

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

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

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

**PAR
GUYLAINE FRÉCHETTE-FRIGON, B.Sc. (Biologie Médicale)**

**LE CHEMIN DE SURVIE CELLULAIRE DE LA
PHOSPHATIDYLINOSITOL 3- KINASE (PI 3-K)/Akt DANS L'ENDOMÈTRE
DE LA RATTE EN FIN DE GESTATION**

AOÛT 2006

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

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

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

REMERCIEMENTS

D'abord, je tiens à remercier mon directeur de recherche, le Dr. Éric Asselin, pour sa grande disponibilité, pour m'avoir encadré tout en me laissant une autonomie dans mon travail et finalement, je lui suis très reconnaissante pour l'opportunité qu'il m'a donné de participer à des congrès internationaux pour compléter ma formation.

Aussi, il est important pour moi de remercier tous les gens avec qui j'ai eu le plaisir de travailler dans le laboratoire : Véronique Gagnon, Marie-Claude Déry, Kim Leblanc, Émilie Sexton, Geoffroy Bélanger, Isabelle St-Louis, Steve Turner et Virginie Boucher. Un merci tout particulier s'impose dans le cas de Valérie Leblanc, Sophie Parent et Céline VanThemsche puisqu'elles m'ont aidé dans toutes les facettes de mon apprentissage, autant pratique que théorique. De plus, je remercie plus particulièrement Pierre-Luc Caron avec qui j'ai travaillé au quotidien pendant un an et demi. Et finalement, un gros merci à Marie-Josée Cardin qui m'a prêté main forte pour terminer mes expériences au laboratoire. Nous avons formé une belle équipe et avons développé de belles amitiés et j'espère vous revoir tous bientôt.

De plus, il est primordial de remercier Mme. Rollande Caron pour son appui et sa confiance en moi pour la manipulation de animaux, mais aussi parce que c'est une personne passionnée par son métier et avec qui il est très agréable de travailler.

Merci beaucoup à ma famille et à mon amoureux.

RÉSUMÉ

Chez le rat, l'implantation embryonnaire, la décidualisation, la régression déciduale et la parturition sont les principaux événements de la gestation. Lors de l'implantation embryonnaire (jour 5,5 de gestation), les cellules épithéliales entrent en apoptose dans le but de libérer l'espace nécessaire à l'embryon. Une seconde vague d'apoptose débute au jour 14 de gestation, ce que l'on nomme la régression déciduale. La parturition, chez le rat, s'effectue en temps normal au jour 22 de gestation, en début d'après-midi. Il est connu que l'ocytocine et les prostaglandines sont directement impliquées dans la parturition. En effet, les prostaglandines produites par la décidue pourraient être importantes dans l'induction ou la progression du travail lors de l'accouchement via leur action au niveau du myomètre. Par contre, les mécanismes intracellulaires et moléculaires permettant la mise en place de la régression déciduale et de la parturition au niveau des cellules endométriales sont très peu documentés. Il a été démontré dans une étude antérieure menée par notre laboratoire que la voie de la PI 3-K/Akt serait impliqué dans le cycle oestral chez le rat et dans l'apoptose induite par le TGF- β dans les cellules stromales en culture. Cette même étude nous a permis de constater la présence d'apoptose au jour 14 de gestation, soit au moment de la régression déciduale. Il est évident la voie de signalisation cellulaire de la PI 3-K/Akt joue un rôle clé dans le contrôle de la destinée des cellules de l'endomètre. Nous croyons donc que cette voie de signalisation cellulaire pourrait aussi jouer un rôle important dans les processus apoptotiques lors de la régression déciduale et possiblement dans la préparation à la parturition.

L'objectif général de mon projet de recherche est donc de caractériser la voie de la PI3-K/Akt dans l'endomètre de la ratte lors de la gestation. Plus particulièrement, de déterminer la présence et la régulation de XIAP et de la PI 3-K/Akt dans les processus apoptotiques au moment de la régression déciduale et de déterminer l'importance de la voie de survie cellulaire de la PI 3-K/Akt dans la préparation de l'utérus à la parturition.

Pour ce faire, nous avons utilisé un modèle *in vivo* : la ratte gestante. Les rattes ont été accouplées et par la suite euthanasiées à différents jours de gestation (jours 12 à 22). Les utérus ont ensuite été recueillis pour en collecter les cellules endométriales et en extraire les protéines pour des analyses de type Western. La prolifération cellulaire, déterminée par l'expression de CDC47/MCM7 est faible lors de la régression déciduale (jour 14 à 20). De plus, la forme active de Akt, P-Akt, diminue lors de la régression déciduale, alors qu'elle augmente aux jours 21 et 22 de gestation. Nous avons observé le même patron d'expression pour I κ B- α et NF- κ B aux jours 21 et 22. XIAP montre un patron d'expression similaire à celui de P-Akt à partir du jour 14 de gestation. Akt1 diminue à partir du jour 14 et Akt2 est exprimée de façon constitutive du jour 14 à 22, alors que Akt3 est exprimé exclusivement aux jours 21 et 22 et est absent au moment de la régression déciduale. Le second modèle utilisé pour notre étude est la culture de cellules déciduales provenant de rattes préalablement traitées au 17 β -oestradiol et à la progestérone. Ces traitements nous permettent d'induire la décidualisation *in vivo*. L'endomètre est par la suite recueilli pour la culture cellulaire. L'inhibiteur de la PI 3-K, la LY294002, bloque la phosphorylation de Akt et diminue l'expression de XIAP *in vitro* dans les cellules déciduales. Ces résultats suggèrent que XIAP et Akt pourraient être des molécules de signalisation cellulaire par lesquelles l'apoptose est régulée dans l'endomètre de la ratte et que la voie de la PI 3-K/Akt pourraient être impliquée dans le processus de parturition via NF- κ B. Cette étude est la première à montrer la régulation de XIAP et de la PI 3-K/Akt dans l'endomètre de la ratte gestante.

Des études ultérieures seront nécessaires dans le but d'établir des liens plus importants entre XIAP et la voie la PI 3-K/Akt dans les cellules endométriales et de déterminer l'état d'activation de NF- κ B dans ces mêmes cellules et sa régulation via la voie de la PI 3-K/Akt.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	II
RÉSUMÉ.....	IV
TABLE DES MATIÈRES	VI
LISTE DES FIGURES	VIII
LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS.....	IX
CHAPITRE I INTRODUCTION	13
1.1 LE MODÈLE ANIMAL	15
1.2 ANATOMIE ET HISTOLOGIE UTÉRINE.....	15
1.3 LES HORMONES STÉROÏDIENNES.....	18
1.4 LA RATTE GESTANTE ET LE CYCLE OESTRAL	20
1.5 LA CULTURE CELLULAIRE	23
1.6 LA DÉCIDUALISATION	24
1.6.1 La régression déciduale.....	26
1.6.2 L'apoptose et les caspases.....	27
1.7 LA PARTURITION	29
1.7.1 Les prostaglandines et les cyclooxygénases	32
1.7.2 Prostaglandines versus parturition	34
1.7.3 Relaxation du myomètre	35
1.8 LA VOIE DE SIGNALISATION CELLULAIRE DE LA PI 3-K/AKT.....	36
1.8.1 La PI 3-K.....	38
1.8.2 Akt/PKB/Rac	39
1.8.3 PTEN/MMAC	40
1.8.4 NF- κ B, I κ B	41
1.8.5 XIAP	43
1.8.6 Famille Bcl-2.....	44
1.8.7 CDC47/MCM7.....	45

1.9	HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS	46
CHAPITRE II RÉGULATION DE LA VOIE DE LA PI 3-K/AKT DANS		
L'ENDOMÈTRE DE LA RATTE DURANT LA GESTATION 47		
	PRÉFACE.....	47
	RÉSUMÉ.....	47
	ABSTRACT	50
	INTRODUCTION.....	51
	MATERIALS AND METHODS.....	53
	RESULTS.....	57
	DISCUSSION	58
	CONCLUSION	61
	ACKNOWLEDGMENTS.....	61
	FIGURE LEGEND.....	66
CHAPITRE III CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 74		
3.1	CONCLUSIONS	74
3.2	PERSPECTIVES	82
BIBLIOGRAPHIE 84		

LISTE DES FIGURES

1.1 Anatomie utérine de la ratte.....	16
1.2 Coupe histologique transversale de l'utérus de la ratte non-gestante.....	17
1.3 Étapes de la stéroïdogénèse.....	19
1.4 Variation des hormones stéroïdiennes et des gonadotropines lors du cycle oestral chez la ratte.....	21
1.5 Frottis vaginaux colorés au bleu de méthylène montrant les étapes du cycle oestral et la confirmation de la fertilisation	22
1.6 Cellules stromales de l'endomètre humain et cellules déciduales suite au processus de décidualisation.....	25
1.7 Schéma montrant les principales étapes menant à la mort cellulaire par apoptose et photos en microscopie électronique comparant une cellule normale à une cellule apoptotique	28
1.8 Modification du rapport de production œstrogène/progestérone par le placenta en fin de gestation chez la ratte.....	31
1.9 Schéma simplifié montrant les principales étapes de la production des prostaglandines à partir de l'aide arachidonique et à l'aide des cyclooxygénases.....	33
1.10 Schéma de la voie de signalisation cellulaire de la PI 3-K/Akt.....	37
2.1 CDC47/MCM7 expression in the rat endometrium during late pregnancy.....	68
2.2 Akt and phospho-Akt expression in the rat endometrium during late pregnancy.....	69
2.3 Akt1/2/3 expression in the rat endometrium during late pregnancy.....	70
2.4 Bcl-2, PTEN and XIAP expression in the rat endometrium during late pregnancy.....	71
2.5 Effect of the PI 3-K inhibitor LY294002 for 24h on Akt, phospho-Akt and XIAP expression in cultured rat decidual cells.....	72

2.6 Expression of Akt, phospho-Akt, NF- κ B p65 subunit and I κ B- α in the endometrium of pregnant rat at the end of pregnancy.....	73
--	----

LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS

AA	Acide arachidonique
ADN	Acide désoxyribonucléique
Akt	Activated by kinase tyrosine
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
Asp	Aspartate
ATP	Adénosine triphosphate
Bad	Bcl-2-antagonist of cell death
Bax	Bcl2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-x _L	Bcl2-like 1
Bid	BH3-interacting domain death agonist
BIR	Baculovirus IAP repeat
BRUCE	BIR repeat containing ubiquitin-conjugating enzyme
Ca ²⁺	Calcium
Caspase	Cysteine-containing aspartate-specific proteases
CDC47/MCM7	Cell Division Cycle 47/Mini Chromosome Maintenance protein 7
COXs	Cyclooxygénases
COX-1	Cyclooxygénase-1
COX-2	Cyclooxygénase-2
C-terminal	Carboxy-terminal
DB	Decidua basalis
D.C.	Dextran-Charcoal
DMEM-F12	Dulbecco's Modified Eagle's Medium F12
E ₂	17β-oestradiol
éd.	Édition
et al.	Plus de deux auteurs dans un ouvrage
FBS	Fœtal bovine serum

FSH	Hormone folliculo-stimulante
g	Gramme
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase
h	Heure
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HPA	Axe hypothalamo-hypophysaire
IAPs	Inhibitor of apoptosis proteins
I κ B	Inhibitory subunit kappa B
I κ B- α	Inhibitory subunit kappa B-alpha
IKK	I κ B kinase
IKK α	I κ B kinase alpha
IKK β	I κ B kinase bêta
LH	Hormone lutéinisante
LY294002	2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-chromone
MCM	Mini Chromosome Maintenance
ml	Millilitre
MLCK	Myosin light-chain kinase
mM	Millimolaire
MMAC	Mutated in Multiple Advanced Cancers
NAIP	Neural apoptosis inhibitory protein
NF- κ B	Nuclear factor kappa B
NLS	Nuclear localization signal
P ₄	Progestérone
P450 _{aro}	Cytochrome P450 aromatase
P450 _{scc}	Cytochrome P450 side-chain cleavage
P-Akt	Phosphorylated Activated by kinase tyrosine
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDK	Phosphoinositide dependant kinase
PGD ₂	Prostaglandine D ₂
PGE ₂	Prostaglandine E ₂

PGF _{2α}	Prostaglandine F _{2α}
PGG ₂	Prostaglandine G ₂
PGH ₂	Prostaglandine H ₂
PGI ₂	Prostacycline
PH	Pleckstrin homology
PI	Phosphoinositides
PI 3-K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PIP	Phosphatidylinositol 3 phosphate
PIP ₂	Phosphatidylinositol 4,5 diphosphate
PIP ₃	Phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate
PKA	Protéine kinase A
PKB	Protein kinase B
PLA2	Phospholipase A2
PLC	Phospholipase C
PMN	Polymorphonucléaires neutrophiles
pp	Page
PRL	Prolactine
PTEN	Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten
Rac	Related to A and C protein kinase
Rel/NF-κB	Related to Nuclear Factor kappaB
RHD	Rel-homology domain
RING	Really interesting new gene
SDS	Sodium dodecyl sulfate
Ser	Sérine
SH2	Src homology 2
Smac/DIABLO	Second mitochondrial activator of caspases/Direct IAP binding protein low pl
TGF-β	Transforming growth factor-bêta
Thr	Thréonine
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling

μg	Microgramme
μl	Microlitre
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis

CHAPITRE I

INTRODUCTION

Les processus intracellulaires reliés aux principaux événements de la gestation sont encore très peu connus. Par exemple, l'implantation de l'embryon est un processus complexe nécessitant une coordination parfaite de la réceptivité de l'utérus avec le fœtus. Les cellules épithéliales de l'endomètre entrent en apoptose pour libérer l'espace nécessaire à l'implantation de l'embryon dans la paroi utérine. Par contre, les processus intracellulaires et moléculaires menant à cette apoptose des cellules sont encore très méconnus. Sachant que 78% des pertes embryonnaires sont causés par des défauts au niveau de l'implantation (Webb et Glasser 1984), il est évident que la connaissance accrue de cet événement serait importante pour la mise au point de traitements contre l'infertilité chez la femme.

Un second événement important de la gestation est la régression déciduale qui est nécessaire au bon développement de l'embryon en expansion. Il est connu que le TGF- β pourrait être responsable de l'induction de la mort par apoptose des cellules déciduales chez la ratte (Shooner et al. 2005).

La parturition, c'est-à-dire l'expulsion du fœtus hors des voies génitales, est guidée par l'action des prostaglandines produites entre autre par le myomètre et l'endomètre suite à l'action des hormones stéroïdiennes. Cependant, les voies de signalisation intracellulaires des cellules endométriales qui mènent à la production de ces prostaglandines sont peu documentées. La prématurité (accouchement avant 37 semaines de grossesse) est définie comme l'un des principaux problèmes de santé périnatale dans les pays industrialisés (Berkowitz et Papiernik 1993) et elle est associée à plus de 70% de la morbidité et de la mortalité néonatale (Lindström et Bennett 2005).

De plus, les accouchements prématurés compliquent plus de 10% des grossesses (Lindström et Bennett 2005).

L'incompréhension des mécanismes précis qui contrôlent le déclenchement de la parturition chez la femme n'est pas étrangère à ce phénomène. Donc, pour prévenir ces accouchements prématurés, il est fondamental de comprendre les mécanismes qui font passer l'utérus de son état quiescent à son état activé.

Dans la présente étude, nous avons concentré nos efforts sur la compréhension des mécanismes intracellulaires au niveau de l'endomètre qui sous-tendent deux événements importants de la gestation, soit, la régression déciduale et la parturition, et ce, en utilisant la ratte Sprague-Dawley comme modèle. Les raisons ayant motivés notre choix seront énumérées à la section 1.1.

Plusieurs indices nous portent à croire que la voie de survie cellulaire de la PI 3-K/Akt pourrait être impliquée dans ces deux événements. Par exemple, lors du cycle oestral (voir section 1.4), parallèlement à un taux important d'apoptose dans l'endomètre, nous observons une baisse de l'activité de Akt (Déry et al. 2003), comme c'est le cas lors de l'apoptose induite par le TGF- β dans des cellules déciduales en culture (Shooner et al. 2005). Nous croyons donc que l'activité de Akt pourrait aussi être régulée dans les cellules endométriales lors de la gestation. Sachant qu'il existe une relation étroite entre la voie de la PI 3-K/Akt et le facteur de transcription NF- κ B (St-Germain et al. 2004), qui lui a un rôle dans la production des prostaglandines, nous avons posé l'hypothèse suivante : la voie de la PI 3-K/Akt via l'activation de NF- κ B pourrait être impliquée dans la production des prostaglandines par l'endomètre. Pour bien comprendre cette étude, il faut d'abord connaître les caractéristiques anatomiques et histologiques de l'utérus de la ratte, ce que nous aborderons dans la prochaine section.

1.1 Le modèle animal

La ratte Sprague-Dawley femelle a été utilisée pour cette étude. Les raisons ayant motivés notre choix sont les suivantes : (a) chez le rat, on observe le même type de placentation que chez l'humain, (b) le cycle de reproduction du rat est très rapide, c'est-à-dire 4 à 5 jours et la gestation courte (environ 22 jours), (c) vu la taille de l'utérus, la quantité de tissus recueillis est plus importante que chez la souris, finalement (d) la taille de l'animal facilite les manipulations. Un résumé des principales caractéristiques anatomiques et histologiques de l'utérus de la ratte seront discutées dans la section qui suit.

1.2 Anatomie et histologie utérine

L'utérus de la ratte est composé d'un corps utérin et de deux cornes, chacune étant située de chaque côté de la cavité abdominale débutant près de la vessie. Une seule artère et une seule veine apportent le sang vers les ovaires, l'utérus et le col de l'utérus (Waynforth et Flecknell 1992) (Figure 1.1). Au niveau histologique, à partir de la lumière utérine, on retrouve d'abord l'endomètre et ensuite le myomètre (muscle lisse). L'endomètre est constitué de l'épithélium luminal et du stroma. Des cellules cylindriques avec microvillosités composent l'épithélium luminal alors que le stroma comprend : (a) des vaisseaux sanguins en grande quantité, (b) une matrice glycoprotéique, (c) des fibroblastes (cellules stromales), (d) des macrophages et mastocytes et, (e) des glandes utérines (Thibault et Levasseur 2001). Le myomètre est constitué de trois couches musculaires : (a) circulaire interne en contact avec le stroma adjacent, (b) intermédiaire où l'on retrouve une grande quantité de vaisseaux sanguins et finalement, (c) longitudinale externe où repose la séreuse (Figure 1.2). Les changements morphologiques et fonctionnels observés au niveau de l'endomètre lors du cycle hormonal ou lors de la gestation sont, en grande partie, sous l'influence des hormones stéroïdiennes : l'œstrogène et la progestérone (P₄).

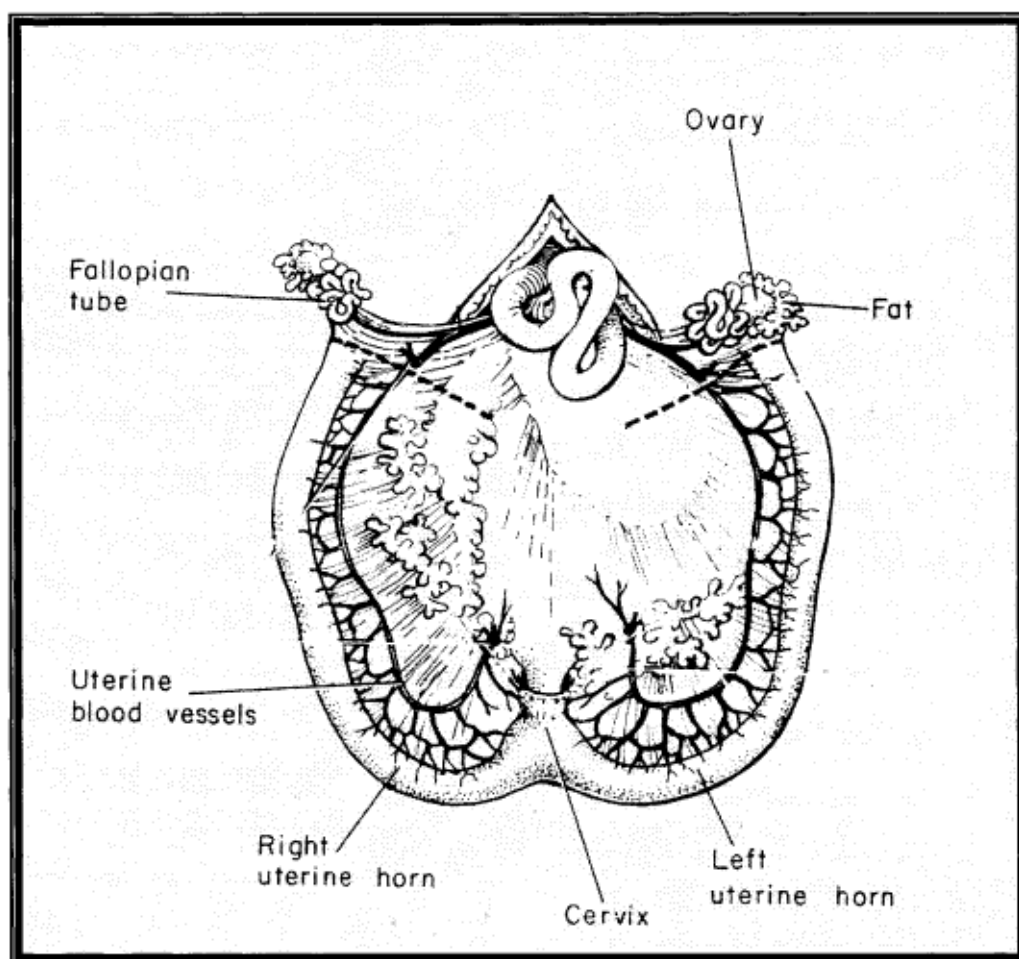


FIGURE 1.1 Anatomie utérine de la ratte (Waynforth et Flecknell 1992).

