

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
PIERRE-LUC CARON**

**LE RÔLE ET L'IMPLICATION DU TRANSFORMING GROWTH
FACTOR- β (TGF- β) DANS LE DESTIN DES CELLULES ENDOMÉTRIALES
DE LA RATE LORS DU CYCLE OESTRAL ET DE LA GESTATION**

JUIN 2007

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

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

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

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier sincèrement mon directeur de recherche, le Dr Éric Asselin, de m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour sa grande confiance en mes compétences, pour son dévouement, sa patience ainsi que sa disponibilité. Je le remercie énormément de l'opportunité qu'il m'a donné de participer à différents congrès internationaux.

Je tiens également à remercier tous mes collègues de travail : Marie-Claude Déry, Véronique Gagnon, Émilie Sexton, Kim Leblanc, Isabelle St-Louis, Geoffroy Bélanger, Steve Turner et Virginie Boucher. Un merci particulier s'impose dans le cas de Guylaine Fréchette-Frigon, avec qui j'ai travaillé quotidiennement, qui m'a aidé, supporté et avec qui j'ai développé une belle complicité. Un gros merci à Valérie Leblanc qui m'a pris sous son aile lors de mon arrivée au laboratoire, pour son dévouement ainsi que pour sa grande patience quotidienne, elle qui a su m'épauler, m'encourager et qui m'a appris tout ce qu'elle savait. Merci à Sophie Parent et Céline VanTemsche qui ont su m'éclairer à plusieurs reprises et qui m'ont aussi beaucoup appris. Finalement, merci à Marie-Josée Cardin qui m'a aidé à terminer mes manipulations. Je vous remercie tous pour votre apport dans mon apprentissage, vous qui avez fait de ce milieu un endroit fort agréable et sympathique. Je garde d'excellents souvenirs de vous et j'espère vous revoir bientôt.

Finalement, je souhaite remercier madame Rollande Caron pour sa patience, sa gentillesse, son énorme dévouement et pour sa grande confiance en moi pour la manipulation des animaux de laboratoire.

Merci à ma famille, ma conjointe Sonia et ma fille Maëlie.

RÉSUMÉ

Durant le cycle oestral, l'endomètre utérin subit de nombreux changements morphologiques et physiologiques. Sous l'effet des hormones stéroïdiennes, l'œstrogène et la progestérone, les cellules endométriales prolifèrent et subissent l'apoptose afin de préparer l'utérus pour l'implantation de l'ovule fécondé. Lors de l'implantation embryonnaire chez la rate (jour 5.5 de la gestation), les cellules épithéliales subissent la première vague d'apoptose de l'endomètre permettant la pénétration de l'embryon dans la paroi utérine. Suite à l'implantation, les cellules stromales endométriales prolifèrent et se différencient en cellules déciduales, un phénomène nommé décidualisation. Vers le 14^e jour de la gestation, les cellules déciduales subissent alors la deuxième vague d'apoptose de l'endomètre que l'on nomme la régression déciduale.

Il est bien connu que les hormones stéroïdiennes sont impliquées dans les processus physiologiques de la reproduction dont l'implantation embryonnaire et la décidualisation. De plus, plusieurs facteurs de croissance permettent le bon déroulement du développement embryonnaire. En effet, le Transforming growth factor- β (TGF- β) joue un rôle crucial dans la prolifération et la différenciation cellulaire, dans l'adhésion et la motilité cellulaire ainsi que dans les processus apoptotiques. L'implication du TGF- β dans le développement embryonnaire est bien établie. Cependant, les mécanismes intracellulaires et moléculaires permettant la régulation du cycle oestral et de la gestation, plus particulièrement la régression de la décidue, par le TGF- β sont peu documentés. Une étude antérieure dans notre laboratoire a permis de démontrer que l'implication de la voie de la PI 3-K/Akt dans le cycle oestral chez la rate. Une deuxième étude plus récente réalisée dans notre laboratoire a révélé que le TGF- β induit l'apoptose dans les cellules stromales en culture et qu'il pourrait exister une interaction entre la voie de la PI 3-K/Akt et celle du TGF- β . Ainsi, nous croyons que la voie de signalisation du TGF- β joue un rôle important dans la régulation du cycle oestral et dans

les processus apoptotiques lors de la régression déciduale grâce à son interaction avec la voie de survie cellulaire de la PI 3-K/Akt.

