

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

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

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

**PAR
VALÉRIE LEBLANC**

**LA RÉGULATION OESTROGÉNIQUE DE L'APOPTOSE AU NIVEAU DE
L'ENDOMÈTRE LORS DU CYCLE OESTRAL DE LA RATE**

DÉCEMBRE 2005

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

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

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

REMERCIEMENTS

Je remercie mon directeur de recherche le Dr Éric Asselin de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire. Je vous remercie pour vos conseils et votre soutien. Soyez assurée de toute mon estime et de mon profond respect.

Merci à Sophie, à qui j'exprime ma reconnaissance pour l'aide apportée, la pertinence de ses conseils, ainsi que pour sa disponibilité. Tu as contribué à la réalisation de ce projet! Merci à Marie-Claude, en témoignage du temps que tu m'as accordé lors des premières semaines pendant lesquelles tu m'as initiée. Merci à Véronique, Isabelle, Kim, Émilie et Marie-Ève. Je vous remercie pour votre aide, votre soutien, votre patience et vos conseils toujours avisés. Merci à Pierre-Luc, Guylaine et Junie pour la complicité que nous avons partagée et le travail que nous avons réalisé ensemble. Soyez assuré de toute ma gratitude et de mon amitié.

Je tiens aussi à remercier les membres de l'équipe du Dr Marc Sirois et du Dr Monique Cadrin, pour avoir toujours été accueillie chaleureusement dans leur laboratoire et pour avoir toujours pu compter sur leur aide pour le travail que je réalisais.

J'adresse ma sincère reconnaissance à Mme Rollande Caron pour son aide et ses précieux conseils à l'animalerie. Merci tout particulièrement pour votre disponibilité, votre dévouement et votre gentillesse.

Merci à ma famille, pour votre soutien sans faille et vos encouragements. Je vous adore.

Merci à Carl, mon ami, en souvenir entre autre des manipulations réalisées ensemble...

RÉSUMÉ

Sous l'effet, des hormones stéroïdiennes, le tractus reproducteur femelle se prépare à une éventuelle fécondation de l'ovule, puis à l'implantation de l'ovocyte et au développement de l'embryon. Certains processus apoptotiques sont étroitement liés au problème de l'infertilité féminine. En effet, l'arrivée de l'embryon dans l'utérus déclenche l'apoptose des cellules épithéliales pour permettre à l'embryon de s'implanter dans la paroi utérine. Toutefois, il arrive que les mécanismes intracellulaires impliqués dans le déclenchement de l'apoptose au niveau des cellules endométriales se dérèglent et qu'il y ait échec de l'implantation embryonnaire. Chez la rate, l'exposition à l'oestrogène est indispensable à l'implantation embryonnaire par ailleurs, en absence de fécondation, il y a dégradation par apoptose des couches externes de la muqueuse utérine sans engendrer d'hémorragie (comme c'est le cas lors des menstruations chez la femme), c'est ce que l'on appelle l'oestrus. Cette étude revêt une importance capitale, puisque la régulation de l'apoptose dans l'utérus est encore très peu documentée. L'objectif de cette étude est d'investiguer l'implication de la voie de signalisation de PI 3-K/Akt (Phosphatidylinositol 3-kinase/ Activated by kinase tyrosine) et la régulation de Smac/DIABLO (Second mitochondrial activator of caspases/Direct IAP binding protein with low pI) et de XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein) dans le contrôle de l'activation des caspases au cours du cycle oestral de la rate ou sous traitement à l'oestradiol-17 β . Les résultats ont été obtenus à partir d'extraits protéiques du tissu endométrial et de sections de cornes utérines prélevées sur des rates cyclées ou ovariectomisées et traitées à l'oestradiol-17 β . De là, l'utilisation des techniques d'immunohistochimie, de TUNEL et d'immunobuvardage Western a mis en lumière

l'expression et la régulation des protéines ciblées. La première étude suggère que l'intensification de l'expression d'Akt et de son activité en réponse à l'oestradiol pourrait être un important mécanisme de protection des cellules endométriales face au déclenchement de l'apoptose et pourrait induire la prolifération cellulaire, tandis que l'inhibition de l'activité d'Akt conduirait à l'activation de la caspase-3 et à l'apoptose dans les cellules endométriales. La seconde étude insinue quant à elle que Smac/DIABLO et XIAP sont régulées différemment et qu'il est possible qu'elles jouent un rôle important dans la régulation de la destinée des cellules endométriales. De plus, cette étude confirme le rôle clé des caspases effectrices dans le contrôle du processus apoptotique à l'oestrus dans l'utérus de la rate. Comprendre les voies et interactions de l'apoptose intervenant lors du cycle, c'est découvrir les véritables raisons de l'infertilité féminine marquée par l'échec du dialogue entre l'utérus et l'embryon.

MOTS CLÉS : APOPTOSE, CYCLE OESTRAL, INFERTILITÉ FÉMININE, IMPLANTATION, UTÉRUS, HORMONES STÉROÏDIENNES , CASPASES, AKT, XIAP, SMAC/DIABLO,

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	ii
RÉSUMÉ.....	iii
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS	x
CHAPITRE I	1
INTRODUCTION.....	2
1.1. APOPTOSE.....	3
1.1.1. GÉNÉRALITÉS.....	3
1.1.2. CARACTÉRISTIQUES MORPHOLOGIQUES.....	3
1.2 LE RAT	4
1.3 L'UTÉRUS.....	6
1.4 LE CYCLE OESTRAL.....	9
1.4.1 LES VARIATIONS HORMONALES.....	9
1.4.2 LA CYTOLOGIE VAGINALE	11
1.5 LES HORMONES STÉROÏDIENNES.....	11
1.5.1 L'OESTRADIOL-17 β ET LA PROGESTÉRONNE	11
1.5.2 LE 2-MÉTHOXYESTRADIOL	15
1.6 L'IMPLANTATION EMBRYONNAIRE	15
1.6.1 INFERTILITÉ FÉMININE	16
1.7 LES MÉCANISMES MOLÉCULAIRES DE L'APOPTOSE.....	18
1.7.1 LES CASPASES.....	18
1.7.2 XIAP	22
1.7.3 Smac/DIABLO.....	24
1.7.4 LA VOIE DE SIGNALISATION PI 3-K/AKT	25

1.7.5 NF- κ B	26
1.7.6 PTEN.....	27
1.8 OBJECTIF	28
CHAPITRE II.....	30
REGULATION OF AKT EXPRESSION AND PHOSPHORYLATION BY 17 β - ESTRADIOL IN THE RAT UTERUS DURING ESTROUS CYCLE.....	30
PRÉFACE	31
RÉSUMÉ.....	32
ABSTRACT	35
INTRODUCTION.....	36
MATERIALS AND METHODS	37
RESULTS.....	40
DISCUSSION.....	42
ACKNOWLEDGMENTS.....	45
REFERENCES	46
FIGURE LEGENDS.....	50
CHAPITRE III	60
OPPOSITE REGULATION OF XIAP AND SMAC/DIABLO IN THE RAT ENDOMETRIUM IN RESPONSE TO 17 β -ESTRADIOL AT ESTRUS.....	60
PRÉFACE	61
RÉSUMÉ.....	62
ABSTRACT	64
INTRODUCTION.....	65
MATERIALS AND METHODS	67
RESULTS.....	69
DISCUSSION.....	71
ACKNOWLEDGMENTS.....	75
REFERENCES	76
FIGURE LEGENDS.....	81

CHAPITRE IV	89
DISCUSSION ET CONCLUSION	89
DISCUSSION.....	90
CONCLUSION.....	96
BIBLIOGRAPHIE	98

LISTE DES FIGURES

1.1	Représentation schématique des différences morphologiques entre l'apoptose et la nécrose.....	5
1.2	Anatomie de l'appareil génital de la rate.....	7
1.3	Coupe histologique d'une corne utérine de rat.....	8
1.4	Variation des niveaux hormonaux au cours des phases du cycle oestral du rat.....	10
1.5	Frottis marquant l'évolution de la cytologie vaginale au cours du cycle oestral du rat.....	12
1.6	La voie de la stéroïdogénèse sexuelle.....	14
1.7	Schéma des différentes étapes de l'implantation.....	17
1.8	Représentation schématique des voies de signalisation cellulaire impliquées lors de processus pro-apoptotiques et/ou anti-apoptotiques.....	19
1.9	Représentation schématique du mode d'activation des caspases.....	20
1.10	Représentation schématique de la voie de signalisation des caspases.....	23
2.1	Prolifération and apoptosis in the rat endometrium during the estrous cycle as demonstrated by Western analysis.....	53
2.2	Prolifération and apoptosis in the rat endometrium during the estrous cycle as demonstrated by TUNEL and IHC.....	54
2.3	Apoptotic and proliferative endometrial cell count during the estrous cycle.....	55
2.4	Expression of Akt, Phospho-Akt and PTEN during the estrous cycle.....	56
2.5	IHC of Akt, Phospho-Akt and PTEN in rat endometrium during the estrous cycle.....	57
2.6	Expression of CDC47/MCM7, Akt and Phospho-Akt in response to 17 β -estradiol in rat endometrium.....	58
2.7	IHC of CDC47/MCM7, Akt and Phospho-Akt in response to 17 β -estradiol in rat endometrium.....	59

3.1	Cleaved caspase-3, -6, and -7 expression in rat endometrium during estrous cycle.....	83
3.2	Smac/DIABLO and XIAP expression in rat endometrium during estrous cycle.....	84
3.3	Immunohistochemistry of Smac/DIABLO and XIAP in rat endometrium during estrous cycle.....	85
3.4	Expression of cleaved caspase-3, -6, -7, Smac/DIABLO and XIAP in response to 17β-estradiol in ovariectomized rats.....	86
3.5	Immunohistochemistry of Smac/DIABLO and XIAP in rat endometrium of treated ovariectomized rats.....	87
3.6	NF-κB and phospho-IκB expression in rat endometrium during estrous cycle.....	88

LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphates
Akt/PKB	Activated by kinase tyrosine/Protein Kinase B
Alpha ERKO	Alpha estrogen receptor knock-out mice
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor-1
ARN	Acides ribonucléiques
ARNm	Acides ribonucléiques messenger
BAD	Bcl-2-antagonist of cell death
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BIRs	Baculovirus IAP repeats
BRUCE	BIR repeat containing ubiquitin-conjugating enzyme
BSA	Bovine serum albumine
°C	Degré Celsius
Caspases	Cysteine aspartate-specific proteases
CARDs	Caspase recruitment domains
CDC47/MCM7	Cell division cycle 47/Mini Chromosome Maintenance protein 7
CHO	Chinese Hamster Ovary Cells
cIAP-1	cellular inhibitor of apoptosis protein-1
cIAP-2	cellular inhibitor of apoptosis protein-2
COMT	catéchol- <i>O</i> -méthyltransférase
DAB	3,3'-diaminobenzidine
DED	Death effector domain
DHEA	Déhydroépiandrosterone
DNA-PK	DNA-dependant protein kinase
DR5	Death receptor 5
E ₁	Oestrone
E ₂	Oestradiol-17 β
E ₃	Oestriol
E3	ubiquitin protein ligase
EGF	Epidermal growth factor
eNOS	Endothelial nitric oxide synthase
~	environ
ER α	Récepteur à l'œstrogène alpha
ER β	Récepteur à l'œstrogène bêta
et al.	Plus d'un auteur
FAS	Protéine transmembranaire de la famille des tumor necrosis factor
Fig.	Figure
FKHR	Forkhead transcription factor
FSH	Hormone folliculostimulante
g	Gramme
GH	Growth hormone
GSK-3 β	Glycogen synthase kinase 3 beta
HIAP-1	Human IAP-1

HIAP-2	Human IAP-2
IAPs	Inhibitor of apoptosis proteins
ICAD/DFF45	Caspase-activated deoxyribonuclease inhibitor/DNA-fragmentation factor 45
IGF-1	Insulin growth factor-1
IHC	Immunohistochimie
I κ B	Inhibitory subunit kappa B
IKK1	I κ B kinase-1
IKK2	I κ B kinase-2
IL-1	interleukin-1
ILP-2	IAP-like protein-2
Kb	Kilobases
KDa	Kilodalton
Kg	kilogramme
L	lumen
LE	Luminal epithelium
LH	Hormone lutéinostimulante
2ME2	2-Méthoxyestradiol
min.	Minute
mM	millimolaire
NAIP	Neuronal apoptosis inhibitory protein
NEMO/IKK γ	NF- κ B essential modulator/I κ B kinase γ
NF- κ B	Nuclear factor kappa B
P4	Progestérone
P-AKT	Phosphorylated Akt
PARP	Poly(ADP-ribose) polymerase
PBS	Phosphate buffer salt
PH	Pleckstrin homology
PDKs	Phosphoinositides-kinases dépendantes
PDZ	PSD95 DiscsLarge Z01
PI 3-K	Phosphatidylinositol 3 kinase
P-I κ B	Phosphorylated Inhibitory subunit kappa B
PIP ₃	Phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphates
PIP ₂	Phosphatidylinositol 4,5 diphosphates
PKB	Proteine Kinase B
POD	Peroxidase
pp.	Pages
PR A	Récepteur de la progestérone de type A
PR B	Récepteur de la progestérone de type B
PTEN/MMAC	Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten / mutated in multiple advanced cancers
RB	retinoblastoma protein
RHD	Rel-homology domain
RING	Really interesting new gene
S	Stroma
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis

Smac/DIABLO	Second mitochondrial activator of caspases/Direct IAP binding protein with low pI
TGF- β	Transforming growth factor-beta
TNF- α	Tumor necrosis factor-alpha
TRAIL	Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
TUNEL	[TdT]-mediated deoxyuridinetriphosphate nick end-labelling
μ g	microgramme
WT	Wild-type
XAF-1	XIAP-associated factor 1
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein

CHAPITRE I

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les recherches effectuées au sein de notre laboratoire sont consacrées à la compréhension des mécanismes intracellulaires et moléculaires qui régissent l'apoptose dans l'utérus de la rate. L'apoptose est un phénomène essentiel au maintien de l'homéostasie à l'intérieur de l'utérus. Ainsi, il contrôle le nombre de cellules présentes au cours du cycle oestral, de l'implantation embryonnaire et de la gestation. Tout cela se produit sous l'influence des sécrétions d'oestrogène et de progestérone qui, entre autres, durant le cycle oestral, régulent la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales et glandulaires en plus de leur mort par apoptose (Moulton, 1997).

Nous avons émis l'hypothèse qu'à l'intérieur de l'utérus la voie de survie cellulaire d'Akt, impliquant XIAP et Smac/DIABLO pourrait avoir une influence sur la survie et la mort des cellules endométriales lors du cycle oestral. Cette étude revêt une importance capitale, puisque le rôle de ces protéines n'avait encore jamais été investigué au niveau de l'utérus. L'étude de l'apoptose n'implique pas seulement de comprendre les mécanismes qui régulent la physiologie normale, mais aussi ceux qui définissent la physiologie anormale. Somme toute, l'ensemble de cette étude servira de base pour de futures investigations sur la nature et la régulation de l'infertilité féminine.

Les résultats ont été obtenus à partir de protéines endométriales et de sections de cornes utérines prélevées sur des rates cyclées ou ovariectomisées et traitées à l'oestradiol-17 β . De là, l'utilisation des techniques d'immunohistochimie, de TUNEL et d'immunobuvardage Western a mis en lumière l'expression et la régulation des protéines ciblées.

Ce mémoire se compose dans un premier temps d'une revue de littérature suivie de la description du matériel et des méthodes et des résultats publiés dans le cadre de deux articles. L'ensemble de ces résultats est ensuite discuté, puis les perspectives ouvertes par ces projets sont présentées. Cette dernière partie se termine par une conclusion générale.

1.1. APOPTOSE

1.1.1. GÉNÉRALITÉS

L'apoptose est un processus de mort cellulaire programmée et hautement régulé au terme duquel la cellule meurt dans des conditions physiologiques sans compromettre l'intégrité de l'organisme.

Le terme apoptose a été introduit en biologie en 1972 par Kerr et ses collaborateurs, afin de désigner une forme de mort cellulaire distincte de la nécrose (Kerr, 1972). Étymologiquement le mot grec apoptose, «apo» pour éloignement et «ptose» pour chute, fait référence à la chute des feuilles en automne. L'apoptose survient naturellement au cours de l'embryogenèse, du renouvellement des tissus soumis à des variations hormonales cycliques (muqueuse utérine, épithélium mammaire) et lors du vieillissement (Kiess, 1998). Ainsi, les cellules surnuméraires et dysfonctionnelles sont éliminées afin de préserver l'homéostasie de l'organisme. Toutefois, la dérégulation de l'apoptose est à l'origine de plusieurs pathologies (Bergamaschi, 1994). La mort cellulaire programmée est donc un mécanisme clé impliqué lors de processus tant physiologiques que pathologiques.

1.1.2. CARACTÉRISTIQUES MORPHOLOGIQUES

La mort cellulaire programmée peut être induite par une vaste gamme de stimuli. Par exemple, la privation de facteur de croissance, des stress physiques ou chimiques, les variations hormonales et l'activation des récepteurs membranaires par leurs ligands (FAS, TNF) (Vaughan, 2002). Cette forme de mort cellulaire met en œuvre des interactions moléculaires prédéterminées, à l'intérieur d'une cellule isolée, lors de la cascade apoptotique. Ainsi, l'apoptose se distingue par une séquence d'altérations morphologiques débutant par la condensation du cytoplasme (entraînant la perte de contact intercellulaire), suivit de l'externalisation de la phosphatidylsérine membranaire. La structure des organites demeure intacte alors que la chromatine se condense et que son ADN se fragmente (180-200 paires de bases) dû à l'activation de la DNase I, la

membrane plasmique bourgeonne et finalement les corps apoptotiques sont phagocytés par les macrophages environnants sans entraîner de réaction inflammatoire. Cependant, la présence insuffisante de cellules phagocytaires entraîne la cytolysse des corps apoptotiques, aussi qualifiée de «nécrose secondaire» (Schwartzman, 1993).

À l'inverse, la nécrose survient de façon accidentelle lorsque la cellule a subi des dommages irréparables. Il y a alors une perméabilisation membranaire précoce qui engendre un gonflement cellulaire, la rupture de la membrane plasmique et la destruction des organites et de la chromatine. Le déversement qui fait suite à la rupture de la membrane est à l'origine de la réaction inflammatoire (Ziegler, 2004) (Fig. 1.1). Les menstruations ont longtemps été associées à la nécrose ischémique de l'endomètre causée par la vasoconstriction de petits vaisseaux. Toutefois, des études menées à l'aide de la microscopie électronique ont révélés la présence de corps apoptotiques dans les cellules épithéliales de l'endomètre humain lors de la phase sécrétrice (Otsuki, 2001).

L'apoptose au sein du tractus reproducteur survient de manière très stéréotypée s'inscrivant dans le cours normal du cycle menstruel/oestral. Sa fidélité est donc primordiale à la régularité du cycle et par le fait même au délicat processus qu'est la reproduction chez les mammifères. Une meilleure compréhension des interactions sophistiquées régissant la destinée des cellules endométriales permettra d'approfondir nos connaissances quant au rôle exact de la régulation moléculaire de l'apoptose dans l'endomètre au cours du cycle.

1.2 LE RAT

Le rat Sprague-Dawley permet l'étude des mécanismes régulant l'apoptose dans un environnement contrôlé. C'est un modèle d'une grande souplesse d'utilisation, car il est de manipulation et d'entretien faciles pour des coûts minimes. Sa petite taille permet de l'entretenir et de le manipuler sans contrainte. De nombreuses études impliquant le rat ont permis d'en savoir plus au niveau physiologique, anatomique, génétique et comportemental. À cet égard, il est bien connu que la rate possède un cycle court (4 à 5

APOPTOSE**Processus physiologique****NÉCROSE****En réponse aux lésions cellulaires**

Diminution du volume cellulaire
Condensation de la chromatine
Fragmentation de la chromatine

Gonflement cellulaire

Formation de corps apoptotiques
Organites et membranes intacts

Lésion des organites

Phagocytose
Aucune réaction inflammatoire
Nécrose secondaire

Rupture des membranes
Destruction des organites
et de la chromatine
Réaction inflammatoire

FIGURE 1.1 : Représentation schématique des différences morphologiques entre l'apoptose et la nécrose. (Adapté de Roche Applied Science "Apoptosis, Cell Death and Cell Proliferation Manual", 3rd edition)

jours) et qu'elle présente de nombreuses similitudes avec la femme telles qu'une ovulation spontanée en l'absence de mâle et une placentation hémo-choriale (le sang maternel est directement en contact avec les villosités choriales) (Thibault, 2001). Ainsi, les résultats obtenus et interprétés avec soin, peuvent être l'extrapolés à la femme (Waynforth, 1992). De plus, les rates ovariectomisées sont communément utilisées en tant que modèle dans l'étude de la régulation des hormones stéroïdiennes (Wu, 2003).

1.3 L'UTÉRUS

La femelle du rat est pourvue d'un utérus «double», c'est-à-dire dotée de deux cornes utérines s'ouvrant sur un seul vagin (Thibault, 2001). Les cornes utérines se situent de chaque côté de la cavité abdominale et se prolongent non loin de la portion inférieure des reins. Parcourant la face intérieure des cornes, les vaisseaux ovariens (artère et veine), transportent le sang vers l'utérus et les ovaires. Les deux ovaires sont de petits organes ronds de forme irrégulière, rattachés à une corne utérine via la trompe de Fallope, qui est enroulée sur elle-même (Waynforth, 1992) (Fig.1.2). La paroi de l'utérus est composée de trois couches de tissus : le périmétrium, le myomètre et l'endomètre. Le périmétrium, la tunique séreuse, est une portion du péritoine viscéral. Le myomètre, la tunique musculaire, est constitué de cellules musculaires lisses, dont les contractions permettent l'expulsion des petits (environ 6 à 10 chez la rate) lors de l'accouchement (Marieb, 1993). La tunique muqueuse ou l'endomètre est constitué d'un épithélium luminal et glandulaire, séparé du stroma conjonctif par une lame basale. Le stroma est richement vascularisé et abrite les glandes utérines qui débouchent dans la lumière (Thibault, 2001) (Fig.1.3). L'utérus a pour rôle de permettre le transport et la survie des spermatozoïdes, d'accueillir l'ovule fécondé et d'assurer l'alimentation du fœtus, ainsi que le maintien de la gestation. En l'absence de fécondation, il y a renouvellement des couches externes de sa muqueuse sans engendrer d'hémorragie (comme c'est le cas lors des menstruations chez la femme), c'est ce que l'on appelle l'oestrus (Thibault, 2001). Ainsi, la muqueuse utérine est dépendante des hormones stéroïdiennes et de leurs fluctuations, pour la préparation à l'implantation d'un embryon.

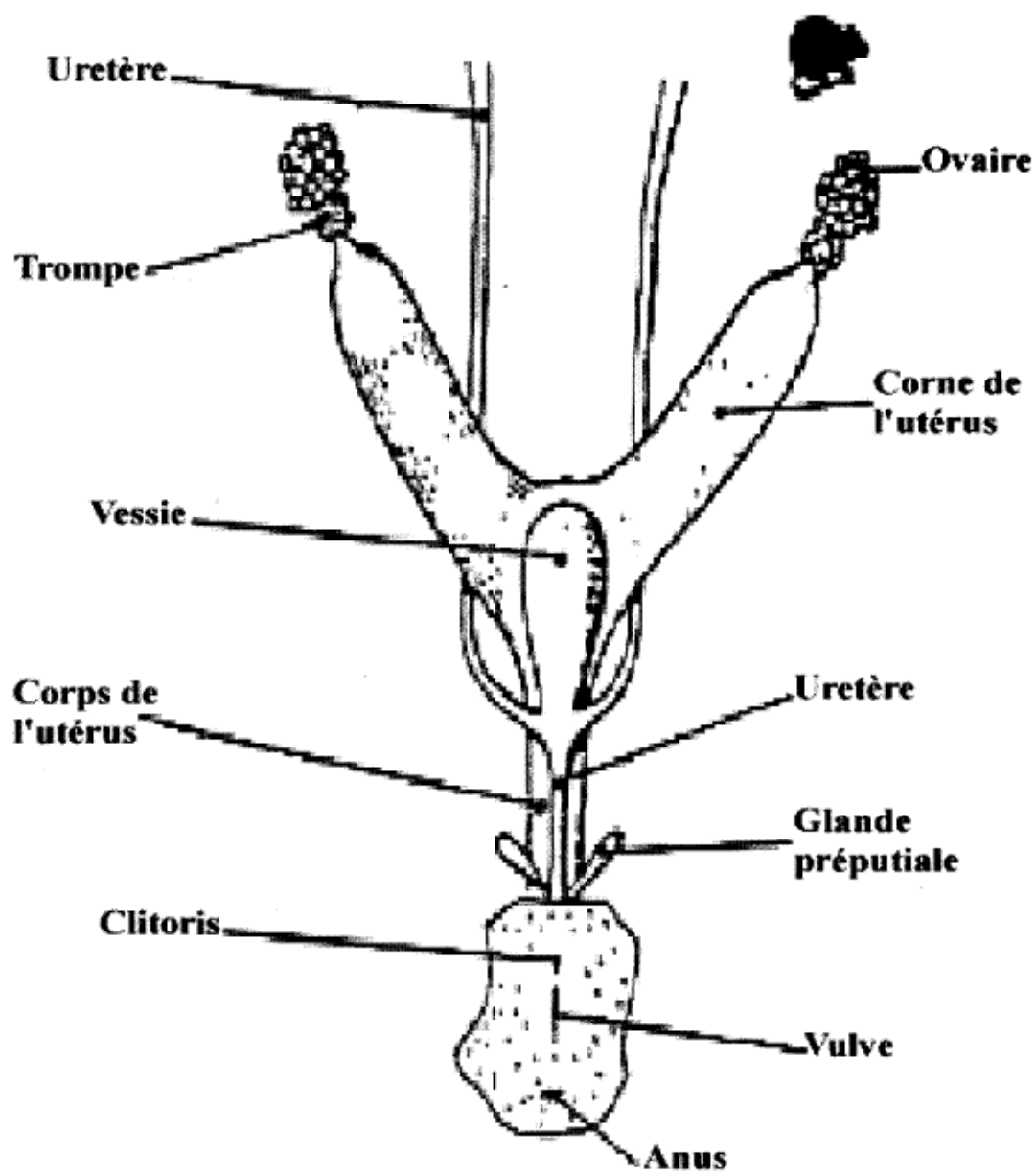


FIGURE 1.2 : Anatomie de l'appareil génital de la rate. (Eckstein et Zuckerman, 1960)

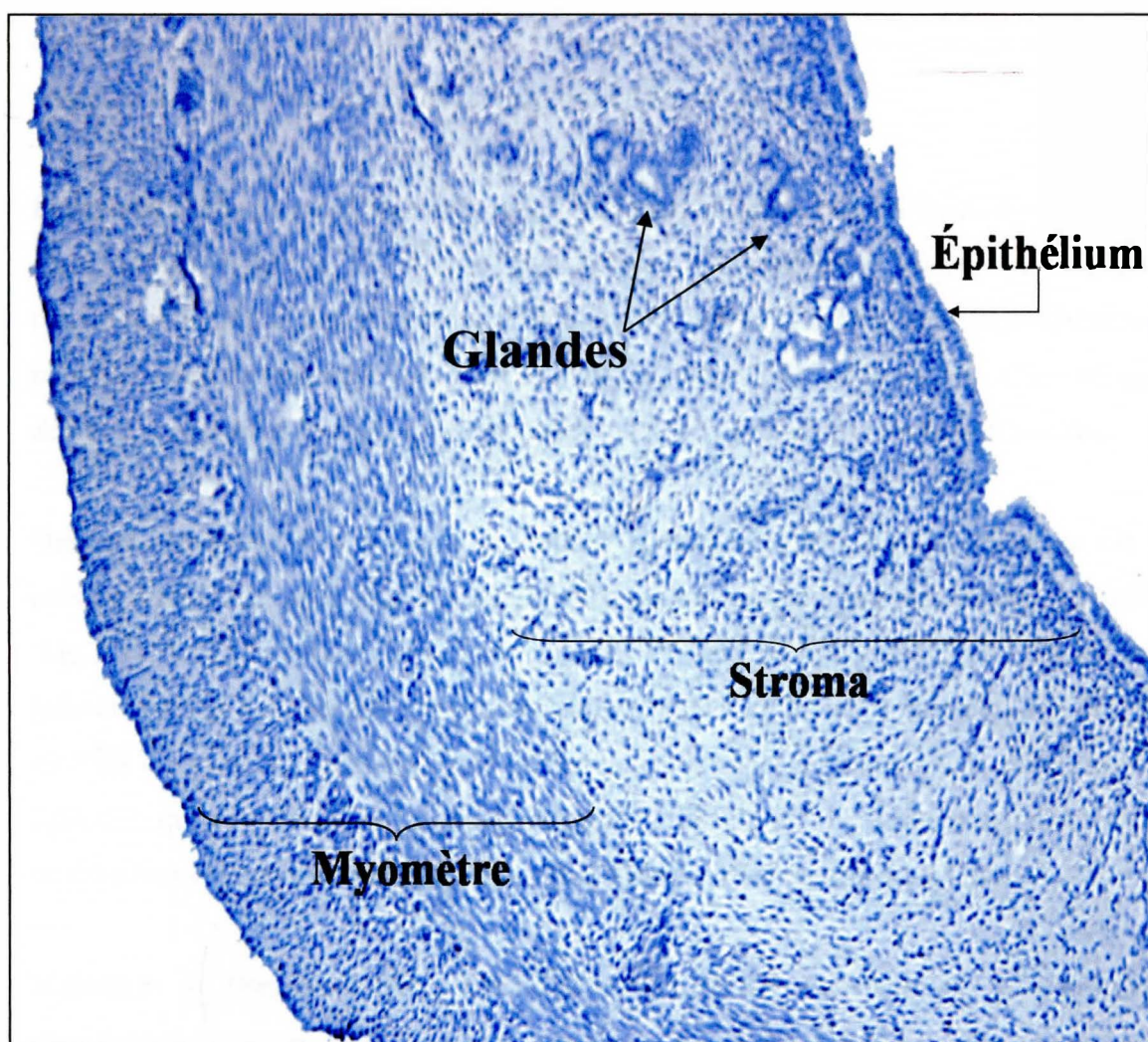


FIGURE 1.3 : Coupe histologique d'une corne utérine de rate (Grossissement 10x).

1.4 LE CYCLE OESTRAL

1.4.1 LES VARIATIONS HORMONALES

Conformément aux caractéristiques structurales et fonctionnelles de l'utérus le cycle oestral de la rate, d'une durée de quatre jours, se subdivise en quatre phases : le diestrus, le proestrus, l'oestrus et le métestrus (Fig.1.4).

Diestrus ou Diestrus-2 (6h) : L'hormone lutéinostimulante (LH) et l'hormone folliculostimulante (FSH) sont à leur point le plus bas. Au Début, le niveau d'oestrogène est au minimum avant d'amorcer sa remontée. La progestérone poursuit sa descente pour atteindre une faible concentration en fin de phase.

Proestrus (72h) : La LH est à son point culminant, alors que la FSH passe rapidement d'un niveau faible à un niveau plus élevé. L'oestrogène accède à son pic, conséquemment à la croissance des follicules. À l'inverse, la progestérone tombe à son plus bas avant de rejoindre son point le plus haut vers la fin de la phase. C'est ici que débute l'acceptation du mâle qui se poursuit jusqu'aux premières heures de l'oestrus.