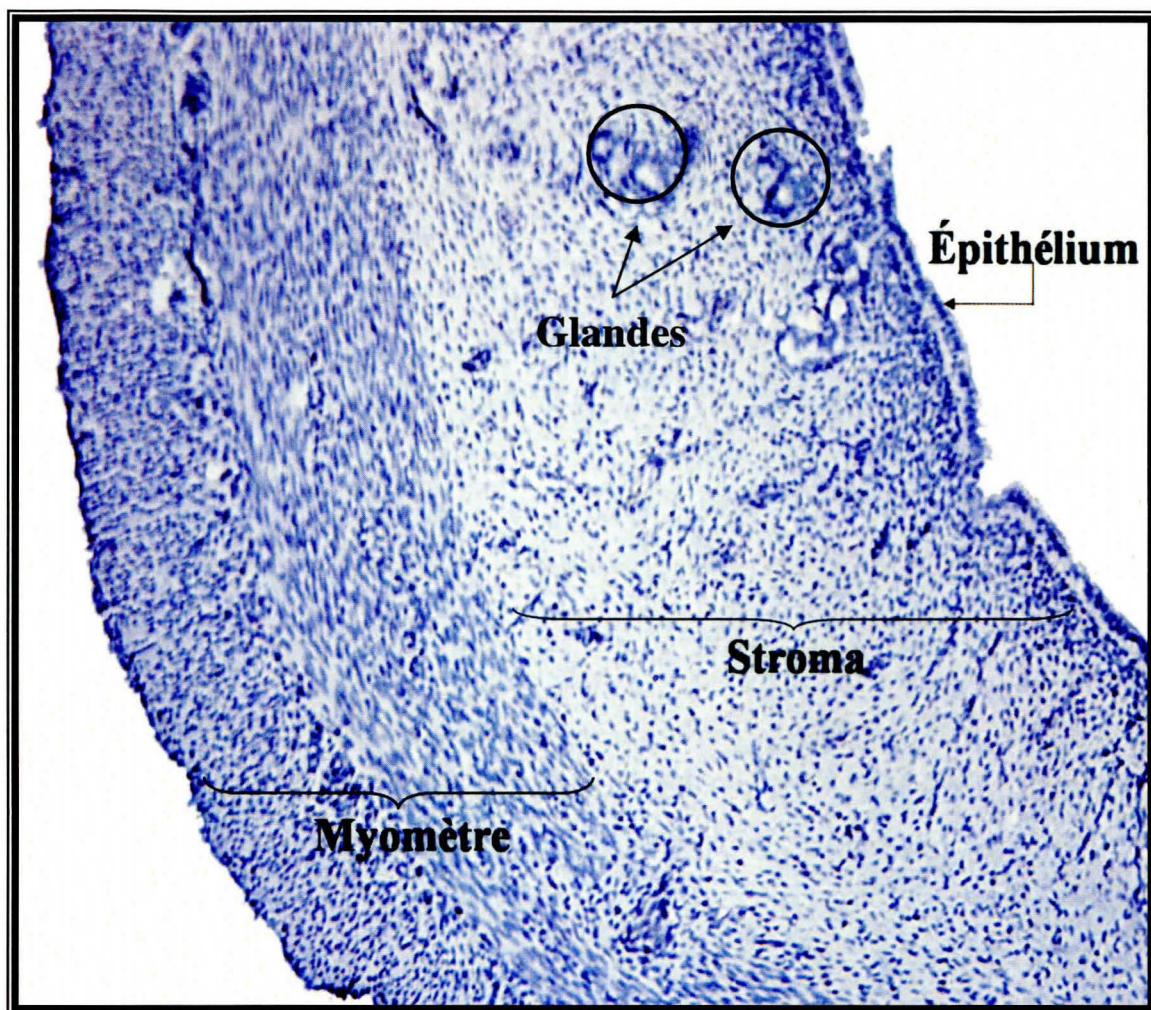


FIGURE 1.2 Coupe histologique transversale de l'utérus de la ratte non-gestante (colorée au bleu de méthylène) (photo obtenue au laboratoire du Dr. Éric Asselin).

1.3 Les hormones stéroïdiennes

Chez la femelle, la régulation des processus de reproduction est sous le contrôle des hormones stéroïdiennes soient l'œstrogène et la progestérone (P_4). Elles sont produites à partir du cholestérol par les cellules folliculaires de l'ovaire, ce qui nécessite l'action successive de molécules de la mitochondrie et du réticulum endoplasmique, par exemple les cytochromes $P450_{sc}$ (side-chain cleavage), $P450C17$ et $P450_{aro}$ (aromatase) et toute une gamme d'enzymes (Figure 1.3) (Thibault et Levasseur 2001).

Les hormones sexuelles, sous le contrôle des gonadotropines : la FSH (hormone folliculo-stimulante) et la LH (hormone lutéinisante), sont nécessaires à la régulation des cycles du système reproducteur femelle. La P_4 produite par le corps jaune a pour rôle général l'établissement et le maintien de la gestation et l'inhibition de la prolifération cellulaire induite par l'œstrogène au niveau de l'endomètre. De plus, elle bloque la contractilité du myomètre lors de la gestation pour maintenir l'utérus dans un état quiescent, et ce, (a) en diminuant l'expression des récepteurs à l'ocytocine (agent stimulant de la contraction du muscle utérin), (b) en stimulant la transcription des récepteurs β -adrénergiques myorelaxants, (c) en diminuant le taux de Ca^{2+} intracellulaire libre et, (d) en stimulant la production de relaxine endométriale. Les oestrogènes sécrétés majoritairement par les cellules folliculaires stimulent la prolifération cellulaire, la formation des récepteurs à la P_4 et déclenche la parturition (Thibault et Levasseur 2001; Tortora et Grabowski 2001). Il existe trois formes d'oestrogènes : (a) le 17β -oestradiol (E_2), la forme la plus active et la plus sécrétée par les ovaires, (b) l'oestrone (E_1), qui se convertit en 17β -oestradiol, et (c) l'oestriol (E_3) (Heffner 2003).

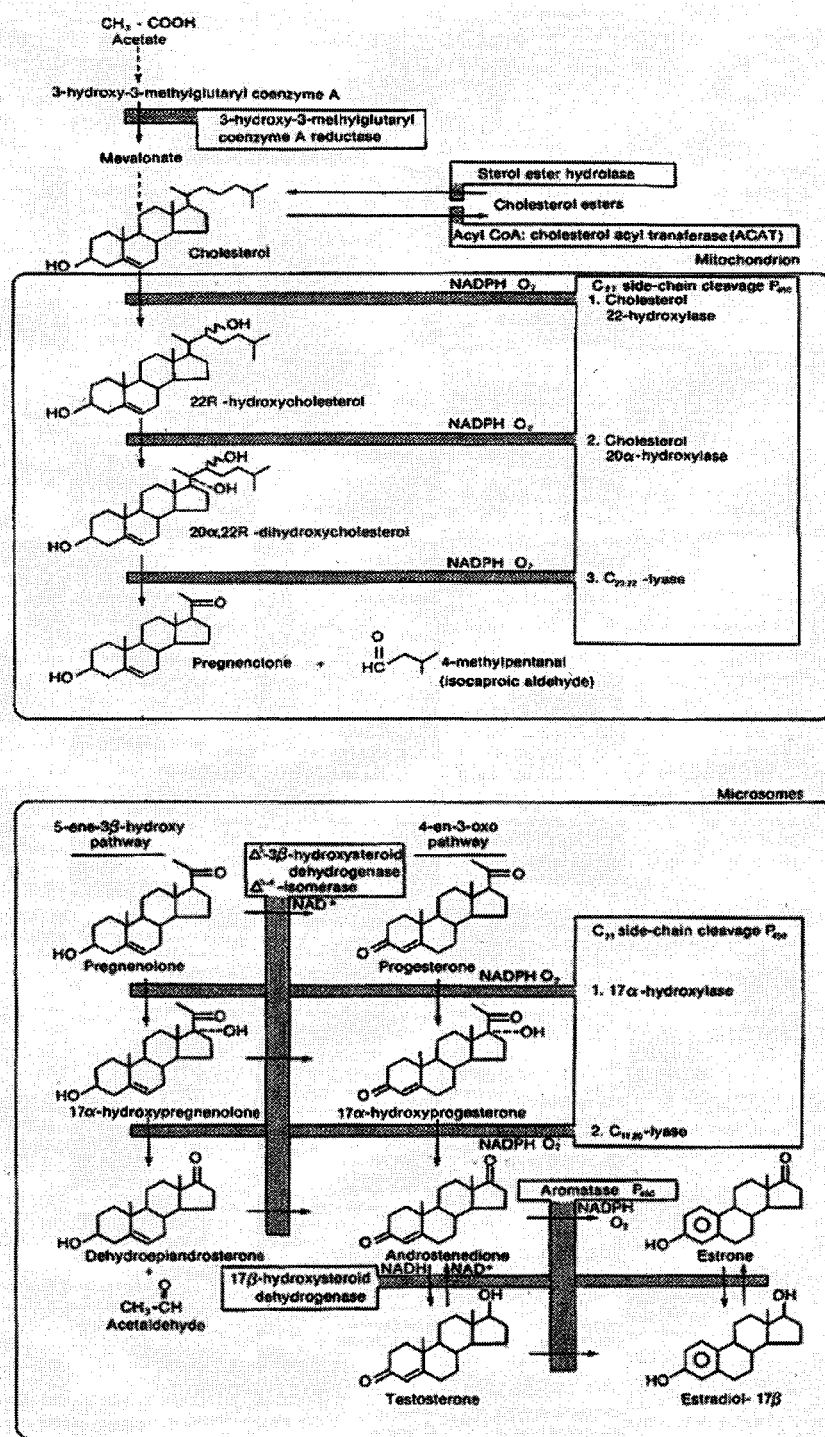


FIGURE 1.3 Étapes de la stéroïdogénèse (Knobil et al. 1994).

Les hormones stéroïdiennes varient tout au long du cycle hormonal (cycle oestral) de la ratte. Nous aborderons ce sujet plus précisément dans la section suivante.

1.4 La ratte gestante et le cycle oestral

Le modèle *in vivo* utilisé pour notre étude est la ratte gestante. Dans le but d'accoupler les rattes, nous devons déterminer, par frottis vaginaux, si la phase du cycle oestral de la ratte le permet. Le cycle oestral a une durée de 4 à 5 jours et est caractérisé par quatre phases différentes : (a) diestrus, (b) proestrus, (c) oestrus, (d) metestrus, l'accouplement est possible seulement en fin de proestrus ou en début d'oestrus, ce qui correspond au moment de l'ovulation. Contrairement à la plupart des mammifères à ovulation spontanée, lors du cycle oestral chez la ratte, un deuxième pic de FSH suit l'ovulation ce qui stimule la formation de l'antrum des follicules qui ovuleront au cycle suivant. Cette croissance provoque l'augmentation d'E₂ en début de proestrus. Une montée de progestérone à ce stade est responsable de l'apparition de l'oestrus et donc de l'ovulation. L'inhibine, une protéine produite au niveau des cellules de la granulosa de l'ovaire, agit au niveau de l'hypophyse antérieure pour inhiber la production de la FSH. Suite à l'ovulation, la chute brutale d'inhibine, permet le deuxième pic de FSH (Figure 1.4) (Thibault et Levasseur 2001).

Les frottis vaginaux de chaque phase du cycle oestral possèdent des caractéristiques histologiques propres (Figure 1.5) nous permettant de juger si la ratte peut être accouplée. En effet, lors du diestrus, qui a une durée de six heures, nous retrouvons dans le frottis vaginal en majorité des polymorphonucléaires neutrophiles (PMN) et quelques cellules nucléées. Le proestrus a une durée totale d'environ 72 heures et est divisé en deux étapes : le proestrus précoce (60 heures) et le proestrus tardif (12 heures), le proestrus précoce est caractérisé par la présence de : (a) cellules nucléées, (b) PMN, (c) quelques cellules cornifiées (mortes) et, (d) beaucoup de mucus.

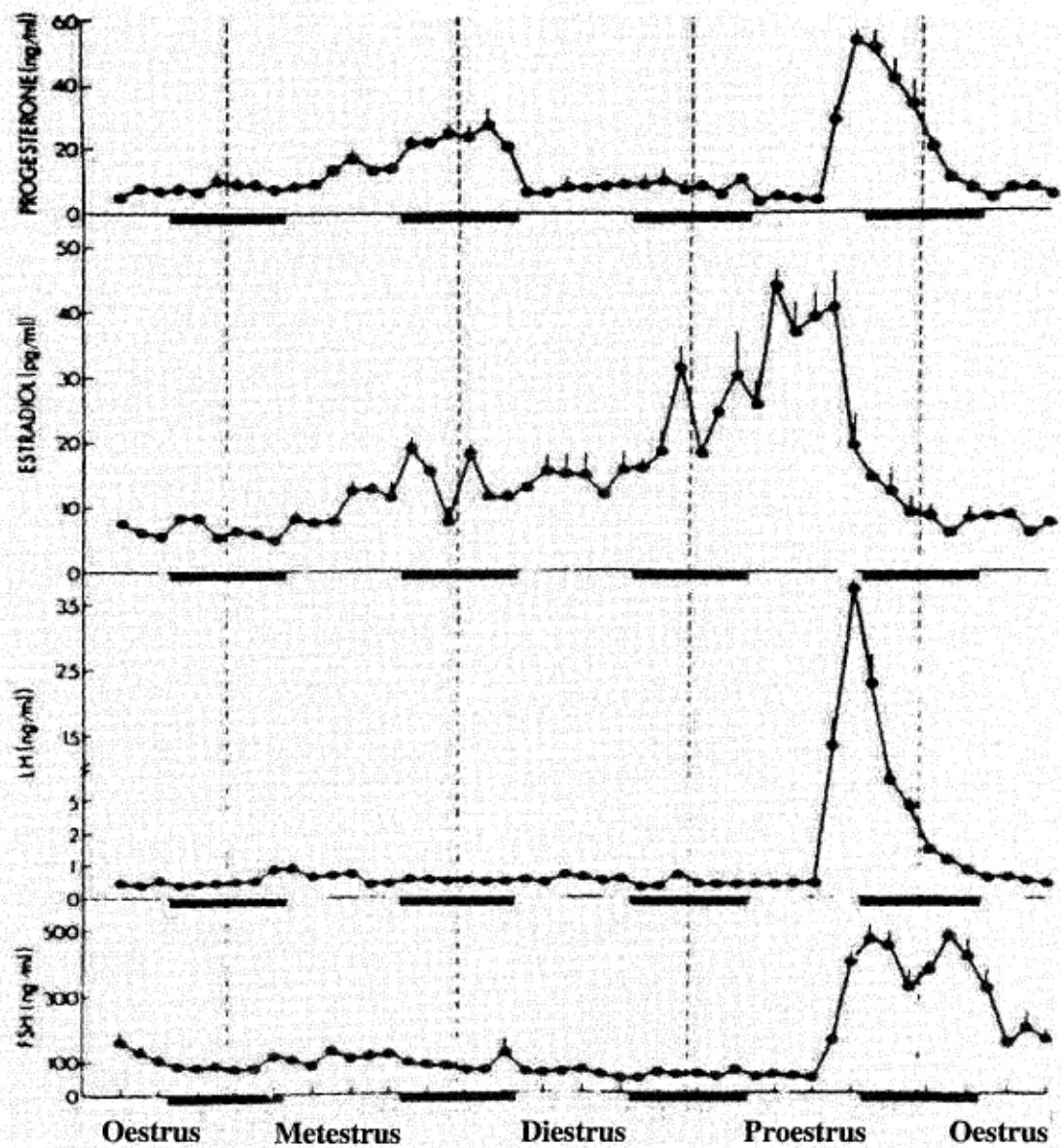


FIGURE 1.4 Variation des hormones stéroïdiennes et des gonadotropines lors du cycle oestral chez la ratte (Smith et al. 1975).

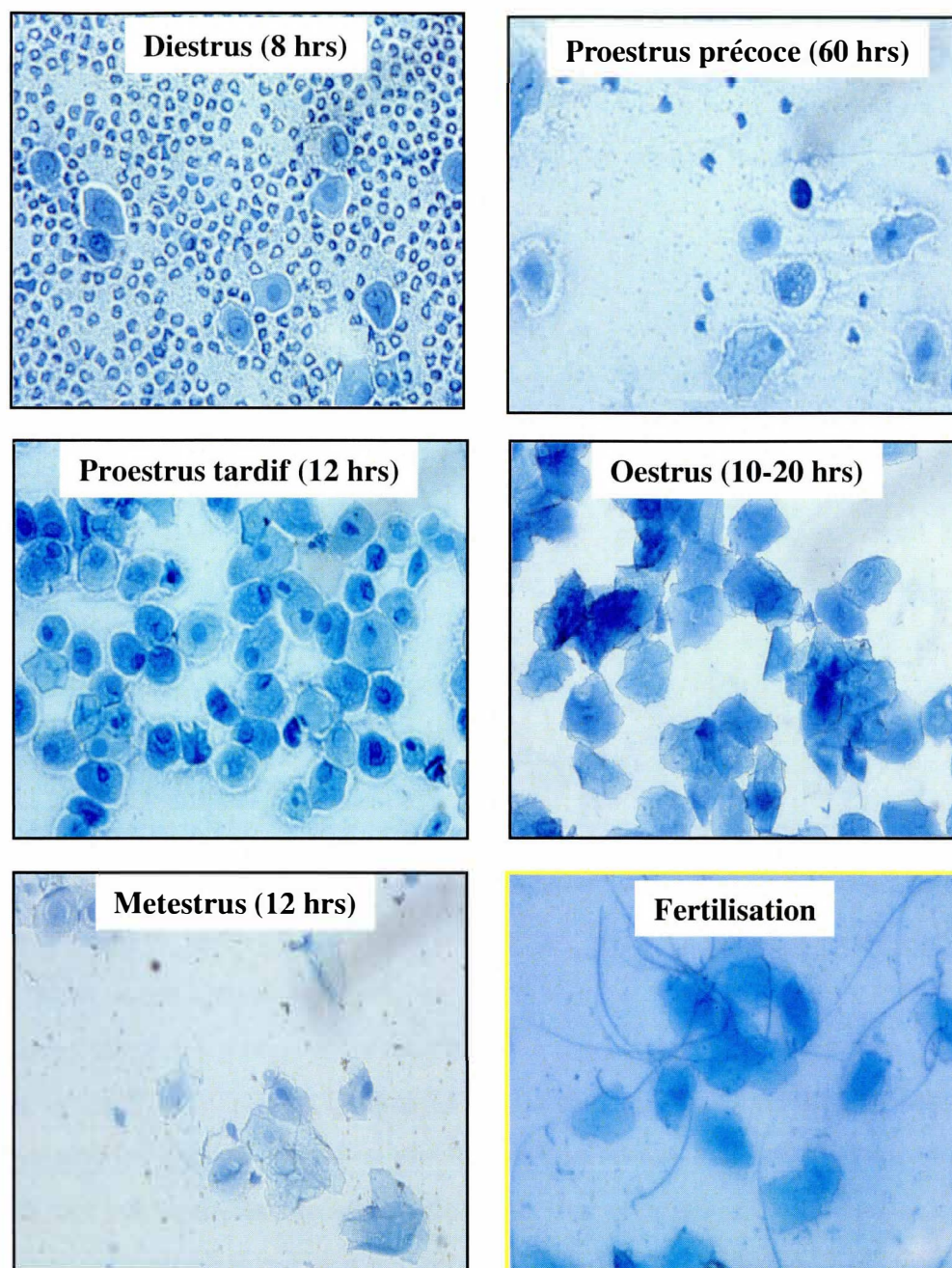


FIGURE 1.5 Frottis vaginaux colorés au bleu de méthylène. On y observe tous les types cellulaires présents dans les différentes étapes du cycle oestral et la confirmation de la fertilisation (photos : laboratoire du Dr. Éric Asselin).

Dans le frottis vaginal au moment du proestrus tardif on observe en grande majorité des cellules nucléées. L'œstrus, où l'on retrouve en majorité des cellules cornifiées, a une durée de dix à vingt heures. Finalement, le metestrus a une durée d'environ huit heures et on y trouve des PMN, des cellules nucléées et des cellules cornifiées (Waynforth et Flecknell 1992).

Le bon succès de l'accouplement est aussi vérifié par frottis vaginaux, nous pouvons alors observer une grande quantité de spermatozoïdes sur la lame de microscope (Figure 1.5). La présence d'un bouchon copulatoire (bouchon composé de la semence du rat) dans le vagin de la ratte le matin suivant l'accouplement est aussi un signe nous permettant d'affirmer que la ratte est gestante (considéré comme le jour 1 de gestation). Les rattes sont ensuite euthanasiées aux jours de gestation désirés et l'endomètre est recueilli pour les analyses futures.

1.5 La culture cellulaire

Notre modèle *in vitro*, les cellules déciduales en culture, nous permet d'étudier les cellules stromales sans la présence des signaux embryonnaires. Nous pouvons alors vérifier l'effet d'un traitement particulier sur les cellules sans l'interférence des signaux embryonnaires. Dans le but d'induire la décidualisation *in vivo*, les rattes Sprague-Dawley ont été ovariectomisées et suite à un repos de 10 jours, elles ont reçu des injections d'E₂ et de P₄ selon un protocole bien précis (Shooner et al. 2005). Au huitième jour, les rattes ont été euthanasiées et les cornes utérines ont été recueillies pour la culture cellulaire primaire.

Chez la ratte, un stimulus utérin (embryonnaire ou artificiel) est requis pour induire la décidualisation (voir section 1.6), ce qui explique pourquoi seulement quelques espèces, dont l'humain et quelques primates, subissent les menstruations. La décidualisation fera l'objet de la prochaine section.

1.6 La décidualisation

Chez la ratte, suite à l'implantation de l'embryon dans la paroi utérine, les cellules stromales de l'endomètre subissent de profonds changements autant dans leur forme et leur organisation que dans leur métabolisme. Sous l'effet du stimulus utérin (embryonnaire ou artificiel), les cellules stromales fibroblastiques prolifèrent et se différencient alors en cellules déciduales (Figure 1.6) pour former la zone déciduale primaire au niveau du site d'implantation de l'embryon (Abrahamsohn et Zorn 1993).

Le rôle et la morphologie des cellules déciduales chez la ratte et chez la femme sont très similaires. Elles sont caractérisées par leur forme polyédrique et leur grande taille. De plus, on y retrouve un plus grand nombre de : (a) réticulum endoplasmique rugueux, (b) de filaments intermédiaires et, (c) de gouttelettes lipidiques et de glycogène, et souvent deux nucléoles proéminents. La formation de jonctions serrées et la diminution de l'espace extracellulaire sont aussi caractéristiques de la décidualisation. La taille et le poids de l'utérus sont alors grandement augmentés et l'on y observe la présence d'œdème (Knobil et Neill 1994).

Cette zone de décidualisation primaire est nécessaire : (a) à la protection du fœtus contre les microorganismes, (b) au support nutritionnel, (c) à la production de facteurs nécessaires à l'invasion du trophoblaste, (d) à la protection de l'embryon contre une réponse immunitaire de la mère et, e) à la protection de la mère contre une invasion

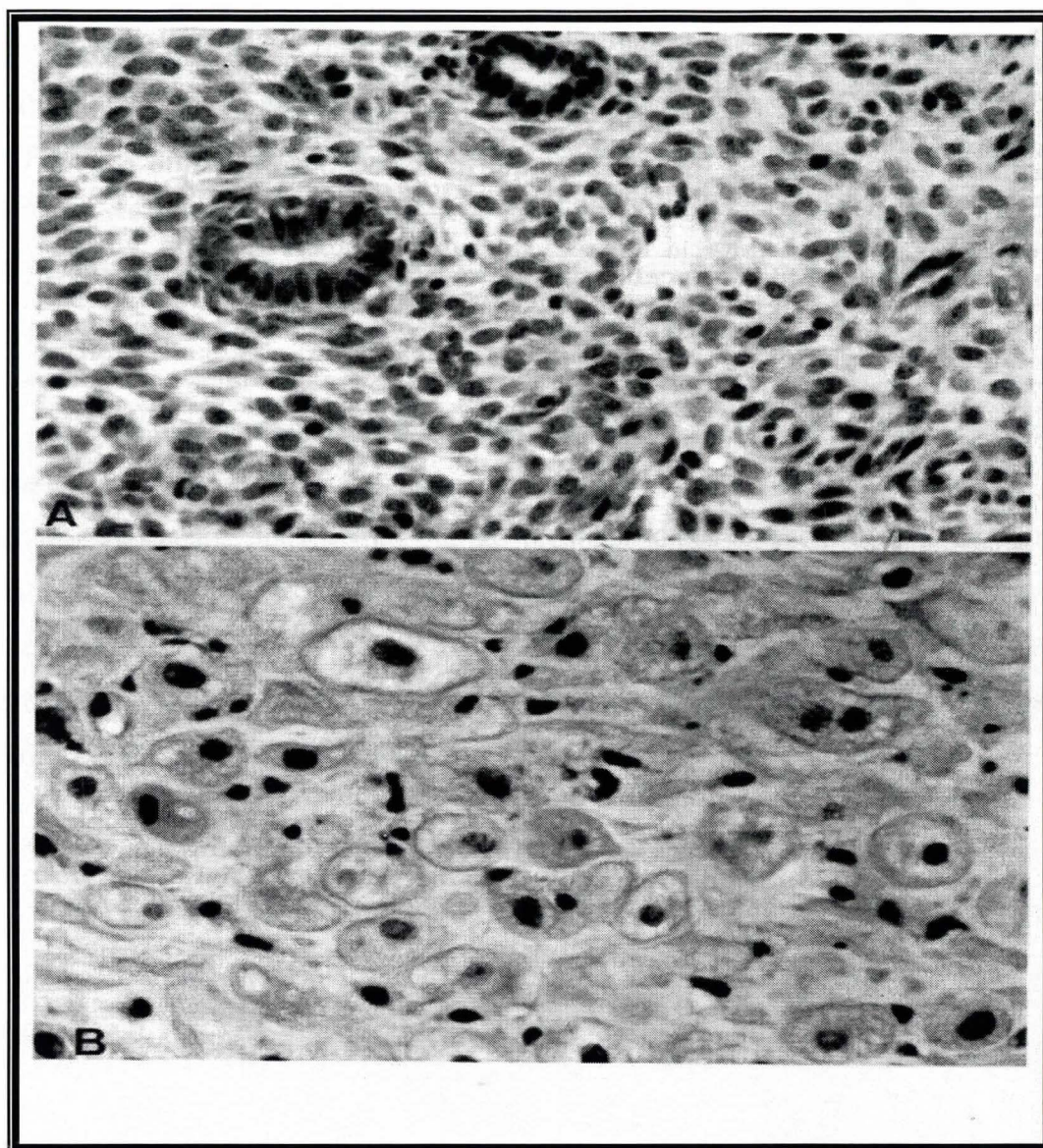


FIGURE 1.6 Cellules stromales de l'endomètre humain (A) et cellules déciduales (B) suite au processus de décidualisation (Thibault et Levasseur 2001).

exagéré du trophoblaste (Fazleabas et Strakova 2002). Accolée à la zone de décidualisation primaire, on retrouve une couche de fibroblastes de morphologie intermédiaire, c'est-à-dire à mi-chemin entre la cellule stromale et la cellule déciduale, que l'on nomme cellules pré-déciduales. La couche subséquente, accolée au myomètre, est composée uniquement de fibroblastes (cellules stromales) indifférenciés et servira à la reconstruction de l'endomètre suite à la parturition (Abrahamsohn et Zorn 1993).