L'objectif général de mon projet de recherche était d'étudier l'implication du TGF- β dans les processus physiologiques de la reproduction lors du cycle oestral et de la gestation. D'une façon plus précise, cette étude a consisté à déterminer la présence, le niveau d'expression et la régulation du TGF- β lors du cycle oestral, et l'implication des TGF- β 1, TGF- β 2 et TGF- β 3 dans la régulation de l'apoptose des cellules déciduales et dans la voie de survie cellulaire de la PI 3-K/Akt. Pour ce faire, nous avons utilisé des rates Sprague-Dawley avec un cycle oestral régulier. Les rates ont été euthanasiées à chaque jour du cycle. Les utérus ont été recueillis pour des coupes de tissus et les cellules endométriales ont été prélevées pour en extraire les protéines et l'ARN. Le TGF- β 1 est présent principalement lors du proestrus et restreint dans les cellules stromales. Par contre, les TGF- β 2 et TGF- β 3 sont exprimés fortement au moment du diestrus et sont localisés à la fois dans les cellules épithéliales et stromales. Notre deuxième modèle, la rate pseudogestante, a été obtenu suite à des injections successives d'œstrogène et de progestérone afin de mimer la gestation sans la présence de l'embryon. Les cellules endométriales ont été prélevées et les protéines extraites pour des analyses de type Western. Les trois isoformes du TGF- β sont exprimés de façon différente dans l'endomètre selon un patron similaire à celui observé lors de la gestation suggérant que l'expression des TGF- β est indépendante de l'embryon. Finalement, notre troisième modèle est la culture de cellules déciduales, provenant de rates ayant subi des injections d'œstrogène et de progestérone afin d'induire la décidualisation. Les traitements des cellules déciduales au TGF- β 2 et TGF- β 3 induisent une diminution de l'activité de Akt, de l'expression de XIAP, une protéine inhibitrice de l'apoptose, et une augmentation de l'apoptose. Ces résultats suggèrent que le TGF- β joue un rôle important au cours du cycle oestral et que la voie de la PI 3-K/Akt est impliquée dans la régulation de l'apoptose des cellules déciduales médiée par le TGF- β .

Des études supplémentaires seront nécessaires afin de définir plus précisément les mécanismes par lesquels le TGF- β et les protéines Smads interagissent avec la voie de la PI 3-K/Akt afin d'induire l'apoptose des cellules déciduales. D'autres études devront être effectuées pour mieux comprendre le rôle du TGF- β au niveau du cycle oestral.

TABLE DES MATIÈRES

	Page
REMERCIEMENTS	ii
RÉSUMÉ.....	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	vi
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS.....	xi
CHAPITRE I INTRODUCTION.....	14
1.1 INFERTILITÉ FÉMININE.....	14
1.2 LE MODÈLE ANIMAL	17
1.3 ANATOMIE ET HISTOLOGIE DE L'UTÉRUS DE LA RATE.....	17
1.4 LES HORMONES STÉROÏDIENNES.....	20
1.5 RÉGULATION DU CYCLE HORMONAL	22
1.6 LE CYCLE OESTRAL	26
1.7 IMPLANTATION EMBRYONNAIRE.....	28
1.8 LA DÉCIDUALISATION.....	33
1.8.1 La régression déciduale.....	36
1.8.2 Induction de la décidualisation (pseudogestation).....	36
1.8.3 Culture cellulaire.....	37
1.9 L' APOPTOSE.....	38
1.9.1 Caractéristiques biochimiques et morphologiques.....	40
1.9.2 Signalisation et caspases	42
1.10 LE TRANSFORMING GROWTH FACTOR-β.....	44
1.10.1 Activation et liaison du TGF- β à son récepteur.....	46
1.10.2 La signalisation intracellulaire du TGF- β et les protéines Smads	48
1.11 LA VOIE DE SURVIE CELLULAIRE DE LA PI3-K.....	50
1.11.1 La protéine Akt/PKB/Rac	51
1.11.2 Xiap.....	53
1.11.3 CDC47/MCM7.....	55

1.12	HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS.....	56
CHAPITRE II EXPRESSION DU TGF-β DURANT LA GESTATION		
	CHEZ LA RATE ET SON ACTIVITÉ SUR LA SURVIE	
	DES CELLULES DÉCIDUALES	57
	PRÉFACE.....	57
	RÉSUMÉ.....	58
	ABSTRACT.....	61
	BACKGROUND	62
	METHODS	64
	RESULTS.....	70
	DISCUSSION	73
	CONCLUSIONS	77
	AUTHORS' CONTRIBUTIONS.....	78
	ACKNOWLEDGMENTS	78
	REFERENCES.....	79
	FIGURE LEGEND.....	85
 CHAPITRE III TRANSFORMING GROWTH FACTOR-β1, 2, 3		
	ISOFORMS INHIBIT AKT ACTIVITY,	
	DOWNREGULATE XIAP LEVELS AND INDUCE	
	APOPTOSIS IN RAT DECIDUAL CELLS.....	97
	PRÉFACE.....	97
	RÉSUMÉ.....	98
	ABSTRACT.....	101
	INTRODUCTION.....	102
	MATERIALS AND METHODS.....	104
	RESULTS.....	110
	DISCUSSION	114
	CONCLUSION.....	120
	ACKNOWLEDGMENTS	120