Oestrus (10-20h) : Il y a ovulation suite à la décharge de LH/FSH. L'ovule est à présent accessible pour une éventuelle fécondation par les spermatozoïdes du mâle (Fig.1.5). La LH diminue jusqu'à son plus bas niveau. La FSH quant à elle débute une remontée jusqu'à un second pic pour ensuite revenir à un niveau intermédiaire. Ce pic de FSH est caractéristique du cycle de la rate, il stimule la formation de l'antrum des follicules qui ovuleront lors du prochain cycle (Thibault, 2001). L'oestrogène continue de diminuer et la progestérone diminue aussi avant de débiter son ascension.

Métestrus ou Diestrus-1 (8h) : Les niveaux de LH/FSH sont minimes. L'oestrogène maintient sa descente, alors que la progestérone augmente jusqu'à un maximum pour redescendre aussitôt (Spornitz, 1999). La rate se distingue par une activité fonctionnelle très brève de son corps jaune cyclique qui est reliée à la hausse des sécrétions de progestérone. Cette activité perdure jusqu'au début du diestrus (Thibault, 2001).

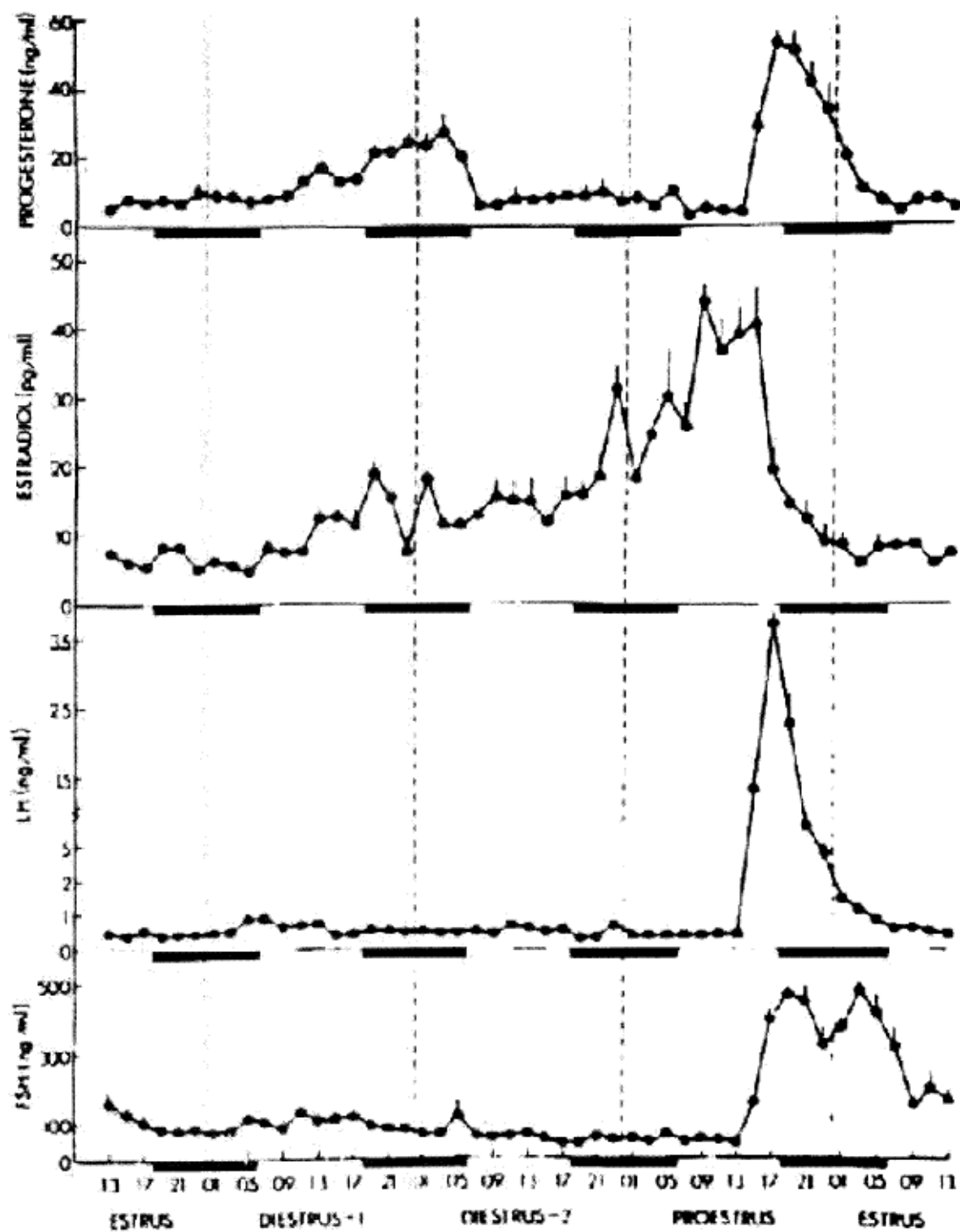


FIGURE 1.4 : Variations des niveaux hormonaux au cours des phases du cycle oestral de la rate. Variations sanguines des stéroïdes ovariens (oestrogène et progestérone) et des gonadotropines (LH/FSH) sur une échelle de 24 heures (noter que la durée des phases peut être variable). (Greep, 1997)

Bref, c'est la décharge de gonadotropines (LH/FSH) au tout début de l'oestrus qui déclenche l'ovulation, marquant la fin de la phase folliculaire et le début de la phase lutéale (Thibault, 2001).

1.4.2 LA CYTOLOGIE VAGINALE

Les frottis vaginaux démontrent que la cytologie de la muqueuse vaginale évolue au cours du cycle oestral de la rate. À ce titre, on observe énormément de leucocytes polymorphonucléaires lors du diestrus, ceux-ci servent à éliminer les cellules mortes. Ensuite, le début du proestrus se caractérise par la présence de mucus au travers duquel se retrouve encore quelques leucocytes polymorphonucléaires, des cellules nucléées et quelques cellules épithéliales kératinisées. La fin du proestrus se compose presque uniquement de cellules nucléées, c'est la phase proliférative. L'oestrus fait place à une abondance de cellules kératinisées mortes par apoptose lorsque l'ovule n'est pas fécondé ainsi qu'en réponse au retrait de l'oestrogène. Finalement, le métestrus révèle quelques cellules kératinisées et nucléées ainsi que l'arrivée des leucocytes polymorphonucléaires (Waynforth, 1992) (Fig.1.5). L'oestrogène et la progestérone sont directement responsables des changements histologiques et morphologiques de l'utérus pendant le cycle oestral (Dharma, 2001).

1.5 LES HORMONES STÉROÏDIENNES

1.5.1 L'OESTRADIOL-17 β ET LA PROGESTÉRONE

La biosynthèse des stéroïdes s'initie dans les mitochondries des cellules de la thèque interne du follicule ovarien. Ils sont élaborés à partir du cholestérol suite à une série de réactions en chaîne. Dans un premier temps, le cytochrome P-450_{sc} (side-chain cleavage), stimulé par la LH, convertit le cholestérol en prégnénolone. La seconde réaction est catalysée au niveau du réticulum endoplasmique par le cytochrome P-450C17 (17 α -hydroxylase/lyase) qui transforme la prégnénolone et la progestérone en leurs dérivés 17 α -hydroxylés. Ces dérivés sont clivés afin d'obtenir la déhydroépiandrostérone (DHEA) et l'androstédione. Le tout se poursuit dans le

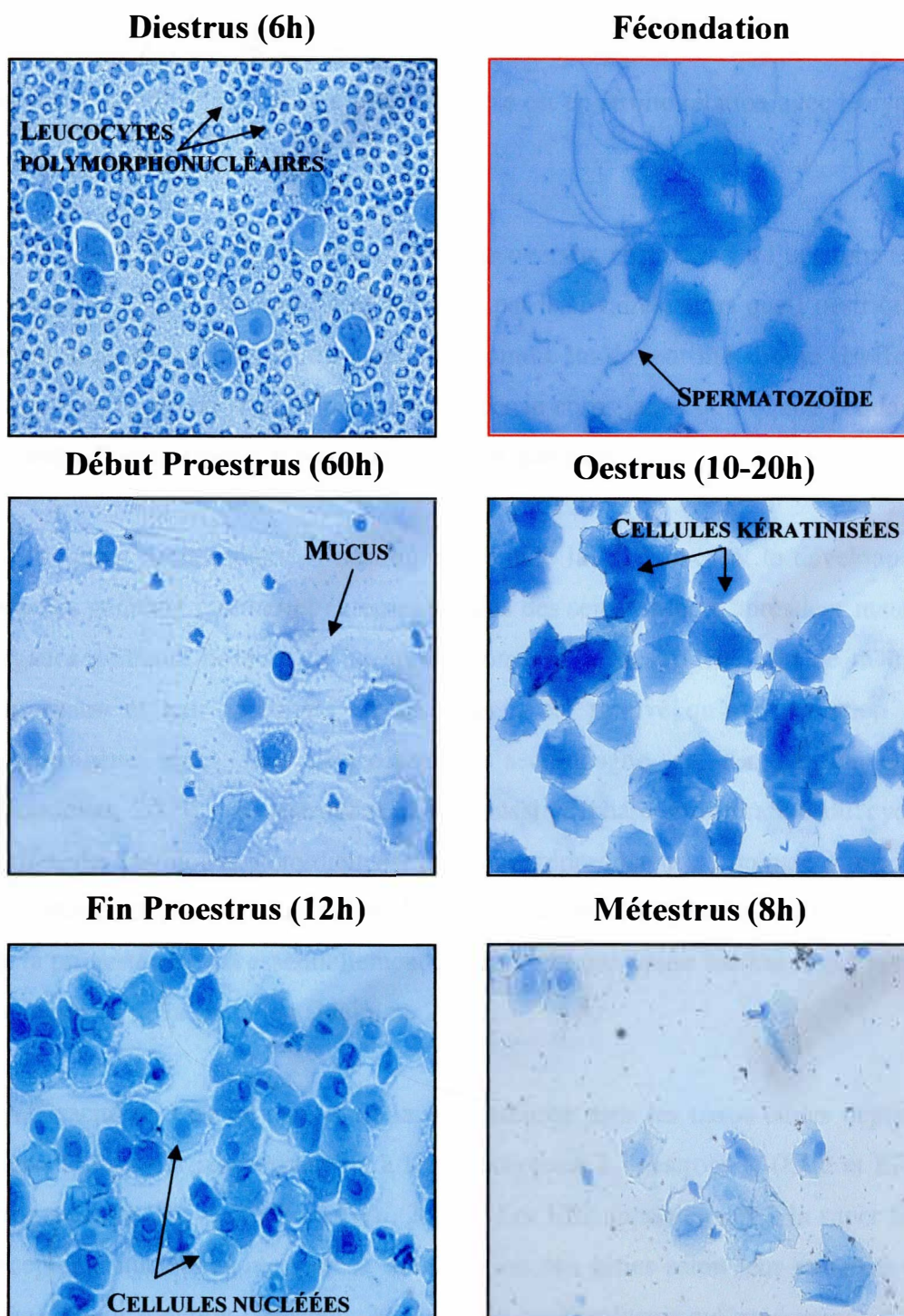


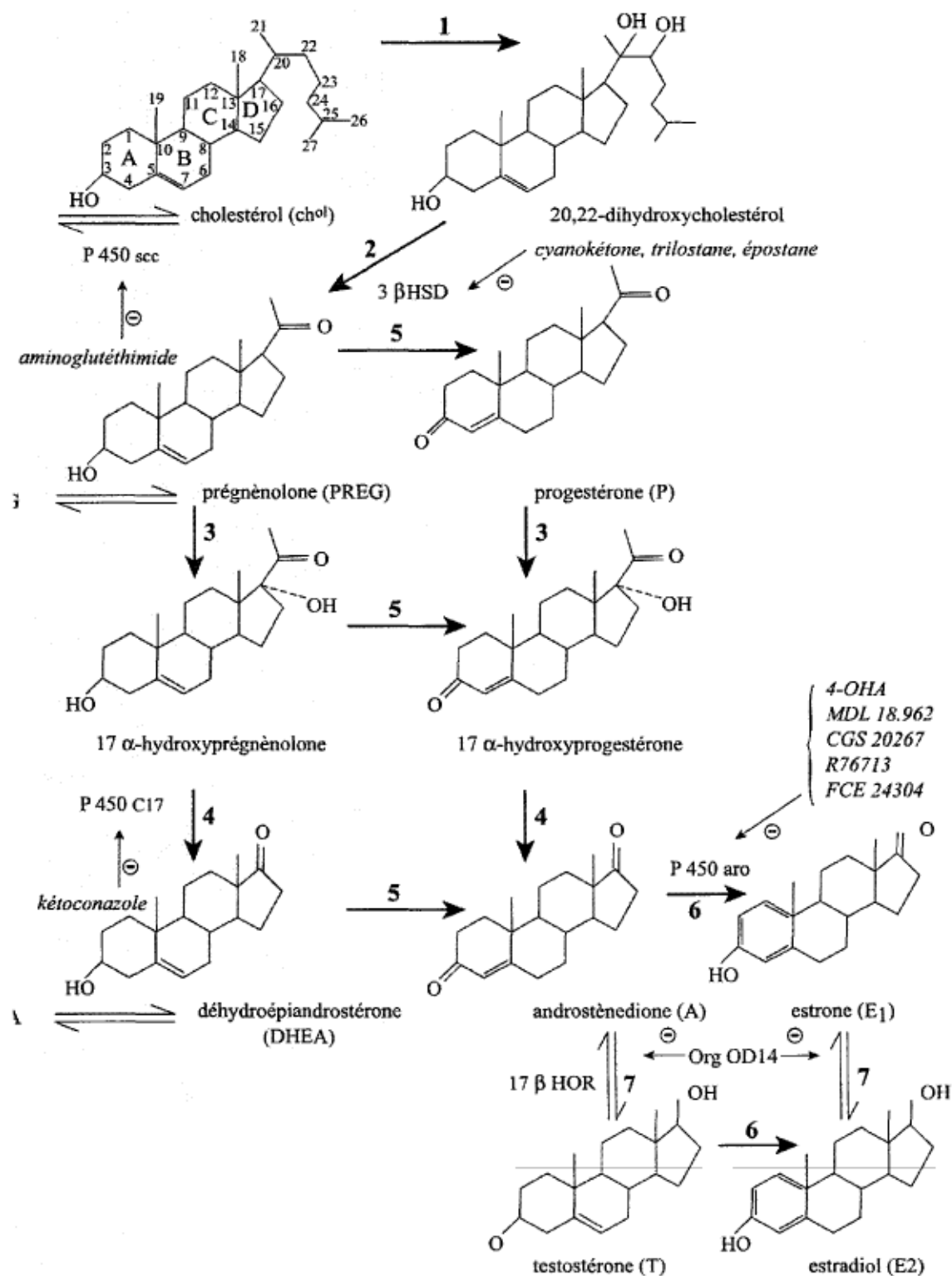
FIGURE 1.5 : Frottis marquant l'évolution de la cytologie vaginale au cours du cycle oestral de la rate. Les cellules apposées sur une lame sont colorées au bleu de méthylène 0.1% (Grossissement 20x).

réticulum endoplasmique des cellules de la granulosa du follicule ovarien. De là, la troisième réaction est induite par l'action de la FSH sur le cytochrome P-450_{aro} (aromatase) qui assure la conversion des androgènes en oestrogènes (Thibault, 2001; Idelman, 2000) (Fig. 1.6). Cette biosynthèse est en étroite relation avec le cycle ovarien (Goodman, 2003).

L'oestradiol (E₂) est le principal oestrogène ovarien, ensuite il y a l'oestrone (E₁) qui est également fournie en quantité appréciable par les ovaires, alors que l'oestriol (E₃) n'est pas d'origine ovarienne et est considéré comme un de leur métabolite (Heffner, 2003). La progestérone est pour sa part sécrétée par le corps jaune de l'ovaire pendant le cycle menstruel/oestral et par le placenta lors de la gestation.

Au moment de la puberté, l'oestrogène stimule la croissance et le développement des organes génitaux internes et externes en plus des seins. Même après leur maturation les organes génitaux nécessitent un apport constant en oestrogène afin de maintenir leur dimension et leur fonction. À ce titre, il est prouvé qu'une privation prolongée d'oestrogène après une ovariectomie s'accompagne de l'involution de l'utérus (Goodman, 2003). L'oestrogène induit aussi la phase proliférative du cycle. Sous l'effet, des hormones stéroïdiennes, le tractus reproducteur se prépare à une éventuelle fécondation de l'ovule, puis à l'implantation et au développement de l'embryon. Le rôle de la progestérone est essentiellement de rendre la muqueuse utérine apte à la nidation et au maintien de la gestation (Idelman, 2000).

L'efficacité de l'oestrogène et de la progestérone dans les tissus cibles dépend de leur capacité à se lier respectivement à leurs récepteurs à l'oestrogène (ER α et ER β) et à la progestérone (PR A et PR B) (Wu, 2003). Les ERs appartiennent à la super famille des récepteurs nucléaires régulant la transcription des gènes selon leur structure (alpha ou bêta) et leur fonction (Nephew, 2000). ER α est l'isoforme qui prédomine au niveau du tissu des glandes mammaires, de l'utérus, du col de l'utérus, du vagin et de plusieurs autres, alors que ER β se limite à l'ovaire, à la rate, aux poumons, à l'hypothalamus et au thymus (Hall, 2001). La concentration des récepteurs fluctue tout au long du cycle



Les termes en italique suivis d'une flèche affectée du signe (-) désignent les inhibiteurs de l'enzyme considérée.

FIGURE 1.6: La voie de la stéroïdogenèse sexuelle. (Thibault, 2001)

oestral et ce en fonction du niveau hormonal. Par conséquent, la hausse de l'oestrogène avant l'ovulation induit l'expression des récepteurs à l'oestrogène (ER α) et à la progestérone (PR) (Thibault, 2001; Ogle, 2002). Cette dernière stimule l'activité sécrétoire de l'endomètre garantissant un environnement propice à l'implantation, puis au développement de l'embryon (Thibault, 2001).

1.5.2 LE 2-MÉTHOXYESTRADIOL

Le 2-méthoxyestradiol (2ME2) est un métabolite endogène de l'oestradiol-17 β retrouvé dans le sang et l'urine, qui a une activité anti-tumorale et anti-angiogénique reconnue depuis plusieurs années. Néanmoins, la fonction physiologique exacte de cette molécule demeure toujours inconnue, mais sa faible toxicité l'assujettit à une vaste gamme d'études cliniques de Phase I et II sous le nom de Panzem (LaVallee, 2003).

Le 2ME2 résulte d'une d'hydroxylation hépatique de l'oestradiol-17 β par les cytochromes P450, suivit d'une méthylation des dérivés hydroxylés (2- ou 4-hydroxyestradiol) par la catéchol-*O*-méthyltransférase (COMT), une enzyme présente dans le foie, les reins, le cerveau, le placenta, l'utérus, les glandes mammaires et les globules rouges (Schumacher, 2001).

Même s'il possède peu d'affinité pour les ERs, une étude effectuée au cours du cycle menstruel de huit femmes a démontré que les concentrations de 2ME2 correspondaient aux variations cycliques de l'oestradiol (Berg, 1983). De plus, l'induction de l'apoptose par le 2ME2 requiert l'exécution de la cascade des caspases dans les cellules endothéliales et cancéreuses (LaVallee, 2003 ; Mooberry, 2003).

1.6 L'IMPLANTATION EMBRYONNAIRE

Chez la rate, l'exposition à l'oestrogène est indispensable à l'implantation embryonnaire, alors que la progestérone permet le maintien de la gestation (Abrahamsohn, 1993). La

femme quant à elle ne requiert que l'apport de la progestérone pour promouvoir l'implantation du blastocyste et la maturation de l'endomètre (Sun, 2004).

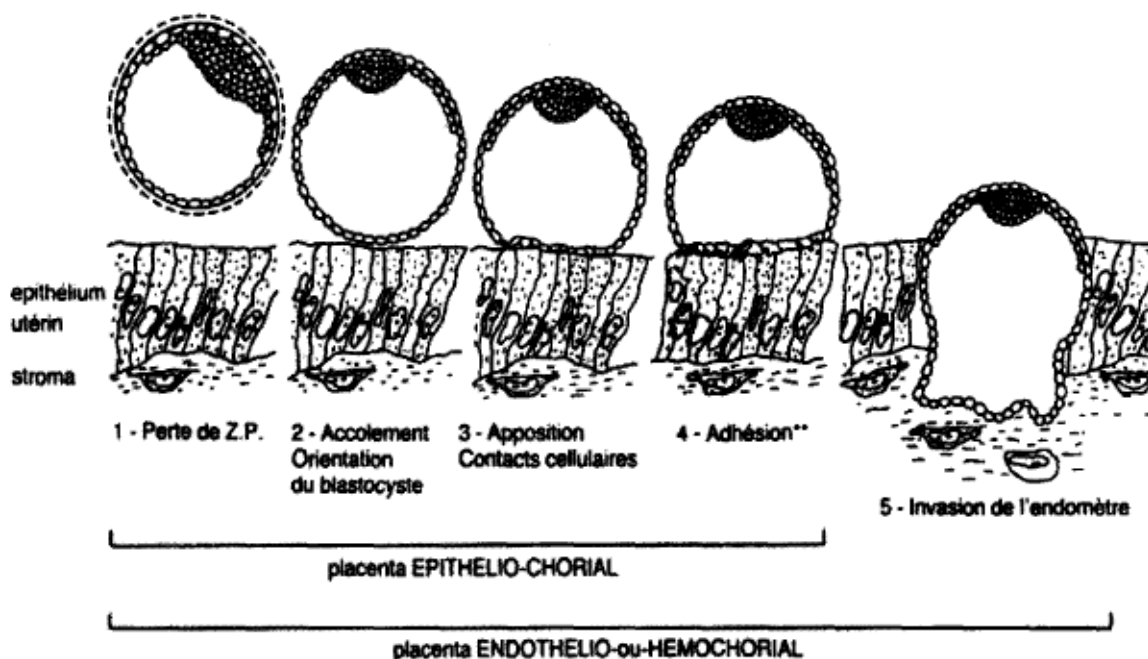
En quelques mots, l'implantation embryonnaire est un processus complexe au cours duquel le blastocyste s'appose d'abord à l'endomètre maternel, y adhère, puis finalement y pénètre et l'envahit (Fig. 1.7). Chez la rate, l'implantation survient autour du jour 5 du développement de l'embryon qui lui arrive à terme aux environs du jour 22 (Thibault, 2001).

L'apoptose s'initie au niveau des cellules épithéliales, détruisant les barrières à la recherche de l'apport sanguin maternel (Pampfer, 1999 ; Parr, 1987), puis les cellules stromales de l'endomètre se métamorphosent en cellules de la décidue, ce processus se nomme la décidualisation. Les cellules de la décidue persistent pour la plupart jusqu'au jour 14 de la gestation, où il y a régression de la décidue par apoptose (Moulton, 1997).

1.6.1 INFERTILITÉ FÉMININE

Le succès de la reproduction chez les mammifères résulte de délicates interactions entre l'embryon et l'environnement maternel (Abrahamsohn, 1993). L'arrivée de l'embryon dans l'utérus déclenche l'apoptose des cellules épithéliales qui cèdent leur place pour permettre à l'embryon de s'implanter dans la paroi utérine. Cette synchronisation est rendue possible grâce au dialogue établi entre l'embryon et l'utérus. Toutefois un dérèglement des interactions embryo-utérines peut contrecarrer la poursuite de l'implantation. Sans implantation, l'embryon est perdu.

On estime à plus de 80% les pertes embryonnaires causées par une mauvaise réceptivité de l'endomètre utérin, ce qui en fait la cause majeure d'infertilité chez les mammifères (Duc-Goiran, 1999). Dans la plupart des cas, l'échec de l'implantation survient avant même que la gestation n'ait été cliniquement détectée. L'insuccès de l'implantation est aussi le principal facteur limitant en reproduction assistée (Sun, 2004).



*Le disque embryonnaire est arbitrairement localisé au pôle opposé au site d'implantation. ** : Ce stade est la phase ultime de l'implantation dans les espèces épithélio-choriales.*

FIGURE 1.7 : Schéma des différentes étapes de l'implantation. Suite à la fécondation, le zygote se segment pendant sa descente dans l'oviducte et son entrée dans l'utérus. Le blastocyste se libère de la zone pellucide pour s'implanter dans l'endomètre. (Tiré de Thibeault, 2001)

1.7 LES MÉCANISMES MOLÉCULAIRES DE L'APOPTOSE

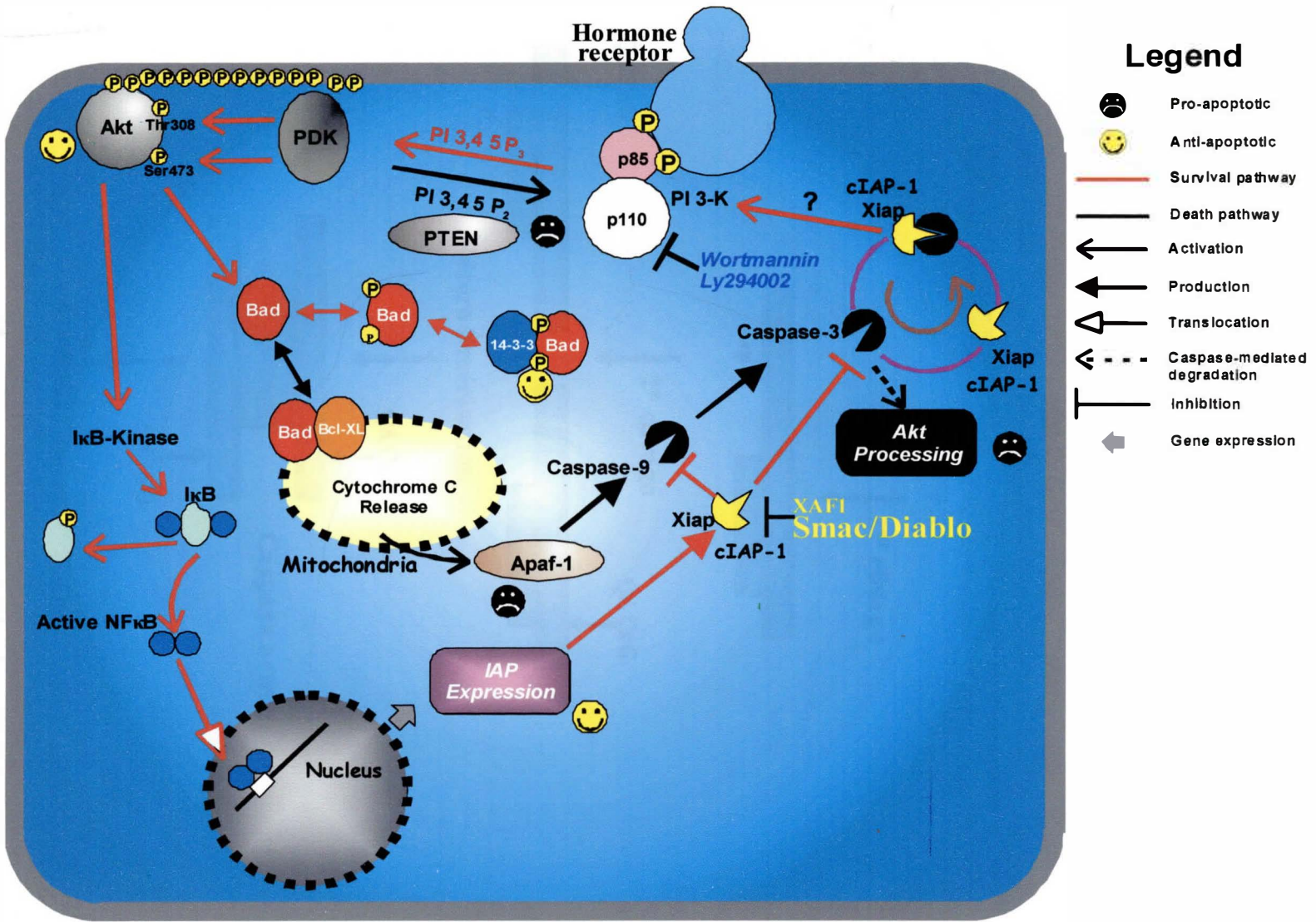
Les changements morphologiques et histologiques des cellules utérines révèlent l'action de molécules spécialisées jouant un rôle prédéterminé au cœur du processus de mort cellulaire programmée. Ainsi, le démantèlement des structures cellulaires est imputable à la transduction des signaux extracellulaires et intracellulaires qui constitue la cascade apoptotique. Vue la multitude de voies de signalisation existantes, cette étude s'est penchée sur la voie de signalisation de PI 3-K/Akt en englobant les protéines qui gravitent autour de celle-ci soit; les caspases, XIAP, Smac/DIABLO, PTEN et NF- κ B (Fig. 1.8).

1.7.1 LES CASPASES

Les caspases (Cystein Aspartate-Specific ProteASEs) constituent une famille de protéases qui tirent leur nom de leur mode d'action (Creagh, 2001). En effet, elles possèdent toutes un site catalytique très conservé composé d'un résidu cystéine (C) localisé dans la séquence peptidique QACxG (où le résidu x est R, Q ou G) (Fig. 1.9). Ce site confère aux caspases une spécificité de reconnaissance et de clivage du substrat au niveau des résidus aspartates (Cohen, 1997). Les caspases jouent un rôle crucial dans l'initiation et dans l'exécution de l'apoptose, c'est pourquoi toutes les cellules mobilisées par la mort cellulaire programmée affichent des modifications morphologiques et biochimiques similaires.

Les caspases sont présentes dans le cytoplasme sous une forme inactive : la pro-caspase. Ces enzymes sont constituées d'un pro-domaine N-terminal, d'une grande sous-unité (~20 KDa) portant le site catalytique et d'une petite sous-unité (~10 KDa) en C-terminal. L'activation des caspases nécessite le clivage successif de la petite et de la grande sous-unité, ainsi que l'élimination du pro-domaine suivit de l'assemblage des sous-unités en un hétérodimère. La forme active de l'enzyme est finalement constituée de deux hétérodimères qui comprennent chacun deux sites catalytiques actifs (Wolf, 1999) (Fig. 1.9).

FIGURE 1.8 : Représentation schématique des voies de signalisation cellulaire impliquées lors de processus pro-apoptotiques et/ou anti-apoptotiques.