La principale chaîne d'événements qui débute avec un stimulus utérin et qui mène à la transformation des cellules stromales en cellules déciduales est encore très peu connue. Cependant, nous savons que les prostaglandines exercent un rôle de premier plan dans la décidualisation, en effet, il a été démontré que l'administration locale de prostaglandines induit la décidualisation et que le niveau de prostaglandines est plus élevé au site d'implantation comparativement au site inter-implantation (Abrahamsohn et Zorn 1993; Knobil et Neill 1994).

Plus la gestation avance, plus le fœtus prend de l'expansion, les cellules déciduales doivent alors mourir par apoptose, c'est ce que l'on nomme la régression déciduale.

1.6.1 La régression déciduale

La régression déciduale est un processus apoptotique observé environ au jour 14 de gestation chez le rat (Welsh et Enders 1993; Shooner et al. 2005). Les cellules déciduales mortes sont alors phagocytées par des cellules trophoblastiques géantes, l'espace ainsi créé pourra être occupé par le trophoblaste grandissant facilitant son développement. Les mécanismes exacts d'induction de l'apoptose au niveau des cellules déciduales est un processus peu documenté. Sachant que la diminution de

l'activité de Akt peut être impliquée dans les processus apoptotiques dans les cellules endométriales chez le rat lors du cycle oestral (Déry et al. 2003) et lors de l'apoptose induite par le TGF- β dans les cellules déciduales en culture (Shooner et al. 2005), il est possible que la voie de la PI 3-K/ Akt joue un rôle dans la régression déciduale. Aussi, l'équipe de Tessier a suggéré que la disparition des récepteurs à la prolactine (PRL), l'hormone responsable de la sécrétion du lait par les glandes mammaires, et l'inactivation de Akt et de la caspase-3 clivée pourrait être un mécanisme de contrôle de l'apoptose dans les cellules déciduales. Ils ont suggéré que la voie de la PI 3-K pourrait être responsable de l'effet anti-apoptotique de la PRL (Tessier et al. 2001).

La régression déciduale étant un processus apoptotique, la prochaine section sera consacrée à l'apoptose et aux caspases.

1.6.2 L'apoptose et les caspases

L'apoptose est un processus de mort cellulaire programmée caractérisé par des changements morphologiques et biochimiques des cellules. Les principales caractéristiques d'une cellule en apoptose sont les suivantes : (a) condensation et fragmentation de l'ADN, (b) destruction des organites, (c) diminution du volume cellulaire, (d) altération des membranes cellulaires et, (e) formation de corps apoptotiques (Griffiths et al. 2001) (Figure 1.7). Les corps apoptotiques sont phagocytés prévenant ainsi la mise en place d'une réaction inflammatoire (Cohen 1997).

L'apoptose est essentielle pour contrôler le nombre de cellules de notre organisme, pour éliminer les cellules potentiellement dangereuses (immuno-réactives ou infectées par un virus), mais aussi pour un développement embryonnaire normal (Lodish

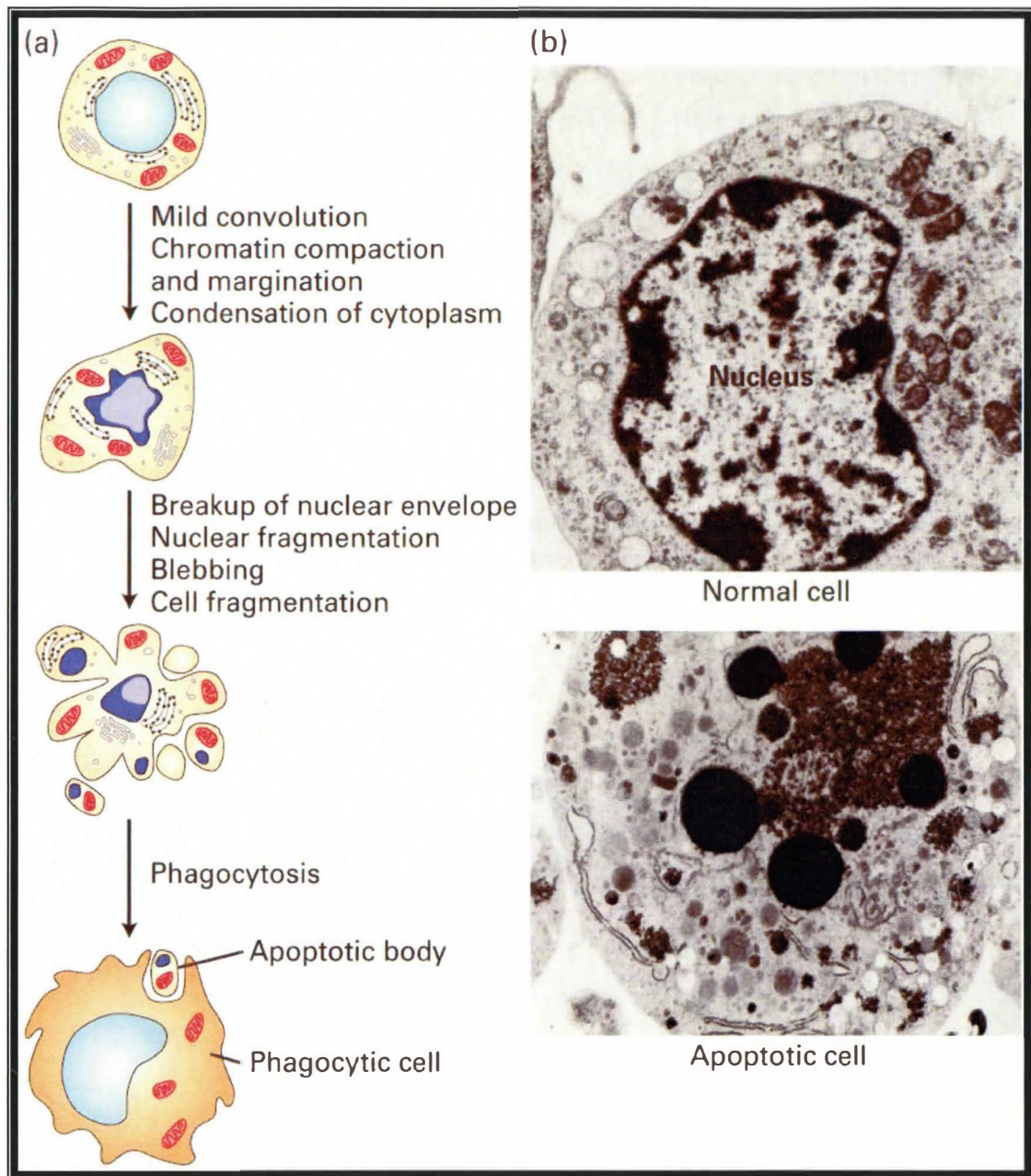


FIGURE 1.7 Schéma montrant les principales étapes menant à la mort cellulaire par apoptose (a), photos en microscopie électronique comparant une cellule normale à une cellule apoptotique (b) (Lodish et al. 2004).

et al. 2004). Il existe plusieurs exemples de situations nécessitant l'induction de l'apoptose, par exemple, lors de l'implantation embryonnaire, les cellules épithéliales de l'endomètre entrent en apoptose permettant ainsi à l'embryon de s'implanter dans la paroi utérine (Pampfer et Donnay 1999). De plus, lors de la régression déciduale, les cellules déciduales meurent par apoptose dans le but de laisser l'espace suffisant au développement du fœtus (Gu et al. 1994). De l'apoptose dans les cellules endométriales est aussi observée lors du cycle oestral chez la souris (Dharma et al. 2001) et le rat (Sato et al. 1997).

Les principaux exécuteurs de l'apoptose sont les caspases (« cysteine-containing aspartate-specific proteases »). Elles sont synthétisées sous forme de pro-enzymes inactives, nommées pro-caspases et sont activées par clivage au niveau d'un résidu aspartate (Asp) spécifique pour former deux sous-unités. Les caspases sont regroupées en deux sous-groupes : les caspases initiatrices et les caspases effectrices. Les caspases initiatrices (caspase-2,-8,-9,-10) sont activées/clivées en réponse à des stimuli apoptotiques cellulaires et clivent à leur tour les caspases exécutrices de l'apoptose (caspase-3,-7,-9). Ces dernières, en plus d'activer d'autres caspases, clivent des protéines cibles qui, en temps normal, sont responsables de maintenir l'intégrité de la cellule et de l'ADN, entraînant ainsi les changements observés lors de l'apoptose (Shiozaki et Shi 2004).

1.7 La parturition

Le deuxième moment important de la gestation sur lequel nous nous sommes attardé est la parturition. Elle est définie comme étant le processus par lequel le fœtus est expulsé de l'utérus vers l'environnement extérieur ce qui nécessite une coordination complexe entre le fœtus et l'utérus (Challis et al. 2000). Le myomètre est relativement inactif tout au long de la gestation, par contre, lors de la parturition il se contracte de façon rythmique, coordonné et avec force favorisant ainsi la dilation du col et

l'expulsion du fœtus et du placenta (Knobil et Neill 1994). L'induction de la parturition comporte une séquence d'événements débutant par la maturation de l'axe hypothalamo-hypophysaire (HPA) du fœtus menant à une augmentation du taux de cortisol dans la circulation du fœtus et du cordon ombilical. Ce changement dans les concentrations de cortisol modifie le rapport de production E_2/P_4 par le placenta. Chez la plupart des mammifères, dont le rat, la fin de gestation est donc associée à une chute des taux plasmatiques de P_4 , alors que l' E_2 augmente favorisant ainsi l'activation de l'utérus (Schuler et al. 2005) (Figure 1.8). Il est à noter que cette chute brutale des taux de P_4 ne se produit ni chez la femme ni chez la plupart des primates (Heffner 2003). Par contre une diminution du rapport E_2/P_4 de 40% est tout de même observé au moment du terme (Thibault et Levasseur 2001) puisque la synthèse des œstrogènes est accrue au moment de l'initiation du travail.

L'œstrogène influence la contraction de l'endomètre au moment de la parturition de plusieurs façons : (a) elle induit l'expression des récepteurs à l'ocytocine (agent stimulant de la contraction du myomètre) au niveau des cellules myométriales, (b) elle facilite la capacité de l'endomètre et du myomètre à produire des prostaglandines, (c) elle induit la formation de jonctions serrées entre les cellules adjacentes du myomètre, ce qui permet une contraction coordonnée et synchronisée du myomètre durant le travail, et finalement, (d) elle permet la formation de l'actine et de la myosine, associées à l'activité du myomètre (Knobil et Neill 1994). La chute des taux de P_4 et l'augmentation du taux d' E_2 favorise donc l'activation de l'utérus et la mise en

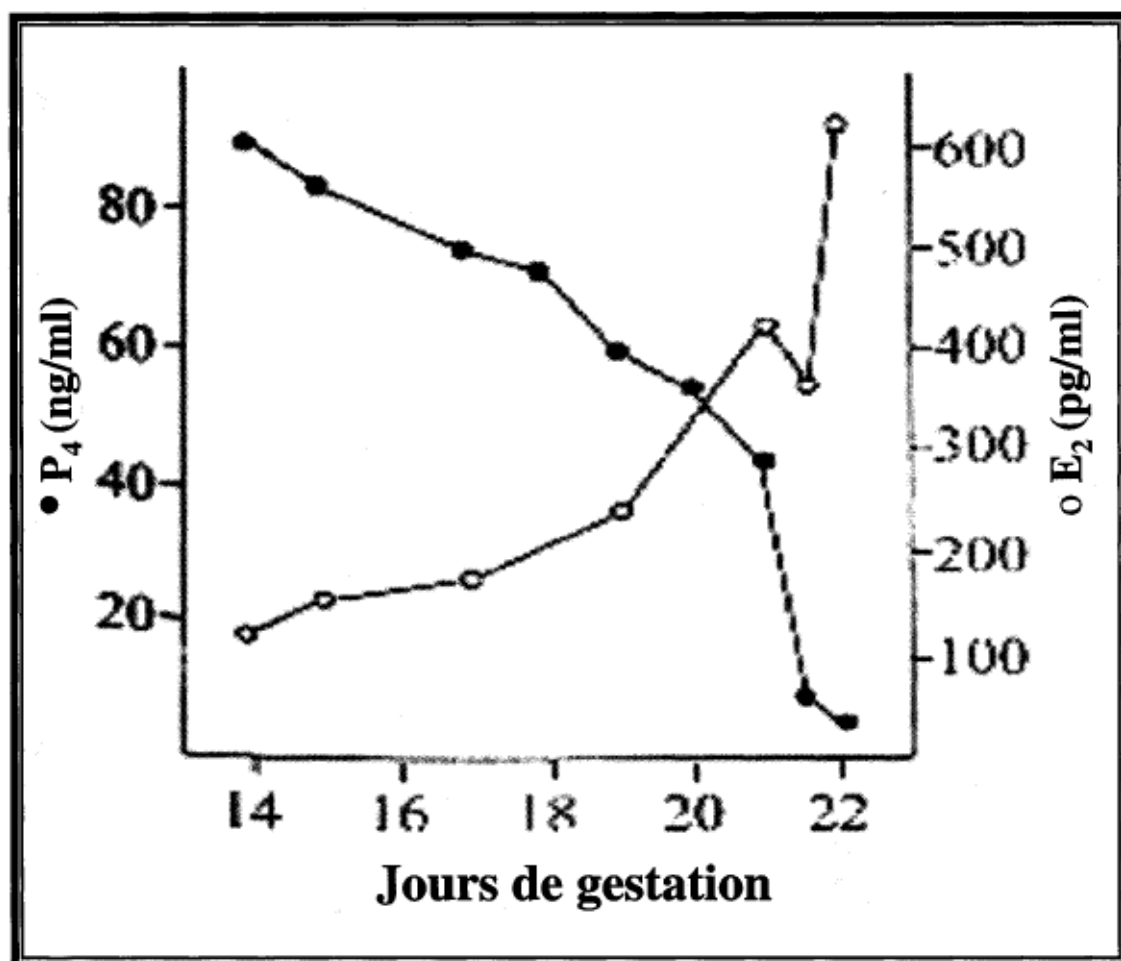


FIGURE 1.8 Modification du rapport de production œstrogène (E₂)/progestérone (P₄) par le placenta en fin de gestation chez la ratte. Aux jours 14 à 22 de gestation, la concentration plasmatique d'E₂ augmente alors que le taux de P₄ chute (Thibault et Levasseur 2001).

place du travail, et ce, par la stimulation de la production des prostaglandines (plus particulièrement la $\text{PGF}_{2\alpha}$) par l'endomètre et le myomètre (Schuler et al. 2005). Les prostaglandines feront donc l'objet de la prochaine section.

1.7.1 Les prostaglandines et les cyclooxygénases

Les prostaglandines font partie de la grande famille des eicosanoïdes qui inclue les leucotriènes et les thromboxanes et sont des métabolites de l'acide arachidonique (AA). Elles sont impliquées dans un grand nombre de processus dont la gestation et la réaction inflammatoire (Kelly 1996). La phospholipase A2 (PLA2) est l'enzyme permettant la libération du précurseur de l'AA emmagasiné au niveau de la membrane plasmique. Par la suite, les cyclooxygénases (COXs) catalysent la transformation de l'AA en prostaglandine H_2 (PGH_2) qui sera convertie en différentes prostaglandines par des synthases ou isomérases spécifiques (Smith et Dewitt 1996) (Figure 1.9).

Les enzymes limitantes de la production des prostaglandines sont les COXs, des enzymes de 70 kDa, plus précisément la cyclooxygénase-1 (COX-1) et la cyclooxygénase-2 (COX-2). La COX-1 est une enzyme constitutive dans la plupart des tissus alors que la COX-2 est exprimé en de plus faible quantité et répond à une stimulation par des facteurs de croissance et des substances mitogènes (Xie 1991). Par contre, il a été démontré que l'ARNm de COX-1 augmente au niveau du myomètre à partir du jour 16 de gestation chez la ratte (Myatt et al. 1994). Cependant, COX-2 est considérée responsable de la stimulation nécessaire à la production des prostaglandines en fin de gestation chez la plupart des mammifères. En effet, Sooranna et ses collègues ont démontré que l'expression de COX-2 dans les cellules myométriales est faible au cours de la grossesse chez la femme et augmente avec l'induction du travail (Sooranna et al. 2004). De plus, une augmentation de COX-2 a été observé en toute fin de

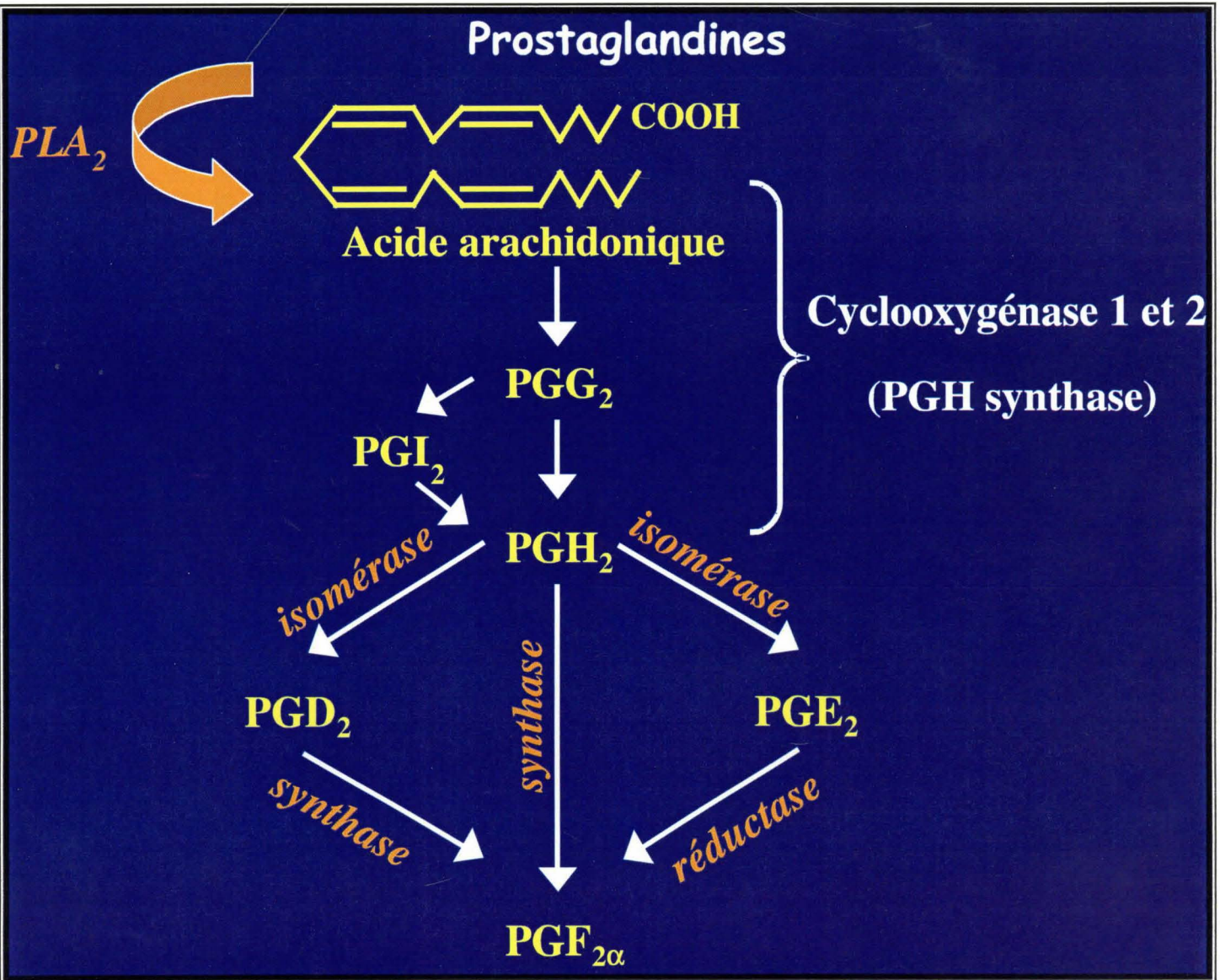


FIGURE 1.9 Schéma simplifié montrant les principales étapes de la production des prostaglandines à partir de l'acide arachidonique et à l'aide des cyclooxygénases.

gestation dans le myomètre de la souris (Tsuboi et al. 2000). Aussi, chez le babouin, plus la gestation avance, plus COX-2 augmente dans l'utérus et son niveau demeure élevé lors du travail (Wu et al. 2004).

Les prostaglandines agissent au niveau des cellules cibles via des récepteurs pour la plupart couplés à une protéine G qui sont répartis en deux groupes : (a) les récepteurs couplés à l'adénylate cyclase et entraînant la relaxation utérine, par exemple, les récepteurs EP2 et EP4 pour les prostaglandines de type E (PGEs), (b) les récepteurs couplés à la phospholipase C (PLC), comme le EP1 et EP3 pour les PGEs et FP pour la PGF_{2α} qui induisent la contraction du myomètre. L'activation de la PLC induit l'activation de seconds messagers, dont le IP3, qui permettent la libération du Ca²⁺ intracellulaire favorisant ainsi la contraction du muscle lisse utérin (Thibault et Levasseur 2001).

1.7.2 Prostaglandines versus parturition

Il est maintenant évident que les prostaglandines, plus précisément la prostaglandine E₂ (PGE₂) et la prostaglandine F_{2α} (PGF_{2α}), et leurs récepteurs jouent un rôle de premier plan au cours de la gestation et lors de la parturition. L'endomètre et les membranes fœtales sont toutes deux responsables de la production de prostaglandines qui agissent de façon paracrine majoritairement au niveau du myomètre (Nathanielsz et al. 2004). Plusieurs évidences nous permettent de constater l'importance des prostaglandines dans la parturition, entre autre, l'administration de prostaglandines à une femme, à n'importe quel stade de la grossesse, initie la contraction du myomètre et l'expulsion du fœtus (Nathanielsz et al. 2004).