RÉFÉRENCES	121
FIGURE LEGEND	129
CHAPITRE IV CONCLUSION ET PERSPECTIVES	141
4.1 CONCLUSION	141
4.2 PERSPECTIVES	152
BIBLIOGRAPHIE	155

LISTE DES FIGURES

1.1	Avortement spontané et potentiel de fertilité en fonction de l'âge chez la femme.....	15
1.2	Anatomie utérine de la rate.....	18
1.3	Coupe histologique transversale de l'utérus de la rate non-gestante.....	19
1.4	Les différentes étapes de la synthèse des hormones stéroïdiennes.....	21
1.5	Schéma démontrant les rétroactions qui régulent la fonction ovarienne.....	23
1.6	Variation des hormones stéroïdiennes et des gonadotropines durant le cycle oestral chez la rate	25
1.7	Frottis vaginaux colorés à l'aide du bleu de méthylène.....	27
1.8	Les différentes étapes de la gestation	31
1.9	Les cellules stromales de l'endomètre utérin humain et les cellules déciduales suite à la décidualisation.....	34
1.10	Schéma montrant les différents changements morphologiques d'une cellule en apoptose et comparaison entre une cellule normale et une cellule apoptotique.....	41
1.11	Schéma de la voie de signalisation de la PI 3-K/Akt.....	43
1.12	Schéma de la voie de signalisation intracellulaire du TGF- β	47
2.1	Detection of apoptosis in pregnant endometrial tissues as demonstrated by Western and TUNEL analyses	88
2.2	TGF- β 1, - β 2 and - β 3 expressions in rat endometrium during rat pregnancy.....	89
2.3	Immunohistochemistry of TGF- β 1 in rat endometrium during pregnancy.....	90
2.4	Immunohistochemistry of TGF- β 2 in rat endometrium during pregnancy.....	91
2.5	Immunohistochemistry of TGF- β 3 in rat endometrium during pregnancy.....	92
2.6	Smad2 and phospho-Smad2 (P-Smad2) expressions in rat endometrium during pregnancy.....	93

2.7	Effect of TGF- β 1 (ng/ml) on cell survival in cultured rat endometrial cells as demonstrated by Hoechst staining, TUNEL and trypan blue exclusion analysis.....	94
2.8	Expression of Smad2, P-Smad2 and CDC47 in cultured rat endometrial cells <i>in vitro</i> as demonstrated by Western blot analysis in response to TGF- β 1 (ng/ml).....	95
2.9	Expression of Akt, P-Akt and XIAP in cultured rat endometrial cells <i>in vitro</i> as demonstrated by Western blot analyses in response to TGF- β 1 (ng/ml).....	96
3.1	TGF- β 1 (A), TGF- β 2 (B) and TGF- β 3 (C) mRNAs abundance during the estrous cycle as demonstrated by RT-PCR analysis.....	132
3.2	TGF- β 1 (A), TGF- β 2 (B) and TGF- β 3 (C) proteins expression during the estrous cycle as determined by Western blot analysis.....	133
3.3	Immunohistochemistry of TGF- β 1 (A), TGF- β 2 (B) and TGF- β 3 (C) in rat endometrium during the estrous cycle.....	134
3.4	TGF- β 1 (A), TGF- β 2 (B), TGF- β 3 (C) and Cleaved Caspase-3 proteins expression during the pseudopregnancy as determined by Western blot analysis.....	135
3.5	Expression of Akt (A), Phospho-Akt (B) and XIAP (C) in cultured rat decidual cells <i>in vitro</i> in response to TGF- β 2 (ng / ml) as demonstrated by Western blot analysis.....	136
3.6	Expression of Akt (A), Phospho-Akt (B) and XIAP (C) in cultured rat decidual cells <i>in vitro</i> in response to TGF- β 3 (ng / ml) as demonstrated by Western blot analysis.....	137
3.7	Expression of Smad2 (A) and Phospho-Smad2 (B) in cultured rat decidual cells <i>in vitro</i> in response to TGF- β 2 (ng / ml) as demonstrated by Western blot.....	138
3.8	Expression of Smad2 (A) and Phospho-Smad2 (B) in cultured rat decidual cells <i>in vitro</i> in response to TGF- β 3 (ng / ml) as demonstrated by Western blot	139
3.9	Expression of CDC-47 in cultured rat decidual cells <i>in vitro</i> in response to TGF- β 2 (A) and TGF- β 3 (B) (ng/ml) as demonstrated by Western blot analysis and effect of TGF- β 2 (C) and TGF- β 3 (D) (ng/ml) on cell survival in cultured rat decidual cells as demonstrated by Hoechst nuclear staining.....	140

LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
Akt	Activated by kinase tyrosine
Apaf-1	Apoptotic protease-activating factor-1
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
BIR	Baculovirus IAP repeat
BRUCE	BIR repeat containing ubiquitin-conjugating enzyme
C-	Contrôle négatif
Caspase	Cysteine-containing aspartate-specific proteases
CDC47/MCM7	Cell Division Cycle 47/Mini Chromosome Maintenance protein 7
DAB	3,3'-diaminobenzidine
DB	Decidua basalis
D.C.	Dextran-Charcoal
DMEM-F12	Dulbecco's Modified Eagle's Medium F12
E ₂	17β-oestradiol
EGF	Epidermal growth factor
EPF	Early pregnancy factor
éd.	Édition
et al.	Plus de deux auteurs dans un ouvrage
FBS	Fœtal bovine serum
FSH	Hormone folliculo-stimulante
g	Gramme
h	Heure

HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HCG	Gonadotrophine chorionique humaine
IAPs	Inhibitor of apoptosis proteins
IGFBP-1	insulin-like growth factor binding protein-1
IHC	Immunohistochimie (immunohistochemistry)
KDa	Kilodalton
LH	Luteinizing hormone (hormone lutéinisante)
LY294002	2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-chromone
MCM	Mini Chromosome Maintenance
MH	Mad homology (homologie à Mad)
ml	Millilitre
NAIP	Neural apoptosis inhibitory protein
NF- κ B	Nuclear factor kappa B
P ₄	Progestérone
P450 _{aro}	Cytochrome P450 aromatase
P450 _{scc}	Cytochrome P450 side-chain cleavage
PBS	Phosphate buffer saline
P-Akt	Phosphorylated Activated by kinase tyrosine
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PDGF	Platelet-derived growth factor
PIF	Preimplantation factor
PCOS	Polycystic ovary syndrome
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PCR	Polymerase chain reaction
PDK	Phosphoinositide dependant kinase
PH	Pleckstrin homology
PI 3-K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PIP	Phosphatidylinositol 3 phosphate
PIP ₂	Phosphatidylinositol 4,5 diphosphate
PIP ₃	Phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate
PKB	Protein kinase B

PMN	Polymorphonucléaires neutrophiles
POD	Peroxydase oxydo-reductase
pp	Page
Rac	Related to A and C protein kinase
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 pI
TGF- β	Transforming growth factor-bêta
TNF- α	Tumor necrosis factor-alpha
Thr	Thréonine
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling
μ g	Microgramme
μ l	Microlitre
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis

CHAPITRE I

INTRODUCTION

L'évolution des mœurs, l'allongement de la durée des études et le travail sont des facteurs qui font en sorte que nous procréons de plus en plus tard. De nos jours, les femmes semblent beaucoup plus axées sur l'établissement de leur carrière professionnelle que sur le fondement d'une famille durant la période de fécondité maximale, soit autour de 18 à 25 ans (Harlap et al. 1989; Brock et Holloway 1990). Plusieurs femmes recherchent, après leurs études, un emploi stable convenant à leur besoin et veulent orienter leur carrière professionnelle dès les premières années et laissent de côté la possibilité d'avoir des enfants sous certains prétextes. Une fois leur vie professionnelle bien démarrée, ces femmes entrevoient finalement la possibilité de bâtir une famille. Ainsi, de plus en plus de femmes âgées entre 30 et 40 ans désirent avoir des enfants mais sont malheureusement freinées par l'infertilité puisque, dès l'âge de 30 à 35 ans, le taux d'avortement spontané augmente et le potentiel de fertilité des femmes diminue (Harlap et al. 1989; Brock et Holloway 1990; Dunson et al. 2002) (Figure 1.1).

1.1 Infertilité féminine

Le succès de la reproduction repose sur une association très étroite entre les tissus maternels et embryonnaires permettant l'échange adéquat de substances entre ces deux tissus. Il a été estimé qu'environ 70% de toutes les grossesses ne se rendent pas à terme; 50 à 60% ne dépassent pas le premier mois de grossesse (Hill et Anderson 1990). Plusieurs facteurs impliqués au niveau de la reproduction humaine peuvent être attribués à l'arrêt de la grossesse et entraîner des problèmes d'infertilité dont certains désordres hormonaux et ovulatoires. Ceux-ci représentent une cause majeure d'infertilité chez la femme. Le syndrome des ovaires polykystiques (polycystic ovary syndrome, PCOS), caractérisé par une morphologie anormale des ovaires, une stéroïdogénèse anormale

marquée par une augmentation de sécrétion d'androgène, de progestérone (P_4) et d'œstrogène (E_2) et une sécrétion anormale de gonadotrophine dont une augmentation de la concentration de l'hormone lutéinisante (LH). Ce syndrome est souvent associé aux