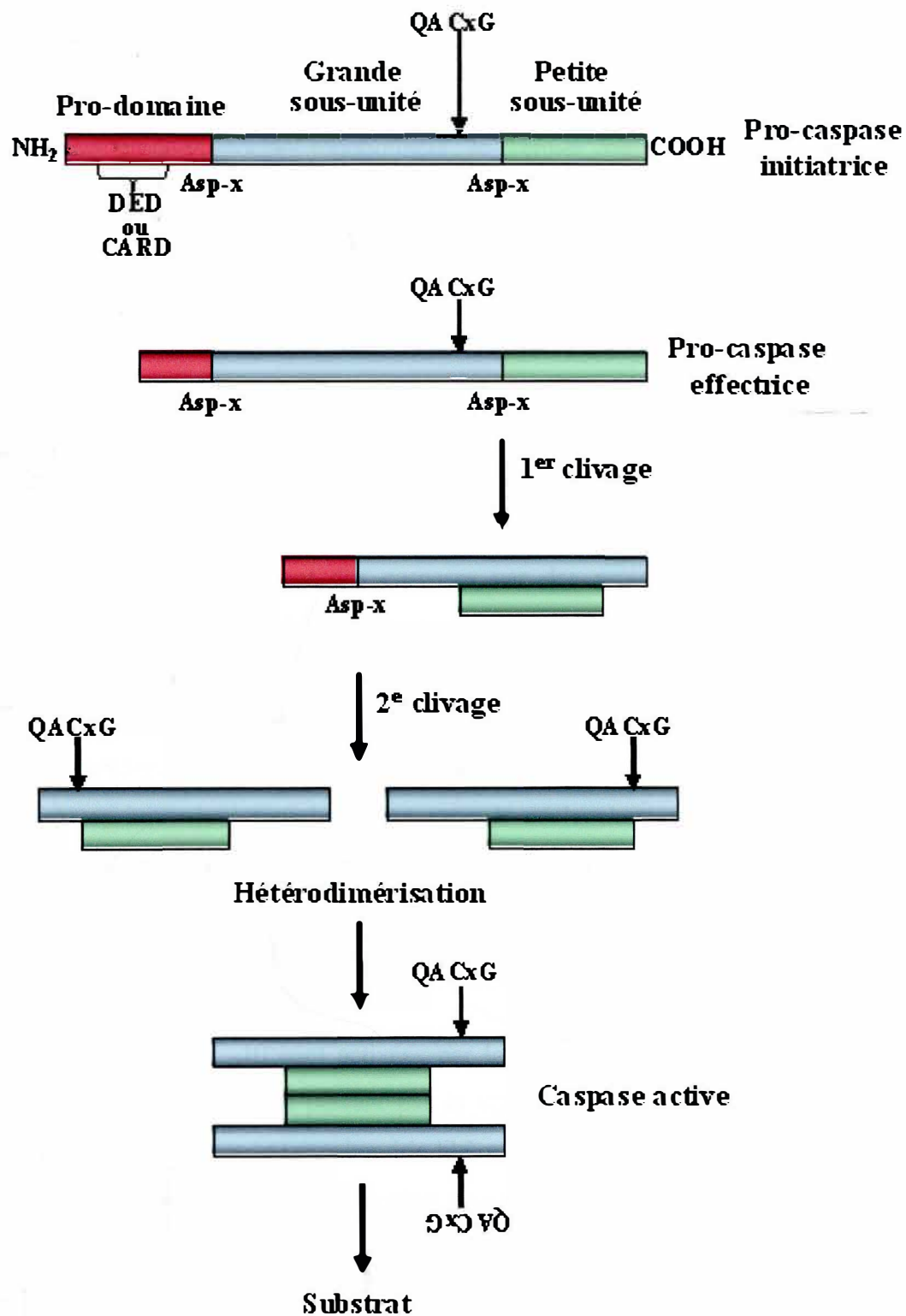


FIGURE 1.9 : Représentation schématique du mode d'activation des caspases.
(d'après Thornberry, 1998)

À ce jour, on dénombre quatorze caspases différentes, les recherches à venir diront si cette liste est exhaustive ou si elle ne l'est pas. Les caspases ont été classées d'après la spécificité de leur substrat ou selon la taille de leur pro-domaine ou encore selon l'étape où elles interviennent au cours du processus. En plus, les caspases sont grossièrement divisées en deux groupes fonctionnels : le premier comprend les caspases activées lors de l'apoptose (caspases-2, -3, -6, -7, -8, -9 et -10) et le second celles intervenant au moment de l'inflammation (caspases-1, -4, -5 et -11), mais cette division est appelée à changer avec la recherche (Creagh, 2001). De là, les caspases impliquées dans l'apoptose sont subdivisées selon l'étape où elles interviennent au cours de la cascade et la taille de leur pro-domaine. Les caspases initiatrices (caspases-2, -8, -9 et -10) possèdent un long pro-domaine N-terminal composé de motifs d'interaction protéine-protéine, tel que le «death effector domain» (DED) pour les caspases-8 et -10 ou le «caspase recruitment domain» (CARD) pour les caspases-2, et -9. Ces domaines permettent le recrutement des caspases par des protéines adaptatrices au sein des complexes d'initiation de l'apoptose, ce qui entraîne leur activation par autocatalyse. Les caspases exécutrices (caspases-3, -6 et -7) sont pourvues d'un pro-domaine court qui ne possède pas de domaine leur permettant d'être recrutées, elles sont donc activées à la suite de leur clivage par une autre caspase (Thornberry, 1998 ; Creagh, 2001). Ainsi les caspases initiatrices font la liaison entre le déclenchement de l'apoptose et la phase d'exécution, assurée par les caspases effectrices. Les caspases peuvent s'autocliver et activer d'autres caspases ou substrats formant alors une cascade enzymatique permettant d'amplifier les signaux pro-apoptotiques (Thornberry, 1998).

Les caspases-8 et -10 sont activées par la voie des récepteurs de mort, alors que la caspase-9 est activée en passant par la voie mitochondriale. Ainsi, en réponse à un stimulus apoptotique la mitochondrie libère le cytochrome c dans le cytosol où il se lie à Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1), puis à la caspase-9 pour constituer sa forme active : l'apoptosome (Creagh, 2001). Il arrive parfois que l'activité protéolytique de la caspase-9 soit inhibée par Akt qui phosphoryle son résidu sérine¹⁹⁶, sans doute dans le but de promouvoir la survie cellulaire (Cardone, 1998).

C'est le clivage protéolytique qui est à l'origine des particularités biochimiques et morphologiques des cellules en apoptose. Il a pour conséquence : 1) l'activation des protéines impliquées dans le déroulement de l'apoptose (pro-caspases, endonucléases, facteurs de transcription), 2) l'inactivation des protéines contribuant au maintien de l'intégrité cellulaire (actine, lamines nucléaires, fodrine, facteur ICAD/DFF45), 3) l'inactivation des protéines participant à la régulation de la réparation de l'ADN (PARP, DNA-PK) ou du cycle cellulaire (RB) (Cohen, 1997). Collectivement, le clivage de ces protéines aboutit irrémédiablement à la mort de la cellule (Fig. 1.10). La clé de la compréhension du suicide cellulaire pourrait donc se situer au sein de leurs mécanismes d'activation et de régulation, de même que chez leurs substrats. Par ailleurs, la régulation des caspases est primordiale au bon fonctionnement de la cellule, c'est pourquoi elles sont modulées par les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAPs).

1.7.2 XIAP

La survie cellulaire nécessite l'inhibition de l'apoptose via le blocage des caspases ou encore via la prévention de leur activation. Ainsi, les protéines qui inhibent l'apoptose (IAPs) empêchent l'activation inappropriée des caspases dans les cellules (Duckett, 1996). À ce jour, huit homologues des IAPs ont été identifiés chez l'homme ; c-IAP1, c-IAP2, NAIP, Survivin, BRUCE, ILP-2, LIVIN et XIAP (Nachmias, 2004). La famille des IAPs se distingue par un domaine hautement conservé d'environ 70 acides aminés baptisé le «baculoviral IAP repeat» (BIR) suite à sa découverte dans les baculovirus (Herrera, 2002). On peut en retrouver jusqu'à trois dans la même IAP. À l'exception de NAIP et Survivin, les IAPs disposent de domaines BIRs dans leur partie N-terminale et un domaine contenant un atome de zinc (RING finger) dans leur partie C-terminale. Le domaine RING confère une activité E3-ligase à la protéine lui permettant entre autre de réguler sa propre activité. L'activité E3-ligase est responsable de l'ubiquitination et de la dégradation de XIAP, mais aussi de Smac/DIABLO (un inhibiteur d'IAP) et probablement des caspases auxquelles elle s'associe (Nachmias, 2004 ; Deveraux et Reed, 1999). Cela pourrait être un autre mécanisme responsable de la diminution de l'activité des caspases.

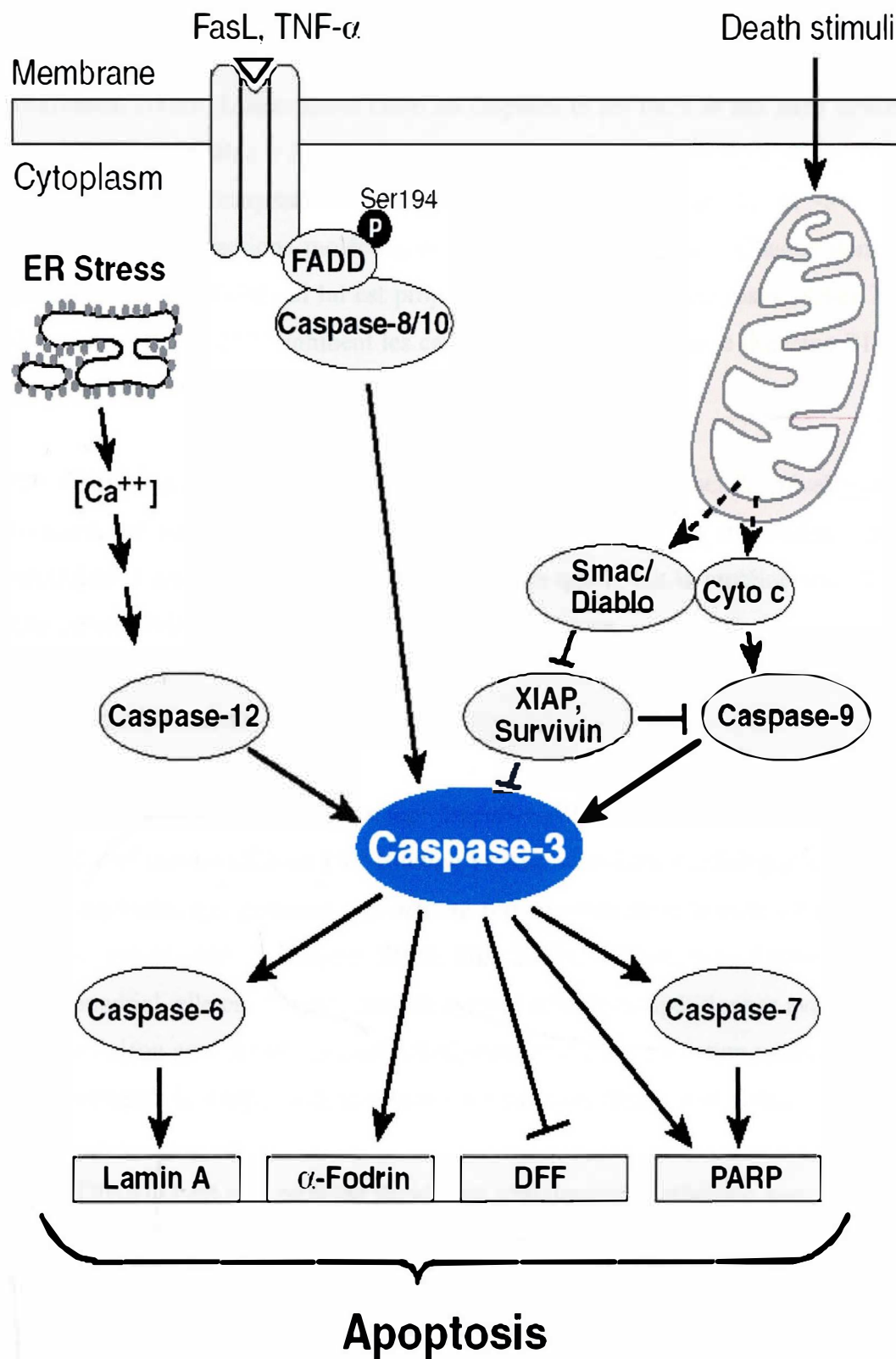


FIGURE 1.10 : Représentation schématique de la voie de signalisation des caspases.
(Tirée du site www.cellsignal.com)

Le membre le mieux caractérisé de cette famille est la IAP liée au chromosome X humain (XIAP). Celui-ci est reconnu pour être un puissant inhibiteur de l'apoptose. En effet, son activité anti-apoptotique est imputable à son habileté à inhiber les caspases (Salvesen, 2002). L'interaction entre les caspases et les IAPs se fait par l'intermédiaire des domaines BIRs. XIAP possède trois domaines BIRs qui lient et inhibent sélectivement les caspases-3, -7 et -9 (mais pas les caspases-1, -6, -8 et -10) par l'entremise d'interactions moléculaires directes (Holcik, 2001). Chaque domaine BIR possède une spécificité qui lui est propre pour la liaison aux caspases. Chez XIAP, les domaines BIR1 et BIR2 inhibent les caspases-3 et -7, alors que le domaine BIR3 inhibe l'activité de la caspase-9 (Deveraux, 1999 ; Nachmias, 2004).

Par ailleurs, puisque la surexpression de XIAP peut favoriser le développement de tumeurs, de nombreuses recherches visent à développer des molécules capables de neutraliser l'action des IAPs de la même manière que le fait la protéine Smac/DIABLO, afin de sensibiliser les cellules cancéreuses à l'apoptose.

1.7.3 SMAC/DIABLO

Chez les mammifères, la protéine Smac/DIABLO (Second mitochondrial-derived activator of caspases/Direct IAP-Binding protein with Low pI) fait partie des protéines mitochondriales qui exercent une activité pro-apoptotique à la suite de leur migration dans le cytoplasme (Verhagen, 2000; Du, 2000). Ainsi, sous l'action d'un stress mitochondrial, elle est relâchée dans le cytosol afin de compétitionner avec les caspases pour la liaison avec XIAP. Smac/DIABLO neutralise donc l'action protectrice de XIAP pour permettre la poursuite de la cascade des caspases (Fig. 1.8 et 1.10).

Smac/DIABLO est une protéine dimérique initialement synthétisée avec une séquence mitochondriale cible en N-terminal qui est clivée lors de la maturation du polypeptide. De plus, la cristallographie au rayon-X a révélé que les quatre premiers acides aminés (AVPI) de la protéine mature se lient préférentiellement au domaine BIR3 de XIAP, cependant la protéine peut tout aussi bien interagir avec le domaine BIR2 (Arnt, 2002 ;

Verhagen, 2002). De cette façon, elle empêche la liaison de XIAP aux caspases-3, -7 et -9 (Srinivasula, 2000).

«XIAP associated factor-1» (XAF-1) est une autre protéine antagoniste de XIAP. Contrairement à Smac/DIABLO, c'est une protéine nucléaire qui possède un domaine en doigts de zinc lui permettant d'interagir directement avec XIAP. XAF-1 séquestre XIAP dans le noyau ce qui a pour conséquence de rendre la cellule plus vulnérable aux processus apoptotiques (Liston, 2001; Leaman, 2002).

1.7.4 LA VOIE DE SIGNALISATION PI 3-K/AKT

Le phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-K) est un hétérodimère qui comprend une sous-unité régulatrice de 85 KDa (p85) et une sous-unité catalytique de 110 KDa (p110). Son substrat privilégié est le phosphatidylinositol 4,5 diphosphates (PIP₂) des lipides membranaires. La PI 3-K est un intermédiaire important de la signalisation via les récepteurs à tyrosine kinase, dont l'action aboutit à l'activation d'Akt («Activated by kinase tyrosine»). Lorsqu'un récepteur capte un signal de survie cellulaire il induit le recrutement de PI 3-K qui opère en tant que précurseur du second messager. De là, la PI 3-K phosphoryle le PIP₂ en position 3'-OH générant le second messager, un phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphates (PIP₃) dans la couche lipidique tout près du récepteur. PIP₃ agit ensuite comme un site de recrutement pour activer d'autres protéines vers la membrane cellulaire incluant les phosphoinositides-kinases dépendantes (PDK) et Akt (Fresno Vara, 2004).

Akt est une protéine sérine/thréonine kinase aussi connue sous le nom de protéine kinase B (PKB) qui stimule la prolifération et la survie cellulaire. Jusqu'à maintenant trois isoformes d'Akt s'exprimant différemment ont été identifiées soit : Akt1, Akt2 et Akt3 (Fresno Vara, 2004). Structuralement parlant, Akt est composée d'un domaine PH, pour «pleckstrin homology», à l'extrémité N-terminale, d'un domaine kinase central et d'un domaine régulateur permettant l'interaction entre les molécules (PDK-2) au moyen de son motif hydrophobe en C-terminal (Song, 2005). La forme inactive de la protéine se

retrouve dans le cytosol, mais elle est mobilisée vers la membrane plasmique, suite à la réception d'un signal (facteurs de croissance ou cytokines) au niveau d'un récepteur, afin de contribuer à la régulation de plusieurs fonctions cellulaires incluant le métabolisme des nutriments, la croissance cellulaire, la régulation transcriptionnelle et évidemment la survie de la cellule (Asselin, 2001 ; Song, 2005). Ce processus requiert l'activation de la PI 3-kinase pour la production de PIP_2 et de PIP_3 nécessaire à l'attachement d'Akt à la membrane plasmique via son domaine PH en N-terminal. Cette interaction entre le domaine PH et les lipides membranaires permet un changement conformationnel d'Akt, dévoilant le site thréonine³⁰⁸, contenu dans la boucle d'activation du domaine kinase, la rendant apte à être phosphorylée par PDK-1. Afin de compléter son activation, Akt nécessite également la phosphorylation du résidu sérine⁴⁷³, situé dans l'extrémité régulatrice C-terminale. Cependant, l'identité de la kinase, appelée temporairement la PDK-2, responsable de cette dernière phosphorylation demeure toujours controversée (Datta, 1999 ; Testa, 2001; Toker, 2000).

Une fois activée Akt peut phosphoryler et induire l'inactivation de la protéine pro-apoptotique BAD («Bcl-2-antagonist of cell death») via la protéine 14-3-3 (Fig. 1.8). Il lui est aussi possible d'inactiver directement la pro-caspase-9 par phosphorylation (Cardone, 1998), ou encore, d'activer certaines protéines telles que IκB, une kinase régulant NF-κB le facteur de transcription des IAPs (Testa, 2001). Toutefois, l'induction de l'apoptose peut être effectuée à l'aide d'inhibiteurs de la PI 3-K tels que le composé LY294002 et la Wortmannin (St-Germain, 2004).

1.7.5 NF-κB

La famille des facteurs de transcription nucléaire Kappa B (NF-κB) régit l'expression de plus de 150 gènes impliqués au sein de divers processus cellulaires (Kumar, 2004). En effet, NF-κB est un régulateur de la réponse immunitaire et inflammatoire, de l'adhésion cellulaire, de la prolifération, mais aussi de la survie cellulaire. Son expression est induite par une multitude de stimuli tels que les cytokines (TNFα et IL-1) et le produit des gènes anti-apoptotiques (Akt) (Hofer-Warbinek, 2000 ; Kane, 1999).

NF- κ B est formé de dimères qui sont constitués de différentes sous-unités : p50, p52, p65 (RelA), c-Rel et RelB, mais le plus commun est l'hétérodimère p50/p65 (RelA). Chaque membre de la famille des NF- κ B possède une région conservée en N-terminal baptisée le domaine «Rel-homology» (RHD) qui participe à la dimérisation, à la localisation dans le noyau et à la liaison à l'ADN (Kumar, 2004). De ce fait, la sous-unité p50 permet la liaison à l'ADN, alors que la sous-unité p65 est plutôt responsable de la régulation de la transcription (Hou, 2003).

En l'absence de stimuli, NF- κ B est séquestré dans le cytoplasme par des inhibiteurs protéiques des protéines κ B (I κ B). La famille des protéines inhibitrices I κ Bs est entre autre constituée des sous-unités I κ B α (la mieux connue), I κ B β et I κ B ϵ qui s'homo- ou s'hétérodimérisent à l'instar de NF- κ B. NF- κ B est activé lorsqu'un signal est capté par les récepteurs cellulaires de là, une série de réactions en chaîne est enclenchée via la voie de signalisation d'Akt (Fig. 1.8). Au terme de quoi il y a phosphorylation d'I κ B α au niveau des résidus sérines 32 et 36 ce qui conduit à l'ubiquitination et irrémédiablement à la dégradation par protéolyse d'I κ B α à l'aide du protéasome 26S.

La phosphorylation d'I κ B α est accomplie par une I κ B kinase (IKK), un complexe protéique divisé en deux sous-unités catalytiques (IKK1 et IKK2) et en une sous-unité régulatrice (NEMO/IKK γ pour «NF- κ B essential modulator»). NF- κ B est donc libéré de l'emprise des I κ Bs et peut finalement se transloquer dans le noyau afin d'y amorcer la transcription des gènes cibles. NF- κ B intercede le plus souvent en tant que répresseur de l'apoptose en activant l'expression des inhibiteurs de caspases comme les IAPs ou les homologues de Bcl-2. Indirectement, il inhibe l'activité des caspases-3, -7 et -9 (Hofer-Warbinek, 2000 ; Kumar, 2004).

1.7.6 PTEN

Le gène suppresseur de tumeur PTEN/MMAC (Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten/mutated in multiple advanced cancers) joue un rôle essentiel, à l'aide de son activité lipide ou protéine phosphatase, dans la régulation des voies de

signalisation cellulaire impliquées lors de la croissance, de l'adhésion, de la migration, de l'invasion et de l'apoptose des cellules (Sugatani, 2003 ; Dahia, 2000) (Fig. 1.8). Tout cela fait de lui une des cibles les plus communes pour les mutations menant au cancer chez l'humain (Hlobilkova, 2003).

La structure de PTEN est constituée de deux principaux domaines : un domaine phosphatase en N-terminal qui possède un très large site actif conçu pour s'encrer à PIP₃ et un domaine C2 en C-terminal qui permet l'association à la membrane lipidique en plus d'un domaine de liaison PDZ (PSD95 DiscsLarge Z01) (Ali, 2000).

Le niveau intracellulaire de phosphorylation est régulé par l'action coordonnée des protéines kinases (Akt) et des phosphatases (PTEN). PTEN limite la prolifération cellulaire en induisant l'apoptose, et est probablement un régulateur de la population des cellules souches neuronales (Li, 2002). En tant que lipide phosphatase, PTEN inverse l'effet de la PI 3-K en déphosphorylant PIP₃, son second messenger, qui est converti en PIP₂ (Petrocelli, 2001). La poursuite de la voie de survie cellulaire requière l'intervention de PIP₃ qui recrute et active PDK-1. Sans PDK-1, Akt n'est pas phosphorylée et NF-κB demeure séquestré dans le cytoplasme (Dahia, 2000 ; Gustin, 2001). En de telles circonstances, la voie des récepteurs de mort prédomine. Une mutation de PTEN ou un dérèglement de cette balance peut conduire à la formation de tumeurs au niveau de l'endomètre utérin, PTEN muté ayant une prévalence pour les cancers endométriaux (Hlobilkova, 2003 ; Mutter, 2000). Lorsque PTEN est muté la voie de survie cellulaire PI 3-K/Akt est activée de façon constitutive, les cellules ne cessent alors de proliférer et des tumeurs se développent (Gagnon, 2003).

1.8 OBJECTIF

Sur le plan physiologique, l'avènement de la reproduction chez les mammifères est un exploit en soi. La réceptivité utérine détermine le sort ultime réservé à l'embryon qui se doit d'être compétent pour l'implantation. Si l'implantation n'a pas lieu, le tractus reproducteur se charge d'initier rapidement un nouveau cycle.

La première étude suggère que l'intensification de l'expression d'Akt et de son activité en réponse à l'oestradiol pourrait être un important mécanisme de protection des cellules endométriales face au déclenchement de l'apoptose et pourrait induire la prolifération cellulaire, tandis que l'inhibition de l'activité d'Akt conduirait à l'activation de la caspase-3 et à l'apoptose dans les cellules endométriales. La seconde étude insinue quant à elle que Smac/DIABLO et XIAP sont régulées différemment et qu'il est possible qu'elles jouent un rôle important dans la régulation de la destinée des cellules endométriales via l'activation ou non des caspases effectrices dans l'utérus de la rate.

L'objectif de cette étude est donc d'investiguer l'implication de la voie de signalisation de PI 3-K/Akt et la régulation de Smac/DIABLO et de XIAP dans le contrôle de l'activation des caspases au cours du cycle oestral de la rate ou sous traitement à l'oestradiol-17 β .

CHAPITRE II

REGULATION OF AKT EXPRESSION AND PHOSPHORYLATION BY 17 β -ESTRADIOL IN THE RAT UTERUS DURING ESTROUS CYCLE

PRÉFACE

Les auteurs du chapitre II (publié en 2003 dans la revue *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1(1):47, 13p.) sont : Marie-Claude Déry (expériences relatives aux jours du cycle, écriture de l'abstract, matériel et méthodes et figures), Valérie Leblanc (expériences à propos de l'oestradiol-17 β et les figures s'y rattachant), Carl Shooner (ovariectomies) et le directeur de recherche, le Dr Éric Asselin, (écriture et correction de l'article).

RÉSUMÉ

Les mécanismes moléculaires et intracellulaires impliqués dans la régulation des processus apoptotiques à l'intérieur des cellules endométriales demeurent toujours incompris et sont peu documentés. Nous avons investigué la possibilité que la voie de survie cellulaire d'Akt pourrait être impliquée dans la régulation de l'apoptose dans l'utérus au cours du cycle oestral. Les rates ayant un cycle oestral régulier (4 jours) sont euthanasiées à chaque jour du cycle (diestrus, proestrus, oestrus et métestrus). Les utérus sont recueillis, puis fixés pour le marquage immunohistochimique (IHC) et pour la détection des cellules apoptotiques via la méthode du [TdT]-mediated deoxyuridinetriphosphate nick end-labelling (TUNEL) ou les protéines endométriales sont amassées pour des analyses de type Western. En comparant les jours du cycle oestral, les analyses TUNEL révèlent que l'apoptose est principalement retrouvée à l'oestrus. Les cellules positives au TUNEL sont uniquement apparentes dans les cellules épithéliales de la lumière. Aucune cellule en apoptose n'est observée au proestrus. Au contraire, la prolifération est maximale au proestrus comme le confirme l'expression de CDC-47/MCM7 (un marqueur de prolifération cellulaire). La forme intacte de caspase-3 est maximale au proestrus et diminue seulement à l'oestrus. En outre, la présence d'un fragment spécifique de caspase-3 clivée est observée exclusivement à l'oestrus et l'IHC dévoile que le signal de la caspase-3 clivée est présent au niveau des cellules épithéliales de la lumière. La protéine PTEN, une phosphatase impliquée dans la régulation de la phosphorylation d'Akt, est présente à tous les jours du cycle oestral et ne démontre aucune régulation significative relativement au cycle. L'expression de phospho-Akt (la forme active d'Akt) est présente au métestrus, au diestrus et au proestrus mais diminue significativement à l'oestrus. L'expression de la protéine Akt est maximale à l'oestrus. L'IHC indique que l'expression d'Akt est élevée à l'oestrus dans les cellules stromales et épithéliales. De plus, des études effectuées sur les rates ovariectomisées ont prouvé que l'oestradiol-17 β augmente la prolifération des cellules endométriales tout en étant accompagnée par une hausse de l'expression d'Akt et de sa phosphorylation. Ces résultats suggèrent que l'intensification de l'expression d'Akt et de son activité en réponse à l'oestradiol pourrait être un important mécanisme de protection des cellules

endométrieales face au déclenchement de l'apoptose et pourrait induire la prolifération cellulaire, tandis que l'inhibition de l'activité d'Akt conduirait à l'activation de la caspase-3 et à l'apoptose dans les cellules endométrieales.

**REGULATION OF AKT EXPRESSION AND PHOSPHORYLATION BY 17 β -
ESTRADIOL IN THE RAT UTERUS DURING ESTROUS CYCLE[†]**

Marie-Claude Dery, Valerie Leblanc, Carl Shooner and Eric Asselin*

Département de Chimie-Biologie, Section Biologie Médicale, Université du Québec à
Trois-Rivières, C.P. 500, Trois-Rivières, Québec, Canada G9A 5H7

Short title: Apoptosis in the rat uterus during estrous cycle.

Key words: Akt, PTEN, Caspases, apoptosis, rat, estrus, uterus.

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

[†]This work has been supported by a grant from NSERC (238501-01). Eric Asselin is a chercheur-boursier from the Fond de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ).

ABSTRACT

Molecular and intra-cellular mechanisms involved in the regulation of apoptosis processes in endometrial cells are poorly understood and documented. We have investigated the possibility that Akt survival pathway might be involved in the regulation of apoptosis in the uterus during the estrous cycle. Rats with regular estrous cycle (4 days) were killed at different days of estrous cycle (diestrus, proestrus, estrus and metestrus). Uteri were collected and fixed for immunohistochemical staining (IHC) and apoptotic cell death detection by [TdT]-mediated deoxyuridinetriphosphate nick end-labelling (TUNEL) or endometrial protein extracts collected for Western analysis. TUNEL analysis revealed that apoptosis was mainly found at estrus compared to other day of estrous cycle. TUNEL positive cells were apparent in luminal epithelial cells only. No apoptotic cells were observed at proestrus. In contrast, proliferation was maximal at proestrus as confirmed with the expression of CDC47/MCM7 (a cell proliferation marker). Intact form of caspase-3 was maximal at proestrus and was reduced only at estrus. Likewise, presence of a specific cleaved caspase-3 fragment was observed only at estrus and IHC revealed that cleaved caspase-3 signal was found in luminal epithelial cells. PTEN protein, a phosphatase involved in the regulation of Akt phosphorylation, was present at all days of estrous cycle and showed no significant regulation in relation to cycle. Expression of phospho-Akt (the activated form of Akt) was present at metestrus, diestrus, and proestrus but decreased significantly at estrus. Akt protein expression was maximal at estrus. IHC revealed that Akt expression was high in both stromal and epithelial cells at estrus. Further studies using ovariectomized rats demonstrated that 17 β -estradiol increased endometrial cell proliferation which was accompanied by an increase of both Akt expression and phosphorylation. These results suggest that increased Akt expression and activity in response to estradiol may be an important mechanism to protect endometrial cells from apoptotic triggering and to induce endometrial cell proliferation, whereas inhibition of Akt activity leads to caspase-3 activation and apoptosis in endometrial cells.

INTRODUCTION

Apoptosis is a mechanism by which uterine luminal epithelium and glands degenerate in the absence of embryonic factors and regenerate in a cycling fashion through the estrous cycle. Sex steroids (estrogen and progesterone) are directly responsible for the histological and morphological changes in the uterus during estrous cycle. Studies have shown highest apoptosis expression in lining epithelium at estrus in mouse [1] and rat [2,3]. Other studies have shown that estrogen induces uterine epithelial cell proliferation and estrogen withdrawal results in cell death [4-6]. However, little is known about the cellular and molecular mechanisms involved in the regulation of apoptosis in the uterus. Since menses are absent in rodents as compared to humans and primates, there must be important mechanisms controlling the balance between survival and death factors in order to maintain integrity of endometrium throughout the estrous cycle, particularly following estrogen-induced proliferation and absence of embryonic signal.

Akt, a serine/threonine protein kinase also known as PKB, is activated by phosphorylation at threonine 308 and serine 473 in response to growth factors or cytokines [7-9] through phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-K). Once phosphorylated Akt has been shown to 1) phosphorylate and block the action of several pro-apoptotic proteins such as Bad [8], and 2) block cytochrome C release from the mitochondria through the regulation of Bcl-2 [10]. This is supported by the observation that an activated form of Akt is able to block apoptosis [11]. PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted in chromosome 10) gene encodes a 403-amino acid polypeptide with lipid phosphatase activity. The PTEN protein dephosphorylates position D3 of phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP₃) and generates inactive PIP₂ [12]. PIP₃ is a direct product of PI 3-K and regulates PDK1, a kinase that phosphorylates and activates Akt. Thus, PTEN is a key negative regulator of Akt activity [13]. Studies using MCF-7 cells showed that 17 β -estradiol effects are mediated through PI 3-K pathway and induced Akt phosphorylation [14,15] indicating that this survival pathway is important for estrogen signaling.