Dans le myomètre de la ratte, juste avant le terme, le rapport de densité des récepteurs FP/EP2 augmente brutalement par une expression accrue des récepteurs FP et une diminution des récepteurs EP2 (Thibault et Levasseur 2001). De plus, chez les babouins, l'expression de l'ARNm des récepteurs EP2 diminue considérablement dans le myomètre lors du travail (Smith et al. 1999). Le même patron d'expression est observé dans le myomètre de la chèvre lors de l'induction du travail, c'est-à-dire que l'expression des récepteurs FP, mais aussi les récepteurs EP3, augmentent considérablement (Wu et al. 1999).

La régulation des récepteurs des prostaglandines tout au long de la gestation est donc de première importance dans le contrôle du niveau de contractilité de l'utérus. Évidemment, après la parturition, l'utérus doit cesser de se contracter et revenir à un état de quiescence qui prévalait avant la parturition. La régulation de la relaxation du myomètre fera donc l'objet de la section suivante.

1.7.3 Relaxation du myomètre

Le myomètre passe de l'état quiescent à activé de concert avec une augmentation des récepteurs de contraction et une perte ou une diminution des récepteurs de relaxation (Olson 2003 article 120). La relaxine est responsable, en partie, de faire cesser les contractions du myomètre après la parturition. Celle-ci induit la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) dans les cellules myométriales, ce qui a pour effet de d'empêcher la libération de Ca^{2+} des réserves intracellulaires. De plus, l'augmentation du taux d'AMPc dans la cellule induit l'activation de la protéine kinase A (PKA). Cette protéine kinase phosphoryle alors la « Myosin light chain kinase » (MLCK), prévenant de cette façon sa fixation au complexe Ca^{2+} -calmoduline (Knobil et Neill 1994 ; Challis et al. 2000), l'interaction entre l'actine et la myosine nécessaire à la contraction musculaire est de cette façon inhibée et l'utérus revient à son état quiescent.

Plusieurs indices nous portent à croire que la voie de signalisation de la « phosphatidylinositol 3-kinase/Activated by kinase tyrosine » (PI 3-K/Akt) et ses principaux intervenants pourraient jouer un rôle dans le contrôle de la destinée des cellules endométriales lors du processus de régression déciduale et lors de la parturition. C'est pourquoi, les sections suivantes seront consacrées à la compréhension de cette voie de signalisation cellulaire et aux différentes molécules qui y sont impliquées.

1.8 La voie de signalisation cellulaire de la PI 3-K/Akt

La voie de signalisation cellulaire de la PI 3-K/Akt est responsable, en grande partie, de la transduction de signaux de survie cellulaire ou d'inhibition de l'apoptose de la membrane cellulaire vers le noyau en induisant l'activation de la transcription de gènes cibles. La balance entre les facteurs apoptotiques et anti-apoptotiques de la cellule est nécessaire pour le maintien de l'homéostasie. C'est pourquoi autant d'études ont été réalisées et le seront au cours des années à venir concernant cette voie de signalisation cellulaire où converge une grande quantité de signaux provenant de l'extérieur de la cellule.

Plusieurs molécules interviennent dans la transduction de signaux par cette voie (Figure 1.10) et quelques-unes vous seront présentées dans les prochaines sections.

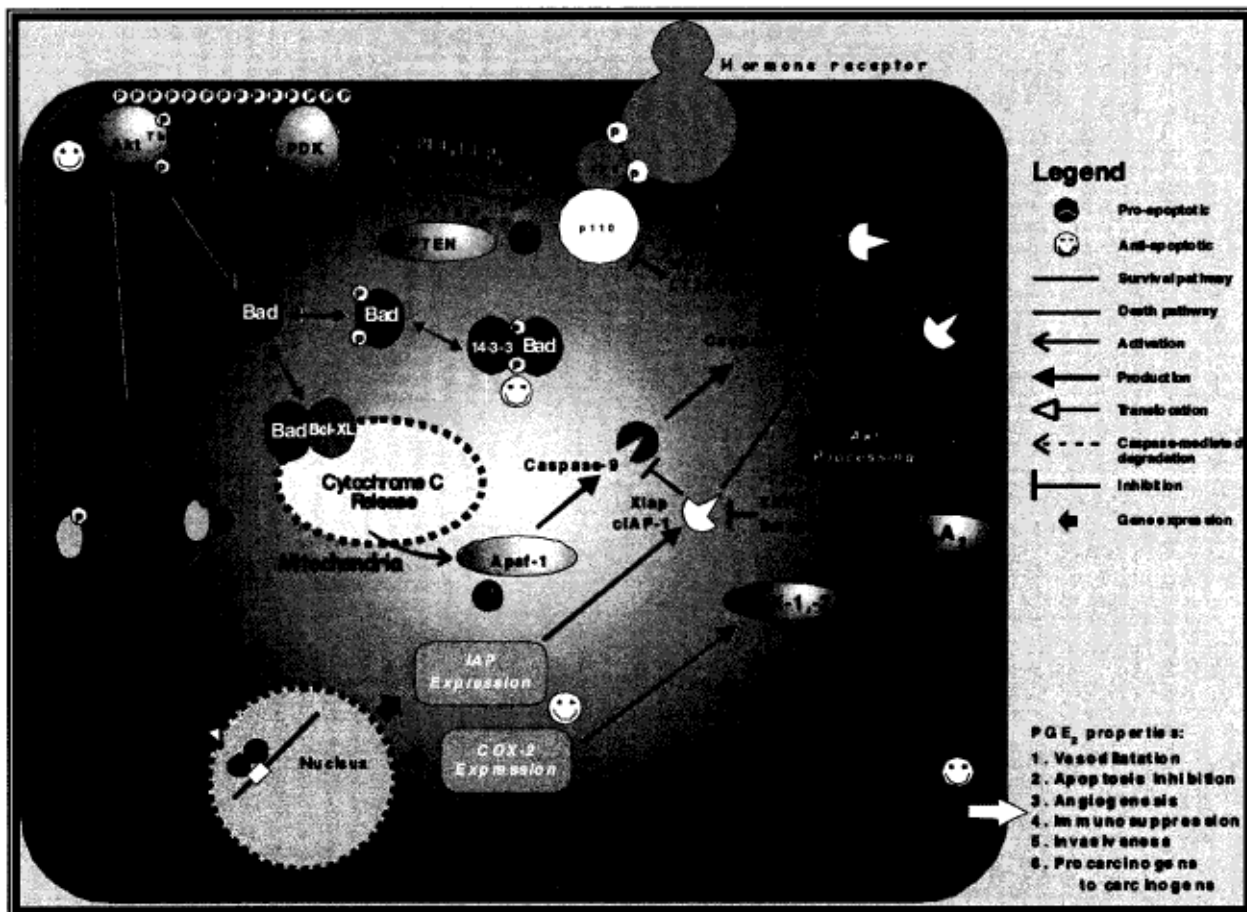


FIGURE 1.10

Schéma de la voie de signalisation cellulaire de la PI 3-K/Akt.

1.8.1 La PI 3-K

La PI 3-K est un hétérodimère contenant une sous-unité catalytique d'environ 110 kDa, la p110 et une sous-unité régulatrice, la p85, possédant deux domaines « Src homology 2 » (SH2) (Kandel et Hay 1999). Ces domaines SH2 lui permettent de se fixer au niveau de récepteurs membranaires possédant une activité tyrosine kinase intrinsèque ou au niveau de récepteurs couplés à une protéine G, et ce, suite à la stimulation de ces récepteurs par un facteur de croissance ou par d'autres signaux de survie cellulaire ou d'inhibition de l'apoptose. Cette liaison permet la translocation de la PI 3-K du cytoplasme vers la membrane plasmique où se situent ses substrats lipidiques (Vanhaesebroeck et Alessi 2000).

Suite à son activation, la sous-unité catalytique de la PI 3-K phosphoryle les phosphoinositides (PI) dans le but de générer les produits lipidiques suivants: (a) « Phosphatidylinositol 3 phosphate » (PIP), (b) « Phosphatidylinositol 4,5 diphosphate » (PIP₂) et, (c) « Phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate » (PIP₃) (Kandel et Hay 1999). La PIP₃ possède une grande affinité pour les protéines « phosphoinositide dependent kinase » (PDKs) qui sont elles-mêmes responsables de la phosphorylation de la protéine kinase Akt (Alessi et al. 1997) (voir section 1.5.2).

Deux observations nous indiquent que l'activation de la protéine kinase Akt est dépendante de la PI 3-K. D'abord, la Wortmannin et la LY294002, deux inhibiteurs spécifiques de la PI 3-K (Vlahos et al. 1994; Woscholski et al. 1994), diminuent la phosphorylation/activation de Akt (Burgering et Coffey 1995). Ensuite, les tyrosines Y740 et Y751 du récepteur PDGF (« platelet-derived growth factor ») qui fixent la sous-unité régulatrice de la PI 3-K, sont nécessaires à l'activation de Akt (Franke et al. 1995)

1.8.2 Akt/PKB/Rac

Akt (« Activated by kinase tyrosine »), aussi nommée « protein kinase B » (PKB) ou « related to A and C protein kinase » (Rac), est une protéine cytosolique de 60 kDa. Akt est l'homologue cellulaire du «transforming oncogene» du rétrovirus AKT8 (Staal 1987). Il en existe trois isoformes: Akt1, Akt2 et Akt3. Akt2 et Akt3 possèdent respectivement 81% et 83% d'homologie avec Akt1 (Konishi et al. 1995). Akt contient un domaine kinase central avec une spécificité pour les résidus sérine ou thréonine des protéines substrats (Bellacosa et al. 1991) et un domaine « pleckstrin homology » (PH) permettant les interactions lipide/protéine ou protéine/protéine (Mayer et al. 1993; Datta et al. 1995). Ce domaine PH lui permet de se lier aux lipides générés par la PI 3-K, majoritairement la PIP₃, cette liaison est nécessaire à la translocation de Akt au niveau de la membrane plasmique pour son activation/phosphorylation par les PDKs (Andjelkovic et al. 1997). Akt possède quatre sites de phosphorylation : la Ser124 et la Thr450 qui sont en permanence phosphorylés et la Thr308 et la Ser473 qui sont phosphorylés suite à un stimulus, ce qui est nécessaire pour l'activation complète de Akt (Alessi et al. 1997).

À la suite de son activation, Akt transduit des signaux nécessaires à la survie cellulaire et à l'inhibition des processus apoptotiques. En effet, Akt activée est responsable de la phosphorylation/inhibition de Bad (Datta et al. 1997), une protéine pro-apoptotique de la famille des Bcl-2 (voir section 1.8.6), et de la libération du facteur de transcription NF- κ B (voir section 1.8.4) facilitant ainsi sa translocation au noyau où il peut activer la transcription de gènes cibles (Madrid et al. 2000).

Il a été démontré dans une étude antérieure menée par notre laboratoire que la forme activée de Akt, Phospho-Akt (P-Akt) est fortement exprimée tout au long du cycle oestral chez la ratte sauf au moment de l'œstrus (Déry et al. 2003), où l'on observe un

taux d'apoptose élevé (Sato et al. 1997). Cette même étude démontre que l'activité de Akt est influencée à la hausse dans les cellules stromales en culture à la suite d'un traitement au E₂. Ces résultats démontrent que l'activité de Akt est régulée dans les cellules endométriales. Il a été suggéré que l'inhibition de l'activation de Akt pourrait être un mécanisme permettant aux cellules endométriales de mourir par apoptose et que, au contraire, l'augmentation de son activation serait importante pour la protection de ces cellules contre l'apoptose et pour induire la prolifération cellulaire (Déry et al. 2003).

1.8.3 PTEN/MMAC

PTEN/MMAC (« Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten/Mutated in Multiple Advanced Cancers »), une protéine pro-apoptotique de 54 kDa, est impliqué dans une grande variété de cancers lorsque mutée, nous indiquant qu'il pourrait réguler des processus cellulaires fondamentaux comme la prolifération. Au niveau de certaines tumeurs, la perte de PTEN peut résulter en une absence de réponse face à des stimuli apoptotiques (Stambolic et al. 1998). Son activité de supresseur de tumeur a été démontrée pour la première fois par un transfert adénoviral de PTEN dans des cellules de gliome où il fut observée une diminution de la prolifération cellulaire (Wayne et al. 1998). L'analyse de sa séquence en acides aminés révèle la présence d'un motif catalytique caractéristique des membres de la famille des protéines tyrosine phosphatases (Myers et al. 1997; Maehama et al. 1998). En effet, PTEN possède une activité phosphatase et peut déphosphoryler des substrats contenant des phosphotyrosines ou des phosphothréonines (Sun et al. 1999). De plus, il a été démontré par Maehama et son équipe que PTEN a la capacité de déphosphoryler PIP₃ en position 3 pour former du PIP₂ (Maehama et al. 1998). En réduisant la disponibilité de la PIP₃, PTEN inhibe la phosphorylation/activation de Akt (Stambolic et al. 1998; Wu et al. 1998). Il a été observé qu'une accumulation de PIP₃ dans des cellules *pten*^{-/-} produisait une augmentation de l'activité de Akt (Sun et al. 1999). L'activité supresseur de tumeur

de PTEN réside donc dans sa capacité à agir au niveau de la voie de la PI 3-K/Akt pour inhiber la phosphorylation de Akt et ainsi empêcher la prolifération cellulaire.

Une étude de l'endomètre chez la femme a révélée que PTEN pourrait être régulée par la progestérone lors du cycle menstruel (Mutter et al. 2000). Il n'est donc pas exclu que cette protéine puisse être régulée par les hormones stéroïdiennes, en particulier la progestérone, pendant la gestation. Aussi, une étude menée par notre laboratoire démontre que dans certaines lignées cellulaires où l'on retrouve PTEN muté, le niveau de phosphorylation de Akt est augmenté, permettant ainsi l'activation de la voie de survie cellulaire de la PI 3-K via le facteur de transcription NF- κ B (St-Germain et al. 2004).

1.8.4 NF- κ B, I κ B

NF- κ B (« Nuclear Factor kappa B ») fut initialement caractérisé comme un facteur de transcription nécessaire à l'expression de gènes spécifiques aux cellules B. Il est maintenant connu que NF- κ B fait partie de la famille des facteurs de transcription Rel et est responsable de l'activation d'une grande variété de gènes (Mercurio et Manning 1999). En effet, NF- κ B est présent dans la majorité des types cellulaires et est impliqué dans plusieurs processus cellulaires importants comme : (a) l'inflammation (Baeuerle 1998), (b) la suppression de l'apoptose (Wang et al. 1996) et, (c) la prolifération cellulaire (Baldwin 1996). Comme chaque membre de la famille Rel, NF- κ B possède une région amino-terminale nommée « Rel-homology domain » (RHD), lui permettant de se lier à l'ADN et de former des hétérodimères, et le «nuclear localization signal» (NLS), permettant sa translocation nucléaire (May et Ghosh 1998). NF- κ B est

formé d'un hétérodimère dont le plus souvent rencontré est constitué des sous-unités p50 et p65, p50 étant responsable de la fixation à l'ADN (Ghosh et al. 1990) et p65 de la fixation à la protéine « Inhibitory subunit kappa B » (IκB) (Nolan et al. 1990).

Sans stimulation de la cellule par des cytokines, des facteurs de croissance ou par des protéines immunorégulatrices, NF-κB est inactif au niveau du cytoplasme de la cellule. En fait, NF-κB est lié à une protéine inhibitrice, IκB-α. Par cette interaction, le signal de localisation nucléaire de NF-κB est masqué, empêchant ainsi sa translocation nucléaire. À la suite à une stimulation cellulaire adéquate, IκB-α sera phosphorylée au niveau de sa Ser32 et de sa Ser36 (May et Ghosh 1998), cette phosphorylation modifie la conformation de IκB-α exposant ainsi une séquence contenant des lysines, marquant la protéine pour l'ubiquitination. Ces deux processus (phosphorylation + ubiquitination) sont nécessaires à l'induction de la dégradation de IκB-α par le protéasome 26S (Chen et al. 1995). NF-κB est alors libéré et peut être transloqué au niveau du noyau dans le but d'activer la transcription de gènes cibles (Figure 1.11). La phosphorylation de IκB-α est possible grâce à un complexe d'environ 700 kDa nommé IκB kinase (IKK) constitué de deux sous-unités : IKKα et IKKβ (Zandi et al. 1997).

Notons que la voie de la PI 3-K est impliqué dans la régulation de NF-κB (Kane et al. 1999). Une étude menée par notre laboratoire a démontré pour la première fois le rôle crucial de Akt dans la régulation de l'activité de NF-κB via la phosphorylation de IκB dans des cellules cancéreuses endométriales (St-Germain et al. 2004). Ces résultats indiquent qu'il existe une relation étroite entre la voie de signalisation cellulaire de la PI 3-K/Akt et le facteur de transcription NF-κB. De plus, il est connu que ce facteur de transcription est impliqué dans la transcription des « inhibitor of apoptosis proteins » (IAPs) (Stehlik et al. 1998; Zou et al. 2004).

1.8.5 XIAP

XIAP (« X-linked inhibitor of apoptosis ») est un inhibiteur de caspases appartenant à la famille des IAPs. Cette famille de protéines fut décrite pour la première fois par Crook et ses collègues dans le cadre d'une étude sur les baculovirus (Crook et al. 1993). Jusqu'à maintenant, huit membres de la famille ont été identifiés : XIAP, IAP1, IAP2, ILP2, NAIP, survivin, BRUCE et livin (Schimmer et al. 2004). Les membres de la famille sont classés selon leur nombre de motifs « baculovirus IAP repeat » (BIR), un motif d'environ 70 acides aminés. XIAP en contient trois, nommés BIR1, BIR2 et BIR3. Son domaine BIR2 permet l'inhibition de la caspase-3 et de la caspase-7, alors que BIR3 permet l'inhibition de la caspase-9 (Sun et al. 1999), empêchant ainsi l'apoptose. XIAP possède un domaine RING en C-terminal, celui-ci est responsable d'une auto-ubiquitination et donc de la dégradation de XIAP suite à un stimulus apoptotique (Devi 2004), il est aussi connu que XIAP peut être clivé par certaines caspases (Devereaux et al. 1999). De plus, Smac/DIABLO, une protéine pro-apoptotique, est un inhibiteur connu de XIAP, il est relâché de la mitochondrie en même temps que le cytochrome C et peut alors se lier au domaine BIR3 de XIAP prévenant ainsi son association avec les caspases (Shiozaki et Shi 2004)

Il a été démontré que XIAP est impliqué dans : (a) la dégradation de I κ B, (b) l'activation de NF- κ B, et, (c) la translocation de NF- κ B au niveau du noyau (Schimmer et al. 2004) et donc de son activation. Aussi, il a été démontré que la surexpression de XIAP induit la phosphorylation/activation de Akt dans les cellules de la granulosa de rat (Asselin et al. 2001) et dans le cancer de type épithélial de l'ovaire (Asselin et al. 2001a). Finalement, Leblanc et son équipe démontré que XIAP et Smac/DIABLO sont régulés de façon opposée dans l'endomètre de la ratte lors du cycle oestral. En effet, au moment de l'oestrus, ils ont observé un taux élevé de la protéine XIAP, alors que Smac/DIABLO était à son minimum d'expression (Leblanc et al. 2003).

1.8.6 Famille Bcl-2

La famille des « B-cell lymphoma 2 » (Bcl-2) comprend des protéines pro-apoptotiques (Bax, Bad, Bid) et anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-x_L). Tous les membres de cette famille possèdent au moins un des quatre motifs « Bcl-2 homology domains » (BH) (Adams et Cory 1998) nécessaires à la formation d'homo- ou d'hétérodimères et à l'activité anti- ou pro-apoptotique de ces protéines. L'hétérodimérisation de ces protéines leur permet de s'activer ou de s'inhiber l'une l'autre pour maintenir la balance entre les facteurs de survie et de mort cellulaire. Elles peuvent être divisées en trois sous-familles, la première étant constituée des protéines anti-apoptotiques et contenant les quatre domaines BH : BH1 à BH4, la deuxième contenant les domaines BH1 à BH3 et la dernière étant constituée uniquement de protéines pro-apoptotiques contenant seulement le domaine BH3 (Tsujimoto 1998).

Bcl-2 et Bcl-x_L (« Bcl2-like 1 ») sont situées au niveau de la membrane externe de la mitochondrie, du réticulum endoplasmique et au niveau de la membrane du noyau. Ces deux protéines anti-apoptotiques préviennent la relâche mitochondriale de facteurs apoptotiques comme le cytochrome C prévenant ainsi l'activation des caspases (Adams et Cory 1998). L'augmentation de la quantité de cytochrome C relâché dans le cytoplasme a pour conséquence la formation d'un complexe nommé apoptosome. Celui-ci est formé de cytochrome C, d'Apaf-1 (« apoptosis protease activating factor-1 »), de la pro-caspase-9 et d'adénosine triphosphate (ATP). L'interaction du cytochrome C et de Apaf-1 favorise l'activation de la pro-caspase-9 (Cohen 1997). Une fois activée, la caspase-9 est responsable du clivage de la caspase-3, elle-même responsable du clivage de protéines clés dans la cellule, par exemple PARP (poly (ADP-ribose) polymerase), une enzyme nucléaire qui agit en tant que facteur de transcription (Bello et al. 2004) menant ainsi à l'apoptose.

L'hétérodimérisation n'est pas la seule façon d'inhiber ou d'activer les membres de la famille des Bcl-2. La phosphorylation/déphosphorylation est aussi un mécanisme connu. En effet, Bad (« Bcl-2-antagonist of cell death »), une protéine pro-apoptotique, est inhibée lorsque phosphorylée par Akt à la suite d'un stimulus de survie ou de prolifération cellulaire, elle est alors séquestrée par une protéine cytosolique que l'on nomme 14-3-3, ceci prévient la formation d'un hétérodimère avec Bcl-x_L au niveau de la mitochondrie et par le fait même empêche la relâche de cytochrome C (Gajewski et Thompson 1996). Il existe donc une relation importante entre certains membres de la famille des Bcl-2 et Akt.

Bid « BH3-interacting domain death agonist », quant à lui, est activé suite au clivage par la caspase-8 (Li et al. 1998). À la suite d'un stimulus apoptotique, Bax (« Bcl2-associated X protein »), un autre membre de cette famille, s'intègre dans la membrane de la mitochondrie comme un homodimère et forme un canal ionique (Schendel et al. 1997) dans le but de déstabiliser la membrane mitochondriale conduisant au relargage de cytochrome C et d'autres facteurs induisant l'apoptose. Par contre, l'hétérodimérisation de Bax avec Bcl-2 ou Bcl-x_L prévient l'habileté de cette molécule à induire l'apoptose (Gajewski et Thompson 1996). Les membres anti-apoptotiques de la famille des Bcl-2 peuvent aussi empêcher les processus apoptotiques en séquestrant directement les caspases. En effet, Bcl-x_L se fixe directement à la pro-caspase-8 et à l'apoptosome pour prévenir la cascade des caspases et l'apoptose (Hu et al. 1998).

1.8.7 CDC47/MCM7

Une autre protéine impliquée dans la survie et la prolifération cellulaire est CDC47/MCM7 (« Cell Division Cycle 47/Mini Chromosome Maintenance protein 7 »). Elle fait partie de la famille des polypeptides « Mini Chromosome Maintenance »

(MCMs). Elle est recrutée durant la phase G1 du cycle cellulaire et est nécessaire à la formation d'un complexe de pré-réplication et à l'initiation de la réplication de l'ADN (Dalton et Hopwood 1997). Elle est donc grandement utilisée comme marqueur de prolifération cellulaire.