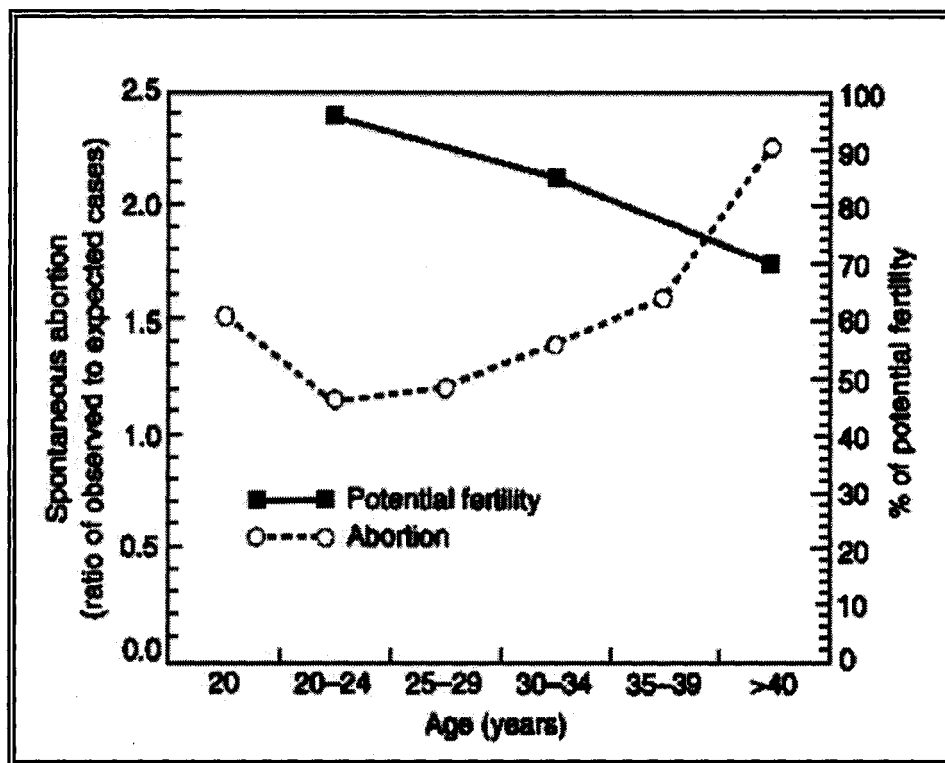


FIGURE 1.1 Avortement spontané et potentiel de fertilité en fonction de l'âge chez la femme (Bulletti et al. 1996).

femmes qui souffrent d'infertilité anovulatoire (Homburg 2003). Un mauvais fonctionnement de la glande thyroïde peut également affecter la fertilité de la femme ; de récentes études révèlent que l'hypothyroïdisme peut être associé à un dysfonctionnement ovulatoire (Trokoudes et al. 2006). L'endométriose, une pathologie dans laquelle l'endomètre utérin s'étend à l'extérieur de l'utérus, peut provoquer l'infertilité en bloquant l'accès à l'utérus ou en s'implantant sur les ovaires (Lyons et al. 2002 ; Allaire 2006). Certains problèmes génétiques dont la trisomie (surtout pour le chromosome 16) et la triploïdie ont été associés à l'infertilité. Il a été démontré que,

durant le premier trimestre, dans 83% des avortements spontanés chez les patientes de plus de 35 ans, l'embryon avait un caryotype aneuploïde, c'est-à-dire un nombre anormal de chromosomes (trisomie ou monosomie) (Strom et al. 1992). Plusieurs cas d'infertilité sont aussi causés par des problèmes au niveau de l'implantation embryonnaire.

La reconnaissance et le maintien de la grossesse sont des processus complexes impliquant à la fois des signaux maternels et embryonnaires. Le succès de la reproduction chez les mammifères nécessite une interaction réciproque entre le blastocyste qui s'implante et l'utérus réceptif, préalablement préparé par les hormones stéroïdiennes dont la progestérone. En absence de ce dialogue moléculaire, l'embryon ne peut s'implanter dans la paroi utérine. De plus, l'incapacité à maintenir la croissance et la différenciation des cellules utérines suite à l'attachement du blastocyste résulte à un avortement spontané (Paria et al. 2001). Considérant que 78% des pertes embryonnaires sont causées par des défauts au niveau de l'implantation embryonnaire (Webb et Glasser 1984), la compréhension des mécanismes impliqués dans le développement de l'embryon précédant l'implantation et l'implantation du blastocyste dans la paroi utérine est un défi de taille dans le but de résoudre les problèmes d'infertilité féminine. Ainsi, il devient primordial d'identifier les mécanismes de signalisation moléculaire permettant la réceptivité de l'endomètre, l'implantation et le développement de l'embryon dans la paroi utérine.