Caspases are well known and documented proteases involved in the activation of apoptosis. Once activated from their proactive forms, caspases target important proteins involved in cell proliferation and survival (for a review see [16]). Caspase-3 is one of the key executioner of apoptosis. During the execution phase of apoptosis, caspase-3 is responsible or in part for the proteolysis of a large number of substrates, each of which contains a common Asp-Xaa-Xaa-Asp (DXXD) motif originally described by Lazebnik *et al.* [17]. We have recently shown that Akt is also a new target for caspase-3 cleavage, indicating that Akt survival pathway inhibition is an important mechanism for apoptosis activation [18].

Although the regulation and importance of Akt has been described in other systems, the presence and role of Akt has not been documented in the cycling uterus. Recent studies revealed that Akt phosphorylation on serine 473 as well as its nuclear translocation are stimulated by prolactin in decidual cells and act through PI-3K pathway to exert antiapoptotic effect in rat deciduas [19]. It is suggested that Akt may also be an important and regulated survival factor in endometrium during the rat estrous cycle. In the present study, regulation of apoptosis was measured in rat uterus during the four stages of estrous cycle (proestrus, estrus, metestrus and diestrus). Regulation of Akt survival pathway and caspase-3 activation were investigated using immunohistochemistry (IHC) and Western analysis using phospho-specific and specific-cleaved-caspase-3 antibodies to determine their involvement in the regulation of apoptotic processes.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

PhosphoPlus Akt (Ser473), PhosphoPlus Akt (Ser473) IHC specific, Akt, PTEN, procaspase-3 and cleaved specific caspase-3 antibodies were obtained from New England Biolabs (Mississauga, ON). CDC47/MCM7 antibody was obtained from Mediacorp (Montréal, QC). β -actin antibody was purchased through Cedarlane (Milton, ON). Vectastain ABC Kit for rabbit IgG was purchased from Vector Laboratories Inc. (Burlington, CA). *In Situ* Cell Death detection, Protease Inhibitor Cocktail Tablets,

POD and DAB substrate were purchases from Roche (Laval, QC). 17 β -Estradiol (E₂) was purchased from Laboratoire Mat (Québec, QC).

Animals

Mature Sprague-Dawley female rats (200-225g) were obtained from Charles River Laboratories Canada. Animals were maintained on standard chow and water, which were available *ad libitum*, in animal facilities illuminated on a normal 12 hour cycle. All procedures were performed in accordance with guidelines of the Canadian Council on Animal Care for the handling and training of laboratory animals and the Good Health and Animal Care Committee of the Université du Québec à Trois-Rivières. Stages of the estrous cycle were confirmed by vaginal smears. Rats with three regular cycles of 4 days were used in these experiments and killed at various stages of the estrous cycle (diestrus, proestrus, estrus and metestrus). Uteri were collected and fixed for immunohistochemical staining (IHC) and apoptotic cell death detection by [TdT]-mediated deoxyuridinetriphosphate nick end-labelling (TUNEL) or endometrial protein extracts collected by scraping the endometrium for Western analysis. To determine the effect of estrogen, rats were ovariectomized for at least 10 days and then injected with E₂. Animals were treated for a total of 3 days and killed after hormone treatment according to previous preliminary time-course studies done in our laboratory (unpublished information). E₂ was dissolved with sesame oil, and administered by subcutaneous injection. Sesame oil was injected into control animals. The dose administered was 40 μ g/kg/day (E₂).

Immunohistochemistry

The uterus was fixed in 4% paraformaldehyde solution and embedded in paraffin. Tissue sections 7 μ m thick were mounted on polylysine-coated slides, deparaffinized, rehydrated, and then heated with 10 mM citrate buffer (pH 6). After two wash with PBS, slides were then incubated with 0.3 % hydrogen peroxide in methanol for 30 min to quench endogenous peroxidase activity. After washing with PBS, tissues were incubated with blocking serum (Vectastain ABC Kit) at room temperature for 1 h. Then, a primary antibody (Akt 1:100; CDC47/MCM7 1:200; Phospho-Akt IHC 1:50; PTEN 1:100 and

cleaved caspase-3 1:50) was added to the slides and incubated at 4°C overnight. After washing 5 min in PBS, tissue sections were incubated for 30 min with 3µg/ml biotinylated antibody (anti-rabbit or anti-mouse). Subsequently, slides were washed with PBS and incubated with avidin-biotin complex reagent containing horseradish peroxidase for 30 min. Again washed with PBS for 5 min and color development was achieved using DAB substrate. The tissue sections were counterstained with haematoxylin. Negative controls were performed using the same protocol without primary antibody.

Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick end-labeling (TUNEL)

Tissue sections were deparaffinized, rehydrated and rinsed with PBS. They were incubated with proteinase K (20 µg/ml) for 30 min at room temperature. Slides were washed two times with PBS, the endogenous peroxidase was inactivated with 0.3 % hydrogen peroxide in methanol for 30 min. Slides were rinsed and incubated with 10 mM citrate solution, two min on ice. Then, tissue sections were rinsed with PBS and incubated with TdT labelling reaction (In Situ Cell Death Detection, POD) for 30 min at 37 °C in humidified environment. Slides were washed three times in PBS and tissue sections were blocked with 3% BSA for 20 min at room temperature. Converter-POD solution was added to the slides and incubated 30 min at 37 °C in humidified environment. Slides were washed 5 min in PBS, colour development was achieved using DAB substrate and counterstained with haematoxylin. Negative control was performed using the same protocol without TdT enzyme.

Protein extraction and Western analysis

Endometrium from each uterus was scraped using a glass microscope slide and homogenized using a pipette in the lysis buffer (PBS 1X pH 7.4; 1% Nonidet P-40; 0.5% Sodium deoxycholate; 0.1% SDS; Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche)). Homogenates were centrifuged (12,000 X g for 20 min at 4°C) to remove insoluble material. The supernatant was recovered and stored at -20 °C pending analysis. Protein content was determined with the Bio-Rad DC Protein Assay. Concentrations of reagents

found in the lysis buffer were chosen to avoid any interference with the protein assay. Protein extracts (50µg) were heated at 94°C for 3 min, resolved by 10% SDS-PAGE and electrotransferred to nitrocellulose membranes using a semidry transfer (Bio-Rad, Mississauga, ON). The membranes were then blocked 2 h at room temperature with PBS containing 5 % milk powder, then incubated with Akt 1:1000 ; Procaspase-3 1:1000; CDC47/MCM7 1:1000; Phospho-Akt 1:250; PTEN 1:500 and cleaved caspases 1:1000 and subsequently with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse secondary antibody (1:3000; room temperature for 45 min). All membranes were reprobbed with a antibody specific to β -actin which was used as an internal standard. Densitometrical analyses were performed on both films (protein of interest and β -actin) using the GelDoc 2000 and the Quantity One software (Bio-Rad, Mississauga, ON). Results are expressed as a ratio protein of interest/ β -actin to correct for loading for each endometrial sample.

Statistical analysis

Western analyses of cycling animals were repeated six to eight times (6 to 8 different rats/endometrial extract per day of estrous cycle). Endometrial extracts from each rats was assessed individually. Western analyses of ovariectomized rats treated with E₂ were repeated 5 times (5 different rats/ endometrial extracts per group including control). Endometrial extracts from each rats was assessed individually for both studies. Results subjected to statistical analyses were expressed as means $\pm$ SEM. Data were subjected to one-way ANOVA (PRISM software version 4.0; GraphPad, San Diego, CA). Differences between experimental groups were determined by the Tukey's test.

RESULTS

Apoptosis and proliferation analyses through the estrous cycle

To confirm proliferation and cell death status of endometrial cells in our current model, uteri of cycling rats were recovered to perform TUNEL, IHC and Western analyses. Estrous cycle determination was carried out using vaginal smear and animals were classified according to the type of cell present in the smear. TUNEL analysis showed

that apoptosis was maximal at estrus, present at metestrus and weakly detectable at diestrus and proestrus (Fig. 1, 2 and 3). Apoptosis was mainly located in the luminal epithelial cells at estrus. These results were in accordance with results obtained previously [3]. On the other hand, cell proliferation was maximal at proestrus as determined by the expression of CDC47/MCM7 (cell proliferation marker) and was significantly reduced at estrus. Intact form of caspase-3 (Procaspase-3) was maximal at proestrus, metestrus and diestrus but was reduced only at estrus (Fig. 1 and 3). Caspase-3 was active mainly at estrus, as demonstrated by the presence of a specific cleaved fragment using Western and IHC analyses. As shown by IHC, Western analysis revealed that CDC47/MCM7 was reduced at estrus compared to other days of the estrous cycle.

Regulation of Akt and PTEN expression and activity during the estrous cycle

In order to determine the possibility that Akt and PTEN might be regulated by sex steroids during estrous cycle, Akt and PTEN protein abundance were measured by Western analyses and localized by IHC. PTEN protein was present at all days of estrous cycle and the estrous cycle did not influence expression of this protein significantly (Fig. 4 and 5). However, expression of total Akt protein was increased from proestrus to estrus. Akt and PTEN proteins were mainly localized in the luminal and glandular epithelium as demonstrated by IHC (Fig. 5). Phospho-Akt (the activated form of Akt) was present at metestrus, diestrus and proestrus but was significantly reduced 3.1 fold at estrus (Fig. 4). IHC revealed that phospho-Akt was primarily located in the luminal and glandular epithelial cells (Fig. 5). Interestingly, as shown by Western analysis, IHC confirmed that phospho-Akt expression was lower at estrus and that phospho-Akt was predominantly localized at the membrane level facing the uterine lumen. In other days of estrous cycle (metestrus, diestrus and proestrus), phospho-Akt signal was found mainly in the cytoplasm and nucleus. These results clearly demonstrate a redistribution of Akt protein from the cytoplasm to cell membrane only at estrus.

Influence of 17 β -estradiol in the regulation of Akt expression and phosphorylation

To further determine if 17 β -estradiol might be involved in the regulation Akt phosphorylation/activity and expression, ovariectomized rats were treated with 17 β -

estradiol for 3 days. The results indicated that 17β -estradiol increased endometrial cell proliferation significantly (as determined by the expression of CDC47/MCM7) (Fig. 6). Furthermore, 17β -estradiol significantly induced both total Akt protein expression and phosphorylation. IHC revealed that 17β -estradiol induced both Akt expression and phosphorylation and was found at the cellular membrane as observed at estrus. IHC studies confirmed in ovariectomized rats treated by 17β -estradiol that both Akt expression and phosphorylation was increased in endometrial cells (Fig. 7). Increased endometrial cell proliferation (epithelial and stromal) in response to 17β -estradiol was confirmed using CDC47/ MCM7 proliferation marker (Fig. 7).

DISCUSSION

This study is the first to show the presence, activity and regulation of Akt in the non-pregnant rat uterus. This survival factor is well known in other systems for its inhibitory effect on apoptosis triggering. Apoptosis has been shown to be present in the rat [2,3] and mouse [1] endometrium during the estrous cycle. Apoptotic index was found to be high at estrus which was accompanied with a low level of estrogen receptor- α and high level of progesterone receptor. Since in the endometrium, growth of epithelial cells is dependent on estrogens and progesterone, and removal of ovarian hormones has been reported to cause cell death in rabbit and hamster [20,21], sex steroids take part actively in the balance of proliferation versus cell death in this tissue. Indeed, the appearance of apoptosis in epithelial cells of the endometrium following ovariectomy or treatment with the antiprogestin RU486 has been described in pseudopregnant rabbits [22] and in primary cell culture [23,24]. However, molecular and cellular mechanisms involved in the regulation of apoptosis in the uterus are poorly documented in the literature. We have recently demonstrated in human ovarian cancer cells [18] and rat granulosa cells [25] the importance of Akt phosphorylation status in relation to cell survival and chemoresistance. Many other studies have demonstrated the involvement of Akt on apoptosis inhibition through the activation of several survival factors [26]. Since apoptosis has been found in the endometrium and that a recent study showed activation of Akt in response to estradiol [27], we hypothesized that Akt might be an important

regulator of uterine function throughout the rat estrous cycle. Given that menses are absent in the rodents uterus, there must be precise intra-cellular systems involved in the regulation of cell death and cellular cleaning (proliferation versus apoptosis) in the endometrium after estrogen withdrawal in the absence of embryonic factors.

As demonstrated previously by others [3], apoptosis was evident in luminal epithelial cells at estrus and proliferation was maximal at proestrus. As hypothesized, Akt activity/phosphorylation was high at proestrus and Akt was strongly expressed and localized in the lining epithelium and glands. Indeed, Akt activity/phosphorylation decreased at estrus whereas cell proliferation was low as demonstrated by the decrease of CDC47/MCM7 proliferation marker. Although, Akt phosphorylation was reduced at estrus, IHC revealed a specific pattern of phospho-Akt expression in luminal epithelial cells and was distributed mainly at the membrane level facing the uterine lumen. Translocation at the plasma membrane of phospho-Akt from the nucleus and/or cytoplasm suggests that its presence at the membrane level may not allow phospho-Akt to be active in term of survival signaling. A recent study demonstrated that transient membrane association is required for the physiological activation of Akt indicating that correct subcellular localization is crucial for the activation of the kinase, and it may also allow its appropriate inactivation by phosphatases [28]. One example of such phosphatase is phosphatase and tensin homologue tumor suppressor PTEN [13], a phosphatase found and active at the plasma membrane [29]. PTEN directly dephosphorylates the phospholipid PIP₃ which is essential for Akt phosphorylation [12]. The present results clearly show that PTEN protein was present in the endometrium and was not influenced by hormonal changes observed during the estrous cycle. Indeed, recruitment of Akt at the membrane level may be a mechanism by which PTEN or unknown phosphatases act on Akt to inactivate its function.

Since the levels of estrogen are maximal at proestrus and further decrease at estrus, we have used ovariectomized rats to determine the possible involvement of 17 β -estradiol in the regulation of Akt phosphorylation. Akt and estrogen have been shown to be involved in the regulation and downstream signaling in different systems such as EGF, IGF-1 and GH

[30,31], endothelial nitric oxide synthase (eNOS) [32], and FSH [33] regulation pathways. Recently, using both wild-type (WT) and ER alpha knockout (alpha ERKO) mice, it has been shown that ER α is necessary for IGF-1 induction of uterine nuclear proliferative responses and that IGF-1 signaling is dependent of Akt [34]. Moreover in ERKO mice, lower levels of vascular nitric oxide has been found suggesting a crucial role of ER α in the regulation of these processes [35]. A recent study showed that there was an apparent increase in Akt activity upon brief stimulation with 17 β -E2 in CHO cells transfected with ER α whereas 17 β -E2 had no effect on Akt activity in cells transfected with control vector or ER β [36]. The present results clearly showed an increase of Akt phosphorylation in response to 17 β -estradiol. As shown in another system [36], it is possible that the activation of estrogen receptor may activate Akt phosphorylation through a signaling mechanism not yet identified in the endometrium. PTEN protein expression was constant through the stages of estrous cycle studied indicating that PTEN is a constitutively expressed protein. In the human endometrium, PTEN has been shown to be regulated by progesterone [37]. However, the rat uterus does not undergo decidualization during the estrous cycle as compared to the menstrual cycle in women. Thus, PTEN might be an important protein involved in embryo implantation processes when decidualization initiate rather than a role during the regulation of estrous cycle in the rat endometrium..

Recent studies demonstrated that the transcriptional nuclear factor kappa-B (NF- κ B) is a direct downstream target of phosphorylated Akt [38]. NF- κ B is sequestered (p65 and p50 subunits) in the cytoplasm by the I κ Bs inhibitors which are phosphorylation targets of Akt. Upon phosphorylation I κ Bs are released and degraded through ubiquitination and NF- κ B enter nucleus for gene expression [39]. In the literature, we found that X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) promoter is a target for NF- κ B [40,41]. Since we have shown previously in rat granulosa cells and human ovarian surface epithelial cancer cells that XIAP might be involved in the regulation of Akt activity [18,25], it is possible that Akt may act on this family of inhibitor of apoptosis protein in order to block apoptosis processes. Whether XIAP or other inhibitor of apoptosis proteins are involved in this process remains to be investigated.

In conclusion, these results document for the first time the presence and regulation of Akt in the rat endometrium during the estrous cycle and further demonstrate that this survival factor is regulated by 17β -estradiol. Further analysis will be necessary to determine more specifically, the intra-cellular and molecular signal transducers involved in the process of apoptosis in the rat reproductive tract. Whether TNF- α or other cytokines/growth factors such as TGF- β , IGF-1 or EGF may be involved in the regulation of programmed cell death through Akt and inhibitors of apoptosis proteins in the rat uterus remain to be elucidated. Currently, investigations are carried out to further characterize the role and mechanism of Akt on cell survival/apoptosis using endometrial (epithelial and stromal cells) cultured *in vitro*.

ACKNOWLEDGMENTS

This work has been supported by a grant from NSERC (238501-01). Eric Asselin is a chercheur-boursier from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). We are grateful to Mrs. Rollande Caron for her support and her precious advices in regards to animal care and maintenance.

REFERENCES

1. SJ Dharma, SD Kholkute, TD Nandedkar: **Apoptosis in endometrium of mouse during estrous cycle.** *Indian J Exp Biol* 2001, **39**: 218-222.
2. MD Lai, LR Lee, KS Cheng, LY Wing: **Expression of proliferating cell nuclear antigen in luminal epithelium during the growth and regression of rat uterus.** *J Endocrinol* 2000, **166**: 87-93.
3. T Sato, Y Fukazawa, H Kojima, M Enari, T Iguchi, Y Ohta: **Apoptotic cell death during the estrous cycle in the rat uterus and vagina.** *Anat Rec* 1997, **248**: 76-83.
4. VE Quarmby, KS Korach: **The influence of 17 beta-estradiol on patterns of cell division in the uterus.** *Endocrinology* 1984, **114**: 694-702.
5. CA Finn, M Publicover: **Hormonal control of cell death in the luminal epithelium of the mouse uterus.** *J Endocrinol* 1981, **91**: 335-340.
6. L Martin, JW Pollard, B Fagg: **Oestriol, oestradiol-17beta and the proliferation and death of uterine cells.** *J Endocrinol* 1976, **69**: 103-115.
7. L Stephens, K Anderson, D Stokoe, H Erdjument-Bromage, GF Painter, AB Holmes, PR Gaffney, CB Reese, F McCormick, P Tempst et al.: **Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B.** *Science* 1998, **279**: 710-714.
8. J Hayakawa, M Ohmichi, H Kurachi, Y Kanda, K Hisamoto, Y Nishio, K Adachi, K Tasaka, T Kanzaki, Y Murata: **Inhibition of BAD phosphorylation either at serine 112 via extracellular signal-regulated protein kinase cascade or at serine 136 via Akt cascade sensitizes human ovarian cancer cells to cisplatin.** *Cancer Res* 2000, **60**: 5988-5994.
9. Y Suzuki, Y Nakabayashi, R Takahashi: **Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**: 8662-8667.
10. MA Davies, D Koul, H Dhesi, R Berman, TJ McDonnell, D McConkey, WK Yung, PA Steck: **Regulation of Akt/PKB activity, cellular growth, and apoptosis in prostate carcinoma cells by MMAC/PTEN.** *Cancer Res* 1999, **59**: 2551-2556.
11. SG Kennedy, AJ Wagner, SD Conzen, J Jordan, A Bellacosa, PN Tsichlis, N Hay: **The PI 3-kinase/Akt signaling pathway delivers an anti-apoptotic signal.** *Genes Dev* 1997, **11**: 701-713.

12. T Maehama, JE Dixon: **The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate.** *J Biol Chem* 1998, **273**: 13375-13378.
13. V Stambolic, A Suzuki, JL de la Pompa, GM Brothers, C Mirtsos, T Sasaki, J Ruland, JM Penninger, DP Siderovski, TW Mak: **Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN.** *Cell* 1998, **95**: 29-39.
14. R Duan, W Xie, X Li, A McDougal, S Safe: **Estrogen regulation of c-fos gene expression through phosphatidylinositol-3-kinase-dependent activation of serum response factor in MCF-7 breast cancer cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 2002, **294**: 384-394.
15. G Castoria, A Migliaccio, A Bilancio, M Di Domenico, A de Falco, M Lombardi, R Fiorentino, L Varricchio, MV Barone, F Auricchio: **PI3-kinase in concert with Src promotes the S-phase entry of oestradiol-stimulated MCF-7 cells.** *EMBO J* 2001, **20**: 6050-6059.
16. GM Cohen: **Caspases: the executioners of apoptosis.** *Biochem J* 1997, **326**: 1-16.
17. YA Lazebnik, SH Kaufmann, S Desnoyers, GG Poirier, WC Earnshaw: **Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE.** *Nature* 1994, **371**: 346-347.
18. E Asselin, GB Mills, BK Tsang: **XIAP regulates Akt activity and caspase-3-dependent cleavage during cisplatin-induced apoptosis in human ovarian epithelial cancer cells.** *Cancer Res* 2001, **61**: 1862-1868.
19. C Tessier, A Prigent-Tessier, S Ferguson-Gottschall, Y Gu, G Gibori: **PRL antiapoptotic effect in the rat decidua involves the PI3K/protein kinase B-mediated inhibition of caspase-3 activity.** *Endocrinology* 2001, **142**: 4086-4094.
20. S Nawaz, MP Lynch, P Galand, LE Gerschenson: **Hormonal regulation of cell death in rabbit uterine epithelium.** *Am J Pathol* 1987, **127**: 51-59.
21. BA Sandow, NB West, RL Norman, RM Brenner: **Hormonal control of apoptosis in hamster uterine luminal epithelium.** *Am J Anat* 1979, **156**: 15-35.
22. S Nawaz, MP Lynch, P Galand, LE Gerschenson: **Hormonal regulation of cell death in rabbit uterine epithelium.** *Am J Pathol* 1987, **127**: 51-59.
23. LE Gerschenson, JR Depaoli, JT Murai: **Inhibition of estrogen-induced proliferation of cultured rabbit uterine epithelial cells by a cell density-dependent factor produced by the same cells.** *J Steroid Biochem* 1981, **14**: 959-969.

24. MP Lynch, S Nawaz, LE Gerschenson: **Evidence for soluble factors regulating cell death and cell proliferation in primary cultures of rabbit endometrial cells grown on collagen.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986, **83**: 4784-4788.
25. E Asselin, Y Wang, BK Tsang: **X-linked inhibitor of apoptosis protein activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in rat granulosa cells during follicular development.** *Endocrinology* 2001, **142**: 2451-2457.
26. SR Datta, A Brunet, ME Greenberg: **Cellular survival: a play in three Akts.** *Genes Dev* 1999, **13**: 2905-2927.
27. GE Stoica, TF Franke, A Wellstein, F Czubayko, HJ List, R Reiter, E Morgan, MB Martin, A Stoica: **Estradiol Rapidly Activates Akt via the ErbB2 Signaling Pathway.** *Mol Endocrinol* 2003, ..
28. M Andjelkovic, DR Alessi, R Meier, A Fernandez, NJ Lamb, M Frech, P Cron, P Cohen, JM Lucocq, BA Hemmings: **Role of translocation in the activation and function of protein kinase B.** *J Biol Chem* 1997, **272**: 31515-31524.
29. M Iijima, P Devreotes: **Tumor suppressor PTEN mediates sensing of chemoattractant gradients.** *Cell* 2002, **109**: 599-610.
30. MB Martin, TF Franke, GE Stoica, P Chambon, BS Katzenellenbogen, BA Stoica, MS McLemore, SE Olivo, A Stoica: **A role for Akt in mediating the estrogenic functions of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I.** *Endocrinology* 2000, **141**: 4503-4511.
31. LN Shoba, M Newman, W Liu, WL Lowe, Jr.: **LY 294002, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, inhibits GH-mediated expression of the IGF-I gene in rat hepatocytes.** *Endocrinology* 2001, **142**: 3980-3986.
32. T Simoncini, G Varone, L Fornari, P Mannella, M Luisi, F Labrie, AR Genazzani: **Genomic and nongenomic mechanisms of nitric oxide synthesis induction in human endothelial cells by a fourth-generation selective estrogen receptor modulator.** *Endocrinology* 2002, **143**: 2052-2061.
33. IJ Gonzalez-Robayna, AE Falender, S Ochsner, GL Firestone, JS Richards: **Follicle-Stimulating hormone (FSH) stimulates phosphorylation and activation of protein kinase B (PKB/Akt) and serum and glucocorticoid-induced kinase (Sgk): evidence for A kinase-independent signaling by FSH in granulosa cells.** *Mol Endocrinol* 2000, **14**: 1283-1300.
34. DM Klotz, SC Hewitt, P Ciana, M Raviscioni, JK Lindzey, J Foley, A Maggi, RP DiAugustine, KS Korach: **Requirement of estrogen receptor-alpha in insulin-like growth factor-1 (IGF-1)-induced uterine responses and in vivo evidence for IGF-1/estrogen receptor cross-talk.** *J Biol Chem* 2002, **277**: 8531-8537.

35. GM Rubanyi, AD Freay, K Kauser, D Sukovich, G Burton, DB Lubahn, JF Couse, SW Curtis, KS Korach: **Vascular estrogen receptors and endothelium-derived nitric oxide production in the mouse aorta. Gender difference and effect of estrogen receptor gene disruption.** *J Clin Invest* 1997, **99**: 2429-2437.
36. K Hisamoto, M Ohmichi, H Kurachi, J Hayakawa, Y Kanda, Y Nishio, K Adachi, K Tasaka, E Miyoshi, N Fujiwara et al.: **Estrogen induces the Akt-dependent activation of endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial cells.** *J Biol Chem* 2001, **276**: 3459-3467.
37. GL Mutter, MC Lin, JT Fitzgerald, JB Kum, C Eng: **Changes in endometrial PTEN expression throughout the human menstrual cycle.** *J Clin Endocrinol Metab* 2000, **85**: 2334-2338.
38. LP Kane, VS Shapiro, D Stokoe, A Weiss: **Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase.** *Curr Biol* 1999, **9**: 601-604.
39. SY Foo, GP Nolan: **NF-kappaB to the rescue: RELs, apoptosis and cellular transformation.** *Trends Genet* 1999, **15**: 229-235.
40. C Stehlik, R de Martin, I Kumabashiri, JA Schmid, BR Binder, J Lipp: **Nuclear factor (NF)-kappaB-regulated X-chromosome-linked iap gene expression protects endothelial cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis.** *J Exp Med* 1998, **188**: 211-216.
41. CW Xiao, K Ash, BK Tsang: **Nuclear factor-kappaB-mediated X-linked inhibitor of apoptosis protein expression prevents rat granulosa cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis.** *Endocrinology* 2001, **142**: 557-563.

FIGURE LEGENDS

Figure 1 Proliferation and apoptosis in the rat endometrium during the estrous cycle as demonstrated by Western analysis. Rats were killed at different days of estrous cycle (diestrus, proestrus, estrus and metestrus) and total endometrial proteins were collected. A) Proliferation as determined by Western analysis of CDC47/MCM7. B) Apoptosis as determined by Western analysis of intact and cleaved caspase-3. Data represent the mean $\pm$ SEM of six independent experiments for CDC47/MCM7 and five for intact and cleaved caspase-3. β -actin blots shown were used as controls to correct for loading in each lane. Blots shown are from one representative experiment. Graphics represent Western blots densitometrical analysis. Columns with different superscript are significantly different (different letters are different from each other) ($p < 0.05$).

Figure 2 Proliferation and apoptosis in the rat endometrium during the estrous cycle as demonstrated by TUNEL and IHC. Rats were killed at different days of estrous cycle (diestrus, proestrus, estrus and metestrus). Uteri were collected, fixed and sectioned for detection of apoptotic cells by TUNEL and IHC of CDC47/MCM7 and cleaved caspase-3. IHC and TUNEL shown are from one representative experiment and were repeated 6 times using 6 different uterine sections from 6 different rats per day of estrous cycle. Arrows indicate example of apoptotic cells. L = lumen, LE = luminal epithelium, S = stroma.

Figure 3 Apoptotic and proliferative endometrial cell count during the estrous cycle. TUNEL and IHC of CDC47/MCM7 were used to count positive apoptotic and proliferative luminal epithelial cells as shown in figure 2. A minimum of 200 luminal epithelial cells per day of estrous cycle were counted in each experiment and results are presented as the percentage of

proliferative positive-cells (A), % of TUNEL apoptotic-positive cells (B), and % of cleaved caspase-3 positive cells (C). Data represent the mean $\pm$ SEM of six different rat endometrial sections per day of estrous cycle.

Columns with different superscript are significantly different (different letters are different from each other) ($p < 0.05$).

*Significantly different ($p < 0.05$).

Figure 4 Expression of Akt, Phospho-Akt and PTEN during the estrous cycle. Endometrial proteins were extracted from uteri at different days of estrous cycle for Western analysis: A) Akt, B) Phospho-Akt and C) PTEN. β -actin blots shown were used as controls to correct for loading in each lane. Graphics represent Western blots densitometrical analysis: Akt (mean $\pm$ SEM of seven independent experiments), Phospho-Akt (mean $\pm$ SEM of six independent experiments) and PTEN (mean $\pm$ SEM of eight independent experiments). Blots shown are from one representative experiment. Columns with different superscript are significantly different (different letters are different from each other) ($p < 0.05$).

Figure 5 IHC of Akt, Phospho-Akt and PTEN in rat endometrium during the estrous cycle. IHC shown are from one representative experiment and were repeated 6 times using 6 different uterine sections from 6 different rats per day of estrous cycle. Arrows indicates strong redistribution of Akt and Phospho-Akt at the membrane level. LE = luminal epithelium, S = stroma.

Figure 6 Expression of CDC47/MCM7 (A), Akt (B) and Phospho-Akt (C) in response to 17β -estradiol (E_2) in rat endometrium. Animals were ovariectomized for at least 10 days and then injected daily with E_2 (or vehicle for control group) for 3 days. Rats were killed and endometrial proteins were collected for Western analysis. β -actin blots shown were

used as controls to correct for loading in each lane. Blots shown are from one representative experiment. Graphics represent western blots densitometrical analysis and are the mean $\pm$ SEM of five independent experiments (5 different rats/endometrial extract per treatment group).

*Significantly different from control ($p < 0.001$).

Figure 7 IHC of CDC47/MCM7, Akt and Phospho-Akt in response to 17β -estradiol (E_2) in rat endometrium. Animals were ovariectomized for at least 10 days and then injected daily with E_2 (or vehicle for control group) for 3 days. Rats were killed and their uteri collected, fixed and sectioned for IHC. IHC shown are from one representative experiment and were repeated five times using five different uterine sections from five different rats per day of estrous cycle. Arrow indicates strong redistribution of Phospho-Akt at the membrane level. LE = luminal epithelium, S = stroma.