Au moment de l'œstrus chez le rat, il a été observé une diminution de la phosphorylation de Akt et au même moment, une baisse de l'expression du marqueur de prolifération cellulaire CDC47/MCM7 (Déry et al. 2003). Il est donc possible qu'une telle situation se produise au moment de la régression déciduale.

1.9 Hypothèse et objectifs

Plusieurs indices nous portent à croire que la voie de survie cellulaire de la PI 3-K/Akt et XIAP pourraient être impliquées dans les processus de signalisation intracellulaire dans l'endomètre en fin de gestation. Les objectifs de cette étude sont donc les suivantes : (a) déterminer l'implication de XIAP et de la PI 3-K/Akt dans les processus apoptotiques au moment de la régression déciduale, (b) déterminer l'importance de la voie de survie cellulaire de la PI 3-K/Akt dans la préparation à la parturition et, (c) caractériser l'expression des trois isoformes de Akt dans l'endomètre de la ratte en fin de gestation.

CHAPITRE II

RÉGULATION DE LA VOIE DE LA PI 3-K/Akt DANS L'ENDOMÈTRE DE LA RATTE DURANT LA GESTATION

Préface

Les auteurs de l'article qui suit sont : (a) Guylaine Fréchette-Frigon (moi-même), qui a fait la rédaction de l'article et les expériences concernant les jours de gestation et a participé à la mise en place de la banque de protéines, (b) Carl Shooner a fait les expériences concernant la culture cellulaire et a contribué à l'élaboration de la banque de protéines provenant des utérus de rattes gestantes, (c) Valérie Leblanc a aussi grandement contribué à l'élaboration de la banque de protéines, (d) Dr. Éric Asselin est le directeur de cette recherche, il a donc fait la supervision de la recherche et la révision de l'article.

Résumé

En début de gestation chez le rat, l'embryon s'accroche à l'épithélium endométrial dans le but de s'implanter dans la paroi utérine, les cellules épithéliales entrent alors en apoptose. Une seconde vague d'apoptose est observée dans les cellules déciduales de l'endomètre en fin de gestation, c'est ce que l'on nomme la régression déciduale (jour 14 à 20). La parturition chez le rat survient environ au jour 22 de gestation et de nombreux agents, entre autre, les prostaglandines et les hormones stéroïdiennes jouent un rôle central dans ce processus. De plus, par sa capacité à fournir des prostaglandines au myomètre, l'endomètre est impliqué dans la parturition. Cependant, les mécanismes intracellulaires et moléculaires impliqués dans la régression déciduale et la parturition au niveau des cellules endométriales sont peu connus et documentés. L'objectif de la présente étude est donc de déterminer la présence et la régulation de XIAP et du chemin

de survie cellulaire de la PI 3-K/Akt dans l'endomètre de la ratte en fin de gestation et de déterminer l'implication possible de ce chemin de survie avant la parturition. Pour ce faire, nous avons utilisé un modèle *in vivo* : la ratte gestante. Les rattes ont été accouplées et par la suite euthanasiées à différents jours de gestation (jours 12 à 22). Les utérus ont ensuite été recueillis pour en collecter les cellules endométriales et en extraire les protéines pour des analyses de type Western. La prolifération cellulaire, déterminée par l'expression de CDC47/MCM7 est faible lors de la régression déciduale (jour 14 à 20). De plus, la forme active de Akt, P-Akt, diminue lors de la régression déciduale, alors qu'elle augmente aux jours 21 et 22 de gestation. Nous avons observé le même patron d'expression pour I κ B- α , et NF- κ B dans les derniers jours de gestation (jours 21 et 22). XIAP montre un patron d'expression similaire à celui de P-Akt à partir du jour 14 de gestation. Akt1 diminue à partir du jour 14 et Akt2 est exprimée de façon constitutive du jour 14 à 22, alors que Akt3 est exprimé exclusivement aux jours 21 et 22 et est absent au moment de la régression déciduale. Le second modèle utilisé pour notre étude est la culture de cellules déciduales provenant de rattes préalablement traitées au 17 β -oestradiol et à la progestérone. Ces traitements nous permettent d'induire la décidualisation *in vivo*. L'endomètre est par la suite recueilli pour la culture cellulaire. L'inhibiteur de la PI 3-K, la LY294002, bloque la phosphorylation de Akt et diminue l'expression de XIAP *in vitro* dans les cellules déciduales. Ces résultats suggèrent que XIAP et Akt pourraient être des molécules de signalisation cellulaire par lesquelles l'apoptose est régulée dans l'endomètre de la ratte et que la voie de la PI 3-K/Akt pourraient être impliquée dans le processus de parturition via NF- κ B. Cette étude est la première à montrer la régulation de XIAP et de la PI 3-K/Akt dans l'endomètre de la ratte gestante.

Regulation of the PI 3-K/Akt survival pathway in the rat endometrium during late gestation

Guyline Fréchette-Frigon, Carl Shooner, Valérie Leblanc and Eric Asselin*

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

Short title: PI 3-K/Akt signaling pathway in the pregnant rat endometrium

Key words: Phosphatidylinositol 3-kinase, Akt, PTEN, XIAP, Bcl-2, NF- κ B, DB regression, gestation, parturition

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

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

ABSTRACT

During rat pregnancy, trophoblast of the tiny embryo begins to join with the endometrium, and epithelial cells undergo apoptosis. A second wave of apoptosis is also observed in the decidua basalis (DB) reaching the end of pregnancy (from day 14 to 20). Rat parturition occurs around day 22 of pregnancy and many agents like oxytocin, sex steroids and prostaglandins play central roles in this process. Additionally, decidua is thought to be involved in the onset of human parturition by providing prostaglandins. However, little is known about the intra-cellular and molecular mechanisms involved in DB regression and parturition. The objective of the present study was to investigate the regulation of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP, a well known caspase inhibitor) and phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-K)/Akt survival pathway in the rat endometrium during late pregnancy and to investigate the possible role of this survival pathway prior rat parturition. Rats were killed at different days of pregnancy (days 12-22) and uteri removed to prepare endometrial protein extracts. Cell proliferation, determined by the expression of proliferation marker CDC47/MCM7, was low during DB regression. The active form of Akt (phospho-Akt) was reduced during DB regression, while it increased on days 21 and 22 of pregnancy. We observed the same pattern for I κ B- α and for the transcription factor NF- κ B on days 21 and 22 of gestation. XIAP showed a similar pattern of expression as observed with phospho-Akt around day 14 of pregnancy. Akt1 is down-regulated from days 12 to 14 and Akt2 is constitutively expressed from days 14 to 22 but Akt3 is expressed on days 21 and 22 only and is absent at time of DB regression. PI 3-K inhibitor LY294002 blocked Akt phosphorylation and reduced XIAP expression *in vitro* in decidual cells. These results suggest that XIAP and the Akt may be important signaling molecules by which apoptosis is regulated in the rat endometrium and that PI 3-K/Akt pathway may be involved in the process of rat parturition probably through NF- κ B. This study is the first to report expression and regulation of XIAP and PI 3-K/Akt in the uterus of pregnant rats.

INTRODUCTION

During embryo implantation in rodents, the trophoblast possesses invasive properties to deeply infiltrate the uterine endometrium (1;2). Under the effect of estrogen and progesterone, endometrial stromal cells begin a process called decidualization. During implantation, epithelial cells of the endometrium undergo apoptosis at the time when trophoblast joins with the uterus cell wall. A second wave of apoptosis occurs around day 14 of pregnancy in the decidua basalis (DB) (3;4). Although some studies have demonstrated that TGF- β might be involved in triggering apoptosis during DB regression (5;6), the specific intracellular mechanisms controlling apoptosis in rat decidual endometrial cells are poorly understood and documented. Numerous studies have demonstrated that prostaglandins and cytokines are directly implicated in parturition (7;8). The human fetal membranes and decidua may be important in the onset and/or progression of labour by providing prostaglandins (PGs) (9). However, the stromal cell signaling pathways involved in transcription of key genes implicated in parturition are not fully understood.

Akt is a 60 kDa serine/threonine protein kinase recruited to the plasma membrane and activated by phosphorylation at threonine 308 and serine 473 in response to growth factors and cytokines through PI 3-kinase (10). To date, three isoforms of Akt have been identified: Akt1, Akt2 and Akt3. Akt2 and Akt3 have 81% and 83% homology in amino acid sequences with Akt1, respectively (11). Once phosphorylated, Akt has been shown to phosphorylate and inactivate several pro-apoptotic protein such as Bad. Akt also block cytochrome C release from mitochondria through regulation of Bcl-2 (12). Once it has been released, cytochrome C binds to Apaf-1, resulting in the recruitment and activation of caspase-9 which in turn regulates and activates caspase-3, one of the key executioners of apoptosis. Caspase-3 is responsible for the proteolytic cleavage of many key cellular proteins, such as PARP (poly(ADP-ribose)polymerase), a nuclear enzyme responsible for DNA repair and which also acts as a transcription factor (13;14).

Recently, it has also been shown that Akt is involved in the phosphorylation of IKK resulting in NF- κ B activation and translocation to the nucleus (15). Phosphatase and Tensin homologue (PTEN) is a tumor suppressor gene implicated in a wide variety of human cancers (16). This pro-apoptotic protein acts as a negative regulator on PI3-K pathway by dephosphorylation of PIP₃ into PIP₂ and preventing the phosphorylation of Akt, leading the cell towards apoptosis (17).

Inhibitor of Apoptosis Protein (IAPs) constitute a family of intracellular anti-apoptotic proteins, which were first identified as analogs of genes present in baculovirus. They are characterized by one or more baculovirus IAP repeats, called BIR domains that are responsible for their anti-apoptotic activity (18). It includes X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein (XIAP), human IAP-1 (HIAP-1), human IAP-2 (HIAP-2), neuronal apoptosis inhibitory protein (NAIP) and survivin (19). With the exception of NAIP and survivin, they include a C-terminal RING-Zinc finger domain, believed to be involved in protein-protein and protein-nucleic acid interactions. XIAP has been shown to be a direct inhibitor of caspase-3 and caspase-7 and to interfere with the Bax/cytochrome C pathway by inhibiting caspase-9 (20;21). It has been shown recently that XIAP might also be involved in cell survival through regulation of Akt phosphorylation in different systems (22;23).

Bcl-2 and related cytoplasmic proteins are also regulators of apoptosis. The Bcl-2 family of proteins are represented by 16 homologs having pro-apoptotic or pro-survival properties (24). Bcl-2 protein promotes cell survival by inhibiting adapters needed for activations of proteases like caspases which are key executioners of cell death. On the other hand, pro-apoptotic proteins like Bax promote apoptosis when activated by phosphorylation. Pro-apoptotic and anti-apoptotic proteins of the Bcl-2 family can heterodimerize and regulate homeostatic balance between cell survival and cell death. Another protein involved in cell survival and proliferation is CDC47/MCM7, a member of the minichromosome maintenance (MCM) family of polypeptides. CDC47/MCM7

has a role in the early stages of chromosomal DNA replication and has been implicated in the regulatory machinery allowing DNA to replicate during S phase, and it is used as a proliferation marker (25).

The transcription factor NF- κ B is a pleiotropic activator that participates in the induction of a wide variety of cellular genes (26). It has been shown to be important in inflammation and in the control of apoptosis and cell proliferation (27). NF- κ B is a heterodimer of two proteins: p50 and p65. NF- κ B lies dormant in the cytoplasm through the binding of I κ Bs inhibitory proteins. Upon stimulation of the cell, I κ B- α is phosphorylated by the I κ B kinase complex (IKK complex) on serine 32 and serine 36 and targeted for degradation by ubiquitin/26 S proteasome pathway. This allows the free NF- κ B heterodimer to translocate to the nucleus and bind to DNA where it can activate transcription (28;29).

The aim of the present study was to characterize the expression of XIAP and PI 3-K/Akt survival pathway in the rat uterus during late pregnancy during this important process of pregnancy and to determine the involvement of PI 3-K/Akt pathway at time preceding rat parturition.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Akt, Phospho-Akt (ser 473), Akt1, Akt2, Akt3, PTEN, XIAP, NF- κ B p65 and I κ B- α antibodies were obtained from Cell Signaling Technology (Beverly, Massachusset, USA). CDC47/MCM7 and Bcl-2 antibodies were obtained from Mediacorp (Montréal, QC, Canada). LY294002 was purchased from Sigma-Aldrich (ON, Canada).

Animals

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

Induction or rat pseudopregnancy

A total of 10 rats were ovariectomized and then allowed to recover from surgery for a minimum of 10 days. They were pre-treated with physiological doses of estradiol (1,3,5(10)-Estratriene-3,17 β -diol, Sigma-Aldrich) and progesterone (Laboratoire Mat, QC, Canada) to induce decidualization as described previously [3]: 1) an injection of 0.2 μ g estradiol per day for three days (in the morning, day -2, -1 and 0); 2) On the third day (day 0 of pseudopregnancy), another estradiol injection in the afternoon (0.2 μ g) and progesterone (1 mg) was performed; 3) No treatment for 2 days (day 1 and 2 of pseudopregnancy); 4) Injections of estradiol (0.1 μ g) and progesterone (4 mg) for three days (day 3, 4 and 5 of pseudopregnancy); 5) Another injection of estradiol (0.1 μ g) in the afternoon on day 7 (day 4 of pseudopregnancy); 6) Rats were killed on day 8 (day 5 of pseudopregnancy).

Decidual cell culture

Uteri from pseudopregnant rats (day 5) were removed and horns taken and immersed in HBSS solution containing HEPES (20 mM), penicillin (100 units/ml), streptomycin (100 μ g/ml) and fungizone (1.25 μ l/ml) (Invitrogen, ON, Canada). Further manipulations

were performed in a sterile environment. The uterine horns were transferred into a sterile petri dish containing HBSS, slit longitudinally and immersed in trypsin type I solution (0.3%) (Roche Diagnostics, QC, Canada) in HBSS and agitated for 60 minutes at room temperature. Uterine horns were then vortexed at maximum speed for 5 sec and supernatant containing epithelial cells was discarded. Uterine horns were washed three times with 2.5 ml of HBSS and immersed in a HBSS solution containing trypsin type I (0.03%), DNase I (0.016%) and collagenase type II (0.064%) for 15 minutes at 37°C in a water bath. Uterine horns were then vortexed at maximum for 5 sec. The supernatant containing stromal cells was transferred into a sterile falcon tube containing 150 µl of FBS D.C. (Dextran-Charcoal extracted). Uterine horns were washed two times with 2.5 ml of HBSS and the supernatant was added to the tube containing stromal cells. Uterine horns were discarded and stromal cells were centrifuged at 1000 g for 5 minutes. Cells were washed two times with HBSS and centrifuged. The supernatant was discarded and cells were resuspended in DMEM-F12 (Invitrogen, On, Canada) containing 2.438 g/L NaHCO₃, 10% FBS D.C. and 50 µg/ml gentamycin. Cells were plated in 6-well plates (Corning plates) at a density of 4×10^5 cells per well and incubated at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂. The medium was changed two hours after the first incubation in order to eliminate unadhered epithelial cells from stromal cell cultures. The purity of stromal cells was more than 97%, as evaluated by cellular morphology and immunofluorescence using an epithelial-specific Keratin 8/18 antibody. Three to 5 days after plating (more than 90% of confluency reached), cells were treated for 24 hours in the presence or absence of increasing doses of LY294002. Total proteins from treated cell cultures were extracted using TRIzol (Invitrogen, ON, Canada). For Western blot analyses, 15 µg of total protein was used.

Protein extraction from pregnant endometrium and Western blot analysis

Protein homogenates from pregnant endometrium were prepared according to a protocol previously described (30). Briefly, uteri from Day 12 to Day 20 of pregnant rats were rapidly excised and placed in ice-cold saline until dissected. Uteri were carefully laid on a glass plate and placed on the stage of a dissecting microscope and endometrium was isolated by gently separating the placenta and myometrial regions with 23-gauge

needles. The protocol for decidua basalis (DB) was described previously by Ogle and George (31). Noteworthy, the DB began to regress on Day 14 and became too thin to reliably dissect after day 17. Endometrial cells from pregnant animals were homogenized using a pipette in RIPA lysis buffer (PBS 1X pH 7.4; 1% Nonidet P-40; 0.5% Sodium deoxycholate; 0.1% SDS; CompleteTM protease inhibitor cocktail tablets (Roche Diagnostics Canada, PQ). The supernatant was recovered and stored at -20°C pending analysis. Protein content was determined with the Bio-Rad DC Protein Assay. Protein extracts (50 µg) were heated at 94°C for 3 min, resolved by 10% SDS-PAGE and electrotransferred to nitrocellulose membranes using a semi-dry transfer apparatus (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada). The membranes were then blocked 1 h at room temperature with PBS containing 5 % milk powder, then incubated with anti-Akt 1:1000; P-Akt (Ser 473)/XIAP/PTEN/Bcl-2 1:500, Akt1 1:4000, Akt2/3 1:750, CDC47/MCM7 1:1000, NF-κB p65/IκB-α 1:750 and subsequently with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse secondary antibody (1:3000 or 1:2000; at room temperature for 45 min). All membranes were reprobed with an antibody specific to β-actin or GAPDH which were used as internal standards. Peroxidase activity was visualized with the Super signal[®] West Femto maximum sensitivity substrate (Pierce, Arlington Heights, IL, USA), according to the manufacturer's instructions. Signal was visualized using the Biochemi Imaging System (UVP, CA, USA). Densitometrical analysis was performed using the Quantity One software (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada). Results are expressed as a ratio (protein of interest/β-actin or GAPDH) to correct for loading for each endometrial sample.

Statistical analysis

Western analysis of pregnant animals were repeated four to eight times (4 to 8 different rats/endometrial extract per day of pregnancy). Endometrial extracts from each rat were assessed individually. Western analysis of cultured decidual cells were repeated 5 times for each LY294002 dose. Results subjected to statistical analysis were expressed as mean ± 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

We have previously shown using TUNEL, immunofluorescence and western analysis of cleaved PARP and cleaved caspase-3 that apoptosis occurred during DB regression (6). In the current study, complementary experiments were performed to quantify cellular proliferation during rat pregnancy. Western blot analysis of CDC47/MCM7, a well known proliferation marker, was carried out on endometrium from pregnant rats (days 12 to 22 of pregnancy). Figure 1 shows that CDC47/MCM7 positive cells are present throughout late pregnancy but significantly reduced at the time of DB regression.

Since we have recently demonstrated the importance of Akt activity inhibition in TGF- β induced-apoptosis in rat decidual cells *in vitro* (6), we sought to determine its expression and activity during late pregnancy. We found that Akt and P-Akt levels gradually reduced from days 14 to 20 of pregnancy (Figure 2). These results support the fact that this pathway is less active when apoptotic processes are triggered at the time of DB regression, and reinforce the idea that Akt activity is related to cell survival. In order to pinpoint which Akt isoform was downregulated during late pregnancy, we have determined the expression level of the three Akt isoforms at the time of DB regression (days 12-20) and at the end of pregnancy (days 21-22). Results showed that Akt1 was reduced from days 12 to 14 while Akt2 levels remained constant throughout late gestation (Fig. 3). However, Akt3 was detected only at the end of pregnancy (days 21-22), suggesting a possible role for Akt3 at time of parturition instead of an action in DB regression.

To further investigate the regulation of factors that might be involved in cell survival, other proteins known to regulate PI 3-K/Akt pathway activity such as Bcl-2, PTEN and XIAP were studied (Figure 4). We found a strong and constant expression level of Bcl-2, a pro-survival member of the Bcl-2 family, throughout late gestation, which argues against a role for Bcl-2 in DB regression. PTEN, a pro-apoptotic phosphatase

directly and negatively involved in Akt phosphorylation, was reduced on days 14 to 20; PTEN is thus unlikely to participate in DB regression. Several studies have shown a possible link between XIAP expression and Akt activity (22;32) and we sought to determine its expression in pregnant rat endometrium. XIAP expression was reduced from day 14 to 20; concomitant P-Akt downregulation indeed suggests a functional link between XIAP expression and Akt activity. To verify this hypothesis, LY294002, a well known and characterized phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor (33), was used to block Akt phosphorylation in cultured decidual cells (Figure 5). As hypothesized, LY294002 prevented Akt phosphorylation and reduced XIAP expression in a dose-dependent manner (Fig. 5), suggesting that Akt activity may regulate XIAP expression in decidual cells, as observed in other systems (22;32).

To investigate the regulation of factors that might be involved in rat parturition, the expression of Akt, P-Akt, I κ B- α and P-I κ B protein and transcription factor NF- κ B were studied. We found no change in the expression of total Akt, but an increase in Akt activity on days 21-22 of pregnancy; the highest activity was observed on day 22 (Fig. 6). Moreover, we observed an increase of I κ B- α and P-I κ B from days 18 to 21 of pregnancy and of NF- κ B from days 18 to 22, suggesting a role for the PI 3-K/ Akt pathway and NF- κ B at the onset of parturition.

DISCUSSION

Numerous studies describe the decidualization processes in rats and mice (see (34;35;36) for reviews) and the involvement of apoptosis during those critical stages of embryo development (3;6;37). Previous work carried out in our laboratory confirmed the presence of apoptosis during DB regression and demonstrated that TGF- β 1, - β 2 and - β 3 isoforms might be important regulators of cell fate during this process (6). The aim of the present study was to characterize the regulation of the PI3-K/Akt survival pathway

and XIAP expression in the rat uterus during apoptosis activation at the time of DB regression and to investigate the possible role of this survival pathway before the onset of parturition (day 21-22).

The present results strengthen our hypothesis that the active form of Akt (phospho-Akt) is a key point of control during cell survival events occurring in the endometrium during rat pregnancy. At the time of DB regression, Akt phosphorylation is reduced and apoptosis is increased as demonstrated by the presence of the cleaved caspase-3 fragment (6). We have recently underlined that increased Akt expression and activity in response to 17β -estradiol in the cycling rat uterus might be an important mechanism to protect endometrial cells from apoptotic triggering and to induce endometrial cell proliferation, whereas inhibition of Akt activity might lead to caspase-3 activation and apoptosis in endometrial cells (38). A similar process might be involved in the pregnant rat uterus. However, the presence of active cleaved caspase-3 does not necessarily indicate that apoptosis will be triggered since many caspase inhibitors can be present in the cytoplasm to block their activities. One example of such inhibitor is the X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP). Surprisingly, our results showed that XIAP expression was high at the beginning of DB regression (day 14 of pregnancy). Since XIAP is an anti-apoptotic factor, logically its expression should be reduced at the time of apoptosis induction. Nonetheless, in the uterus of cycling rats, a similar situation was observed: apoptosis was strong at estrus even though XIAP expression was maximal (22). It is therefore possible that XIAP be inhibited on day 14 of pregnancy to allow apoptosis of decidual cells. This inhibition could be accomplished by Smac/DIABLO. Although it has been shown in ovariectomized rats that XIAP expression was increased by 17β -estradiol, which is consistent with the mitogenic activity of 17β -estradiol and the apoptosis inhibitory activity of XIAP. In the present study XIAP expression positively correlates with proliferation, supporting the anti-apoptotic properties of this inhibitor of caspases activity, cellular activities other than inhibition of caspases have recently been ascribed to XIAP. Notably, it has been demonstrated that XIAP functions as a cofactor for TGF- β 1 in the regulation of gene expression (39).

Our observation of concomitant inhibition of Akt phosphorylation and down-regulation of XIAP expression in stromal cells upon exposure to PI3-K inhibitor LY294002 indicates that Akt activity may be involved in the regulation of XIAP expression. In addition, since Akt activity can induce NF- κ B mobilization and activation, (40;41), it is possible that Akt upregulates XIAP via NF- κ B in decidual cells.