À l'intérieur de cette étude, nous nous sommes efforcés de comprendre les mécanismes de signalisation intracellulaire dans l'endomètre utérin de la rate pendant deux processus importants de la gestation, soit l'implantation embryonnaire et la régression déciduale. Pour ce faire, nous avons étudié plus spécifiquement l'importance d'un facteur de croissance, le Transforming growth factor- β (TGF- β) durant le cycle oestral et la gestation chez la rate, et plus particulièrement, son effet sur les cellules déciduales.

1.2 Le modèle animal

Le modèle animal que nous avons utilisé pour cette étude est la rate femelle Sprague-Dawley ayant un poids d'environ 200 à 250g. Différentes raisons justifient notre choix. Tout d'abord, la rate possède certaines similitudes avec la femme ; son ovulation est spontanée, c'est-à-dire qu'elle survient même en absence de coït avec le mâle, le type de placentation est le même que chez l'humain soit hémochorial avec érosion de l'endothélium vasculaire et un placenta discoïde, c'est-à-dire que seule la partie invasive de l'embryon en développement participe à la formation du placenta (Thibault et Levasseur 2001). De plus, chez la rate, la décidualisation des cellules stromales qui est normalement induite par un stimulus utérin embryonnaire peut être mimée à l'aide d'un stimulus artificiel, ce qui nous permet d'étudier certains moments de la gestation sans la présence de l'embryon. Le cycle de reproduction de la rate, nommé cycle oestral, et le temps de gestation sont de courte durée soit de 4 à 5 jours et de 21 à 23 jours respectivement, ce qui facilite l'obtention de tissus. De plus, l'utérus étant de petite taille, la quantité de tissus recueillis est plus importante chez la rate que chez la souris. Finalement, la taille de l'animal facilite les manipulations.

1.3 Anatomie et histologie de l'utérus de la rate

L'utérus de la rate est constitué de deux cornes utérines entièrement séparées sur toute leur longueur, chacune située de chaque côté de la cavité abdominale au-dessus du vagin et près de la vessie. Une seule artère et une seule veine parcourent toute la longueur de chaque corne utérine jusqu'à l'ovaire et permettent ainsi d'acheminer le sang vers les ovaires, l'utérus et le col utérin. Les ovaires sont petits et ronds reliés aux cornes utérines par les oviductes et maintenus en place par du tissu adipeux (Waynforth et Flecknell 1992) (Figure 1.2). Du point de vue histologique, l'utérus est formé d'une muqueuse, l'endomètre, et d'une couche épaisse de muscle lisse, le myomètre. La

muqueuse endométriale est constituée d'une couche fonctionnelle, l'épithélium luminal qui est en contact direct avec la lumière utérine et d'une couche basale, le stroma. L'épithélium de l'endomètre est composé de cellules dont la surface comporte des microvillosités. De son côté, le stroma est constitué d'une matrice glycoprotéique, de nombreux vaisseaux sanguins, de fibroblastes également dénommés cellules stromales, de macrophages, de mastocystes et de glandes utérines (Thibault et Levasseur 2001). Le