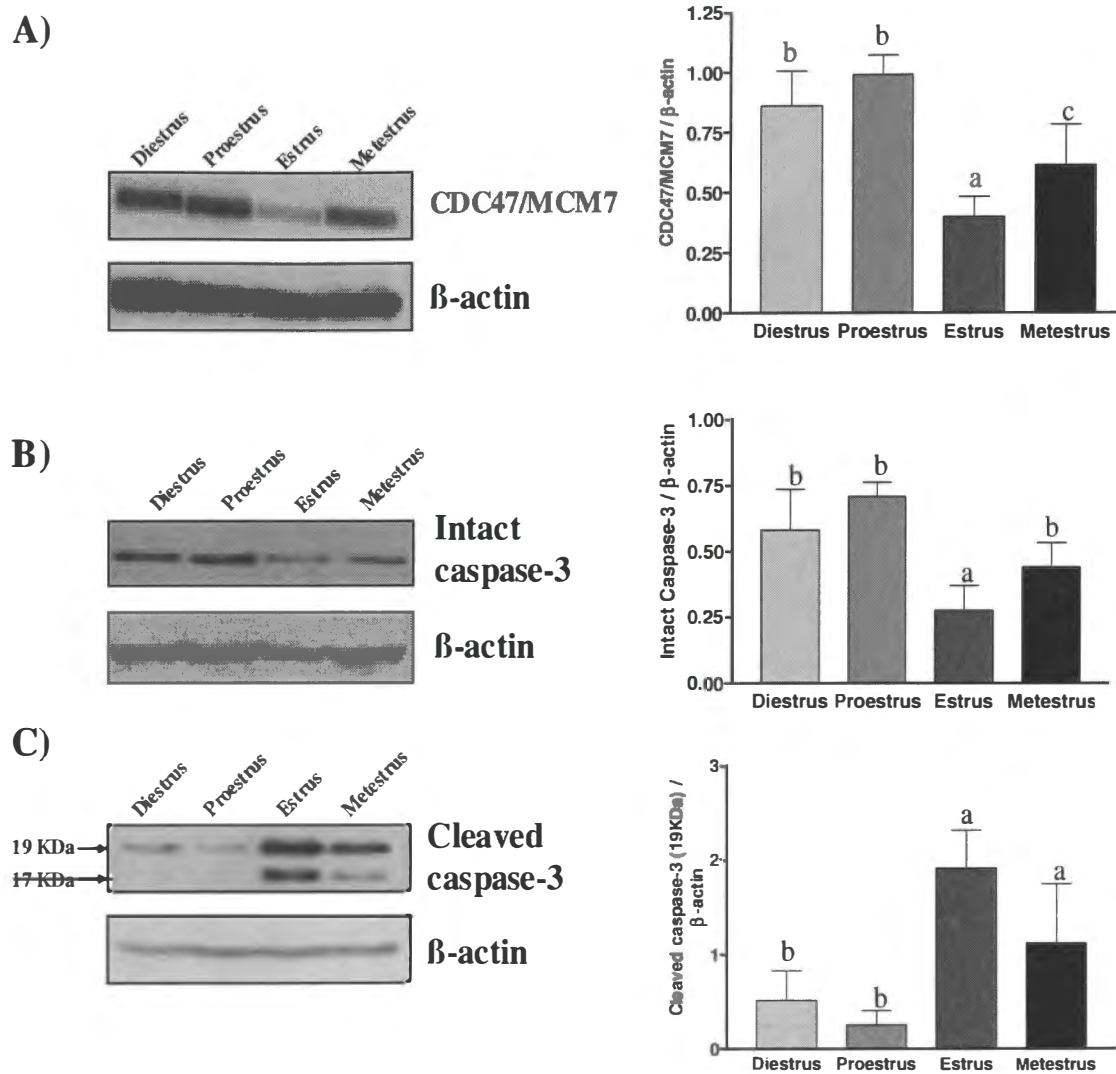


Figure 1 : Déry et al.

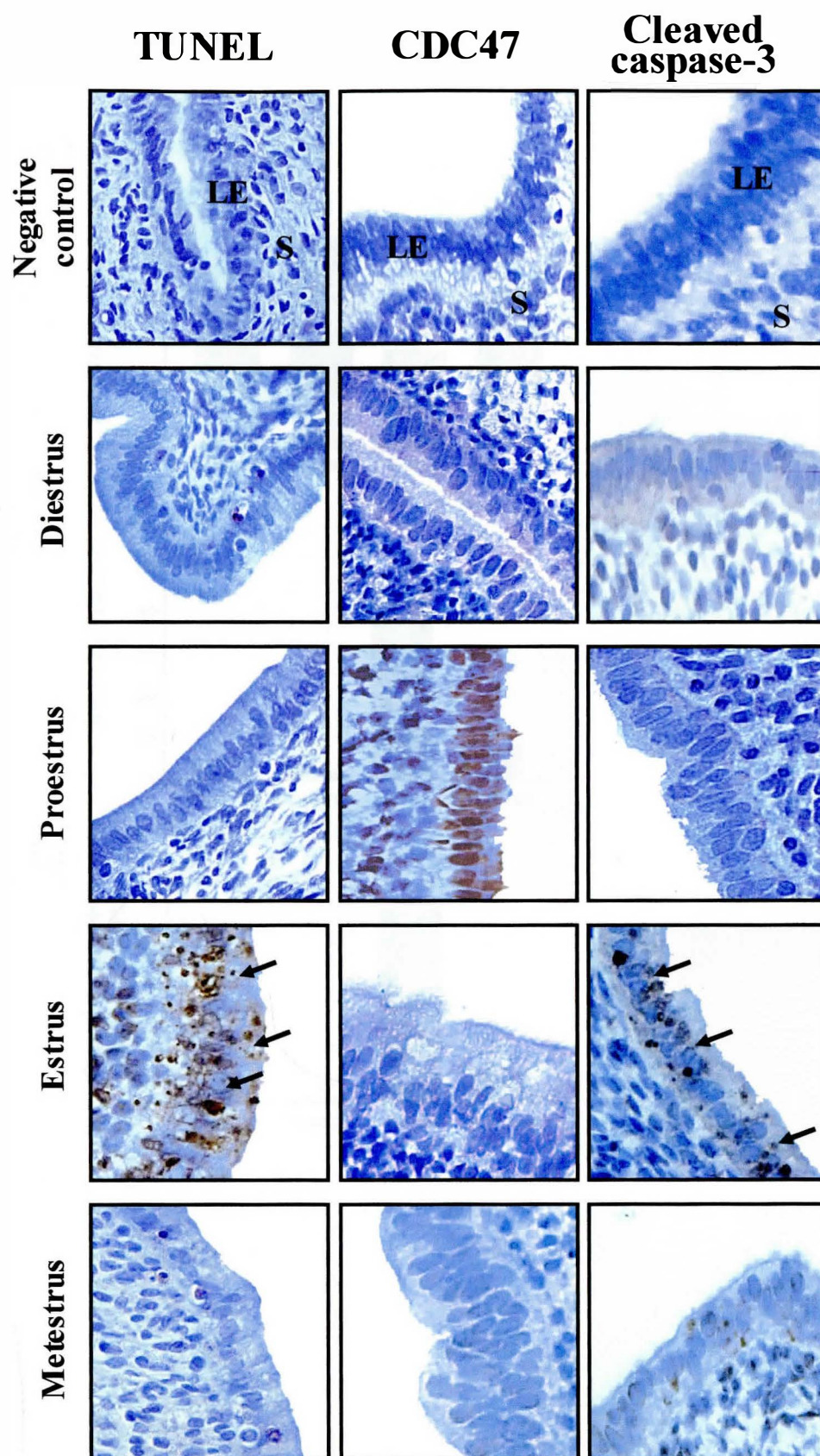


Figure 2 : Déry et al.

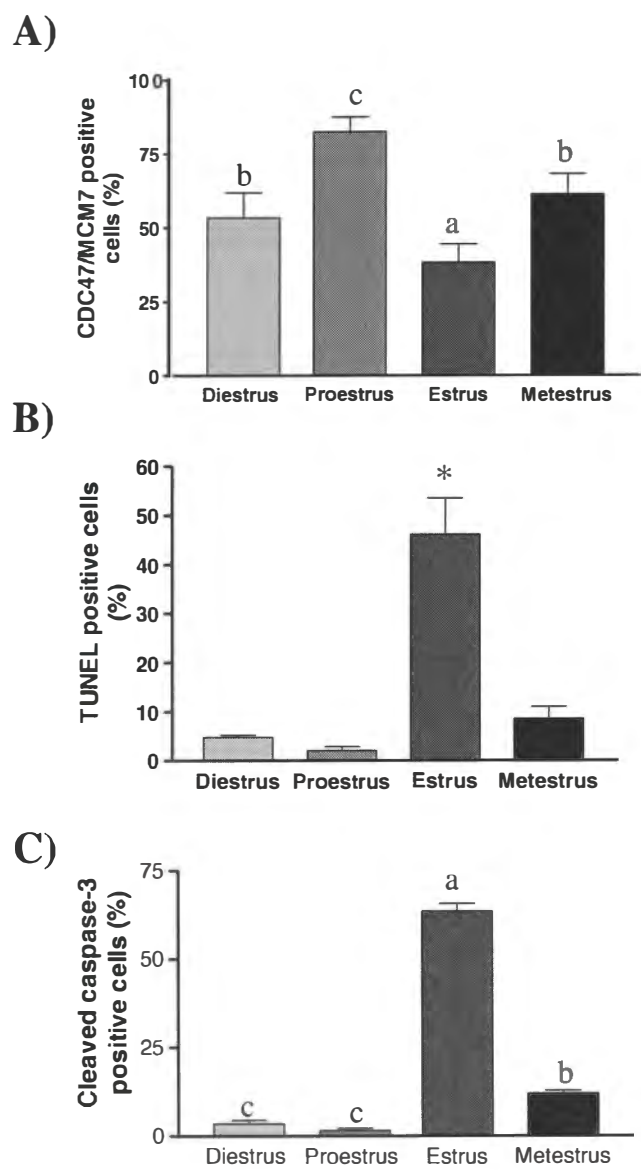


Figure 3 : Déry et al.

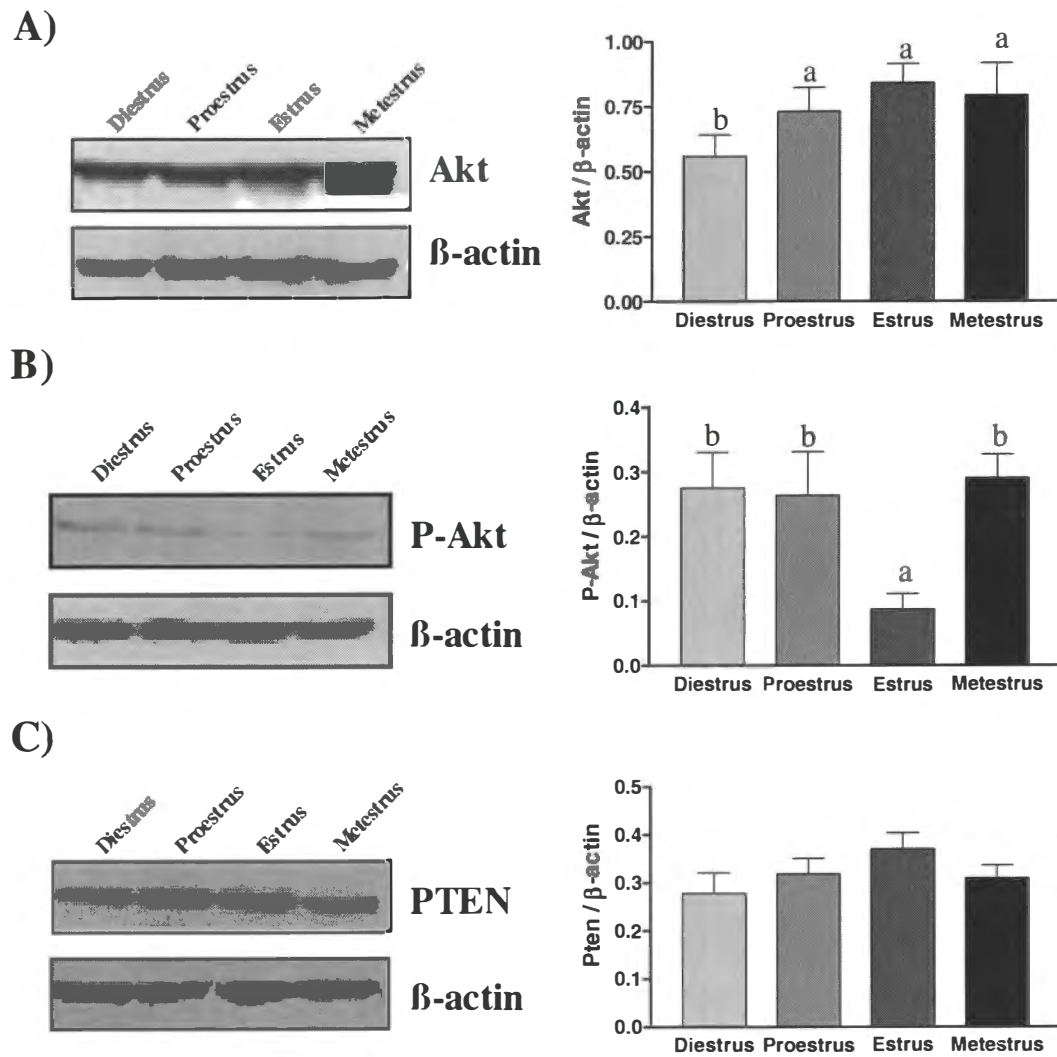


Figure 4 : Déry et al.

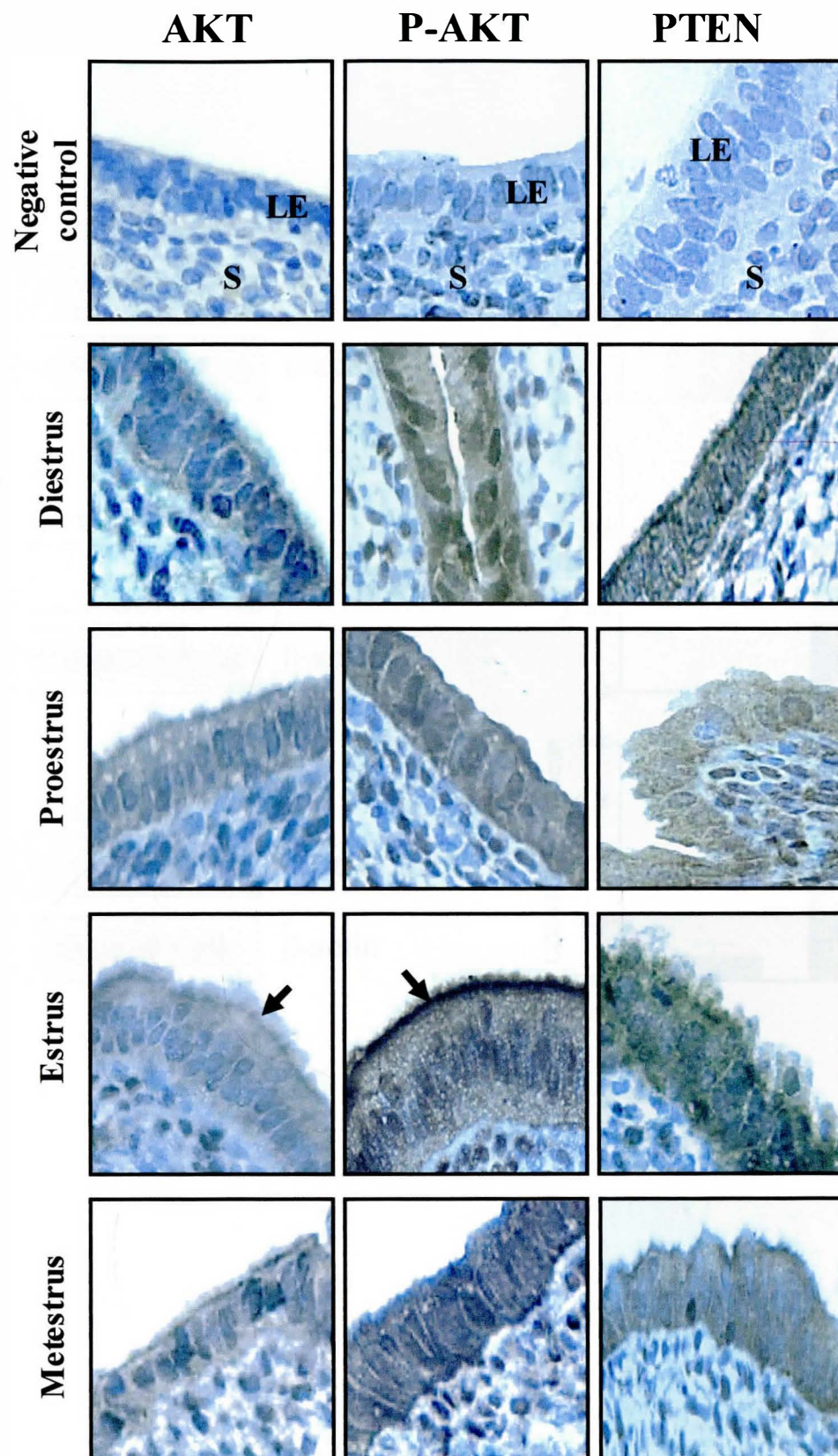


Figure 5 : Déry et al.

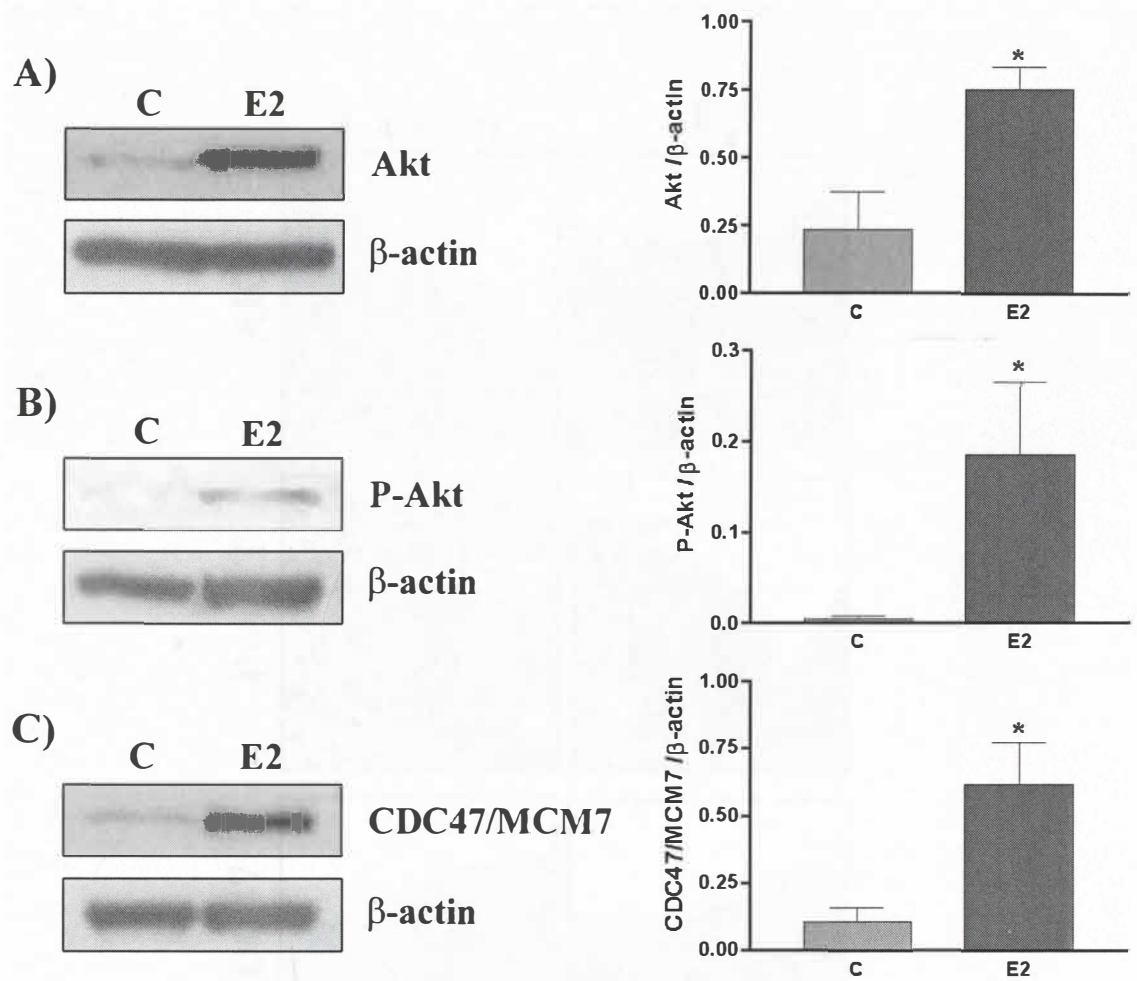


Figure 6 : Déry et al.

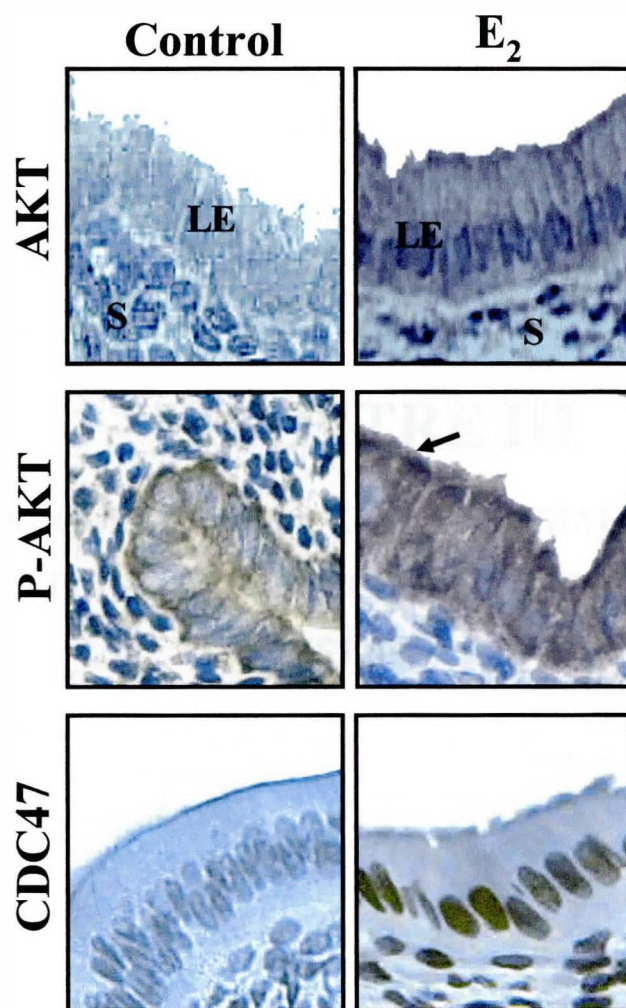


Figure 7 : Déry et al.

CHAPITRE III

**OPPOSITE REGULATION OF XIAP AND SMAC/DIABLO IN THE
RAT ENDOMETRIUM IN RESPONSE TO 17 β -ESTRADIOL AT
ESTRUS**

PRÉFACE

Les auteurs du chapitre III (publié en 2003 dans la revue *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1(1):59, 12p.) sont :Valérie Leblanc (expériences portant sur le cycle et sur l'oestradiol-17 β , expérimentations avec les animaux, figures et écriture d'une partie du matériel et méthodes), Marie-Claude Déry (quelques expériences et figures concernant NF- κ B, écriture d'une partie du matériel et méthodes), Carl Shooner (ovariectomies) et le directeur de recherche, le Dr Éric Asselin, (écriture et correction de l'article).

RÉSUMÉ

Durant le cycle oestral de la rate, l'endomètre prolifère en réponse aux hormones stéroïdiennes, puis en l'absence de facteurs embryonnaires il dégénère par apoptose au niveau des cellules épithéliales. Les caspases (cysteine aspartate-specific proteases), sont au cœur de ce processus de mort cellulaire programmée. Smac/DIABLO est relarguée de la mitochondrie lors de l'apoptose et sa stimulation induit l'activation des caspases en neutralisant XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein), un membre de la famille des protéines qui inhibent l'apoptose. L'objectif de cette étude est d'investiguer l'implication de Smac/DIABLO et de XIAP dans le contrôle de l'activation des caspases dans l'utérus de rates cyclées. Les femelles cyclées sont sacrifiées à chaque phase du cycle oestral (diestrus, proestrus, oestrus et métestrus). Les protéines endométriales sont recueillies à des fins d'analyses de type Western Blot. Les cornes utérines sont sectionnées pour pouvoir procéder à l'immunohistochimie (IHC). Nous avons déjà, de même que plusieurs autres, démontré la présence d'apoptose à l'oestrus dans l'utérus de la rate. Dans la présente étude, les fragments de caspases-3, -6, et -7 clivées sont détectées à l'oestrus. L'IHC confirme que la caspase-3 clivée est uniquement présente à l'oestrus dans l'épithélium luminal et glandulaire. XIAP est très exprimée à l'oestrus dans les cellules épithéliales et stromales. Au contraire, l'expression de Smac/DIABLO est élevée au diestrus, au proestrus et au métestrus, mais minimale à l'oestrus. Le traitement à l'oestradiol-17 β des rates ovariectomisées induit l'expression de XIAP et inhibe celle de Smac/DIABLO dans l'endomètre. Les fragments de caspases -3, -6 et -7 clivées augmentent en fonction des traitements à l'oestradiol-17 β dans les extraits de protéines endométriales. L'expression de NF- κ B, d'I κ B et de P-I κ B est détectée dans l'endomètre, mais elle n'est pas influencée par les fluctuations du cycle oestral. Ces résultats suggèrent que Smac/DIABLO et XIAP sont régulées différemment et qu'il est possible qu'elles jouent un rôle important dans la régulation de la destinée des cellules endométriales. De plus, cette étude confirme le rôle clé des caspases effectrices dans le contrôle du processus apoptotique à l'oestrus dans l'utérus de la rate.

**OPPOSITE REGULATION OF XIAP AND SMAC/DIABLO IN THE RAT
ENDOMETRIUM IN RESPONSE TO 17 β -ESTRADIOL AT ESTRUS[†]**

Valerie Leblanc, Marie-Claude Dery, Carl Shooner and Eric Asselin*

Département de Chimie-Biologie, Section Biologie Médicale, Université du Québec à
Trois-Rivières, C.P. 500, Trois-Rivières, Québec, Canada G9A 5H7

Short title: XIAP and Smac/DIABLO in rat uterus.

Key words: X-linked inhibitor of apoptosis protein; Caspases, apoptosis, uterus,
Smac/DIABLO, NF- κ B, I κ B, 17 β -estradiol, rat, estrus, estrous cycle.

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

[†]This work has been supported by a grant from NSERC (238501-01). Eric Asselin is a recipient of a fellowship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ).

ABSTRACT

During rat estrous cycle, the endometrium proliferates in response to sex steroids and specific endometrial epithelial cells undergo apoptosis in absence of embryonic factors. The central executioner of apoptosis is a family of aspartic acid-specific cysteine proteases known as caspases. Smac/DIABLO is released from the mitochondria during apoptosis and its stimulation promotes caspases activation by neutralizing members of the inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) family, such as X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP). The aim of this study was to investigate the involvement of Smac/DIABLO and XIAP in the control of caspases activation in endometrium of cycling rats. Polyoestrus female rats were sacrificed at each stage of estrous cycle (diestrus, proestrus, estrus, and metestrus). Endometrial protein extracts were collected to perform Western Blot analysis. Alternatively, uterine horns were sectioned for immunohistochemistry (IHC). We and others showed previously the presence of apoptosis at estrus in rat uterine epithelium. In the present study, cleaved caspase-3, -6, and -7 fragments were detected at estrus. IHC confirmed that caspase-3 was present only in luminal and glandular epithelium at estrus. XIAP was highly expressed at estrus in both epithelial and stromal cells. In contrast, expression of Smac/DIABLO was elevated at diestrus, proestrus and metestrus but was minimal at estrus. Treatment of ovariectomized rats with 17β -estradiol induced XIAP expression and inhibited Smac/DIABLO protein expression in the endometrium. Cleaved caspase-3, -6, and -7 fragments increased in endometrial protein extracts following 17β -estradiol treatment. Expression of NF- κ B and I κ B proteins, and I κ B phosphorylation status were detected in the endometrium but were not influenced by the estrous cycle. These findings suggest that Smac/DIABLO and XIAP are regulated differently and may play important roles in the regulation of endometrial cell fate. Moreover, this study confirms a key role for executioner caspases in the control of apoptotic processes at estrus in the rat uterus.

INTRODUCTION

In the absence of embryonic factors during pre-implantation period in uterine luminal epithelium, glands and stroma cell death is found in a cycling fashion through the estrous cycle by a mechanism known as apoptosis. Estrogens and progesterone are directly responsible for the histological and morphological changes in the uterus during estrous cycle. Studies have shown that apoptosis was induced in luminal epithelium at estrus in mouse [1] and rat [2,3]. Other studies have shown that estrogen induces uterine epithelial cell proliferation and estrogen withdrawal results in cell death [4-6]. However, little is known about the cellular and molecular mechanisms involved in the regulation of apoptosis in the uterus. Our group has recently demonstrated that Akt, a serine/threonine protein kinase also known as PKB, is an important kinase involved in the control of endometrial cell proliferation and its expression and phosphorylation/activation are regulated during the estrous cycle, particularly through the action of 17 β -estradiol [7]. We have further showed a decrease in Akt activity at estrus which was accompanied by an increase in apoptosis in luminal epithelial cells[7]. Whether downstream Akt targets might be involved in the regulation of proliferation/cell death in the endometrium is unknown.

X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) is a well known inhibitor of caspase-3, -7 and -9 [8,9]. XIAP belongs to a family of IAP genes which represent critical regulatory factors of apoptosis signaling and regulation. The IAP family also includes c-IAP1 (HIAP2), c-IAP2 (HIAP1), NAIP and Survivin [10]. Recently, we demonstrated in rat granulosa cells and human ovarian surface epithelial cancer cells that XIAP overexpression induces Akt phosphorylation/activation [11,12]. Akt is activated by phosphorylation at threonine 308 and serine 473 in response to growth factors or cytokines [13-15] through phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-K). Once phosphorylated Akt has been shown to 1) phosphorylates and blocks the action of several pro-apoptotic proteins such as Bad [14], and 2) block cytochrome C release from the mitochondria through the regulation of Bcl-2 [16]. The kinase Akt has been shown to induces phosphorylation of procaspase-9, suggesting that caspase processing and apoptosis can be directly regulated by protein

phosphorylation [17]. This is supported by the observation that an activated form of Akt is able to block apoptosis [18].

At the time of apoptosis induction Smac/DIABLO is released from mitochondria into the cytosol, where it binds to IAPs and enables caspase activation [19]. It has been shown that Smac/DIABLO promotes not only the proteolytic activation of procaspase-3 but also the enzymatic activity of mature caspase-3, both of which depend upon its ability to interact physically with IAPs [19]. Smac/DIABLO is synthesized with an N-terminal mitochondrial targeting sequence that is proteolytically removed during maturation to the mature polypeptide. X-ray crystallography has shown that the first four amino acids (AVPI) of mature Smac/DIABLO bind to a portion of the third BIR (BIR3) domain of XIAP [20]. This N-terminal sequence is essential for binding IAPs and blocking their antiapoptotic effects [20].

Caspases are well known executioners of apoptosis. Once activated from their proactive forms, caspases target important proteins involved in cell proliferation and survival (for a review see [21]). Caspase-3 is one of the key executioner of apoptosis and induces downstream caspase-6 which in turn target cleavage of important structural proteins such as laminin and keratins [22,23]. Among other caspase targets, poly(ADP-ribose) polymerase (PARP, 113–116 kDa), a nuclear enzyme which is activated during DNA damage, is known to be cleaved by caspases-3 and -7 [24]. We have recently demonstrated that Akt is also a target for caspase-3 cleavage, indicating that Akt survival pathway inhibition is an important mechanism for apoptosis activation [12].