The presence of *bcl-2* in some tissues responsive to steroid hormones, such as endometrium and myometrium, suggested that *bcl-2* gene expression may be related to hormone-dependent apoptosis (42). In a study using ovariectomized rats primed with 17 β -estradiol and treated with progestin and 17 β -estradiol before an intrauterine stimulus to initiate decidualization, expression of *bcl-2* was decreased (43). However, the present results showed that *bcl-2* expression is not modulated throughout late pregnancy and rather suggest that although Bcl-2 protein may be important to control cell survival, its elimination or down-regulation might not be important in the control of apoptosis in the rat uterus during DB regression.

PTEN, a phosphatase localized at the plasma membrane (44) which directly dephosphorylates the phospholipid PIP₃ and is important for Akt phosphorylation/activation (45), might, contrary to our hypothesis, not be the phosphatase involved in the diminution of Akt activity in DB regression since the level of PTEN protein at time of DB regression remained unchanged while P-Akt levels decreased. The current results clearly show that PTEN protein was present in the endometrium and was not influenced by hormonal changes observed during late pregnancy. A study in the human endometrium revealed that PTEN might be regulated by progesterone (46) but it is not the case here in the rat endometrium.

At the end of pregnancy, we observed an increased of Akt phosphorylation, Akt3 protein content and NF- κ B p65 subunit expression. Recently, it has also been shown that Akt can regulate signaling pathway that lead to activation of NF- κ B (47). Moreover, previous reports indicate that the transcription factor NF- κ B can control the transcription of cyclooxygenase-2 (COX-2) gene through the IKK pathway activation in different systems (11;40). Our results suggest that the PI 3-K/Akt pathway might be involved in parturition through NF- κ B transcription factor; it is therefore possible that a subsequent COX-2 mRNA upregulation would lead to prostaglandins production by endometrial cells. This hypothesis is currently under investigation in our labroatory.

CONCLUSION

In conclusion, this study demonstrates for the first time that Akt activity and XIAP expression might be important points of control to direct endometrial cell fate during late pregnancy. The present study also shows that the three isoforms of Akt are differently regulated in rat endometrial cells in late pregnancy and that PI 3-K/Akt pathway might be involved in rat parturition through NF- κ B. Further analysis will be necessary to determine the interaction between Akt isoforms and XIAP during pregnancy, the localization of NF- κ B in the endometrial cells at the end of pregnancy and its regulation through the PI 3-K/Akt pathway, and the expression of COX-2 protein and mRNA in stromal cells at the end of pregnancy.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Mrs Rollande Caron for the contribution of her precious time and expertise to our project. We thank also Mrs Daphne Efford and Dr Céline Van Themsche for reviewing the manuscript.

REFERENCES

1. **Tabibzadeh S, Babaknia A** 1995 The signals and molecular pathways involved in implantation, a symbiotic interaction between blastocyst and endometrium involving adhesion and tissue invasion. *Hum Reprod* 10:1579-1602
2. **Barkai U, Kraicer PF** 1996 Intrauterine signaling and embryonic implantation. *Biol Signals* 5:111-121
3. **Pampfer S, Donnay I** 1999 Apoptosis at the time of embryo implantation in mouse and rat. *Cell Death Differ* 6:533-545
4. **Gu Y, Jow GM, Moulton BC, Lee C, Sensibar JA, Park-Sarge OK, Chen TJ, Gibori G** 1994 Apoptosis in decidual tissue regression and reorganization. *Endocrinology* 135:1272-1279
5. **Moulton BC** 1994 Transforming growth factor-beta stimulates endometrial stromal apoptosis in vitro. *Endocrinology* 134:1055-1060
6. **Shooner C, Caron PL, Frechette-Frigon G, Leblanc V, Dery MC, Asselin E** 2005 TGF-beta expression during rat pregnancy and activity on decidual cell survival. *Reprod Biol Endocrinol* 3:20
7. **Fang X, Wong S, Mitchell BF** 1996 Relationships among sex steroids, oxytocin, and their receptors in the rat uterus during late gestation and at parturition. *Endocrinology* 137:3213-3219
8. **Kelly RW** 1996 Inflammatory mediators and parturition. *Reviews Reprod* 1:89-96
9. **Yan X, Sun M, Gibb W** 2002 Localization of Nuclear Factor- κ B (NF- κ B) and inhibitory factor- κ B (I κ B) in human fetal membranes and decidua at term and preterm delivery. *Placenta* 23:288-293
10. **Songyang Z, Baltimore D, Cantley LC, Kaplan DR, Franke TF** 1997 Interleukin 3-dependent survival by the Akt protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:11345-11350
11. **Vanhaesebroeck B, Alessi DR** 2000 The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J* 76:346-561
12. **Datta SP, Brunet A, Greenberg ME** 1999 Cellular survival: a play in three Akts. *Genes and dev* 13:2905-2927
13. **Cohen GM** 1997 Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326:1-16
14. **D'Amours D, Desnoyers S, D'Silva I, Poirier GG** 1999 Poly(ADP-ribosylation) reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem J* 342:249-268

15. **Wang Y, Chang J, Li YC, Li YS, Shyy JY, Chien S** 2002 Shear stress and VEGF activate IKK via the Flk-1/Cbl/Akt signaling pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286:H685-H692
16. **Myers MP, Pass I, Batty IH, Van dK, Stolarov JP, Hemmings BA, Wigler MH, Downes CP, Tonks NK** 1998 The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:13513-13518
17. **Stiles B, Groszer M, Wang S, Jiao J, Wu H** 2004 PTENless means more. *Dev Biol* 273:175-184
18. **Nachmias B, Ashhab Y, Ben Yehuda D** 2004 The inhibitor of apoptosis protein family (IAPs): an emerging therapeutic target in cancer. *Semin Cancer Biol* 14:231-243
19. **Liston P, Roy N, Tamai K, Lefebvre C, Baird S, Cherton-Horvat G, Farahani R, McLean M, Ikeda JE, MacKenzie A, Korneluk RG** 1996 Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature* 379:349-353
20. **Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC** 1997 X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 388:300-304
21. **Takahashi R, Deveraux Q, Tamm I, Welsh K, Assa-Munt N, Salvesen GS, Reed JC** 1998 A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases. *J Biol Chem* 273:7787-7790
22. **Asselin E, Mills GB, Tsang BK** 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
23. **Leblanc V, Dery MC, Shooner C, Asselin E** 2003 Opposite regulation of XIAP and Smac/DIABLO in the rat endometrium in response to 17 β -estradiol at estrus. *Reprod Biol Endocrinol* 1:59
24. **Adams JM, Cory S** 1998 The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281:1322-1326
25. **Lei M, Tye BK** 2001 Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM complex. *J Cell Sci* 114:1447-1454
26. **Leonardo MJ, Baltimore D** 1989 NF-kappa B: a pleiotropic mediator of inducible tissue-specific gene control. *Cell* 58:227-229
27. **Baeuerle PA, Baltimore D** 1996 NF- κ B: Ten years after. *Cell* 87:13-20
28. **Thanos D, Maniatis T** 1995 NF- κ B: a lesson in family values. *Cell* 80:529-532

29. **Baeuerle PA** 1998 Pro-inflammatory signalling: Last pieces in the NF- κ B puzzle? *Current Biol* 8:R19-R22
30. **Dai D, Ogle TF** 1999 Progesterone regulation of epidermal growth factor receptor in rat decidua basalis during pregnancy. *Biol Reprod* 61:326-332
31. **Ogle TF, George P** 1995 Regulation of the estrogen receptor in the decidua basalis of the pregnant rat. *Biol Reprod* 53:65-77
32. **Asselin E, Wang Y, Tsang BK** 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
33. **Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF** 1994 A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem* 269:5241-5248
34. **Abrahamsohn PA, Zorn TM** 1993 Implantation and decidualization in rodents. *J Exp Zool* 266:603-628
35. **Kennedy TG** 1983 Embryonic signals and the initiation of blastocyst implantation. *Aust J Biol Sci* 36:531-543
36. **Fazleabas AT, Strakova Z** 2002 Endometrial function: cell specific changes in the uterine environment. *Mol Cell Endocrinol* 186:143-147
37. **Joswig A, Gabriel HD, Kibschull M, Winterhager E** 2003 Apoptosis in uterine epithelium and decidua in response to implantation: evidence for two different pathways. *Reprod Biol Endocrinol* 1:44
38. **Dery MC, Leblanc V, Shooner C, Asselin E** 2003 Regulation of Akt expression and phosphorylation by 17 β -estradiol in the rat uterus during estrous cycle. *Reprod Biol Endocrinol* 1:47
39. **Birkey Reffey S, Wurthner JU, Parks WT, Roberts AB, Duckett CS** 2001 X-linked inhibitor of apoptosis protein functions as a cofactor in transforming growth factor- β signaling. *J Biol Chem* 276:26542-26549
40. **St Germain ME, 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 pathway. *Mol Cancer* 3:7
41. **Gagnon V, St Germain ME, Parent S, Asselin E** 2003 Akt activity in endometrial cancer cells: regulation of cell survival through cIAP-1. *Int J Oncol* 23:803-810
42. **Lu QL, Poulson R, Wong L, Hanby AM** 1993 Bcl-2 expression in adult and embryonic non-haematopoietic tissues. *J Pathol* 169:431-437

43. **Akcali KC, Khan SA, Moulton BC** 1996 Effect of decidualization on the expression of bax and bcl-2 in the rat uterine endometrium. *Endocrinology* 137:3123-3131
44. **Stambolic V, Tsao MS, Macpherson D, Suzuki A, Chapman WB, Mak TW** 2000 High incidence of breast and endometrial neoplasia resembling human Cowden syndrome in pten+/- mice. *Cancer Res* 60:3605-3611
45. **Machama T, Dixon JE** 1998 The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* 273:13375-13378
46. **Mutter GL, Lin MC, Fitzgerald JT, Kum JB, Eng C.** 2000 Changes in endometrial PTEN expression throughout the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 85:2334-2338.
47. **Béraud C, Henzel WJ, Baeuerle PA** 1999 Involvement of regulatory and catalytic subunits of phosphoinositide 3-kinase in NF- κ B activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:429-434

FIGURE LEGEND

Figure 1 : CDC47/MCM7 expression in the rat endometrium during rat late pregnancy. Total endometrial proteins were collected at different days of pregnancy. GAPDH blots shown were used as controls to correct for loading. Blots shown are from one representative experiment. Graphics represent Western blot densitometrical analysis. Data represent the mean \pm SEM of six independent experiments. *Significantly different from days 12-14 ($p < 0.05$)

Figure 2 : Akt and phospho-Akt expression in the rat endometrium during late pregnancy. Total endometrial proteins were collected at different days of pregnancy. β -actin blots shown were used as controls to correct for loading. Blots shown are from one representative experiment. Graphics represent Western blot densitometrical analysis. Data represent the mean \pm SEM of six independent experiments.

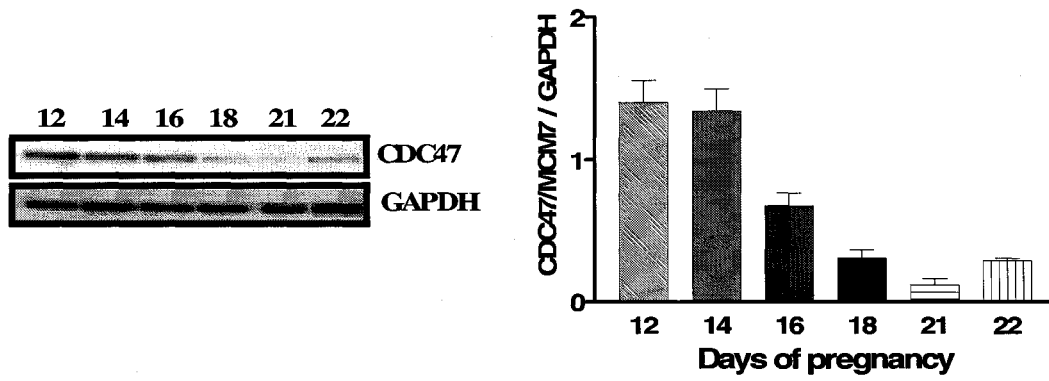
Figure 3 : Akt1/2/3 expression in the rat endometrium during late pregnancy. Total endometrial proteins were collected at different days of pregnancy. GAPDH blots shown were used as controls to correct for loading. Blots shown are from one representative experiment. Graphics represent Western blot densitometrical analysis. Data represent the mean \pm SEM of six independent experiments. *Significantly different from day 12 ($p < 0.05$) **Significantly different from days 12,14,16,18 ($p < 0.001$).

Figure 4 : Bcl-2, PTEN and XIAP expression in the rat endometrium during late pregnancy. Total endometrial proteins were collected at different days of pregnancy. β -actin blots shown were used as controls to correct for loading.

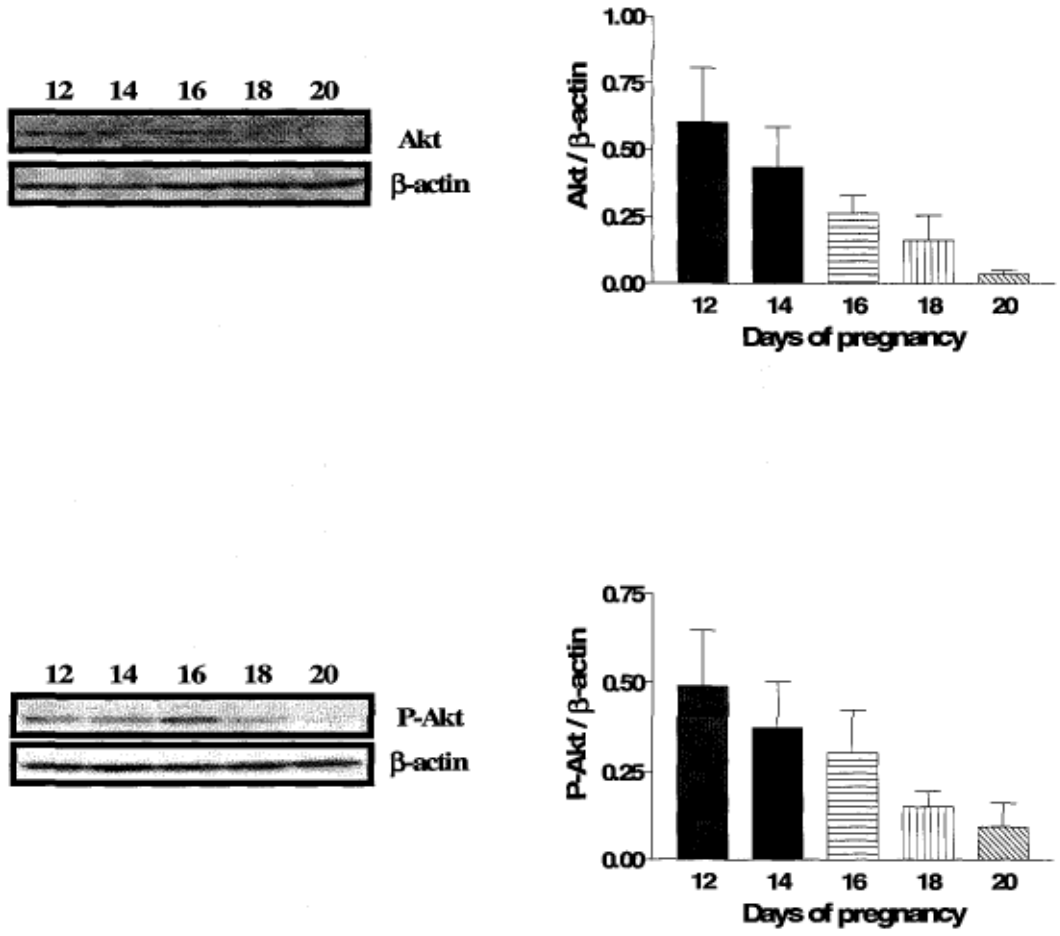
Blots shown are from one representative experiment. Graphics represent Western blot densitometrical analysis. Data represent the mean \pm SEM of six independent experiments.

Figure 5: Effect of PI 3-K inhibitor LY294002 for 24h on Akt, phospho-Akt and XIAP expression in cultured rat decidual cells. β -actin blots shown were used as controls to correct for loading. Blots shown are from one representative experiment. Graphics represent Western blot densitometrical analysis and are the mean \pm SEM of six independent experiments. *Significantly different from control ($p < 0.05$).

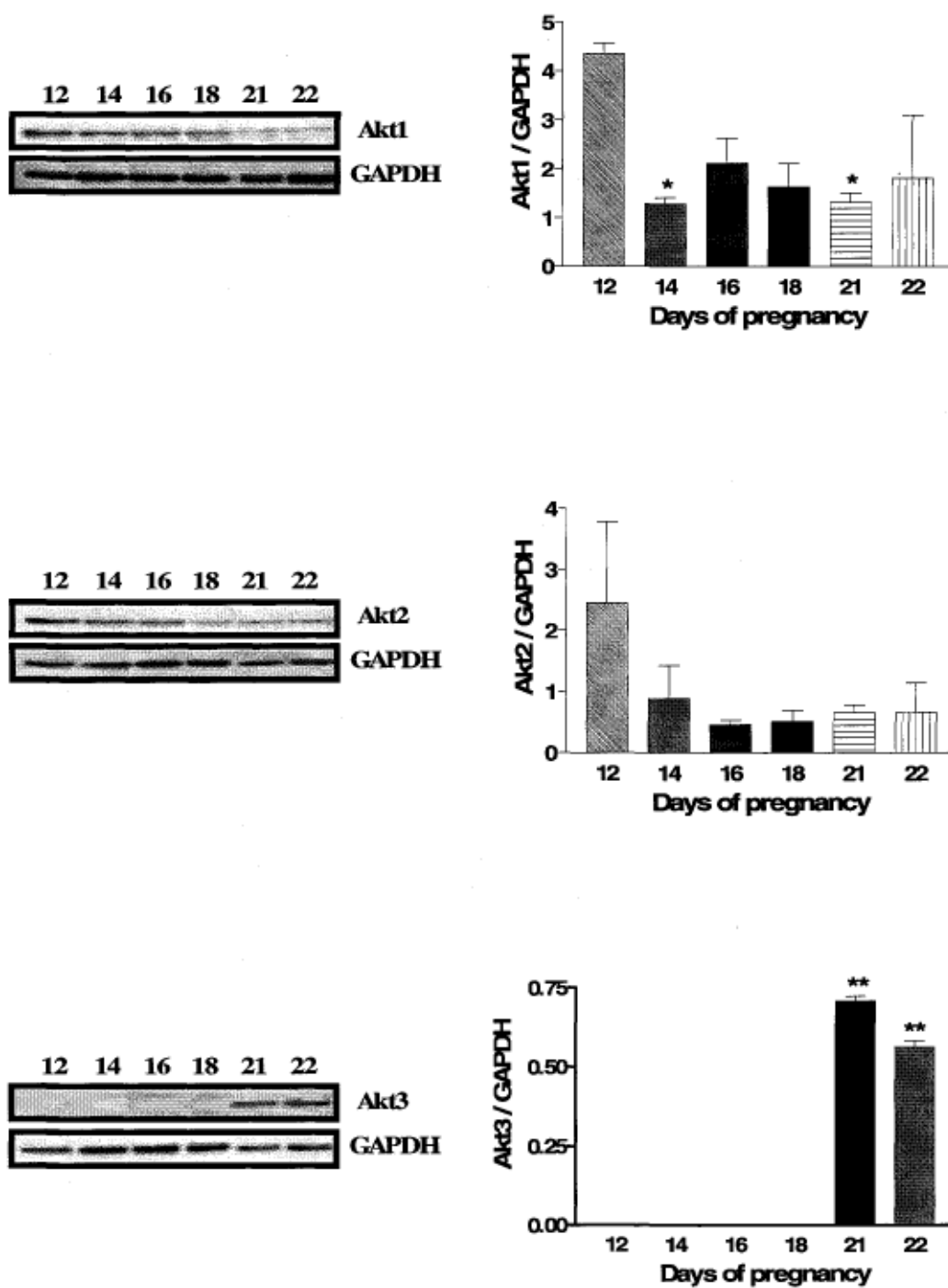
Figure 6 : Expression of Akt, phospho-Akt, NF- κ B p65 subunit and I κ B- α in the endometrium of pregnant rat at the end of pregnancy. GAPDH blots shown were used as controls to correct for loading. Blots shown are from one representative experiment. Graphics represent Western blot densitometrical analysis and are the mean \pm SEM of six independent experiments. *Significantly different from days 16 and 18 ($p < 0.05$).