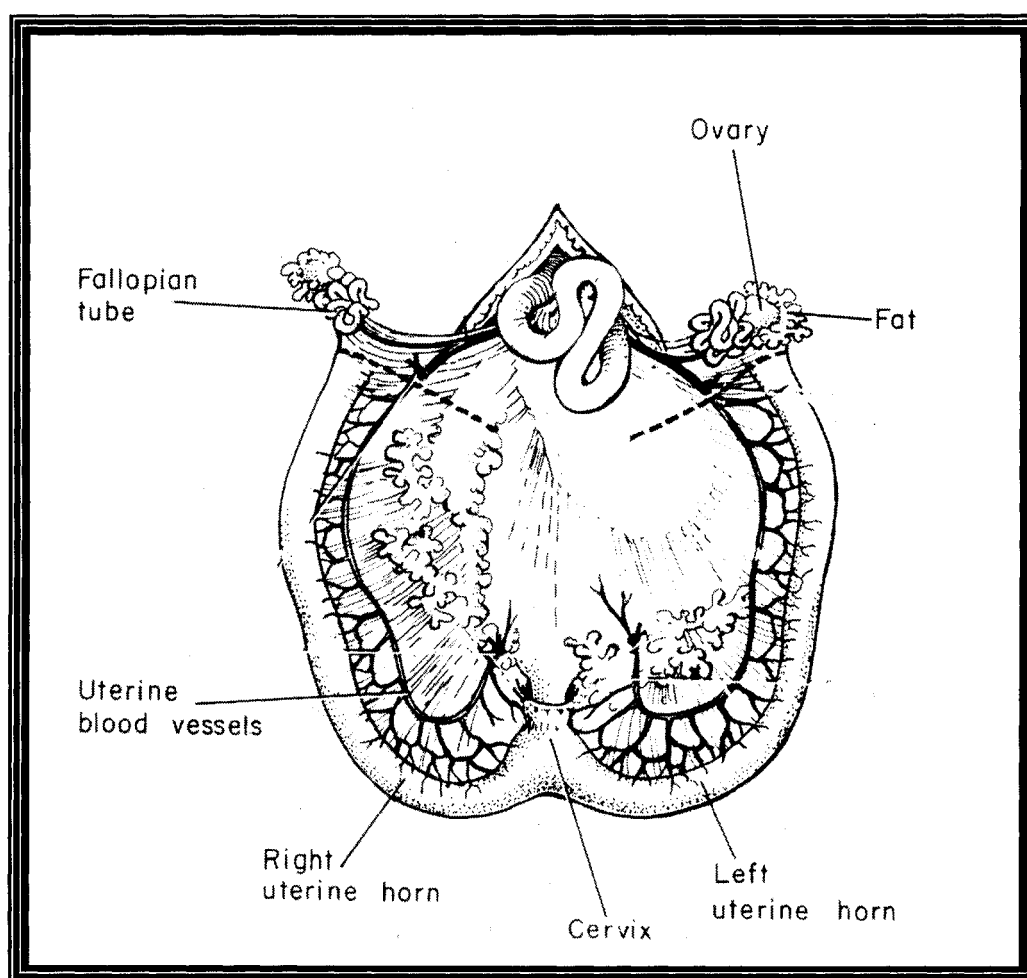


FIGURE 1.2 Anatomie utérine de la rate (Waynforth et Flecknell 1992)

myomètre est formé de muscles lisses divisés en trois couches : (a) longitudinale interne qui est en contact avec le stroma, (b) circulaire moyenne située entre les deux couches longitudinales, et (c) longitudinale externe qui est en contact avec la séreuse qui recouvre la plus grande partie de l'utérus (Figure 1.3).