Although the regulation and importance of XIAP and Smac/DIABLO has been described in other systems and cell types, their expression has not been reported for the uterus. In the present study, we have investigated the regulation of XIAP, Smac/DIABLO, caspase-3, -6 and -7 during the four stages of estrous cycle (proestrus, estrus, metestrus and diestrus) and further analyses were carried out to determine the possible regulation of XIAP and Smac/DIABLO by 17 β -estradiol in ovariectomized rats.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

XIAP, Smac/DIABLO, NF- κ B, I κ B, Phospho-I κ B and cleaved-caspases antibodies were obtained from New England Biolabs (Mississauga, ON). Vectastain ABC Kit for rabbit IgG was purchased from Vector Laboratories Inc. (Burlingame, CA). Protease Inhibitor Cocktail Tablets, POD and DAB substrate were purchased from Roche (Laval, QC). 17 β -estradiol (E₂) was purchased from Laboratoire Mat (Québec, QC).

Animals

Mature Sprague-Dawley female rats (200-225g) were obtained from Charles River Laboratories Canada. Animals were maintained on standard chow and water, which were available *ad libitum*, in animal facilities illuminated on a normal 12 hour cycle. All procedures were performed in accordance with guidelines of the Canadian Council on Animal Care for the handling and training of laboratory animals and the Good Health and Animal Care Committee of the Université du Québec à Trois-Rivières. Stages of the estrous cycle were confirmed by vaginal smears. Rats with three regular cycles of 4 days were used in these experiments and killed at various stages of the estrous cycle (diestrus, proestrus, estrus and metestrus). Uteri were collected and fixed for immunohistochemical staining (IHC) or endometrial protein extracts collected by scraping the endometrium for Western analysis. To determine the effect of estrogen, rats were ovariectomized for at least 10 days and then injected with (17 β -estradiol) E₂. Animals were treated for a total of 3 days and killed after hormone treatment (72 hours) according to previous preliminary time-course studies done in our laboratory (Leblanc et al., unpublished information) and information found in the literature [25]. E₂ was dissolved with sesame oil, and administered by subcutaneous injection. Sesame oil was injected into control animals. The dose administered was 40 μ g/kg/day (E₂).

Immunohistochemistry

The uterus was fixed in 4% paraformaldehyde solution and embedded in paraffin. Tissue sections 7 μ m thick were mounted on polylysine-coated slides, deparaffinized,

rehydrated, and then heated with 10 mM citrate buffer (pH 6). After two wash with PBS, slides were then incubated with 0.3 % hydrogen peroxide in methanol for 30 min to quench endogenous peroxidase activity. After washing with PBS, tissues were incubated with blocking serum (Vectastain ABC Kit) at room temperature for 1 h. Then, a primary antibody (XIAP 1:200; Smac/DIABLO 1:100; and cleaved caspase-3 1:100) was added to the slides and incubated at 4°C overnight. After washing 5 min in PBS, tissue sections were incubated for 30 min with 3µg/ml biotinylated antibody (anti-rabbit or anti-mouse). Subsequently, slides were washed with PBS and incubated with avidin-biotin complex reagent containing horseradish peroxidase for 30 min. Again washed with PBS for 5 min and colour development was achieved using DAB substrate. The tissue sections were counterstained with haematoxylin. Negative controls were performed using the same protocol without the presence of primary antibody.

Protein extraction and Western analysis

Endometrium from each uterus was scraped using a glass microscope slide and homogenized using a pipette in the lysis buffer (PBS 1X pH 7.4; 1% Nonidet P-40; 0.5% Sodium deoxycholate; 0.1% SDS; Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche)). Homogenates were centrifuged (12,000 X g for 20 min at 4°C) to remove insoluble material. The supernatant was recovered and stored at -20 °C pending analysis. Protein content was determined with the Bio-Rad DC Protein Assay. Concentrations of reagents found in the lysis buffer were chosen to avoid any interference with the protein assay. Protein extracts (50µg) were heated at 94°C for 3 min, resolved by 10% SDS-PAGE and electrotransferred to nitrocellulose membranes using a semidry transfer (Bio-Rad, Mississauga, ON). The membranes were then blocked 2 h at room temperature with PBS containing 5 % milk powder, then incubated with XIAP 1:500; Smac/DIABLO 1:500; Caspase-3 1:1000; Caspase-6 1:1000; Caspase-7 1:1000; NF-κB 1:1000; IκB 1:1000; Phospho-IκB 1:500 and subsequently with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse secondary antibody (1:3000; room temperature for 45 min). All membranes were reprobed with a antibody specific to β-actin which was used as an internal standard. Densitometrical analyses were performed on both films (protein of interest and β-actin) using the GelDoc 2000 and the Quantity One software (Bio-Rad,

Mississauga, ON). Results are expressed as a ratio protein of interest/ β -actin to correct for loading for each endometrial sample.

Statistical analysis

Western analyses of cycling animals were repeated four to six times (one rat per extract/day repeated 4 to 6 different times). Endometrial extracts from each rats was assessed individually. Western blot analyses were performed with samples from ovariectomized rats treated with E_2 (4 rats/group). Endometrial extracts from each rats was assessed individually for both studies. Results subjected to statistical analyses were expressed as means $\pm$ SEM. Data were subjected to one-way ANOVA (PRISM software version 4.0; GraphPad, San Diego, CA). Differences between experimental groups were determined by the Tukey's test. Statistical significance was accepted when $P < 0.05$.

RESULTS

Caspases activation during the estrous cycle.

We have shown previously that apoptosis was maximal at estrus and weakly detectable at metestrus, diestrus and proestrus [7]. Apoptosis was mainly located in luminal epithelial cells at estrus. On the other hand, cell proliferation was maximal at proestrus as determined by expression of the cell proliferation marker CDC47/MCM7 [7]. Since executioner caspases such as caspase-3, -6 and -7 are key proteases involved in the execution of apoptosis, we have investigated, using antibodies specific for activated forms (cleaved fragments), their expression in the endometrium throughout estrous cycle. Caspase-3 fragments were detected in greatest amounts at estrus (Fig.1). Caspase-3 19 KDa fragment was weakly detectable at diestrus and proestrus, maximal at estrus and further reduced at metestrus. Likewise, caspase-3 17 KDa fragment was detected only at estrus and metestrus but was significantly reduced at metestrus compared to estrus. Large cleaved caspase-6 subunit (18 KDa) was absent at diestrus and proestrus, maximal at estrus and reduced at metestrus. Similarly, large cleaved caspase-7 subunit (19 KDa) was weakly detected at diestrus and proestrus, was highly increased at estrus and reduced at metestrus. IHC studies using the antibody specific for cleaved caspase-3

(cleaved caspase-6 and -7 antibodies are not functional for IHC) revealed that cleaved caspase-3 fragment signal was located in apoptotic luminal epithelial cells at estrus and that the signal was absent in proliferative endometrium at proestrus.

XIAP and Smac/DIABLO expression during the estrous cycle.

Expression of XIAP and Smac/DIABLO proteins has not been reported for the uterus. Because we have demonstrated previously a possible link between XIAP and survival factor Akt [11,12] and further that Akt expression and activity/phosphorylation are regulated by 17β -estradiol in rat endometrium [7], we have asked the question whether XIAP and its inhibitor Smac/DIABLO might have important roles in the control of endometrial cell fate. Western blot revealed that XIAP protein was present at all stages of the estrous cycle, but maximal at estrus (Fig.2; 2.9-fold increase compared to proestrus; $p<0.05$). IHC revealed that XIAP expression was high in stromal cells and in both luminal and glandular epithelial cells at estrus (Fig.3). Expression of Smac/DIABLO during estrous cycle was similar at metestrus, diestrus and proestrus but was significantly reduced at estrus (Fig.2; 3.6-fold decrease compared to proestrus; $p<0.05$). IHC confirmed downregulation of Smac/DIABLO at estrus and showed that it was localized mainly in epithelial cells but was also present in stromal cells (Fig.3).

Effect of 17β -estradiol on XIAP and Smac/DIABLO expression and caspases activation.

To further determine importance of 17β -estradiol in the regulation of XIAP and Smac/DIABLO, ovariectomized rats were treated with 17β -estradiol and uteri were recovered for Western analysis (Fig.4) and IHC (Fig.5) analyses. Our previous results indicated that 17β -estradiol increased significantly endometrial cell proliferation (as determined by the expression of CDC47/MCM7) and increased Akt protein expression and its phosphorylation/activity [7]. In the present study, results shows that 17β -estradiol induced significantly XIAP protein expression (4.0-fold compared to control; $p<0.05$) whereas it significantly inhibited Smac/DIABLO protein expression (2.7-fold compared to control; $p<0.05$) (Fig.4). IHC analysis in ovariectomized rats confirmed the increase

of XIAP expression and inhibition of Smac/DIABLO in the endometrium (Fig.5). As observed during estrous cycle (Fig.3), XIAP and Smac/DIABLO proteins were found mainly in epithelial cells but were also present in stroma (Fig.5). The effect of 17 β -estradiol on the regulation of XIAP and Smac/DIABLO support the mitogenic role of 17 β -estradiol and its involvement in cell survival.

NF- κ B pathway regulation through the estrous cycle.

The NF- κ B pathway has been shown to be activated by Akt in several cell types (for a review [26]). Furthermore, it has been shown that XIAP expression is up-regulated once NF- κ B is activated and translocated to the nucleus [27,28]. The activation of NF- κ B proceeds through the phosphorylation of its inhibitor, I κ B α , that targets it for polyubiquitination and subsequent enzymatic degradation by the 26S ubiquitin proteasome [29]. Since we have showed an increase of Akt phosphorylation in response to E₂ [7], we sought to determine if NF- κ B/I κ B pathway might be involved in the regulation of XIAP expression in response to 17 β -estradiol. The present study shows that NF- κ B (both p50 and p65 subunits) and I κ B proteins were both expressed in the endometrium but were not influenced by the estrous cycle (Fig.6). Since I κ B phosphorylation status is a sign of NF- κ B activation, we also carried out Western analyses using a phospho specific I κ B antibody (Fig.6C). The results showed that phosphorylation of I κ B was detected at all days of estrous cycle but was not influenced by the estrous cycle. These results demonstrate that NF- κ B/I κ B pathway is not involved in the regulation of XIAP expression in the cycling rat uterus.

DISCUSSION

We and other have demonstrated the presence of apoptosis in the rat [2,3,7] and mouse [1] endometrium during the estrous cycle. Although our recent study showed that regulation of Akt survival pathway is a key factor involved in the regulation of endometrial cell fate during estrous cycle [7], molecular and cellular mechanisms involved in the regulation of apoptosis in the uterus are poorly documented in the

literature. Since menses are absent in rodent specie, there must be precise intra-cellular mechanisms involved in the regulation of cell fate in the endometrium after estrogen withdrawal in the absence of embryonic factors. We have previously demonstrated in human ovarian cancer cells [12] and rat granulosa cells [11] the importance of XIAP and Akt expression/activity. In the present study, regulation of XIAP and Smac/DIABLO have been investigated in rat uterus to determine their importance and their possible influence on endometrial cell survival/death in relation to the stage of estrous cycle.

In the present study, expression of XIAP was maximum at estrus and increased in response to E_2 in ovariectomized rats. XIAP was strongly expressed in luminal and glandular epithelia and stroma during estrus, perhaps to protect these cells from apoptosis. Although stimulation of XIAP by E_2 is consistent with mitogenic activity and apoptosis inhibitory activity, it is not clear why XIAP expression does not increase during proestrus. A recent study showed that XIAP may be directly regulated by the presence of tumor necrosis factor- α (TNF- α) in rat granulosa cells [27]. Since it has been shown that TNF- α mRNA expression was high at estrus and was regulated by estrogen in the mouse uterus [30], a similar process may be involved in the endometrium. Thus, action of E_2 on XIAP expression might be indirect and might involve specific factors regulated upstream and/or downstream by this hormone. Whether involvement of TNF- α or other growth factors/cytokines might be involved in this process remains to be elucidated.

In contrast, Smac/DIABLO was decreased at estrus and E_2 treatment in ovariectomized rats reduced its expression. These results directly support the mitogenic action of estrogens on endometrial cells. Since Smac/DIABLO is a pro-apoptotic protein, its down-regulation may be sufficient to activate XIAP to inhibit caspase activity. Smac/DIABLO down-regulation also support our results obtained at estrus showing apoptosis predominantly in luminal epithelial cells [7] and suggest that this pro-apoptotic factor might have a key function in triggering apoptosis at this particular time of rat estrous cycle. There is currently no information available in the literature demonstrating that E_2 modulates Smac/DIABLO expression and the present findings are the first to demonstrate this mechanism. E_2 treatment resulted in the cleavage of caspase-3, -6 and -7 in endometrial cells. This result

was contradictory to the fact that E₂ induces endometrial cells proliferation rather than inducing activation of the caspase cascade and apoptosis. Although it has been shown that E₂ triggers apoptosis in a preosteoclastic cell line *in vitro* [31] and in thymocytes of ovariectomized mice *in vivo* [32], it is unlikely that E₂ induced apoptosis in the endometrium. This can be explained by the fact that following injection of ovariectomized rats with E₂, latent endometrial cells are forced to proliferate and they might be in a situation of stress. Indeed, controlling the balance between survival and death factors is a key mechanism in order to maintain homeostasis in the proliferating endometrium. Increased caspase cleavage is not necessarily a sign of apoptosis activation; caspases activity can be blocked by the presence of high levels of XIAP (or other known or unknown inhibitor of apoptosis proteins such as cIAPs [33]) and the presence of low levels of Smac/DIABLO. This particular mechanism in endometrial cells might be important in order to rapidly induce apoptosis at the appropriate timing (at estrus for instance) through the simple inhibition or degradation of XIAP protein through its ubiquitin protein ligase activity its degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli [34].

Another explanation for the induction of caspase activation in response to E₂ might be due to the presence and activity of E₂ metabolites. For example, 2-Methoxyestradiol (2ME2), a natural metabolite of E₂, is a potent antitumor and antiangiogenic agent [35] and has been shown to induce apoptosis in several cell type (for a review see [36]). Furthermore, 2ME2 is currently tested in clinical trials for cancer therapies [36]. 2ME2 is a major metabolite of estradiol in human serum and its concentration peaks at mid-cycle, like that of estradiol [37]. Studies have shown that 2ME2 acts through other signaling pathways than E₂ [38,39]. A recent study revealed that 2ME2 treatment resulted in up-regulation of death receptor 5 (DR5) protein expression *in vitro* and *in vivo* and rendered cells more sensitive to the cytotoxic activities of the DR5 ligand tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) [40]. In addition, the latter study demonstrated that 2ME2-induced apoptosis required activation of caspase-8, caspase-9, and caspase-3 [40]. Another recent study also showed induction of caspase-3 and apoptosis in response to 2ME2 in gastric carcinoma cells [41]. This observation established in other systems and cell types suggest that 2ME2 could be an element of investigation in order to determine how E₂ might be involved in the induction of caspase

cleavage in rat endometrium and the possibility that activation of caspases observed might not be a direct action of E₂.

Recent studies demonstrated that the transcriptional nuclear factor kappa-B (NF- κ B) is a direct downstream target of phosphorylated Akt [42]. NF- κ B is sequestered (p65 and p50 subunits) in the cytoplasm by the I κ Bs inhibitors which are phosphorylation targets of Akt. Upon phosphorylation I κ Bs are released and degraded through ubiquitination and NF- κ B enter nucleus for gene expression [43]. In the literature, we found that XIAP promoter is a target for NF- κ B [27,28]. Since we have recently demonstrated the activation of Akt in response to 17 β -estradiol in rat endometrium and that Akt has been shown to activate NF- κ B signaling pathway [42], we wanted to know if Akt/ NF- κ B/I κ B pathway might be involved in the regulation of XIAP expression. Results of the present study showed that there was no difference in the expression of NF- κ B and I κ B nor I κ B phosphorylation during the four stages of estrous cycle which exclude the involvement of this pathway in the regulation of XIAP or Smac/DIABLO expression. Other pathways downstream of Akt known to be regulated by this kinase are currently investigated in our laboratory such as eNOS [44,45], Bad [46], glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β) [47,48], and caspase-9 [49]. A recent report further demonstrated that insulin-like growth factor-1 (IGF-1) induced activation of Akt, NF- κ B and induced phosphorylation of Forkhead transcription factor (FKHR), which in turn up-regulated a series of intracellular anti-apoptotic proteins such as XIAP [50]. Because, FKHR is also a well known target for Akt action [51], phosphorylation, activity and regulation of this transcription factor in the uterus needs to be investigated.

In conclusion, the present study showed for the first time the presence and regulation of XIAP and Smac/DIABLO in the rat endometrium and further demonstrated that these two survival factors are regulated in the opposite direction by E₂. Further analysis will be necessary to determine more specifically, the intra-cellular and molecular signal transducers involved in the process of apoptosis in the rat reproductive tract and to determine the mechanism by which XIAP and Smac/DIABLO are regulated.

ACKNOWLEDGMENTS

This work has been supported by a grant from NSERC (238501-01). Eric Asselin is a recipient of a fellowship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). We are grateful to Mrs. Rollande Caron who brought a lot technical expertise with animals and gave plenty of her precious time for these studies.

REFERENCES

1. Dharma SJ, Kholkute SD, Nandedkar TD: **Apoptosis in endometrium of mouse during estrous cycle.** *Indian J Exp Biol* 2001, **39**: 218-222.
2. Lai MD, Lee LR, Cheng KS, Wing LY: **Expression of proliferating cell nuclear antigen in luminal epithelium during the growth and regression of rat uterus.** *J Endocrinol* 2000, **166**: 87-93.
3. Sato T, Fukazawa Y, Kojima H, Enari M, Iguchi T, Ohta Y: **Apoptotic cell death during the estrous cycle in the rat uterus and vagina.** *Anat Rec* 1997, **248**: 76-83.
4. Quarmby VE, Korach KS: **The influence of 17 beta-estradiol on patterns of cell division in the uterus.** *Endocrinology* 1984, **114**: 694-702.
5. Finn CA, Publicover M: **Hormonal control of cell death in the luminal epithelium of the mouse uterus.** *J Endocrinol* 1981, **91**: 335-340.
6. Martin L, Pollard JW, Fagg B: **Oestriol, oestradiol-17beta and the proliferation and death of uterine cells.** *J Endocrinol* 1976, **69**: 103-115.
7. Dery MC, Leblanc V, Shooner C, Asselin E: **Regulation of Akt expression and phosphorylation by 17beta-estradiol in the rat uterus during estrous cycle.** *Reprod Biol Endocrinol* 2003, **1**: 47.
8. Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC: **X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases.** *Nature* 1997, **388**: 300-304.
9. Takahashi R, Deveraux Q, Tamm I, Welsh K, Assa-Munt N, Salvesen GS *et al.*: **A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases.** *J Biol Chem* 1998, **273**: 7787-7790.
10. LaCasse EC, Baird S, Korneluk RG, Mackenzie AE: **The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer.** *Oncogene* 1998, **17**: 3247-3259.
11. Asselin E, Wang Y, Tsang BK: **X-linked inhibitor of apoptosis protein activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in rat granulosa cells during follicular development.** *Endocrinology* 2001, **142**: 2451-2457.
12. Asselin E, Mills GB, Tsang BK: **XIAP regulates Akt activity and caspase-3-dependent cleavage during cisplatin-induced apoptosis in human ovarian epithelial cancer cells.** *Cancer Res* 2001, **61**: 1862-1868.
13. Stephens L, Anderson K, Stokoe D, Erdjument-Bromage H, Painter GF, Holmes AB *et al.*: **Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-**

- trisphosphate-dependent activation of protein kinase B.** *Science* 1998, **279**: 710-714.
14. Hayakawa J, Ohmichi M, Kurachi H, Kanda Y, Hisamoto K, Nishio Y *et al.*: **Inhibition of BAD phosphorylation either at serine 112 via extracellular signal-regulated protein kinase cascade or at serine 136 via Akt cascade sensitizes human ovarian cancer cells to cisplatin.** *Cancer Res* 2000, **60**: 5988-5994.
 15. Suzuki Y, Nakabayashi Y, Takahashi R: **Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**: 8662-8667.
 16. Davies MA, Koul D, Dhese H, Berman R, McDonnell TJ, McConkey D *et al.*: **Regulation of Akt/PKB activity, cellular growth, and apoptosis in prostate carcinoma cells by MMAC/PTEN.** *Cancer Res* 1999, **59**: 2551-2556.
 17. Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E *et al.*: **Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation.** *Science* 1998, **282**: 1318-1321.
 18. Kennedy SG, Wagner AJ, Conzen SD, Jordan J, Bellacosa A, Tsichlis PN *et al.*: **The PI 3-kinase/Akt signaling pathway delivers an anti-apoptotic signal.** *Genes Dev* 1997, **11**: 701-713.
 19. Chai J, Du C, Wu JW, Kyin S, Wang X, Shi Y: **Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO.** *Nature* 2000, **406**: 855-862.
 20. Liu Z, Sun C, Olejniczak ET, Meadows RP, Betz SF, Oost T *et al.*: **Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain.** *Nature* 2000, **408**: 1004-1008.
 21. Cohen GM: **Caspases: the executioners of apoptosis.** *Biochem J* 1997, **326**: 1-16.
 22. Prasad SC, Thraves PJ, Kuettel MR, Srinivasarao GY, Dritschilo A, Soldatenkov VA: **Apoptosis-associated proteolysis of vimentin in human prostate epithelial tumor cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 1998, **249**: 332-338.
 23. Caulin C, Salvesen GS, Oshima RG: **Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis.** *J Cell Biol* 1997, **138**: 1379-1394.
 24. Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M *et al.*: **Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis.** *Nature* 1995, **376**: 37-43.

25. Nephew KP, Ray S, Hlaing M, Ahluwalia A, Wu SD, Long X *et al.*: **Expression of estrogen receptor coactivators in the rat uterus.** *Biol Reprod* 2000, **63**: 361-367.
26. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME: **Cellular survival: a play in three Akts.** *Genes Dev* 1999, **13**: 2905-2927.
27. Xiao CW, Ash K, Tsang BK: **Nuclear factor-kappaB-mediated X-linked inhibitor of apoptosis protein expression prevents rat granulosa cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis.** *Endocrinology* 2001, **142**: 557-563.
28. Stehlik C, de Martin R, Kumabashiri I, Schmid JA, Binder BR, Lipp J: **Nuclear factor (NF)-kappaB-regulated X-chromosome-linked iap gene expression protects endothelial cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis.** *J Exp Med* 1998, **188**: 211-216.
29. Steffan NM, Bren GD, Frantz B, Tocci MJ, O'Neill EA, Paya CV: **Regulation of Ikb alpha phosphorylation by PKC- and Ca(2+)-dependent signal transduction pathways.** *J Immunol* 1995, **155**: 4685-4691.
30. De M, Sanford TR, Wood GW: **Interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor alpha are produced in the mouse uterus during the estrous cycle and are induced by estrogen and progesterone.** *Dev Biol* 1992, **151**: 297-305.
31. Zecchi-Orlandini S, Formigli L, Tani A, Benvenuti S, Fiorelli G, Papucci L *et al.*: **17beta-estradiol induces apoptosis in the preosteoclastic FLG 29.1 cell line.** *Biochem Biophys Res Commun* 1999, **255**: 680-685.
32. Patel H, Hoffman-Goetz L: **Effects of oestrogen and exercise on caspase-3 activity in primary and secondary lymphoid compartments in ovariectomized mice.** *Acta Physiol Scand* 2002, **176**: 177-184.
33. Gagnon V, St-Germain ME, Parent S, Asselin E. **Akt activity in endometrial cancer cells: regulation of cell survival through cIAP-1.** *Int J Oncol* 2003, **23**: 803-810.
34. Yang Y, Fang S, Jensen JP, Weissman AM, Ashwell JD: **Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli.** *Science* 2000, **288**: 874-877.
35. Pribluda VS, Gubish ER, Jr., LaVallee TM, Treston A, Swartz GM, Green SJ: **2-Methoxyestradiol: an endogenous antiangiogenic and antiproliferative drug candidate.** *Cancer Metastasis Rev* 2000, **19**: 173-179.

36. Schumacher G, Neuhaus P: **The physiological estrogen metabolite 2-methoxyestradiol reduces tumor growth and induces apoptosis in human solid tumors.** *J Cancer Res Clin Oncol* 2001, **127**: 405-410.
37. Berg D, Sonsalla R, Kuss E: **Concentrations of 2-methoxyoestrogens in human serum measured by a heterologous immunoassay with an ¹²⁵I-labelled ligand.** *Acta Endocrinol (Copenh)* 1983, **103**: 282-288.
38. Dubey RK, Jackson EK, Keller PJ, Imthurn B, Rosselli M: **Estradiol metabolites inhibit endothelin synthesis by an estrogen receptor-independent mechanism.** *Hypertension* 2001, **37**: 640-644.
39. Dubey RK, Gillespie DG, Zacharia LC, Rosselli M, Korzekwa KR, Fingerle J *et al.*: **Methoxyestradiols mediate the antimitogenic effects of estradiol on vascular smooth muscle cells via estrogen receptor-independent mechanisms.** *Biochem Biophys Res Commun* 2000, **278**: 27-33.
40. LaVallee TM, Zhan XH, Johnson MS, Herbstritt CJ, Swartz G, Williams MS *et al.*: **2-methoxyestradiol up-regulates death receptor 5 and induces apoptosis through activation of the extrinsic pathway.** *Cancer Res* 2003, **63**: 468-475.
41. Lin HL, Liu TY, Wu CW, Chi CW: **2-Methoxyestradiol-induced caspase-3 activation and apoptosis occurs through G(2)/M arrest dependent and independent pathways in gastric carcinoma cells.** *Cancer* 2001, **92**: 500-509.
42. Kane LP, Shapiro VS, Stokoe D, Weiss A: **Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase.** *Curr Biol* 1999, **9**: 601-604.
43. Foo SY, Nolan GP: **NF-kappaB to the rescue: RELs, apoptosis and cellular transformation.** *Trends Genet* 1999, **15**: 229-235.
44. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM: **Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation.** *Nature* 1999, **399**: 601-605.
45. Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K *et al.*: **Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt.** *Nature* 1999, **399**: 597-601.
46. Pastorino JG, Tafani M, Farber JL: **Tumor necrosis factor induces phosphorylation and translocation of BAD through a phosphatidylinositide-3-OH kinase-dependent pathway.** *J Biol Chem* 1999, **274**: 19411-19416.
47. Pap M, Cooper GM: **Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt cell survival pathway.** *J Biol Chem* 1998, **273**: 19929-19932.

48. van Weeren PC, de Bruyn KM, Vries-Smits AM, van Lint J, Burgering BM: **Essential role for protein kinase B (PKB) in insulin-induced glycogen synthase kinase 3 inactivation. Characterization of dominant-negative mutant of PKB.** *J Biol Chem* 1998, **273**: 13150-13156.
49. Zhou H, Li XM, Meinkoth J, Pittman RN: **Akt regulates cell survival and apoptosis at a postmitochondrial level.** *J Cell Biol* 2000, **151**: 483-494.
50. Mitsiades CS, Mitsiades N, Poulaki V, Schlossman R, Akiyama M, Chauhan D *et al.*: **Activation of NF-kappaB and upregulation of intracellular anti-apoptotic proteins via the IGF-1/Akt signaling in human multiple myeloma cells: therapeutic implications.** *Oncogene* 2002, **21**: 5673-5683.
51. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS *et al.*: **Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor.** *Cell* 1999, **96**: 857-868.

FIGURE LEGENDS

Figure 1 Cleaved caspase-3, -6, and -7 expression in rat endometrium during estrous cycle. Polyoestrus rats were sacrificed at each stage of the estrous cycle (diestrus, proestrus, estrus and metestrus) and total endometrial proteins were collected. A) Western blots of cleaved caspase-3, -6 and -7 (one blot presented out of 4). Graphics shows Western blots densitometric analysis. Data represent the mean $\pm$ SEM of four independent experiments (four different rats). B) Immunohistochemistry of cleaved caspase-3. IHC shown are from one representative experiment (a total of four different uterine sections from four different rats per day of the estrous cycle have been tested).

*Significantly different from diestrus and proestrus ($p < 0.05$).

Figure 2 Smac/DIABLO and XIAP expression in rat endometrium during estrous cycle. Total endometrial proteins were collected from polyoestrus cycling rats at each stage of the estrous cycle (diestrus, proestrus, estrus and metestrus). A) Western blots analyses of Smac/DIABLO and XIAP (one blot presented out of 6). Graphics shows Western blots densitometric analysis. Data represent the mean $\pm$ SEM of four independent experiments (four different rats).

*Significantly different from all other days of estrus cycle ($p < 0.05$).

Figure 3 Immunohistochemistry of Smac/DIABLO and XIAP in rat endometrium during estrous cycle. IHC shown are from one representative experiment carried out on four different uterine sections (a total of four different uterine sections from four different rats per day of the estrous cycle have been tested). Negative control: primary antibody absent.

Figure 4 Expression of cleaved caspase-3, -6, -7, Smac/DIABLO and XIAP in response to 17β -estradiol (E_2) in ovariectomized rats. Ovariectomized rats received daily subcutaneous injections of E_2 (40mg/Kg/day) or vehicle for control group for 3 days. Graphics shows Western blots (one blot

presented out of 4) densitometric analysis. Data represent the mean $\pm$ SEM of four independent experiments (4 rats per group).

*Significantly different from control ($p < 0.05$).

Figure 5

Immunohistochemistry of Smac/DIABLO and XIAP in rat endometrium of treated ovariectomized rats. Ovariectomized rats received daily subcutaneous injections of E₂ (40mg/Kg/day) or vehicle for control group for 3 days. IHC shown are from one representative experiment per group (a total of four different uterine sections from four different treated ovariectomized rats have been tested).

Figure 6

NF- κ B, I κ B and phospho-I κ B expression in rat endometrium during estrous cycle. Total endometrial proteins were collected from polyoestrus cycling rats at each stage of the estrous cycle (diestrus, proestrus, estrus and metestrus). A) Western blots analyses of NF- κ B, I κ B and phospho-I κ B (one blot presented out of 6). Graphics shows Western blots densitometric analysis. Data represent the mean $\pm$ SEM of six independent experiments (six different rats).