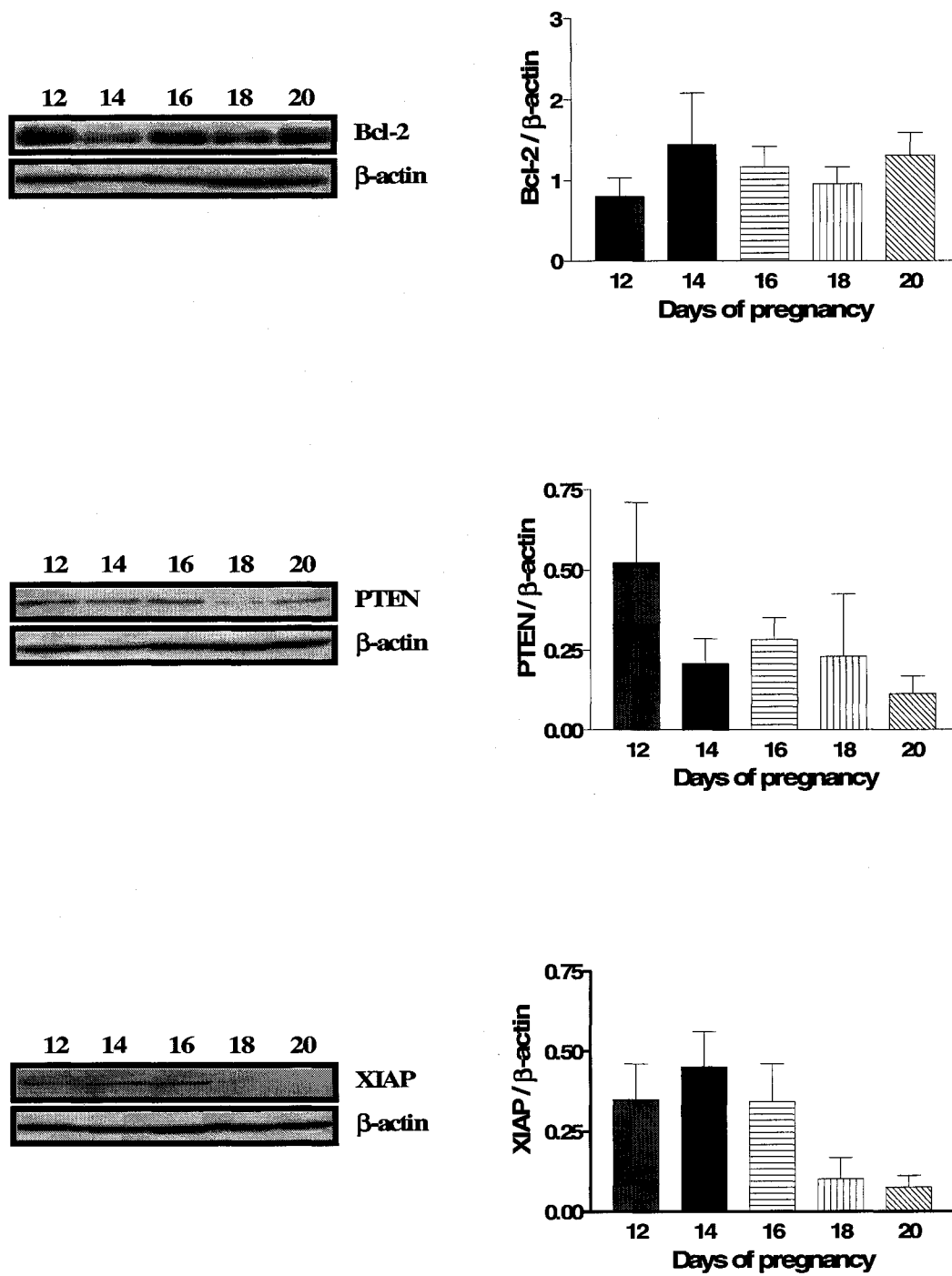
Fréchette-Frigon et al.; **Figure 1**



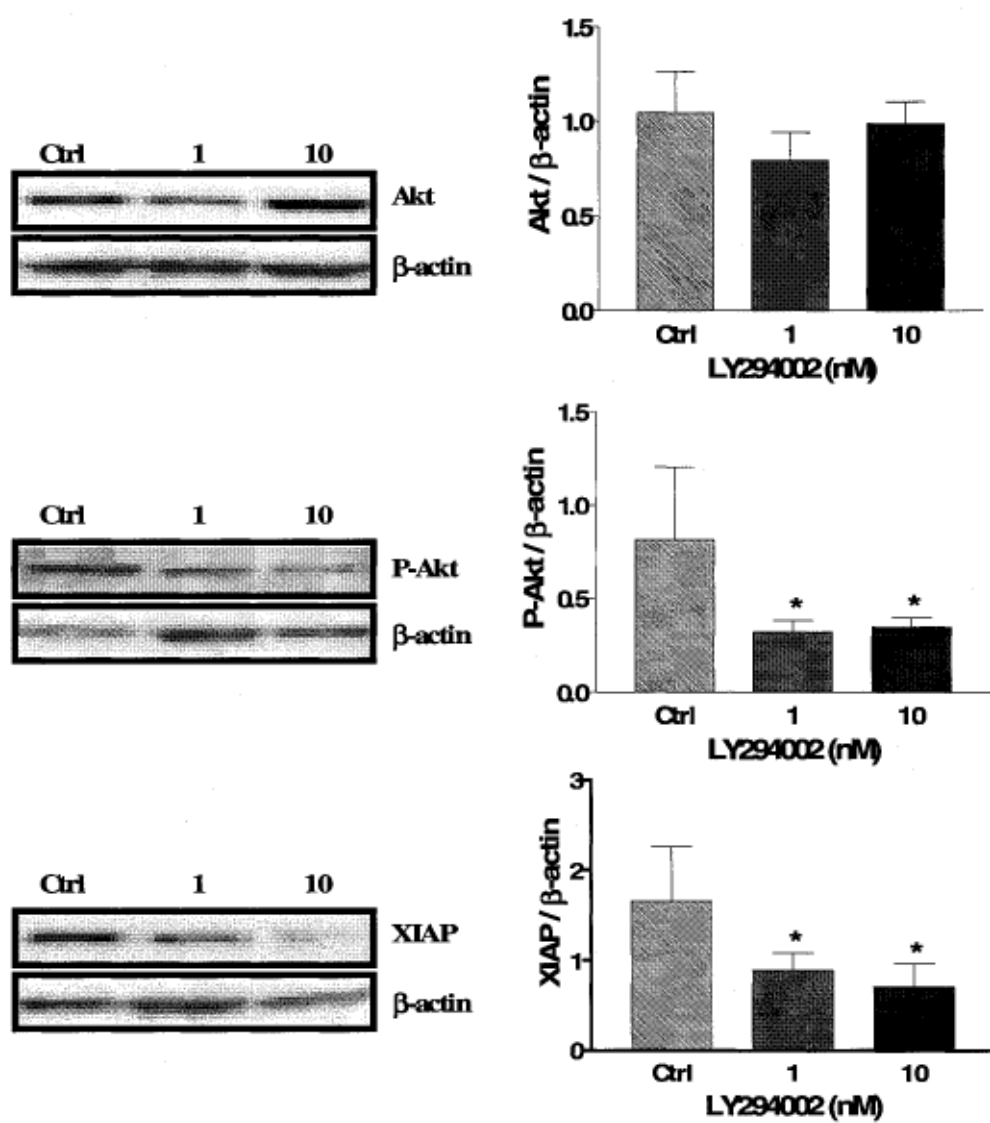
Fréchette-Frigon et al.; Figure 2



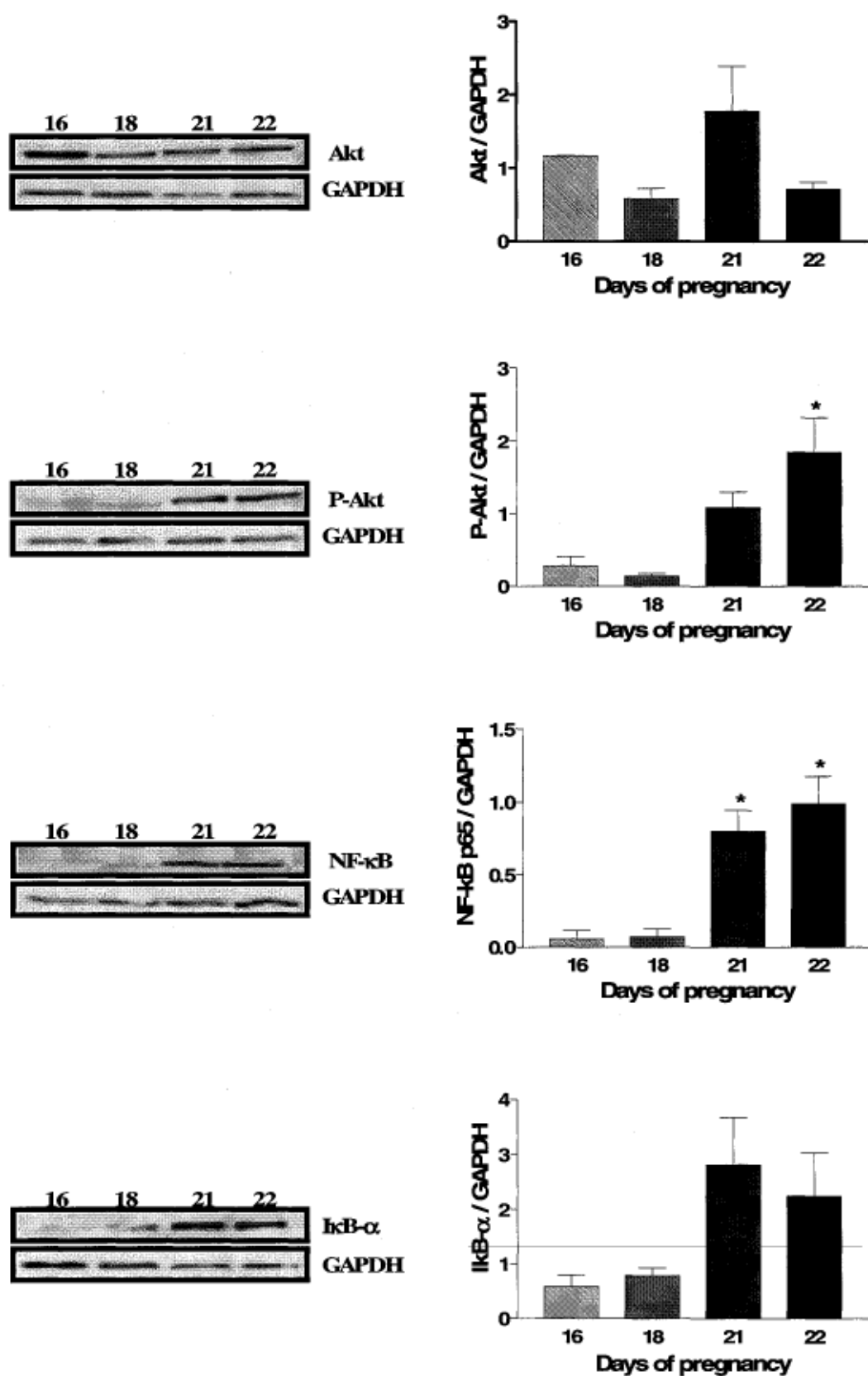
Fr chet te-Frigon et al.; Figure 3



Fréchette-Frigon et al.; Figure 4



Fr chet te-Frigon et al.; Figure 5

Fréchette-Frigon *et al.*; Figure 6

CHAPITRE III

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

3.1 Conclusions

La voie de signalisation cellulaire de la PI 3-K/Akt est un chemin de survie central où converge un grand nombre de signaux anti-apoptotiques, de prolifération ou de survie cellulaire. Des études antérieures menées dans notre laboratoire nous suggèrent que cette voie de signalisation pourrait jouer un rôle de premier plan dans la régulation des processus de reproduction, entre autre, dans le contrôle de la destinée des cellules endométriales de l'utérus pendant le cycle oestral (Déry et al. 2003). Le premier objectif de notre étude était donc de déterminer la présence et la régulation de cette voie de signalisation et de XIAP dans l'endomètre de la ratte lors de la régression déciduale.

Une étude menée par notre équipe nous a montré un niveau important de mort par apoptose des cellules endométriales lors de la régression déciduale chez la ratte gestante. En fait, au jour 14 de gestation, la caspase-3 clivée atteignait son maximum d'expression et la technique de TUNEL a révélée, au même jour, des cellules apoptotiques dans l'endomètre (Shooner et al. 2005). Nous avons donc voulu vérifier la variation de prolifération cellulaire du jour 12 à 22 de gestation. Pour ce faire, nous avons vérifié la variation du niveau de la protéine CDC47/MCM7, un marqueur de prolifération cellulaire, en fin de gestation. Nous avons observé une baisse de la prolifération à partir du jour 14 de gestation au moment où les niveaux d'apoptose sont élevés dans l'endomètre.

La présence d'apoptose dans les cellules de l'endomètre de la ratte lors de l'oestrus a été démontrée par de nombreuses équipes (Sato et al. 1997 ; Lai et al.

2000). Le rôle de la voie de la PI 3-K/Akt dans ce processus apoptotique a été démontré pour la première fois par notre équipe. Nous avons observé que la forme active de Akt, P-Akt, diminue lors de la phase apoptotique du cycle oestral, c'est-à-dire à l'œstrus, au même moment où la caspase-3 clivée est présente en grande quantité et lorsque la prolifération cellulaire à son minimum dans l'endomètre (Déry et al. 2003). Nous avons posé l'hypothèse qu'il est alors possible que le même scénario se produise dans un moment apoptotique clé de la gestation chez le rat : la régression déciduale. En effet, nous avons démontré par la technique d'immunobuvardage de type Western que la forme active de Akt, à l'opposé de la caspase-3 clivé (Shooner et al. 2005), diminue lors de la régression déciduale. Ce résultat suggère que l'inhibition de l'activation de Akt dans les cellules endométriales pourrait être un mécanisme permettant aux cellules d'entrer en apoptose. Cependant, il est à noter que cette inhibition de l'activité de Akt peut aussi bien être une conséquence du déclenchement des processus apoptotiques et non un déclencheur en soit. Ce résultat renforce tout de même l'idée que Akt est une protéine importante pour la survie des cellules endométriales lors de la gestation puisque son activation est réduite lors des processus apoptotiques.

Pour mieux comprendre le rôle de Akt dans les cellules endométriales, nous avons utilisé la culture cellulaire primaire. Suite à des ovariectomies et des injections d'E₂ et de P₄, nous avons pu induire la décidualisation chez les ratte, sans la présence de l'embryon. Ce modèle nous a permis d'effectuer l'inhibition de la PI 3-K dans nos cellules déciduales et d'en vérifier l'effet. En effet, le traitement à la LY294002, un inhibiteur spécifique de la PI 3-K (Vlahos et al. 1994), nous a permis de constater que l'inhibition de la phosphorylation de Akt consécutive à l'inhibition de la PI 3-K, induisait aussi la diminution de la protéine XIAP, comme démontré par immunobuvardage de type Western. L'importance de l'interaction entre Akt et XIAP a été démontrée dans les processus de chimiorésistance au niveau des cellules du cancer de l'ovaire humain (Asselin et al. 2001a) et dans les cellules de la granulosa chez le rat (Asselin et al. 2001). De plus, lors de l'apoptose induite par le TGF- β dans les cellules déciduales en culture, nous avons observé une diminution de la phosphorylation de Akt

et aussi une diminution de la protéine XIAP (Shooner et al. 2005). L'inhibition concomitante de XIAP et de P-Akt dans les cellules déciduales en culture suite à l'exposition au LY294002 et au TGF- β (Shooner et al. 2005) nous indique que Akt pourrait être impliqué dans la régulation de l'expression de XIAP. De plus, il est connu que l'activité de Akt induit la mobilisation et l'activation de NF- κ B (Chu et al. 1997 ; You et al. 1997) et que ce facteur de transcription est impliqué dans la transcription des iAPS (Stehlik et al. 1998; Zou et al. 2004). Il est donc possible que Akt augmente l'expression de XIAP via NF- κ B dans les cellules déciduales, cette hypothèse est toujours à l'étude au laboratoire.

Contrairement à notre hypothèse, nos résultats montrent que l'expression de XIAP est élevée au début de la régression déciduale (jour 14 de gestation). Sachant que XIAP est une protéine anti-apoptotique, son expression devrait logiquement diminuer au moment de l'induction de l'apoptose. Néanmoins, une situation similaire se produit au niveau des cellules endométriales pendant le cycle oestral où XIAP atteignait son maximum d'expression au moment de l'œstrus. Il a été suggéré que cette augmentation était nécessaire à la protection de certaines cellules de l'endomètre contre l'apoptose (Leblanc et al. 2003). Sachant que l'homéostasie cellulaire et tissulaire repose sur la balance entre les facteurs de survie et de mort cellulaire, il est tout à fait possible que XIAP, au jour 14 tout comme à l'œstrus, soit responsable de maintenir l'intégrité de l'endomètre lors de ce processus de mort et qu'il soit un facteur nécessaire à la survie des cellules endométriales. En effet, il est à noter que lors de l'expérimentation, nous recueillons l'endomètre complet et que ce ne sont pas toutes les cellules qui doivent mourir par apoptose, ce qui pourrait influencer nos résultats. De plus, une autre hypothèse est à considérer puisqu'il est tout à fait possible que Smac/DIABLO soit responsable de l'inhibition de XIAP au jour 14 de gestation pour permettre l'apoptose des cellules déciduales. Nous observons tout de même une diminution importante de l'expression de XIAP dans les cellules endométriales suite au jour 14 de gestation. Il est possible que cette baisse d'expression soit le résultat de la diminution d'activité de Akt au même moment, ce qui va dans le même sens que les résultats obtenus *in vitro* puisque

nous avons observé une diminution de XIAP suite à l'inhibition de l'activation de Akt. Par contre, cette diminution de XIAP pourrait aussi être due à sa dégradation par les caspases (Devereaux et al. 1999) ou une conséquence de son auto-ubiquitination, phénomène fréquent dans les cellules en apoptose (Devi 2004).

Les trois isoformes de Akt, bien que tous exprimés chez les mammifères, ont des niveaux d'expression variant énormément selon les tissus. En effet, Akt1 est la forme prédominante et est exprimée de façon constitutive dans la plupart des tissus, alors que Akt2 est retrouvée dans la majorité des tissus répondant à l'insuline, par exemple : (a) le cœur, (b) le foie, (c) les reins (Altomare et al. 1995). Akt3, qui a un patron d'expression plus restreint, est prédominant au niveau du cerveau et des testicules (Konishi et al. 1995). Dans le but de déterminer la régulation des isoformes de Akt lors de la régression déciduale, nous avons déterminé leur niveau d'expression lors de ce processus apoptotique. Nous avons démontré que deux des isoformes de Akt sont présents dans l'endomètre de la ratte lors de la gestation mais que leurs niveaux d'expression diffèrent. En effet, Akt1 diminue du jour 12 au jour 14, les niveaux de Akt2 restent constants, alors que Akt3 n'est pas exprimé dans les cellules endométriales lors de la régression déciduale. Cependant, il est à noter que le niveau d'expression des isoformes n'est pas représentatif de leur activation puisque les niveaux de phosphorylation (indicateur du niveau d'activation) n'ont pas été déterminés jusqu'à maintenant.

Dans le but de déterminer la régulation de facteurs pouvant être impliqués dans la survie cellulaire, nous avons vérifié l'expression d'autres protéines pouvant interagir avec la voie de survie cellulaire de la PI 3-K/Akt. Par exemple, Bcl-2, un membre anti-apoptotique de la famille des Bcl-2, est présent et régulé dans certains tissus répondant aux hormones stéroïdiennes (Lu et al. 1993). Par contre, nos résultats démontrent que Bcl-2 est exprimé, mais de façon constante en fin de gestation, ce qui nous suggère que cette protéine n'a pas de rôle particulier dans la régression déciduale. Par contre, il n'est

pas exclu que Bcl-2 soit important pour la survie des cellules endométriales. Il serait nécessaire de déterminer son niveau d'activation pour conclure d'une implication ou non de Bcl-2 dans les processus apoptotiques lors de la régression déciduale.

De plus, notre étude démontre que PTEN, une phosphatase anti-apoptotique directement impliquée dans la déphosphorylation de Akt (Maehama et Dixon 1998), diminue du jour 12 au jour 14 et est stable jusqu'au jour 20 de gestation dans les cellules endométriales de la ratte. Cette protéine ne semble donc pas, contrairement à notre hypothèse, être responsable de la déphosphorylation de Akt au niveau de l'endomètre de la ratte gestante lors de régression déciduale puisque le niveau de PTEN est constant au moment de la régression déciduale alors que le niveau de P-Akt diminue. Par contre, comme pour Bcl-2, le niveau d'activation de PTEN n'a pas été déterminé, ce qui serait important pour conclure de son implication dans ce processus. Ces résultats démontrent tout de même que PTEN est présent dans l'endomètre, mais son expression ne semble pas être influencée par les changements hormonaux observés en fin de gestation. Une étude a démontrée que l'expression de PTEN pourrait être régulée par la progestérone dans l'endomètre humain (Mutter et al. 2000), mais ce ne semble pas être le cas chez la ratte.

Nous savons maintenant que Akt aurait un rôle important dans les processus de reproduction et qu'il est impliqué dans l'activation de NF- κ B (Wang et al. 2004; St-Germain et al. 2004), qui lui joue un rôle dans la parturition (Condon et al. 2005). Notre second objectif était donc de déterminer l'expression de la voie de survie cellulaire de la PI 3-K/Akt dans l'endomètre en toute fin de gestation, c'est-à-dire lors de préparation à la parturition.

Par immunobuvardage de type Western, nous avons déterminé l'expression de la protéine Akt et de sa forme active, P-Akt, dans l'endomètre de la ratte aux jours 16, 18, 21 et 22. Nous avons pu remarquer une variation significative de l'activité de Akt au jour 22. Sachant que la parturition chez la ratte se produit environ au jour 22 de gestation en début d'après-midi, ce résultat suggère que l'activation de Akt a un rôle probable dans la préparation de l'endomètre pour la parturition. Yoshino et ses collègues ont démontré que la progestérone inhibe la phosphorylation de Akt dans des cellules déciduales humaines en culture (Yoshino et al 2003). Il est alors possible que la chute de progestérone observée dans les derniers jours de gestation ne soit pas étrangère à l'augmentation de phosphorylation de Akt dans les cellules endométriales.

L'expression de chacun des isoformes de Akt dans l'endomètre aux jours 16 à 22 a aussi été vérifiée, dans le cas de Akt1 et Akt2, nous n'avons pu démontrer aucun changement important. Par contre, en ce qui concerne Akt3, nous avons remarqué que celui-ci était présent uniquement aux jours 21 et 22, suggérant ainsi que cet isoforme pourrait être important dans la mise en place du processus de parturition. Il est à noter, cependant, que les anticorps que nous avons utilisés ne reconnaissent pas la forme active des isoformes, alors il sera très important de vérifier leur activité avant de tirer des conclusions hâtives. Il est cependant peu probable que l'augmentation de P-Akt au jour 22 soit le résultat de l'augmentation de la phosphorylation de Akt3 puisque plusieurs équipes ont démontré que chez le rat, Akt3 ne possède pas le domaine C-terminal hydrophobe où l'on retrouve le site de phosphorylation de la Ser473 (notre anticorps anti-P-Akt reconnaît Akt phosphorylé au niveau de cette sérine) (Konishi et al. 1995 ; Brodbeck et al. 2001), ce qui suggère que cet isoforme serait activé par un autre mécanisme qui n'est cependant pas connu. Il serait donc important de déterminer quel isoforme est phosphorylé/activé aux jours 21 et 22 de gestation dans l'endomètre.

Il est connu que Akt permet la libération du facteur de transcription NF- κ B facilitant ainsi sa translocation au noyau où il peut activer la transcription de gènes

cibles (Madrid et al. 2000) impliqués par exemple dans l'inflammation (Baeuerle 1998), la suppression de l'apoptose (Wang et al. 1996) et la prolifération cellulaire (Baldwin 1996). Entre autre, ce facteur de transcription est responsable de la transcription du gène de COX-2 (Plummer et al. 1999), une enzyme limitante de la production des prostaglandines. Il a été démontré que Akt pouvait induire la production de COX-2 via NF- κ B dans des cellules cancéreuses de l'endomètre (St-Germain et al. 2004). Par contre, une telle relation n'a encore jamais été démontrée au niveau de l'endomètre de la ratte. Puisque nous avons observé une augmentation marquée de P-Akt au jour 22 de gestation, nous avons vérifié l'expression de NF- κ B aux jours 16 à 22. Son expression est significativement augmentée à partir du jour 21 et atteint un maximum au jour 22 de gestation. Ces résultats seuls ne nous permettent pas de déterminer si NF- κ B est actif puisque nous ne connaissons pas sa localisation dans la cellule. Nous pouvons tout de même conclure que Akt et NF- κ B ont possiblement un rôle dans la mise en place de la parturition puisqu'ils sont régulés à la hausse aux jours 21 et 22 de gestation. L'hypothèse qu'il existe un lien entre ces deux protéines dans l'endomètre en fin de gestation est toujours à l'étude dans notre laboratoire.

Une étude menée par Gross et ses collaborateurs nous indique que, chez les modèles murins, COX-1 est nécessaire pour le travail à terme (Gross et al 1998). De plus, Myatt et ses collègues ont observé une augmentation de l'ARNm de COX-1 dans le myomètre de la ratte en fin de gestation (Myatt et al. 1994). Des résultats préliminaires obtenus dans notre laboratoire nous démontrent aussi que l'expression de l'ARNm et de la protéine COX-1 sont à la hausse aux jours 21 et 22 de gestation tout comme la protéine P-I κ B (résultats non-publiés), et ce, au niveau de l'endomètre. L'augmentation de la phosphorylation de I κ B est un indice de l'activation du facteur de transcription NF- κ B.

Il est connu que NF- κ B est impliqué dans la parturition puisqu'il a été démontré que les sous-unités p50 et p65 sont transloquées au niveau du noyau dans les cellules de

l'endomètre de la souris près du terme (Condon et al 2004). De plus, Condon et ses collaborateurs ont observé une augmentation de la sous-unités p65 au niveau du noyau dans le myomètre humain lors du travail (Condon et al. 2005) et nous savons que NF- κ B est responsable de la transcription des COXs (enzymes limitantes de la production des prostaglandines) (Plummer et al. 1999). Ce qui nous mène à poser l'hypothèse que l'activation de la voie de la PI 3-K/Akt en toute fin de gestation pourrait être responsable de la production des prostaglandines, via le facteur de transcription NF- κ B, dans les cellules endométriales. Les prostaglandines pourraient alors agir de façon paracrine au niveau du myomètre dans le but d'activer les contractions utérines nécessaires à la parturition, cette hypothèse n'a cependant pas encore été vérifiée au laboratoire.

