stromal Decidualization. *Sci Rep*. 3 sept 2015;5:13735.
196. Catalano RD, Johnson MH, Campbell EA, Charnock-Jones DS, Smith SK, Sharkey AM. Inhibition of Stat3 activation in the endometrium prevents implantation: A nonsteroidal approach to contraception. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [Internet]. 14 juin 2005 [cité 13 mars 2024];102(24):8585-90. Disponible sur: <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.0502343102>
197. Kermack AJ, Finn-Sell S, Cheong YC, Brook N, Eckert JJ, Macklon NS, et al. Amino acid composition of human uterine fluid: association with age, lifestyle and gynaecological pathology. *Human Reproduction* [Internet]. 1 avr 2015 [cité 13 mars 2024];30(4):917-24. Disponible sur: <https://doi.org/10.1093/humrep/dev008>
198. Leese HJ, McKeegan PJ, Sturmey RG. Amino Acids and the Early Mammalian Embryo: Origin, Fate, Function and Life-Long Legacy. *International Journal of Environmental Research and Public Health* [Internet]. janv 2021 [cité 13 mars 2024];18(18):9874. Disponible sur: <https://www.mdpi.com/1660-4601/18/18/9874>
199. Lane M, Gardner DK. Amino acids and vitamins prevent culture-induced metabolic perturbations and associated loss of viability of mouse blastocysts. *Human Reproduction* [Internet]. 1 avr 1998 [cité 13 mars 2024];13(4):991-7. Disponible sur: <https://doi.org/10.1093/humrep/13.4.991>

200. Rieger D. Relationships between energy metabolism and development of early mammalian embryos. *Theriogenology* [Internet]. 1 janv 1992 [cité 13 mars 2024];37(1):75-93. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0093691X9290248P>