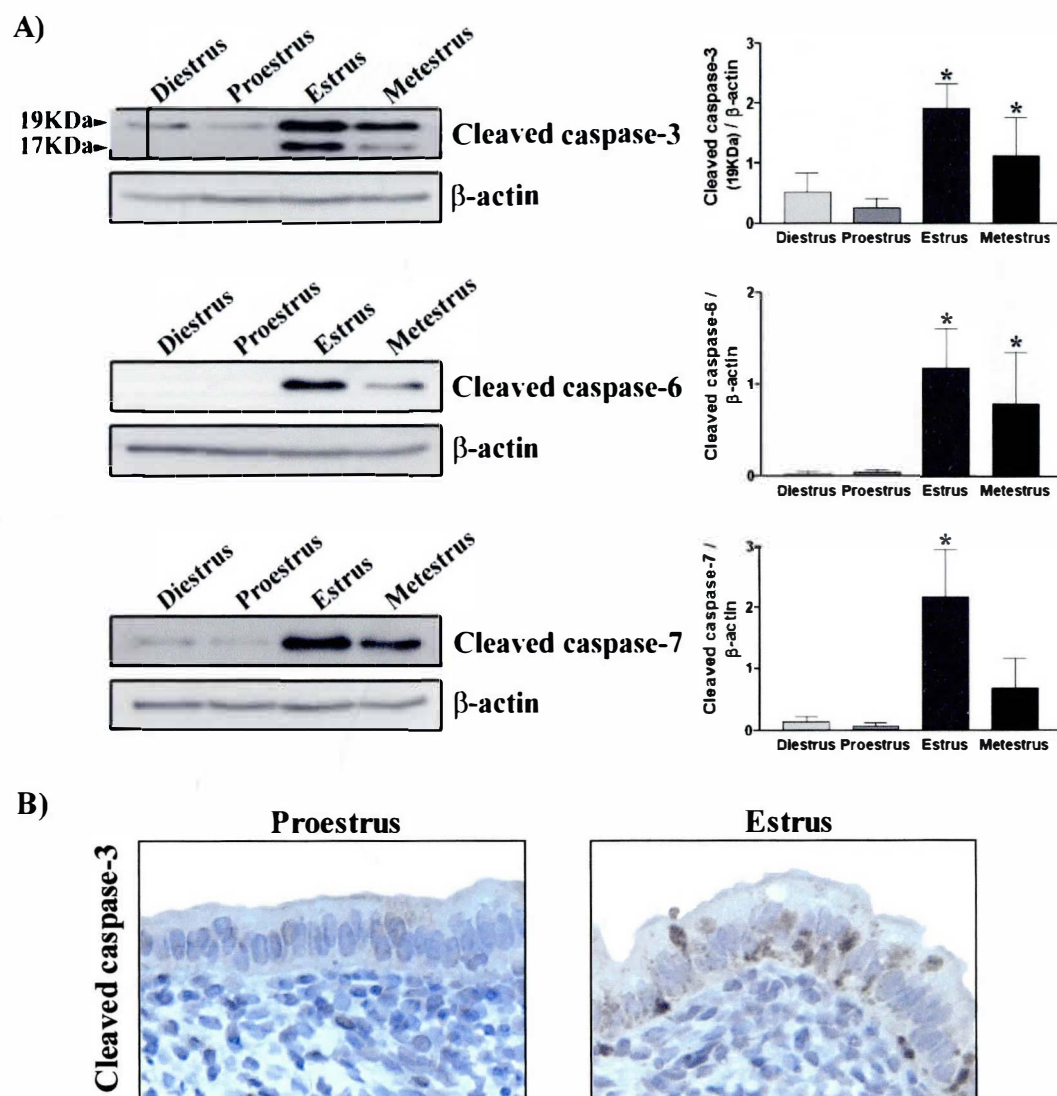


Figure 1 : Leblanc et al.

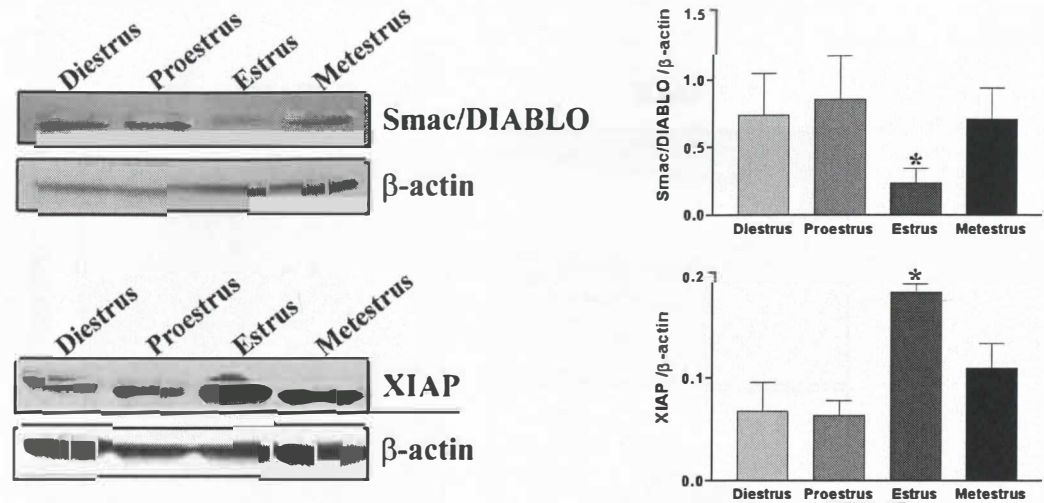


Figure 2 : Leblanc et al.

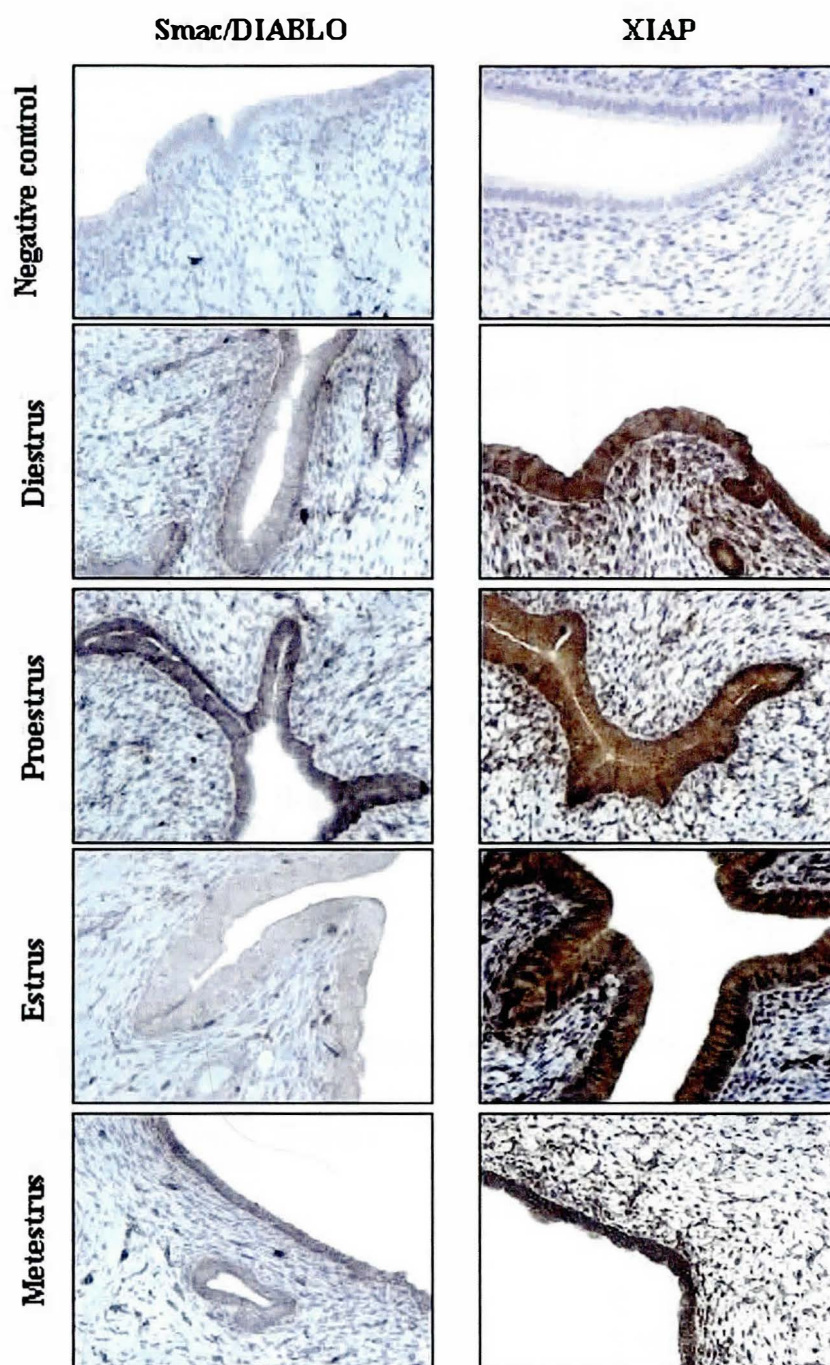


Figure 3 : Leblanc et al.

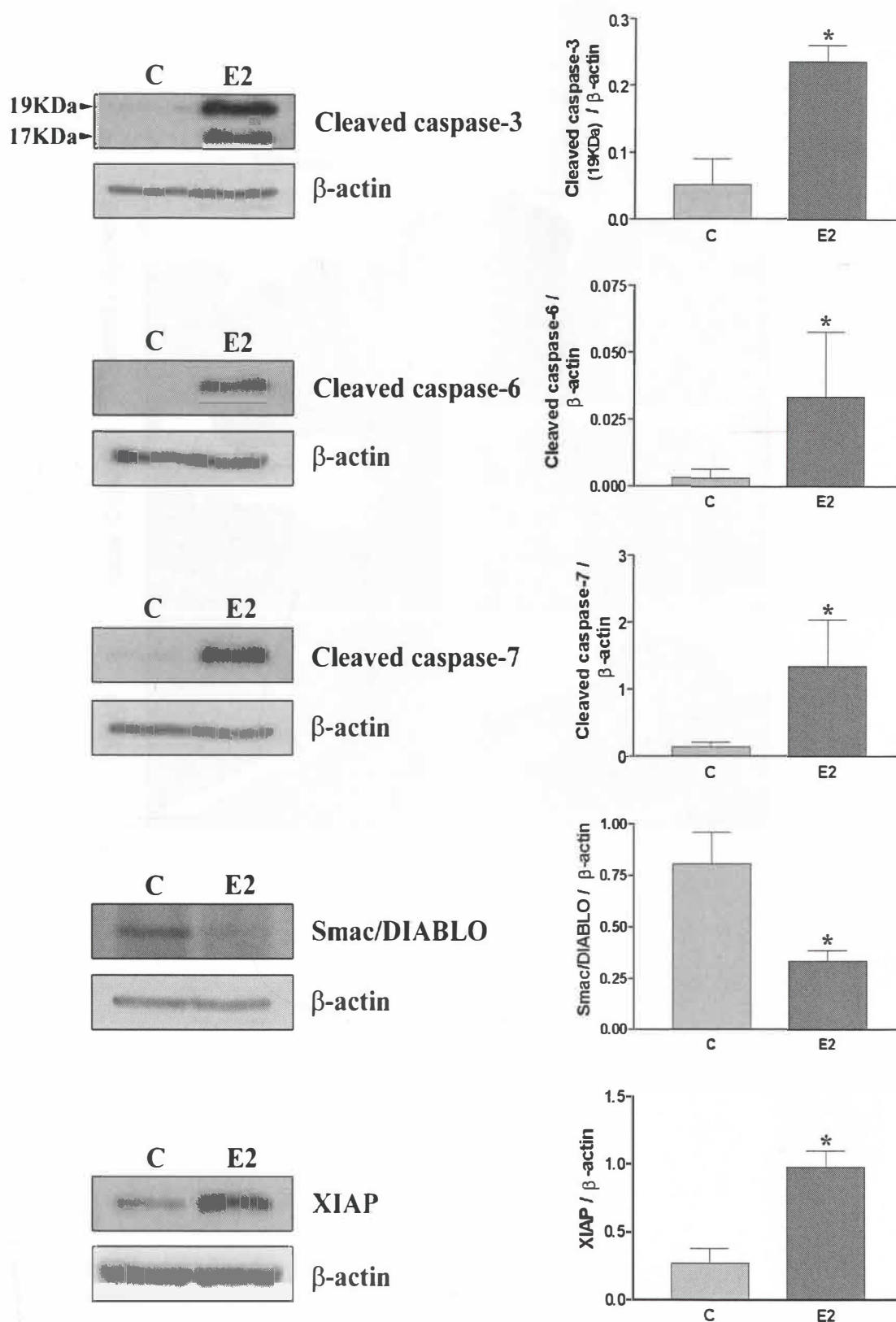


Figure 4 : Leblanc et al.

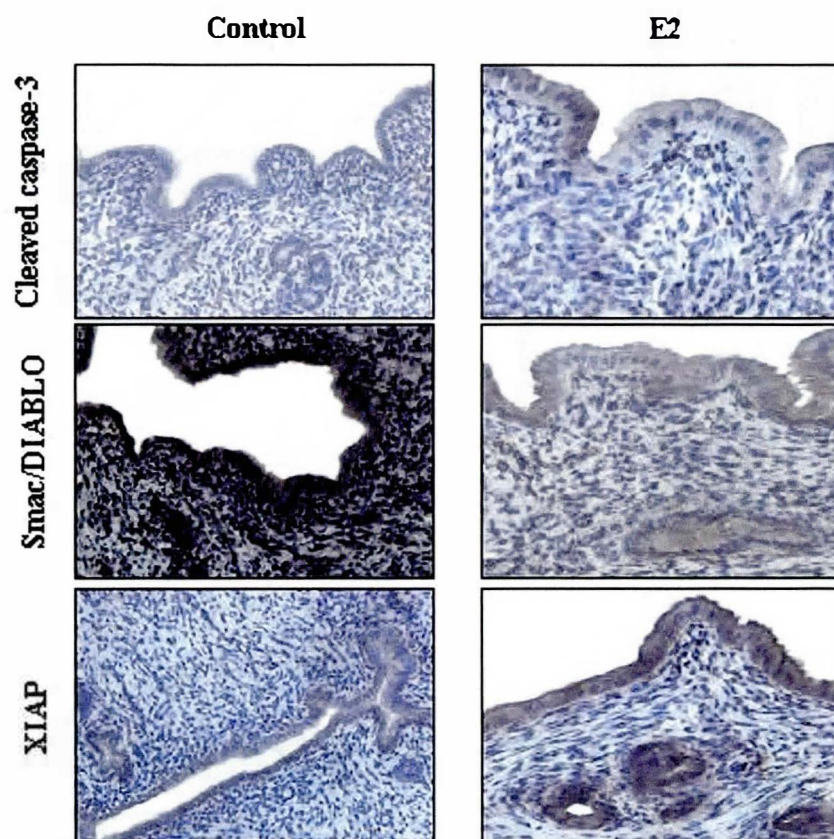


Figure 5 : Leblanc et al.

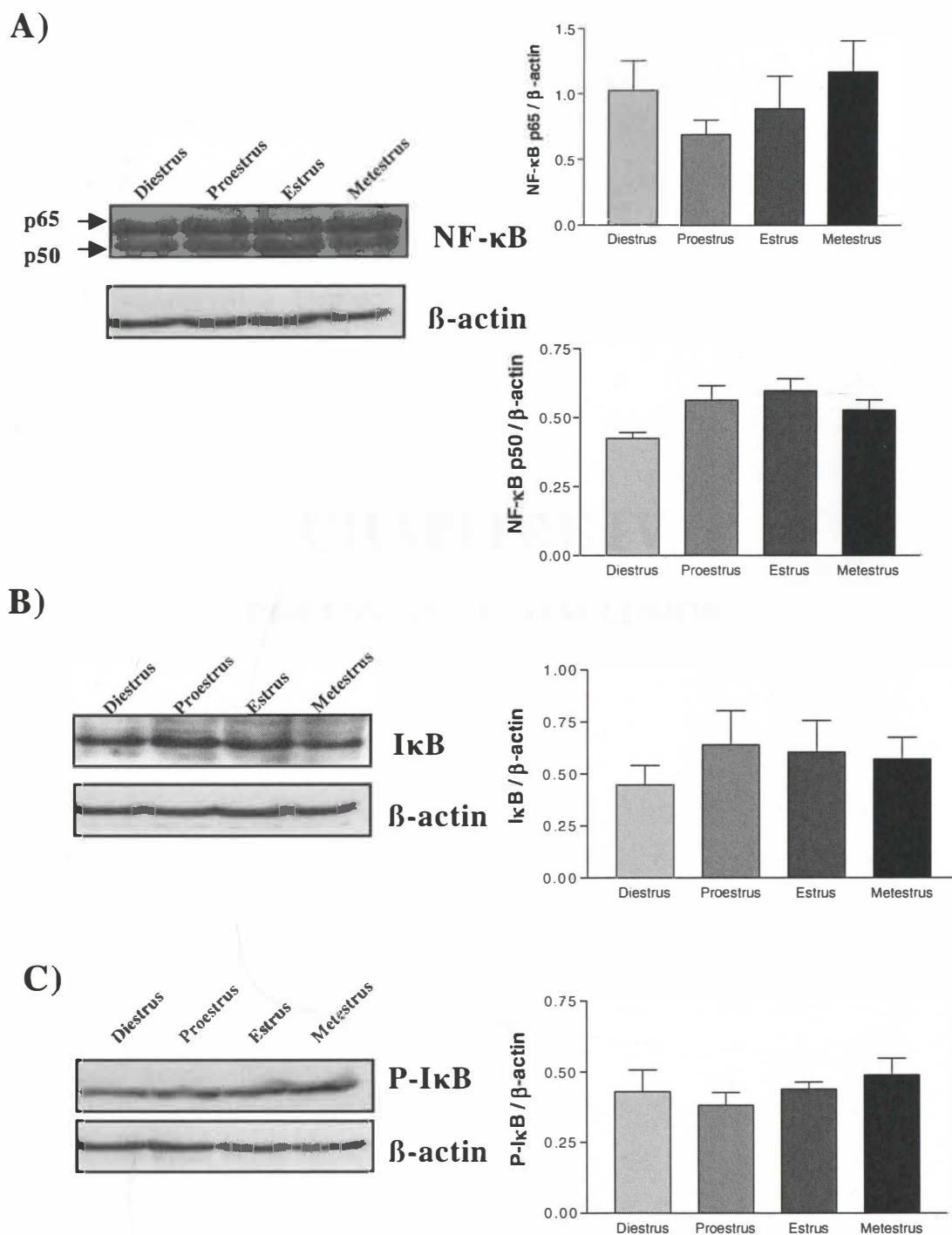


Figure 6 : Leblanc et al.

CHAPITRE IV

DISCUSSION ET CONCLUSION

DISCUSSION

La fidélité de l'apoptose est primordiale à la bonne marche d'un organisme, sa constance dans le tractus reproducteur permet d'initier rapidement un nouveau cycle en absence de facteurs embryonnaires. Toutefois, le déclenchement inopportun de l'apoptose peut engendrer de lourdes conséquences pour l'organisme, telle que l'échec de l'implantation embryonnaire, voire même l'infertilité. C'est pourquoi la cellule est dotée de mécanismes moléculaires et intracellulaires mettant en action des protéines anti-apoptotiques (Akt, XIAP, NF- κ B) et pro-apoptotiques (caspases, Smac/DIABLO, PTEN) qui créent un équilibre à l'intérieur de la cellule. À cet égard, vue l'absence de menstruations chez les rongeurs, il doit y avoir des mécanismes intracellulaires précis engagés dans la régulation de la destinée cellulaire de l'endomètre suite à la diminution de l'oestrogène en absence de facteurs embryonnaires. Cette étude contribue donc aux lacunes flagrantes de la littérature en ce qui à trait aux mécanismes moléculaires et intracellulaires impliqués dans la régulation de l'apoptose à l'intérieur de l'utérus. De ce fait, elle est la première à montrer la présence, l'activité et la régulation d'Akt, XIAP et Smac/DIABLO au sein du cycle oestral de la rate.

Dans l'endomètre, les stéroïdes ovariens participent activement à la balance entre la prolifération et la mort cellulaire. Ainsi, la croissance des cellules épithéliales de l'endomètre est dépendante de l'oestrogène et de la progestérone, le retrait de ces hormones induit la mort cellulaire chez le lapin et le hamster (Nawaz, 1987 ; Sandow, 1979). D'ailleurs, l'apoptose est présente dans des cellules épithéliales de l'endomètre suite à une ovariectomie ou à un traitement avec l'antiprogestin RU486 chez les lapins pseudogestants (Nawaz, 1987) ou en culture cellulaire primaire (Gerschenson, 1981 ; Lynch, 1986). De nombreux travaux ont mis en évidence l'implication d'Akt dans l'inhibition de l'apoptose via l'activation de plusieurs facteurs de survie (Datta, 1999). Puisque l'apoptose est confirmée dans l'endomètre et qu'une étude récente a illustré l'activation d'Akt en réponse à l'oestradiol (Stoica, 2003), notre hypothèse est qu'Akt pourrait être un important régulateur de la fonction utérine au cours du cycle oestral.

La première étude (chapitre II) confirme la présence de l'apoptose à l'oestrus dans l'endomètre utérin de la rate (Lai, 2000; Sato, 1997), ce qui corrobore les résultats obtenus chez la souris par l'équipe de Dharma (Dharma, 2001). De plus, elle tend à démontrer que la régulation de la voie de survie d'Akt est un facteur clé impliqué dans la régulation de la destinée des cellules endométriales lors du cycle oestral. Comme démontré précédemment par Sato et son équipe (Sato, 1997), l'apoptose est indéniable dans les cellules épithéliales de la lumière à l'oestrus et la prolifération est maximale au proestrus. Tout comme nous l'avions supposé, l'activité (phosphorylation) d'Akt est élevée au proestrus et Akt est fortement exprimée en plus d'être localisée dans l'épithélium de la lumière et des glandes. Par ailleurs, l'activité (phosphorylation) d'Akt régresse à l'oestrus de même que le marqueur de prolifération CDC47/MCM7, ce qui indique un faible taux de prolifération.

Bien que la phosphorylation d'Akt est réduite à l'oestrus, l'IHC révèle un patron de phosphorylation spécifique au niveau de l'expression de phospho-Akt dans les cellules épithéliales. En effet, phospho-Akt est principalement distribuée à la surface interne de la membrane plasmique du côté faisant face à la lumière utérine. La translocation de phospho-Akt à partir du noyau ou du cytoplasme vers la membrane plasmique suggère que sa présence au niveau de la membrane pourrait ne pas permettre l'activation de phospho-Akt pour la suite de la voie de signalisation. Une étude récente a démontrée que les associations membranaires transitoires sont requises à l'activation physiologique d'Akt, indiquant qu'une localisation subcellulaire adéquate est cruciale à l'activation des kinases, ce qui peut aussi permettre une inactivation appropriée par les phosphatases (Andjelkovic, 1997). À ce titre, PTEN est une phosphatase (Stambolic, 1998) active dans la membrane plasmique (Iijima, 2002). PTEN déphosphoryle les phospholipides PIP₃ lesquels sont essentiels à la phosphorylation d'Akt (Maehama, 1998). Les résultats ici présents montrent clairement que la protéine PTEN est présente dans l'endomètre et qu'elle n'est pas influencée par les changements hormonaux observés durant le cycle oestral. En fait, le recrutement d'Akt au niveau de la membrane pourrait être un mécanisme par lequel PTEN ou d'autres phosphatases inconnues agiraient afin d'inactiver la fonction d'Akt.

Puisque le niveau d'oestrogène est maximal au proestrus et diminue à l'oestrus, nous avons utilisé des rates ovariectomisées pour déterminer l'implication possible de l'oestradiol-17 β dans la régulation de la phosphorylation d'Akt. Akt et l'oestrogène sont impliqués dans la régulation et la signalisation cellulaire au sein de différents systèmes tels que : l'EGF, l'IGF-1, la GH (Martin, 2000, Shoba, 2001), eNOS (Simoncini, 2002) et la FSH (Gonzalez-Robayna, 2000). À l'aide de souris de type sauvage et de souris alpha ERKO («ER alpha knock-out»), il a été prouvé que ER α est nécessaire à l'induction de la réponse proliférative nucléaire utérine d'IGF-1 et que la signalisation d'IGF-1 est dépendante d'Akt (Klotz, 2002). De plus, chez les souris ERKO, de bas niveaux d'oxyde nitrique vasculaire ont été trouvés suggérant un rôle prépondérant pour ER α dans la régulation de ces processus (Rubanyi, 1997). Une étude a dernièrement établie qu'il y a une augmentation de l'activité d'Akt suite à une brève stimulation à l'oestradiol-17 β chez les cellules CHO transfectées avec ER α tandis que l'oestradiol-17 β n'a aucun effet sur l'activité d'Akt dans des cellules transfectées avec le vecteur contrôle ou avec ER β (Hisamoto, 2001). Les résultats actuels exposent l'augmentation de la phosphorylation d'Akt sous l'effet de l'oestradiol-17 β . Comme démontré au sein d'autres systèmes (Hisamoto, 2001), il est possible que l'activation des récepteurs de l'oestrogène active la phosphorylation d'Akt par l'entremise d'un mécanisme de signalisation cellulaire qui n'a pas encore été identifié jusqu'à maintenant dans l'endomètre.

PTEN est une protéine exprimée constitutivement et son expression ne fluctue pas tout au long des quatre phases du cycle oestral. Dans l'endomètre humain, PTEN est régulée par la progestérone (Mutter, 2000). Or, contrairement au cycle menstruel de la femme, le cycle oestral de la rate ne connaît pas de période de décidualisation utérine. Par conséquent, PTEN pourrait être une protéine importante impliquée dans le processus d'implantation embryonnaire lorsque la décidualisation s'initie plutôt que d'être impliquée dans la régulation du cycle oestral dans l'endomètre de la rate. Puisque nous avons établi précédemment dans les cellules cancéreuses ovariennes humaines et dans les cellules de la granulosa chez la rate que XIAP pourrait être impliquée dans la

régulation de l'activité d'Akt (Asselin, 2001), il est possible qu'Akt agisse sur cette famille d'inhibiteurs de l'apoptose afin de bloquer le processus apoptotique.

Dans la seconde étude (chapitre III), la régulation de XIAP et Smac/DIABLO dans l'utérus de la rate fut investiguée afin de déterminer leur importance et leur possible influence sur la survie et la mort des cellules endométriales relativement aux phases du cycle oestral. Ainsi, l'expression de XIAP est maximale à l'oestrus et augmente en réponse à E_2 chez les rates ovariectomisées. XIAP est fortement exprimée pendant l'oestrus dans l'épithélium de la lumière et des glandes et dans le stroma, sans doute pour protéger ces cellules de l'apoptose. Même si la stimulation de XIAP par E_2 est en accord avec l'activité mitogénique et l'inhibition de l'apoptose, le fait que l'expression de XIAP n'augmente pas au proestrus demeure nébuleux.

Une étude récente menée par Xiao et al. a prouvé que XIAP pourrait être directement régulée par la présence de «tumor necrosis factor- α » (TNF- α) dans les cellules de la granulosa de la rate (Xiao, 2001). Comme il a été illustré dans l'utérus de la souris que l'expression de l'ARNm du TNF- α est élevée à l'oestrus et qu'elle est régulée par l'oestrogène (De, 1992), un processus similaire pourrait procéder ainsi dans l'endomètre. Par conséquent, l'action de E_2 sur l'expression de XIAP pourrait être indirecte et pourrait aussi impliquer des facteurs spécifiques régulés par cette hormone. L'implication du TNF- α ou d'autres facteurs de croissance et/ou cytokines dans ce processus reste à être élucidée.

À l'inverse, Smac/DIABLO diminue à l'oestrus de même que lors des traitements avec E_2 sur les rates ovariectomisées. Ces résultats viennent encore une fois appuyer l'action mitogénique de l'oestrogène sur les cellules endométriales. Parce que Smac/DIABLO est une protéine pro-apoptotique, sa diminution pourrait être suffisante à l'activation de XIAP afin d'inhiber l'activité des caspases. La diminution de Smac/DIABLO étaye aussi nos résultats obtenus à l'oestrus en dévoilant la prédominance de l'apoptose dans les cellules épithéliales de la lumière utérine (Déry, 2003). De plus, la diminution de ce facteur pro-apoptotique lors de l'oestrus suggère qu'il pourrait bien disposer d'une

fonction clé dans le déclenchement de l'apoptose à ce moment précis du cycle oestral de la rate. À ce jour, il n'y a aucune information disponible dans la littérature démontrant que E₂ module l'expression de Smac/DIABLO, à cet égard ces constatations sont les premières à révéler ce mécanisme.

Les traitements à l'oestradiol-17 β engendrent le clivage des caspases-3, -6 et -7 dans les cellules endométriales. Ces résultats entrent en contradiction avec le fait que E₂ induit la prolifération des cellules endométriales au lieu d'induire l'activation de la cascade des caspases et l'apoptose. Même s'il a été établi que E₂ déclenche l'apoptose *in vitro* dans les lignées de cellules préostéoclastiques (Zecchi-Orlandini, 1999) et *in vivo* dans les thymocytes de souris ovariectomisées (Patel, 2002), il est peu probable que E₂ induise l'apoptose dans l'endomètre. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'à la suite des injections de E₂ faites aux rates ovariectomisées, des cellules endométriales en état de latence sont forcées de proliférer et peuvent se retrouver en situation de stress. D'ailleurs, le contrôle de la balance entre les facteurs de survie et de mort cellulaire est un mécanisme clé dans le maintien de l'homéostasie à l'intérieur de l'endomètre en prolifération. La hausse du clivage des caspases n'est pas nécessairement un signe de l'activation de l'apoptose. L'activité des caspases peut être bloquée par la présence d'un niveau élevé de XIAP (ou d'autres protéines inhibitrices d'apoptose connues ou inconnues comme les cIAPs (Gagnon, 2003)) et d'une faible concentration de Smac/DIABLO. Ce mécanisme particulier des cellules endométriales pourrait être important afin d'induire rapidement l'apoptose à un moment approprié du cycle (à l'oestrus par exemple) simplement par l'entremise de l'inhibition ou de la dégradation de XIAP par l'activité ligase de l'ubiquitine (Yang, 2000).

L'induction de l'activation des caspases en réponse à l'oestradiol-17 β peut également être expliqué par la présence et l'activité d'un métabolite naturel de E₂, soit le 2-méthoxyestradiol (2ME2). Ce dernier est un puissant agent anti-tumoral et anti-angiogénique (Pribluda, 2000) qui induit l'apoptose chez plusieurs types cellulaires (Schumacher, 2001). De plus, le 2ME2 est actuellement sous essai clinique comme thérapie contre le cancer (Schumacher, 2001). Il est un des principaux métabolites de

l'oestradiol retrouvé dans le sérum humain et en milieu de cycle il augmente tout comme l'oestradiol (Berg, 1983). Toutefois, des études ont montré que le 2ME2 agissait selon une voie de signalisation différente de E₂ (Dubey, 2000 et 2001). Une étude récente révèle qu'un traitement au 2ME2 résulte en une augmentation *in vitro* et *in vivo* de la régulation du récepteur de mort 5 (DR5), ce qui rendrait les cellules plus sensibles à l'activité cytotoxique du ligand de DR5 («tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand» ou TRAIL) (LaVallee, 2003). En plus, les toutes dernières études démontrent que l'induction de l'apoptose par le 2ME2 requière l'activation des caspases-8, -9 et -3 (LaVallee, 2003). Une autre étude récente expose aussi l'induction de la caspase-3 et de l'apoptose sous l'effet du 2ME2 dans les cellules du carcinome gastrique (Lin, 2001). Ces observations établies au sein d'autres systèmes et types cellulaires suggèrent que le 2ME2 pourrait être un élément d'investigation dans le but de déterminer comment E₂ est impliqué dans l'induction du clivage des caspases dans l'endomètre de la rate. À cet égard, il pourrait aussi être possible que l'activation des caspases ne soit pas due à l'action directe de E₂.

Le facteur nucléaire transcriptionnel Kappa B (NF- κ B) a fait l'objet de récentes études démontrant qu'il est la cible directe de P-Akt (Kane, 1999). NF- κ B est séquestré (sous-unités p65 et p50) dans le cytoplasme par les inhibiteurs I κ Bs lesquels sont phosphorylés par Akt. Suite à leur phosphorylation, les I κ Bs sont relargués et dégradés par ubiquitination, ensuite NF- κ B pénètre dans le noyau pour l'expression des gènes (Foo, 1999). Nous avons trouvé dans la littérature que le promoteur de XIAP est aussi une cible pour NF- κ B (Xiao, 2001; Stehlik, 1998). Depuis, nous avons prouvé l'activation d'Akt en réponse à l'oestradiol-17 β dans l'endomètre de la rate pendant que l'équipe de Kane a démontré qu'Akt activait la voie de signalisation de NF- κ B (Kane, 1999). Suite à cela, nous avons voulu savoir si la voie de signalisation Akt/NF- κ B/I κ B pouvait intervenir dans la régulation de l'expression de XIAP. Les résultats de la présente étude révèlent qu'il n'y a pas de différence dans l'expression de NF- κ B, I κ B ou la phosphorylation d'I κ B durant les quatre phases du cycle oestral, ce qui exclut l'implication de cette voie dans la régulation de l'expression de XIAP ou de Smac/DIABLO.