Cependant, il est à noter que nous avons aussi observé une augmentation de la protéine I κ B- α (responsable d'inhiber/séquestrer NF- κ B), et ce, aux jours 21 et 22, ce qui va à l'encontre de notre hypothèse et de nos résultats puisque nous avons aussi observé une augmentation au niveau de COX-1. Il sera donc très important de vérifier si, malgré la présence d'inhibiteur, NF- κ B est actif dans les cellules endométriales. L'augmentation de la phosphorylation de I κ B- α (résultat non-publié) est tout de même un indice nous permettant de croire que NF- κ B est actif et transloqué au noyau pour activer la transcription de gènes, entre autre, ceux des COXs.

En conclusion, cette étude a démontré pour la première fois que l'activité de Akt et l'expression de XIAP pourrait être important dans le contrôle de la survie cellulaire dans l'endomètre de la ratte en fin de gestation. Ces deux protéines pourraient agir de concert pour promouvoir la survie des cellules endométriales. De plus, nous avons montré que les trois isoformes de Akt sont régulées différemment dans l'endomètre en fin de gestation et que la voie de survie cellulaire de la PI 3-K/Akt pourrait être impliquée dans la parturition via NF- κ B.

3.2 Perspectives

Des analyses complémentaires seront nécessaires dans le but de caractériser davantage l'interaction entre la voie de la PI 3-K/Akt et XIAP dans l'endomètre de la ratte en fin de gestation. Il serait possible, par exemple, de vérifier si l'inhibition ou à l'inverse la surexpression de Akt (et de ses différents isoformes) dans des cellules déciduales en culture affecte l'expression de la protéine XIAP. De plus, la connaissance du patron d'expression de la protéine pro-apoptotique Smac/DIABLO lors de la régression déciduale serait importante puisque celle-ci est responsable de l'inhibition de XIAP, ce qui nous renseignerait sur son état d'activation.

Plusieurs expérimentations restent à faire dans le but de confirmer l'hypothèse suivante : Akt pourrait être impliquée dans la production des prostaglandines en préparation de la parturition au niveau de l'endomètre via NF- κ B. En effet, des analyses supplémentaires seront nécessaires à l'évaluation du rôle de Akt dans l'activation de NF- κ B en toute fin de gestation. La localisation intracellulaire de NF- κ B, la phosphorylation de I κ B ou certains tests d'activité, pourront nous renseigner sur l'activation du facteur de transcription. De plus, il serait intéressant de vérifier l'effet de l'inhibition de l'activation de Akt (par la LY294002) et/ou de l'expression de Akt (par siRNA) sur l'activation de NF- κ B et sur l'expression des COXs dans les cellules stromales en culture. Il serait aussi important de vérifier l'expression de la protéine et/ou de l'ARNm de COX-2, enzyme limitante de la production des prostaglandines, dans l'endomètre.

Nous avons observé une augmentation de la phosphorylation de Akt dans l'endomètre de la ratte à la toute fin de la gestation et nous savons que Akt3 ne peut en être responsable. Il serait intéressant de déterminer lequel des deux isoformes restants est phosphorylé/activé, pour ce faire, la technique d'immunoprécipitation pourra être

utilisée. De plus, des analyses futures seront nécessaires pour déterminer le rôle exact de Akt3 dans les cellules endométriales en préparation à la parturition.

À plus long terme, il serait intéressant d'évaluer le rôle de la voie de signalisation cellulaire de la PI 3-K/Akt lors de l'implantation embryonnaire. Lors de ce processus majeur de la gestation, les cellules épithéliales de l'endomètre entre en apoptose pour permettre à l'embryon de se faire une place dans la paroi utérine (Pampfer et Donnay 1999). La régression déciduale étant aussi un processus apoptotique, il y a certainement des rapprochements à faire au niveau des voies de signalisation activées lors de ces deux événements. De plus, une meilleure connaissance des processus intracellulaires impliqués dans l'apoptose lors de l'implantation embryonnaire pourra nous aider à mieux comprendre les causes des avortements spontanés et à faire avancer la recherche sur l'infertilité chez la femme.

Cette étude nous a permis d'approfondir nos connaissances concernant les mécanismes intracellulaires impliqués dans la gestation chez la ratte, plus particulièrement lors de la régression déciduale et de la parturition. La connaissance des processus fondamentaux qui sous-tendent la mise en place de la parturition seront éventuellement nécessaires à l'élucidation des causes menant aux accouchements prématurés et au développement d'indicateurs diagnostiques permettant la prise en charge rapide pour éviter la prématurité.

BIBLIOGRAPHIE

- Abrahamsohn, P.A. and Zorn, T.M. (1993) "Implantation and decidualization in rodents", *J. Exp. Zool.* 266:603-628.
- Adams, J.M. and Cory, S. (1998) "The Bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival", *Science* 281:1322-1326.
- Alessi, D.R., Andjelkovic, B., Caudwell, P., Cron, N., Morrice, N., Cohen, P., Hemmings, B.A. (1996) "Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1", *EMBO. J.* 15:6541-6551.
- Alessi, D.R., James, S.R., Downes, C.P., Holmes, A.B., Gaffney, P.R., Reese, C.B., Cohen, P. (1997) "Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha", *Curr. Biol.* 7:261-269.
- Altomare, D.A., Guo, K., Ceng, J.Q., Sonoda, G., Walssh, K., Testa, J.R. (1995) "Cloning, chromosomal localization and expression analysis of the mouse Akt2 oncogene", *Oncogene* 11:1055-1060.
- Andjelkovic, M., Alessi, D.R., Meier, R., Fernandez, A., Lamb, N.J.C., Frech, M., Cron, P., Cohen, P., Lucocq, M., Hemmings, B.A. (1997) "Role of translocation in the activation and function of protein kinase B", *J. Biol. Chem.* 272:31515-31524.
- Asselin, E., Mills, G.B., Tsang, B.K. (2001a) "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.
- Baeuerle, P.A. (1998) "Pro-inflammatory signalling: Last pieces in the NF- κ B puzzle?", *Curr. Biol.* 8:R19-R22.
- Baldwin, A.S. Jr. (1996) "The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights", *Annu. Rev. Immunol.* 16:649-681.
- Barkai, U. and Kraice,r P.F. (1996) "Intrauterine signaling and embryonic implantation", *Biol. Signals* 5:111-121.
- Bellacosa, A., Testa, J.R., Staal, S.P., Tsichlis, P.N. (1991) "A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region", *Science* 254:274-277.

- Bello, B.D., Valentini, M.A., Mangiavacchi, P., Comporti, M., Maellaro, E. (2004) "Role of caspase-3 and -7 in Apaf-1 proteolytic cleavage and degradation events during cisplatin-induced apoptosis in melanoma cells", *Exp. Cell. Res.* 293:302-310.
- Berkowitz, G.S., Papiernik E. (1993) "Epidemiology of preterm birth", *Epidemiol. Rev.* 15:414-443.
- Burgering, B.M. and Coffey, P.J. (1995) "Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction", *Nature* 376:599-602.
- Brodbeck, D., Hill, M.M., Hemmings, B.A. (2001) "Two splice variants of protein kinase B gamma have different regulatory capacity depending on the presence or absence of the regulatory phosphorylation site serine 472 in the carboxyl-terminal hydrophobic domain", *J. Biol. Chem.* 276:29950-29558.
- Challis, J.R.G., Matthews, S.G., Gibb, W., Lye, S.J. (2000) "Endocrine and paracrine regulation of birth at term and preterm", *Endocr. Rev.* 21:514-550.
- Chen, Z., Hagler, J., Palombella, V.J., Melandri, F., Scherer, D., Ballard, D., Maniatis, T. (1995) "Signal-induced site specific phosphorylation targets I κ B α to the ubiquitin-proteasome pathway" *Genes dev.* 9:1586-1597.
- Chu, Z.L., McKinsey, T.A., Liu, L., Gentry, J.J., Malim, M.H., Ballard, D.W. (1997) "Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF- κ B control", *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 94:10057-10062.
- Cohen, M.G. (1997) "Caspases: the executioners of apoptosis", *Biochem. J.* 326:1-16
- Condon, J.C., Jeyasuria, P., Faust, J.M., Mendelson, C.R. (2004) "Surfactant protein secreted by the maturing mouse fetal lung acts as a hormone that signals the initiation of parturition", *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 14: 4978-4883.
- Condon, J.C., Hardy, D.B., Kovacic, K., Mendelson, C.R. (2005) "Upregulation of the Progesterone Receptor (PR)-C Isoform in Laboring Myometrium by Activation of NF- κ B May Contribute to the Onset of Labor through Inhibition of PR Function", *Mol. Endocrinol.* [Epub ahead of print].
- Crook, N.E., Clem, R.J., Miller, L.K. (1993) "An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif" *J. Virol.* 67:2168-2174.
- Dalton, S. and Hopwood, B. (1997) "Characterization of cdc47p-minichromosome maintenance complexes in *Saccharomyces cerevisiae*: Identification of Cdc45p as a subunit" *Mol. Cell. Biol.* 17:5867-5875.
- Datta, K., Franke, T.F., Chan, T.O., Makris, A., Yang, S.I., Kaplan, D.R., Morrison, D.K., Golemis, E.A., Tsichlis, P.N. (1995) "AH/PH domain-mediated interaction

between Akt molecules and its potential role in Akt regulation", *Mol. Cell. Biol.* 15:2304-2310.

Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., Greenberg, M.E. (1997) "Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery", *Cell* 91:231-241.

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.

Devereaux, Q.L., Leo, E., Stennick, 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.* 18:5242-5251.

Devi, G.R. (2004) "XIAP as a target for therapeutic apoptosis in prostate cancer", *Drug News Perspect.* 17:127-134.

Dharma, S.J., Kholkute, S.D., Nandedkar, T.D. (2001) "Apoptosis in endometrium of mouse during estrous cycle", *Indian. J. Exp. Biol.* 39:218-222.

Eckstein, P. and Zuckerman, S. (1960) "Traité de zoologie" Tome XVI, Fascicule VI. Grassé P.P, Masson cie. Paris.

Fang, X., Wong, S., Mitchell, B.F. (1996) "Relationships among sex steroids, oxytocin, and their receptors in the rat uterus during late gestation and parturition", *Endocrinology* 137:3213-3219.

Fazleabas, A.T. and Strakova, Z. (2002) "Endometrial function: cell specific changes in the uterine environment", *Mol. Cell. Endocrinol.* 186:143-147.

Franke, T.F., Yang, S.I., Chan, T.O., Datta, K., Kaslauska, A., Morrison, D.K., Kaplan, D.R., Tsichlis, P.N. (1995) "The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase", *Cell* 81:727-736.

Gajewski, T.F. and Thompson, C.B. (1996) "Apoptosis meets signal transduction: elimination of a BAD influence" *Cell* 87: 589-592.

Ghosh, S., Gifford, A.M., Riviere, L.R., Tempst, P., Nolan, G.P., Baltimore, D. (1990) "Cloning of the p50 DNA bonding subunit of NF- κ B: Homology to *rel* and *dorsal*", *Cell* 62:1019-1029.

Griffiths, A.J.F., Gelbart, W.M., Miller, J.H., Lewontin, R.C. (2001) "Analyse génétique moderne", éditions De Boeck Université, Paris, pp. 470.

- Gross, G.A., Imamura, T., Luedke, C., Vogt, S.K., Olson, L.M., Nelson, D.M., Sadovsky, Y., Muglia, L.J. (1998) "Opposing actions of prostaglandins and oxytocin determine the onset of murine labor", *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 20:11875-11879.
- Gu, Y., Jow, G.M., Moulton, B.C., Lee, C., Sensibar, J.A., Park-Sarge, O.K., Chen, T.J., Gibori, G. (1994) "Apoptosis in decidual tissue regression and reorganization", *Endocrinology* 135:1272-1279.
- Heffner, L.J. (2003) "Reproduction humaine", éditions De Boeck Université, Paris, pp.17.
- Hu, Y., Benedict, M.A., Wu, D., Inohara, N., Nunez, G. (1998) "Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95:4386-4391.
- Kandel, E.S. and Hay, N. (1999) "The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB", *Exp. Cell. Res.* 253:210-229.
- Kane, L.P., Shapiro, V.S., Stokoe, D., Weiss, A. (1999) "Induction of NF- κ B by the Akt/PKB kinase", *Curr. Biol.* 9:601-604.
- Kelly, R.W. (1996) "Inflammatory mediators and parturition", *Rev. Reprod.* 1:89-96.
- Knobil, E. and Neill, J.D. (1994) "The physiology of reproduction", 2e éd., Raven press, New York, U. S. A., pp. 403-404; 941-983.
- Konisi, H., Kuroda, S., Tanaka, M., Matsuzaki, H., Ono, Y., Kameyama, K., Haga, T., Kikkawa, U. (1995) "Molecular cloning and characterization of a new member of the RAC protein kinase family: association of the pleckstrin homology domain of three types of RAC protein kinase with protein kinase C subspecies and beta gamma subunits of G proteins", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 216 :526-534.
- 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.
- Leblanc, V., Déry, M.C., Shooner, C., Asselin, E. (2003) "Opposite regulation of XIAP and Smac/DIABLO in the rat endometrium in response to 17 β -estradiol at estrus", *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1:59.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C., Yuan, J. (1998) "Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway apoptosis", *Cell* 94:481-490.
- Lindström, T.M. and Bennett, P.R. (2005) "The role of nuclear factor kappa B in human labour", *Reproduction* 130:569-581.

- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Zipursky, S.L., Darnell, J. (2004) "Molecular cell biology", 5e éd., W.H. Freeman, New York, U. S. A., pp 924-925.
- Lu, Q.L., Poulson, R., Wong, L., Hanby, A.M. (1993) "Bcl-2 expression in adult and embryonic non-haematopoietic tissues", *J. Pathol.* 169:431-437.
- Madrid, L.V., Wang, C.Y., Guttridge, D.C., Schottelius, A.J., Baldwin, A.S. Jr, Mayo, M.W. (2000) "Akt suppresses apoptosis by stimulating the transactivation potential of the RelA/p65 subunit of NF-kappaB" *Mol. Cell. Biol.* 20:1626-1638.
- Maehama, T. and Dixon, J.E. (1998) "The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate", 273:13375-13378.
- May, M.J. and Ghosh, S. (1998) "Signal transduction through NF-kB", *Immunol. Today* 19:80-88.
- Mayer, B.J., Ren, R., Clark, K.L., Baltimore, D. (1993) "A putative modular domain present in diverse signaling proteins", *Cell* 73:629-630.
- Merurio, F. and Manning, A.M. (1999) "Multiple signals converging on NF-kB", *Curr. Opin. Cell. Biol.* 11:226-232.
- Mitchell, B.F., Fang, X., Wong, S. (1997) "Metabolism of oxytocin in rat uterus and placenta in late gestation", *Biol. Reprod.* 57:807-812.
- 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.
- Myatt, L., Langdon, D.E., Brockman, D.E. (1994) "Identification and changes in concentrations of prostaglandin synthase (PGHS) isoforms in rat myometrium at parturition", *Prostaglandins* 48:285-296.
- Myers, M.P. and Tonks, N.K. (1997) "PTEN: sometimes taking it off can be better than putting it on", *Am. J. Human. Genet.* 61:1234-1238.
- Nathanielsz, P.W., Smith, G., Wu, W. (2004) "Topographical specialization of prostaglandin function in late pregnancy and at parturition in the baboon", *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 70:199-206.
- Nolan, G., Ghosh, S., Liou, H.C., Tempst, P., Baltimore, D. (1991) "DNA binding and IκB inhibition of the cloned p65 subunit of NF-kB, a *rel*-related polypeptide", *Cell* 64:961-969.
- Olson, D.M. (2003) "The role of prostaglandins in the initiation of parturition", *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 17:717-730.

Pampfer, S. and Donnay, I. (1999) "Apoptosis at time of embryo implantation in mouse and rat", *Cell. Death. Differ.* 6:533-545.

Plummer, S.M., Holloway, K.A., Manson, M.M., Munks, R.J., Kaptein, A., Farrow, S., Howells, L. (1999) "Inhibition of cyclo-oxygenase 2 expression in colon cells by the chemo-preventive agent curumin involves inhibition of NF-kappaB activation via the NIK/IKK signalling complex", *Oncogene* 18:6013-6020.

Sato, T., Fukaza, 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.

Schendel, S.L., Xie, Z., Montal, M.O., Matsuyama, S., Montal, M., Reed, J.C. (1997) "Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2", *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 94:5113-5118.

Schimmer, A.D. (2004) "Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice", *Cancer Res.* 64:7183-7190.

Schuler, G., Teichmann, U., Kowaleswski, M.P., Hoffmann, B., Madore, E., Fortier, M.A., Klisch, K. (2005) "Expression of Cyclooxygenase-II (COX-II) and 20alpha-Hydroxysteroid Dehydrogenase (20alpha-HSD)/Prostaglandin F-synthase (PGFS) in Bovine Placentomes: Implications for the Initiation of Parturition in Cattle", *Placenta*. Article in press:1-8.

Shiozaki, E.N. and Shi, Y. (2003) "Caspases, IAPs and Smac/DIABLO: mechanisms from structural biology", *Trends Biochem. Sci.* 29:486-494.

Shooner, C., Caron, P.L., Fréchette-Frigon, G., Leblanc, V., Déry, M.C, Asselin, E. (2005) "TGF-beta expression during rat pregnancy and activity on decidual cell survival", *Reprod. Biol. Endocrinol.* 3:20.

Smith, G.C.S, WU, W.X., Nathanielsz, P.W. (1999) "Baboon labour is associated with a decreased uterine prostanoid EP2 receptor expression". *Gynecol. Invest.* 6:128A-129A.

Smith, M.S., Freeman, M.E., Neill, J.D.(1975) "The control of progesterone secretion during the estrous cycle end early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels association with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy", *Endocrinology*, 96:219-226.

Smith, W.L., Dewitt, D.L. (1996) "Prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2", *Adv. Immunol.* 62:167-215.

Sooranna, S.R., Lee, Y., Kim, L.U., Mohan, A.R., Bennett, P.R., Johnson, M.R. (2004) "Mechanical stretch activates type 2 cyclooxygenase via protein-1 transcription factor in human myometrial cells", *Mol. Hum. Reprod.* 10:109-113.

- 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*. 3:7.
- Staal, S.P. (1987) "Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of KT1 in a primary human gastric adenocarcinoma", *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 74:3065-3067.
- 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.
- Stehlik, C., De Martin, R., Kumabashiri, I., Schmid, J.A., Bonder, B.R., Lipp, J. (1998) "Nuclear factor (NF)- κ B-regulated X-chromosome-linked iap gene expression protects endothelial cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis", *J. Exp. Med.* 188:211-216.
- Sun, C., Cai, M., Gunasekera, A.H., Meadows, R.P., Wang, H., Chen, J., Zhang, H., Wu, W., Xu, N., Ng, S.C., Fesik, S.W. (1999) "NMR structure and mutagenesis of the inhibitor-of-apoptosis protein XIAP", *Nature* 401:818-822.
- Sun, H., Lesche, R., Li, D.M., Liliental, J., Zhang, H., Gao, J., Gavrilova, N., Mueller, B., Liu, X., Wu, H. (1999) "PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate and Akt/protein kinase B signaling pathway", *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 96:6199-6204.
- 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.
- Thibault, C. et Levasseur, M.C. (2001) « La reproduction chez les mammifères et l'homme », Ellipses Édition Marketing S.A., pp. 460.
- Tortora, G.J. et Grabowski, S.R. (2001) « Principes d'anatomie et de physiologie », Éditions du Renouveau Pédagogique Inc. Ca., pp. 1066.
- Tsuboi, K., Sugimoto, Y., Iwane, A., Yamamoto, K., Yamamoto, S., Ichikawa, A. (2000) "Uterine expression of prostaglandin H2 synthase in late pregnancy and during parturition in prostaglandin F receptor-deficient mice", *Endocrinology* 141:315-324.
- Tsujimoto, Y. (1998) "Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondrial", *Genes Cells* 3:697-707.
- Vanhaesebroeck, B. and Alessi, D.R. (2000) "The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB", *Biochem. J.* 346:561-576.

- Vlahos, C.J., Matter, W.F., Hui, K.Y., Brown, R.F. (1994) "A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-Kinase, 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002)", *J. Biol. Chem.* 269:5241-5248.
- Wang, C.Y., Mayo, M.W., Baldwin, A.S. Jr. (1996) "TNF-and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB", *Science* 274:784-787.
- Wang, Y., Chang, J., Li, Y.C., Li, Y.S., Shyy, J.Y., Chien, S. (2004) "Shear stress and VEGF activate IKK via the Flk-1/Cbl/Akt signaling pathway", *Am. J. Physiol. Heart Cric. Physiol.* 286:H685-H692.
- Wayne, I., Johnson, D.E., Vaillancourt, M.T., Avanzini, J., Miromoto, A., Demers, G.W., Wills, K.N., Shabram, P.W., Bolen, J.B., Tavtigian, S.V., Bookstein, R. (1998) "Suppression of tumorigenicity of glioblastoma cells by adenovirus mediated MMAC1/PTEN gene transfer", *Cancer Res.* 58:2331-2334.
- Waynforth, H.B. and Flecknell, P.A. (1992) "Experimental and surgical technique in the rat", 2e éd., Academic press, San Diego, U. S. A., pp. 256.
- Welsh, A.O. and Enders, A.C. (1993) "Chorioallantoic placenta formation in the rat. III. Granulated cells invade the uterine luminal epithelium at the time of epithelial cell death", *Biol. Reprod.* 49:38-57.
- Woscholski, R., Kodaki, T., McKinnon, M., Waterfield, M.D., Parker, P.J. (1994) "A comparison of demethoxyviridin and wortmannin as inhibitors of phosphatidylinositol 3-kinase", *FEBS Lett.* 342:109-114.
- Wu, W.X., Ma, X.H., Yoshizato, T. (1999) "Differential expression of myometrial oxytocin receptor and prostaglandin H synthase 2, but not estrogen receptor alpha and heat shock protein 90 messenger ribonucleic acid in the gravid horn and nongravid horn in sheep during betamethasone-induced labor.", *Endocrinology* 140:5712-5718.
- Wu, X., Senechal, K., Neshat, M.S., Whang, Y.E., Sawyers, C.L. (1998) "The PTEN/MMAC1 tumor suppressor phosphatase functions as a negative regulator of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway" *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 95:15587-15591.
- Xie, W., Chipman, J.G., Robertson, D.L., Erickson, R.L., Simmons, D.L. (1991) "Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88:2692-2696.
- Yoshino, O., Osuga, Y., Hirota, Y., Koga, K., Yano, T., Tsutsumi, O., Taketani, Y. (2003) "Akt as a possible intracellular mediator for decidualization in human endometrial stromal cells", *Mol. Hum. Reprod.* 9:265-269.
- You, M., Ku, P.T., Hrdlickova, R., Bose, H.R. Jr. (1997) "ch-IAP1, a member of the inhibitor-of-apoptosis protein family, is a mediator of the antiapoptotic activity of the v-Rel oncoprotein", *Mol. Cell. Biol.* 17:7328-7341.

Zandi, E., Rothwarf, D.M., Delhase, M., Hayakama, M., Karin, M. (1997) "The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation" *Cell* 91:243-252.

Zou, T., Rao, J.N., Guo, X., Liu, L., Zhang, H.M., Strauch, E.D., Bass, B.L., Wang, J.Y. (2004) "NF-kappaB-mediated IAP expression induces resistance of intestinal epithelial cells to apoptosis after polyamine depletion", *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 286: C1009-1018.