D'autres voies de signalisation en aval d'Akt, connues pour être régulées par cette kinase, sont actuellement investiguées dans notre laboratoire comme par exemple eNOS (Dimmeler, 1999 ; Fulton, 1999), Bad (Pastorino, 1999), GSK-3 β (Pap, 1998 ; van Weeren, 1998) et la caspase-9 (Zhou, 2000). Dernièrement un rapport démontrait que l'IGF-1 (insulin-like growth factor-1) induisait l'activation d'Akt et de NF- κ B, en plus de la phosphorylation du facteur de transcription Forkhead (FKHR) lequel, en retour, active une série de protéines intracellulaires anti-apoptotiques telles que XIAP (Mitsiades, 2002). Puisque FKHR est aussi une cible bien connue de l'action d'Akt (Brunet, 1999), la phosphorylation, l'activité et la régulation de ce facteur de transcription dans l'utérus nécessite de plus amples investigations.

CONCLUSION

En conclusion, cette étude expose pour la première fois la présence et la régulation de Akt, XIAP et Smac/DIABLO dans l'endomètre de la rate au cours du cycle oestral. De plus, elle démontre la régulation du facteur de survie Akt, ainsi que la régulation opposée de XIAP et Smac/DIABLO sous traitement à l'oestradiol-17 β . Des analyses plus approfondies seront nécessaires pour déterminer plus spécifiquement les voies de signalisation intracellulaires et moléculaires impliquées dans le processus apoptotique du tractus reproducteur femelle. L'implication du TNF- α ou d'autres cytokines ou facteurs de croissance tels que le TGF- β , l'IGF-1 ou l'EGF dans la régulation de la mort cellulaire programmée via Akt et les inhibiteurs de l'apoptose (XIAP ou cIAP-1 et cIAP-2), dans l'utérus de la rate reste à être élucidée. Dans cette optique, il semble aussi nécessaire de pousser la vérification au niveau 1) de l'expression des différentes isoformes d'Akt, 2) des autres phosphatases possiblement impliquées dans l'inactivation d'Akt, 3) de FKHR, 4) de XAF-1, une autre protéine antagoniste des IAPs, 5) des c-IAP1 et 2, 6) de la concentration de 2ME2 dans le sérum et de ses effets sur la rate. Des investigations sont en cours afin de caractériser le rôle et le mécanisme de nos protéines d'intérêt dans la survie et la mort cellulaire au moyen de culture de cellules épithéliales et stromales de l'endomètre.

Il sera ainsi possible de déterminer plus exactement par quel mécanisme Akt, XIAP et Smac/DIABLO sont régulées. Car, une fois que le processus apoptotique est enclenché, la cellule s'engage irrémédiablement vers une mort certaine. Comprendre les voies et interactions de l'apoptose intervenant lors du cycle, c'est découvrir les véritables raisons de l'infertilité féminine marquée par l'échec de l'implantation embryonnaire, puisqu'en dépit du perfectionnement des méthodes de stimulation ovarienne et des techniques de fécondation *in vitro* certaines femmes ne parviennent toujours pas à concevoir. De là, il sera possible de diminuer le taux d'infertilité et d'améliorer les méthodes de contraception chez l'humain.

BIBLIOGRAPHIE

- Abrahamsohn, P.A., Zorn, T.M. (1993) "Implantation and decidualization in rodents.", *J Exp Zool.* 266(6):603-28.
- Ali, I.U. (2000) "Gatekeeper for endometrium: the PTEN tumor suppressor gene.", *J Natl Cancer Inst.* 92(11):861-3.
- Andjelkovic, M., Alessi, D.R., Meier, R., Fernandez, A., Lamb, N.J., Frech, M., Cron, P., Cohen, P., Lucocq, J.M., Hemmings, B.A. (1997) "Role of translocation in the activation and function of protein kinase B.", *J Biol Chem* 272:31515-31524.
- Arnt, C.R., Chiorean, M.V., Heldebrant, M.P., Gores, G.J., Kaufmann, S.H. (2002) "Synthetic Smac/DIABLO peptides enhance the effects of chemotherapeutic agents by binding XIAP and cIAP1 in situ.", *J Biol Chem.* 277(46):44236-43.
- Asselin, E., Mills, G.B., Tsang, B.K. (2001) "XIAP regulates Akt activity and caspase-3-dependent cleavage during cisplatin-induced apoptosis in human ovarian epithelial cancer cells.", *Cancer Res* 61:1862-1868.
- Asselin, E., Wang, Y., Tsang, B.K. (2001) "X-linked inhibitor of apoptosis protein activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in rat granulosa cells during follicular development.", *Endocrinology* 142:2451-2457.
- Berg, D., Sonsalla, R., Kuss, E. (1983) "Concentrations of 2-methoxyoestrogens in human serum measured by a heterologous immunoassay with an 125I-labelled ligand.", *Acta Endocrinol (Copenh).* 103(2):282-8.
- Bergamaschi, G., Rosti, V., Danova, M., Lucotti, C., Cazzola, M. (1994) "Apoptosis: biological and clinical aspects.", *Haematologica.* 79:86-93.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J., Greenberg, M.E. (1999) "Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor.", *Cell* 96:857-868.
- Cardone, M.H., Roy, N., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Franke, T.F., Stanbridge, E., Frisch, S., Reed, J.C. (1998) "Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation.", *Science.* 282(5392):1318-21.
- Castoria, G., Migliaccio, A., Bilancio, A., Di Domenico, M., de Falco, A., Lombardi, M., Fiorentino, R., Varricchio, L., Barone, M.V., Auricchio, F. (2001) "PI3-kinase in concert with Src promotes the S-phase entry of oestradiol-stimulated MCF-7 cells.", *EMBO J* 20:6050-6059.

- Caulin, C., Salvesen, G.S., Oshima, R.G. (1997) "Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis.", *J Cell Biol* 138:1379-1394.
- Chai, J., Du, C., Wu, J.W., Kyin, S., Wang, X., Shi, Y. (2000) "Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO.", *Nature* 406:855-862.
- Cohen, G.M. (1997) "Caspases: the executioners of apoptosis.", *Biochem J.* 326 (Pt 1):1-16.
- Creagh, E.M., Martin, S.J. (2001) "Caspases: cellular demolition experts.", *Biochem Soc Trans.* 29(Pt 6):696-702.
- Dahia, P.L.M. (2000) "PTEN, a unique tumor suppressor gene.", *Endocrine-Related Cancer* 7 115-129.
- Datta, S.R., Brunet, A., Greenberg, M.E. (1999) "Cellular survival: a play in three Acts.", *Genes Dev.* 13(22):2905-27.
- Davies, M.A., Koul, D., Dhesi, H., Berman, R., McDonnell, T.J., McConkey, D., Yung, W.K., Steck, P.A. (1999) "Regulation of Akt/PKB activity, cellular growth, and apoptosis in prostate carcinoma cells by MMAC/PTEN.", *Cancer Res* 59:2551-2556.
- De, M., Sanford, T.R., Wood, G.W. (1992) "Interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor alpha are produced in the mouse uterus during the estrous cycle and are induced by estrogen and progesterone.", *Dev Biol* 151:297-305.
- Dery, M.C., Leblanc, V., Shooner, C., Asselin, E. (2003) "Regulation of Akt expression and phosphorylation by 17beta-estradiol in the rat uterus during estrous cycle.", *Reprod Biol Endocrinol* 1:47.
- Deveraux, Q.L., Leo, E., Stennicke, H.R., Welsh, K., Salvesen, G.S., Reed, J.C. (1999) "Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases.", *EMBO J.* 18(19):5242-51.
- Deveraux, Q.L., Reed, J.C. (1999) "IAP family proteins--suppressors of apoptosis.", *Genes Dev.* 13(3):239-52.
- Deveraux, Q.L., Takahashi, R., Salvesen, G.S., Reed, J.C. (1997) "X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases.", *Nature* 388:300-304.
- Dharma, S.J., Kholkute, S.D., Nandedkar, T.D. (2001) "Apoptosis in endometrium of mouse during estrous cycle.", *Indian J Exp Biol.* 39(3):218-22.
- Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R., Zeiher, A.M. (1999) "Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation.", *Nature* 399:601-605.

Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., Wang, X. (2000) "Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition.", *Cell*. 102(1):33-42.

Duan, R., Xie, W., Li, X., McDougal, A., Safe, S. (2002) "Estrogen regulation of c-fos gene expression through phosphatidylinositol-3-kinase-dependent activation of serum response factor in MCF-7 breast cancer cells.", *Biochem Biophys Res Commun* 294:384-394.

Dubey, R.K., Gillespie, D.G., Zacharia, L.C., Rosselli, M., Korzekwa, K.R., Fingerle, J., Jackson, E.K. (2000) "Methoxyestradiols mediate the antimitogenic effects of estradiol on vascular smooth muscle cells via estrogen receptor-independent mechanisms.", *Biochem Biophys Res Commun* 278:27-33.

Dubey, R.K., Jackson, E.K., Keller, P.J., Imthurn, B., Rosselli, M. (2001) "Estradiol metabolites inhibit endothelin synthesis by an estrogen receptor-independent mechanism.", *Hypertension* 37:640-644.

Duc-Goiran, P., Mignot, T.M., Bourgeois, C., Ferre, F. (1999) "Embryo-maternal interactions at the implantation site: a delicate equilibrium.", *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 83(1):85-100.

Duckett, C.S., Nava, V.E., Gedrich, R.W., Clem, R.J., Van Dongen, J.L., Gilfillan, M.C., Shiels, H., Hardwick, J.M., Thompson, C.B. (1996) "A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors.", *EMBO J*. 15(11):2685-94.

Finn, C.A., Publicover, M. (1981) "Hormonal control of cell death in the luminal epithelium of the mouse uterus.", *J Endocrinol* 91:335-340.

Foo, S.Y., Nolan, G.P. (1999) "NF-kappaB to the rescue: RELs, apoptosis and cellular transformation.", *Trends Genet* 15:229-235.

Fresno Vara, J.A., Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C., Gonzalez-Baron, M. (2004) "PI3K/Akt signalling pathway and cancer.", *Cancer Treat Rev*. 30(2):193-204.

Fulton, D., Gratton, J.P., McCabe, T.J., Fontana, J., Fujio, Y., Walsh, K., Franke, T.F., Papapetropoulos, A., Sessa, W.C. (1999) "Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt.", *Nature* 399:597-601.

Gagnon, V., St-Germain, M.E., Parent, S., Asselin, E. (2003) "Akt activity in endometrial cancer cells: regulation of cell survival through cIAP-1.", *Int J Oncol* 23:803-810.

Gerschenson, L.E., Depaoli, J.R., Murai, J.T. (1981) "Inhibition of estrogen-induced proliferation of cultured rabbit uterine epithelial cells by a cell density-dependent factor produced by the same cells.", *J Steroid Biochem* 14:959-969.

Gonzalez-Robayna, I.J., Falender, A.E., Ochsner, S., Firestone, G.L., Richards, J.S. (2000) "Follicle-Stimulating hormone (FSH) stimulates phosphorylation and activation of protein kinase B (PKB/Akt) and serum and glucocorticoid-induced kinase (Sgk): evidence for A kinase-independent signaling by FSH in granulosa cells.", *Mol Endocrinol* 14:1283-1300.

Goodman, H.m. (2003) "Basic Medical endocrinology", 3e éd., Academic Press, San Diego, U.S.A., pp.391-456.

Greep, R.O. (1977) "Reproductive physiology II", University Park Press, Baltimore, pp.284.

Gustin, J.A., Maehama, T., Dixon, J.E., Donner, D.B. (2001) "The PTEN tumor suppressor protein inhibits tumor necrosis factor-induced nuclear factor kappa B activity.", *J Biol Chem*. 276(29):27740-4.

Hall, J.M., Couse, J.F., Korach, K.S. (2001) "The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling.", *J Biol Chem*. 276(40):36869-72.

Hayakawa, J., Ohmichi, M., Kurachi, H., Kanda, Y., Hisamoto, K., Nishio, Y., Adachi, K., Tasaka, K., Kanzaki, T., Murata, Y. (2000) "Inhibition of BAD phosphorylation either at serine 112 via extracellular signal-regulated protein kinase cascade or at serine 136 via Akt cascade sensitizes human ovarian cancer cells to cisplatin.", *Cancer Res* 60:5988-5994.

Heffner, L.J. (2003) "Reproduction humaine", Édition De boeck University, Paris, pp.123.

Herrera, B., Fernandez, M., Benito, M., Fabregat, I. (2002) "cIAP-1, but not XIAP, is cleaved by caspases during the apoptosis induced by TGF-beta in fetal rat hepatocytes.", *FEBS Lett*. 520(1-3):93-6.

Hisamoto, K., Ohmichi, M., Kurachi, H., Hayakawa, J., Kanda, Y., Nishio, Y., Adachi, K., Tasaka, K., Miyoshi, E., Fujiwara, N., Taniguchi, N., Murata, Y. (2001) "Estrogen induces the Akt-dependent activation of endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial cells.", *J Biol Chem* 276:3459-3467.

Hlobilkova, A., Knillova, J., Bartek, J., Lukas, J., Kolar, Z. (2003) "The mechanism of action of the tumour suppressor gene PTEN.", *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 147(1):19-25.

Hofer-Warbinek, R., Schmid, J.A., Stehlik, C., Binder, B.R., Lipp, J., de Martin, R. (2000) "Activation of NF-kappa B by XIAP, the X chromosome-linked inhibitor of apoptosis, in endothelial cells involves TAK1.", *J Biol Chem*. 275(29):22064-8.

Holcik, M., Gibson, H., Korneluk, R.G. (2001) "XIAP: apoptotic brake and promising therapeutic target.", *Apoptosis*. 6(4):253-61.

Hou, S., Guan, H., Ricciardi, R.P. (2003) "Phosphorylation of serine 337 of NF-kappaB p50 is critical for DNA binding.", *J Biol Chem.* 278(46):45994-8.

Idelman, S. Verdeti, J. (2000) "Endocrinologie et communications cellulaires", EDP Sciences, Grenoble, pp.417-441.

Iijima, M., Devreotes, P. (2002) "Tumor suppressor PTEN mediates sensing of chemoattractant gradients.", *Cell* 109:599-610.

Kane, L.P., Shapiro, V.S., Stokoe, D., Weiss, A. (1999) "Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase.", *Curr Biol* 9:601-604.

Kennedy, S.G., Wagner, A.J., Conzen, S.D., Jordan, J., Bellacosa, A., Tsichlis, P.N., Hay, N. (1997) "The PI 3-kinase/Akt signaling pathway delivers an anti-apoptotic signal.", *Genes Dev* 11:701-713.

Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R. (1972) "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.", *Br J Cancer.* 26:239-57.

Kiess, W., Gallaher, B. (1998) "Hormonal control of programmed cell death/apoptosis.", *Eur J Endocrinol.* 138(5):482-91.

Klotz, D.M., Hewitt, S.C., Ciana, P., Raviscioni, M., Lindzey, J.K., Foley, J., Maggi, A., DiAugustine, R.P., Korach, K.S. (2002) "Requirement of estrogen receptor-alpha in insulin-like growth factor-1 (IGF-1)-induced uterine responses and in vivo evidence for IGF-1/estrogen receptor cross-talk.", *J Biol Chem* 277:8531-8537.

Kumar, A., Takade, Y., Boriek, A.M., Aggarwal, B.B. (2004) "Nuclear factor-kB: its role in health and disease.", *J Mol Med* 82:434-448.

LaCasse, E.C., Baird, S., Korneluk, R.G., Mackenzie, A.E. (1998) "The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer.", *Oncogene* 17:3247-3259.

Lai, M.D., Lee, L.R., Cheng, K.S., Wing, L.Y. (2000) "Expression of proliferating cell nuclear antigen in luminal epithelium during the growth and regression of rat uterus.", *J Endocrinol* 166:87-93.

LaVallee, T.M., Zhan, X.H., Johnson, M.S., Herbst, C.J., Swartz, G., Williams, M.S., Hembrough, W.A., Green, S.J., Pribluda, V.S. (2003) "2-methoxyestradiol up-regulates death receptor 5 and induces apoptosis through activation of the extrinsic pathway.", *Cancer Res.* 63(2):468-75.

Lazebnik, Y.A., Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Poirier, G.G., Earnshaw, W.C. (1994) "Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE.", *Nature* 371:346-347.

- Leaman, D.W., Chawla-Sarkar, M., Vyas, K., Reheman, M., Tamai, K., Toji, S., Borden, E.C. (2002) "Identification of X-linked inhibitor of apoptosis-associated factor-1 as an interferon-stimulated gene that augments TRAIL Apo2L-induced apoptosis.", *J Biol Chem.* 277(32):28504-11.
- Li, L., Liu, F., Salmonsens, R.A., Turner, T.K., Litofsky, N.S., Di Cristofano, A., Pandolfi, P.P., Jones, S.N., Recht, L.D., Ross, A.H. (2002) "PTEN in neural precursor cells: regulation of migration, apoptosis, and proliferation.", *Mol Cell Neurosci.* 20(1):21-9.
- Lin, H.L., Liu, T.Y., Wu, C.W., Chi, C.W. (2001) "2-Methoxyestradiol-induced caspase-3 activation and apoptosis occurs through G(2)/M arrest dependent and independent pathways in gastric carcinoma cells.", *Cancer* 92:500-509.
- Liston, P., Fong, W.G., Kelly, N.L., Toji, S., Miyazaki, T., Conte, D., Tamai, K., Craig, C.G., McBurney, M.W., Korneluk, R.G. (2001) "Identification of XAF1 as an antagonist of XIAP anti-Caspase activity.", *Nat Cell Biol.* 3(2):128-33.
- Liu, Z., Sun, C., Olejniczak, E.T., Meadows, R.P., Betz, S.F., Oost, T., Herrmann, J., Wu, J.C., Fesik, S.W. (2000) "Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain.", *Nature* 408:1004-1008.
- Lynch, M.P., Nawaz, S., Gerschenson, L.E. (1986) "Evidence for soluble factors regulating cell death and cell proliferation in primary cultures of rabbit endometrial cells grown on collagen.", *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:4784-4788.
- Maehama, T., Dixon, J.E. (1998) "The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate.", *J Biol Chem* 273:13375-13378.
- Marieb, E.N., Laurendeau, G., (1993) "Anatomie et physiologie humaines", ERPI, Canada, p. 950.
- Martin, L., Pollard, J.W., Fagg, B. (1976) "Oestriol, oestradiol-17beta and the proliferation and death of uterine cells.", *J Endocrinol* 69:103-115.
- Martin, M.B., Franke, T.F., Stoica, G.E., Chambon, P., Katzenellenbogen, B.S., Stoica, B.A., McLemore, M.S., Olivo, S.E., Stoica, A. (2000) "A role for Akt in mediating the estrogenic functions of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I.", *Endocrinology* 141:4503-4511.
- Mitsiades, C.S., Mitsiades, N., Poulaki, V., Schlossman, R., Akiyama, M., Chauhan, D., Hideshima, T., Treon, S.P., Munshi, N.C., Richardson, P.G., Anderson, K.C. (2002) "Activation of NF-kappaB and upregulation of intracellular anti-apoptotic proteins via the IGF-1/Akt signaling in human multiple myeloma cells: therapeutic implications.", *Oncogene* 21:5673-5683.

Mooberry, S.L. (2003) "Mechanism of action of 2-methoxyestradiol: new developments.", *Drug Resist Updat.* 6(6):355-61.

Moulton, B.C., Akcali, K.C., Ogle, T.F., Brown, T.H., Motz, J., Khan, S.A. (1997) "Control of apoptosis in the uterus during decidualization.", *Cell Death in Reproductive Physiology*. Edits: Tilly J, Strauss JF, Tenniswood M, Springer Verlag New York Inc. pp. 48-66.

Mutter, G.L., Lin, M.C., Fitzgerald, J.T., Kum, J.B., Eng, C. (2000) "Changes in endometrial PTEN expression throughout the human menstrual cycle.", *J Clin Endocrinol Metab* 85:2334-2338.

Nachmias, B., Ashhab, Y., Ben-Yehuda, D. (2004) "The inhibitor of apoptosis protein family (IAPs): an emerging therapeutic target in cancer.", *Semin Cancer Biol.* 14(4):231-43.

Nawaz, S., Lynch, M.P., Galand, P., Gerschenson, L.E. (1987) "Hormonal regulation of cell death in rabbit uterine epithelium.", *Am J Pathol* 127:51-59.

Nephew, K.P., Ray, S., Hlaing, M., Ahluwalia, A., Wu, S.D., Long, X., Hyder, S.M., Bigsby, R.M. (2000) "Expression of estrogen receptor coactivators in the rat uterus.", *Biol Reprod.* 63(2):361-7.

Nicholson, D.W., Ali, A., Thornberry, N.A., Vaillancourt, J.P., Ding, C.K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P.R., Labelle, M., Lazebnik, Y.A. (1995) "Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis.", *Nature* 376:37-43.

Ogle, T.F. (2002) "Progesterone-action in the decidual mesometrium of pregnancy.", *Steroids.* 67(1):1-14.

Otsuki, Y., (2001) "Apoptosis in human endometrium : apoptotic detection methods and signaling", *Med Electron Microsc* 34:166-173.

Pampfer, S., Donnay, I. (1999) "Apoptosis at the time of embryo implantation in mouse and rat.", *Cell Death Differ.* 6(6):533-45.

Pap, M., Cooper, G.M. (1998) "Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt cell survival pathway.", *J Biol Chem* 273:19929-19932.

Parr, E.L., Tung, H.N., Parr, M.B. (1987) "Apoptosis as the mode of uterine epithelial cell death during embryo implantation in mice and rats.", *Biol Reprod.* 36(1):211-25.

Pastorino, J.G., Tafani, M., Farber, J.L. (1999) "Tumor necrosis factor induces phosphorylation and translocation of BAD through a phosphatidylinositide-3-OH kinase-dependent pathway.", *J Biol Chem* 274:19411-19416.

- Patel, H., Hoffman-Goetz, L. (2002) "Effects of oestrogen and exercise on caspase-3 activity in primary and secondary lymphoid compartments in ovariectomized mice.", *Acta Physiol Scand* 176:177-184.
- Petrocelli, T., Slingerland, J.M. (2001) "PTEN deficiency: a role in mammary carcinogenesis.", *Breast Cancer Res.* 3(6):356-60.
- Prasad, S.C., Thraves, P.J., Kuettel, M.R., Srinivasarao, G.Y., Dritschilo, A., Soldatenkov, V.A. (1998) "Apoptosis-associated proteolysis of vimentin in human prostate epithelial tumor cells.", *Biochem Biophys Res Commun* 249:332-338.
- Pribluda, V.S., Gubish, E.R., Jr., LaVallee, T.M., Treston, A., Swartz, G.M., Green, S.J. (2000) "2-Methoxyestradiol: an endogenous antiangiogenic and antiproliferative drug candidate.", *Cancer Metastasis Rev* 19:173-179.
- Quarmby, V.E., Korach, K.S. (1984) "The influence of 17 beta-estradiol on patterns of cell division in the uterus.", *Endocrinology* 114:694-702.
- Roche "Apoptosis, Cell Death and Cell Proliferation Manual", 3rd edition., Roche Applied Science pp.2.
- Rubanyi, G.M., Freay, A.D., Kauser, K., Sukovich, D., Burton, G., Lubahn, D.B., Couse, J.F., Curtis, S.W., Korach, K.S. (1997) "Vascular estrogen receptors and endothelium-derived nitric oxide production in the mouse aorta. Gender difference and effect of estrogen receptor gene disruption.", *J Clin Invest* 99:2429-2437.
- Salvesen, G.S., Duckett, C.S. (2002) "IAP proteins: blocking the road to death's door.", *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3(6):401-10.
- Sadow, B.A., West, N.B., Norman, R.L., Brenner, R.M. (1979) "Hormonal control of apoptosis in hamster uterine luminal epithelium.", *Am J Anat* 156:15-35.
- Sato, T., Fukazawa, Y., Kojima, H., Enari, M., Iguchi, T., Ohta, Y. (1997) "Apoptotic cell death during the estrous cycle in the rat uterus and vagina.", *Anat Rec* 248:76-83.
- Schumacher, G., Neuhaus, P. (2001) "The physiological estrogen metabolite 2-methoxyestradiol reduces tumor growth and induces apoptosis in human solid tumors.", *J Cancer Res Clin Oncol.* 127(7):405-10.
- Schwartzman, R.A., Cidlowski, J.A. (1993) "Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death.", *Endocr Rev.* 2:133-51.
- Shoba, L.N., Newman, M., Liu, W., Lowe, W.L., Jr. (2001) "LY 294002, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, inhibits GH-mediated expression of the IGF-I gene in rat hepatocytes.", *Endocrinology* 142:3980-3986.

Simoncini, T., Varone, G., Fornari, L., Mannella, P., Luisi, M., Labrie, F., Genazzani, A.R. (2002) "Genomic and nongenomic mechanisms of nitric oxide synthesis induction in human endothelial cells by a fourth-generation selective estrogen receptor modulator.", *Endocrinology* 143:2052-2061.

Spornitz, U.M., Socin, C.D., Dravid, A.A. (1999) "Estrous stage determination in rats by means of scanning electron microscopic images of uterine surface epithelium.", *Anat Rec.* 254(1):116-26.

Srinivasula, S.M., Datta, P., Fan, X.J., Fernandes-Alnemri, T., Huang, Z., Alnemri, E.S. (2000) "Molecular determinants of the caspase-promoting activity of Smac/DIABLO and its role in the death receptor pathway.", *J Biol Chem.* 275(46):36152-7.

Steffan, N.M., Bren, G.D., Frantz, B., Tocci, M.J., O'Neill, E.A., Paya, C.V. (1995) "Regulation of I κ B α phosphorylation by PKC- and Ca(2+)-dependent signal transduction pathways.", *J Immunol* 155:4685-4691.

Stehlik, C., de Martin, R., Kumabashiri, I., Schmid, J.A., Binder, B.R., Lipp, J. (1998) "Nuclear factor (NF)- κ B-regulated X-chromosome-linked iap gene expression protects endothelial cells from tumor necrosis factor α -induced apoptosis.", *J Exp Med* 188:211-216.

Stephens, L., Anderson, K., Stokoe, D., Erdjument-Bromage, H., Painter, G.F., Holmes, A.B., Gaffney, P.R., Reese, C.B., McCormick, F., Tempst, P., Coadwell, J., Hawkins, P.T. (1998) "Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B.", *Science* 279:710-714.

St-Germain, M.E., Gagnon, V., Parent, S., Asselin, E. (2004) "Regulation of COX-2 protein expression by Akt in endometrial cancer cells is mediated through NF- κ B/I κ B pathway.", *Mol Cancer.* 3(1):7.

Stoica, G.E., Franke, T.F., Wellstein, A., Czubayko, F., List, H.J., Reiter, R., Morgan, E., Martin, M.B., Stoica, A. (2003) "Estradiol Rapidly Activates Akt via the ErbB2 Signaling Pathway.", *Mol Endocrinol*, in press.

Song, G., Ouyang, G., Bao, S. (2005) "The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival.", *J Cell Mol Med.* 9(1):59-71.

Stambolic, V., Suzuki, A., de la Pompa, J.L., Brothers, G.M., Mirtsos, C., Sasaki, T., Ruland, J., Penninger, J.M., Siderovski, D.P., Mak, T.W. (1998) "Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN.", *Cell* 95:29-39.

Sugatani, T., Alvarez, U., Hruska, K.A. (2003) "PTEN regulates RANKL- and osteopontin-stimulated signal transduction during osteoclast differentiation and cell motility.", *J Biol Chem.* 278(7):5001-8.

Sun, X.Y., Li, F.X., Li, J., Tan, Y.F., Piao, Y.S., Tang, S., Wang, Y.L. (2004) "Determination of genes involved in the early process of embryonic implantation in rhesus monkey (*Macaca mulatta*) by suppression subtractive hybridization.", *Biol Reprod.* 70(5):1365-73.

Suzuki, Y., Nakabayashi, Y., Takahashi, R. (2001) "Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death.", *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:8662-8667.

Takahashi, R., Deveraux, Q., Tamm, I., Welsh, K., Assa-Munt, N., Salvesen, G.S., Reed, J.C. (1998) "A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases.", *J Biol Chem* 273:7787-7790.

Tessier, C., Prigent-Tessier, A., Ferguson-Gottschall, S., Gu, Y., Gibori, G. (2001) "PRL antiapoptotic effect in the rat decidua involves the PI3K/protein kinase B-mediated inhibition of caspase-3 activity.", *Endocrinology* 142:4086-4094.

Testa, J.R., Bellacosa, A. (2001) "AKT plays a central role in tumorigenesis.", *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(20):10983-5.

Thibeault, C., Levasseur, M.C. (2001) "La reproduction chez les mammifères et l'homme.", Ellipses, Paris, 928p.

Thornberry, N.A., Lazebnik, Y. (1998) "Caspases: enemies within.", *Science.* 281(5381):1312-6.

Toker, A. (2000) "Protein kinases as mediators of phosphoinositide 3-kinase signaling.", *Mol Pharmacol.* 57(4):652-8.

van Weeren, P.C., de Bruyn, K.M., Vries-Smits, A.M., van Lint, J., Burgering, B.M. (1998) "Essential role for protein kinase B (PKB) in insulin-induced glycogen synthase kinase 3 inactivation. Characterization of dominant-negative mutant of PKB.", *J Biol Chem* 273:13150-13156.

Vaughan, A.T., Betti, C.J., Villalobos, M.J. (2002) "Surviving apoptosis", *Apoptosis.* 7(2):173-7.

Verhagen, A.M., Ekert, P.G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L.M., Reid, G.E., Moritz, R.L., Simpson, R.J., Vaux, D.L. (2000) "Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins.", *Cell.* 102(1):43-53.

Verhagen, A.M., Vaux, D.L. (2002) "Cell death regulation by the mammalian IAP antagonist Diablo/Smac.", *Apoptosis.* 7(2):163-6.

- Waynforth, H.B., Flecknell, P.A. (1992) "Experimental and surgical technique in the rat.", 2e éd., Academic Press, San Diego, U.S.A., pp.256-257
- Wolf, B.B., Green, D.R. (1999) "Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases.", *J Biol Chem.* 274(29):20049-52.
- Wu, X., Pang, S.T., Sahlin, L., Blanck, A., Norstedt, G., Flores-Morales, A. (2003) "Gene expression profiling of the effects of castration and estrogen treatment in the rat uterus.", *Biol Reprod.* 69(4):1308-17.
- Xiao, C.W., Ash, K., Tsang, B.K. (2001) "Nuclear factor-kappaB-mediated X-linked inhibitor of apoptosis protein expression prevents rat granulosa cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis.", *Endocrinology* 142:557-563.
- Yang, Y., Fang, S., Jensen, J.P., Weissman, A.M., Ashwell, J.D. (2000) "Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli.", *Science* 288:874-877.
- Zecchi-Orlandini, S., Formigli, L., Tani, A., Benvenuti, S., Fiorelli, G., Papucci, L., Capaccioli, S., Orlandini, G.E., Brandi, M.L. (1999) "17beta-estradiol induces apoptosis in the preosteoclastic FLG 29.1 cell line.", *Biochem Biophys Res Commun* 255:680-685.
- Zhou, H., Li, X.M., Meinkoth, J., Pittman, R.N. (2000) "Akt regulates cell survival and apoptosis at a postmitochondrial level.", *J Cell Biol* 151:483-494.
- Ziegler, U., Groscurth, P. (2004) "Morphological features of cell death.", *News Physiol Sci.* 19:124-8.