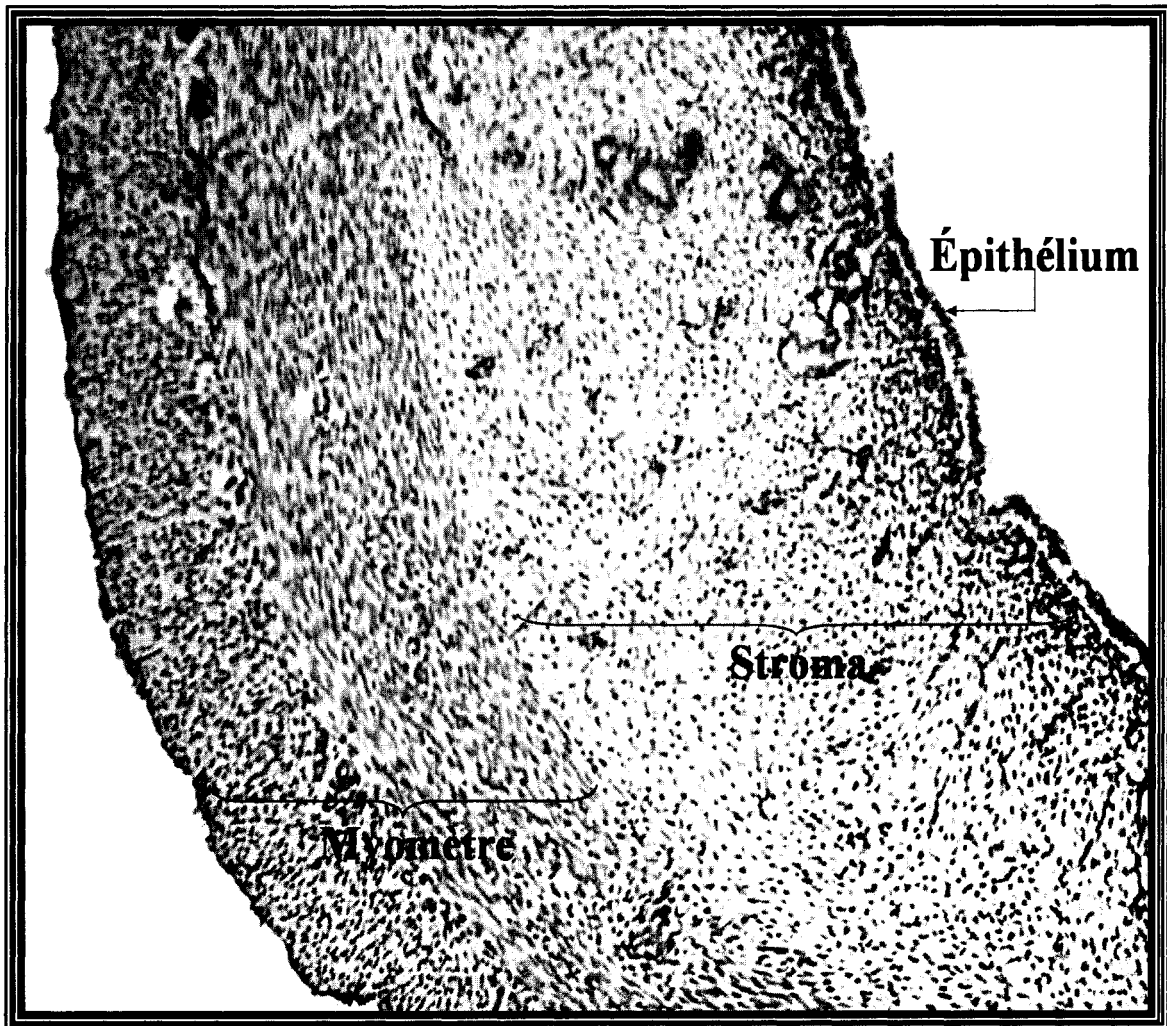


FIGURE 1.3

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

Durant le cycle oestral, l'endomètre subit de nombreux changements morphologiques et histologiques afin de créer un environnement propice à l'implantation de l'embryon. Tous ces changements résultent de l'action des hormones stéroïdiennes, l'œstrogène (E_2) et la progestérone (P_4).

1.4 Les hormones stéroïdiennes

Le cycle de reproduction chez les mammifères est sous le contrôle des hormones stéroïdiennes, soit l'œstrogène et la progestérone. Elles sont synthétisées par les cellules ovariennes à partir du cholestérol qui est converti en prégnénolone grâce au cytochrome P-450_{sc} (side-chain cleavage) de la mitochondrie. La prégnénolone et la progestérone sont ensuite transformées en androgènes par la coupure de leur chaîne latérale par le cytochrome P-450C17. Par la suite, un troisième cytochrome, le P450_{aro} (aromatase) situé dans le réticulum endoplasmique, assure la conversion des androgènes en œstrogènes (Figure 1.4). Les œstrogènes présents dans l'organisme existent sous trois formes : (a) le 17β -œstradiol (E_2), la forme la plus active et la plus sécrétée par les ovaires, (b) l'estrone (E_1) et (c) l'oestriol (E_3) (Knobil et al 1994, Tortora et Grabowski 1994, Thibault et Levasseur 2001).

Les hormones stéroïdiennes, nécessaires à la régulation du cycle de reproduction, sont sous le contrôle des gonadotropines, l'hormone folliculostimulante (FSH) et l'hormone lutéinisante (LH). La FSH stimule le développement initial des follicules ovariens et la sécrétion des œstrogènes par les follicules. La LH stimule le développement des follicules ovariens, déclenche l'ovulation et stimule la production des œstrogènes, de la progestérone, de l'inhibine et de la relaxine par le corps jaune (Tortora et Grabowski 1994). D'une manière générale, l'œstradiol stimule la multiplication cellulaire, la formation des récepteurs de la progestérone et le déclenchement de la parturition. De plus, les œstrogènes (a) assurent le développement

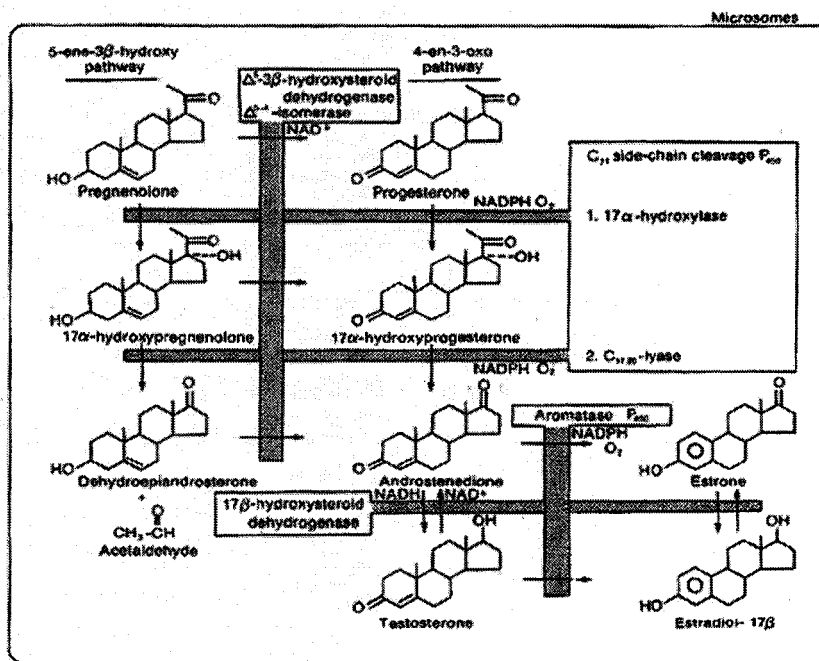
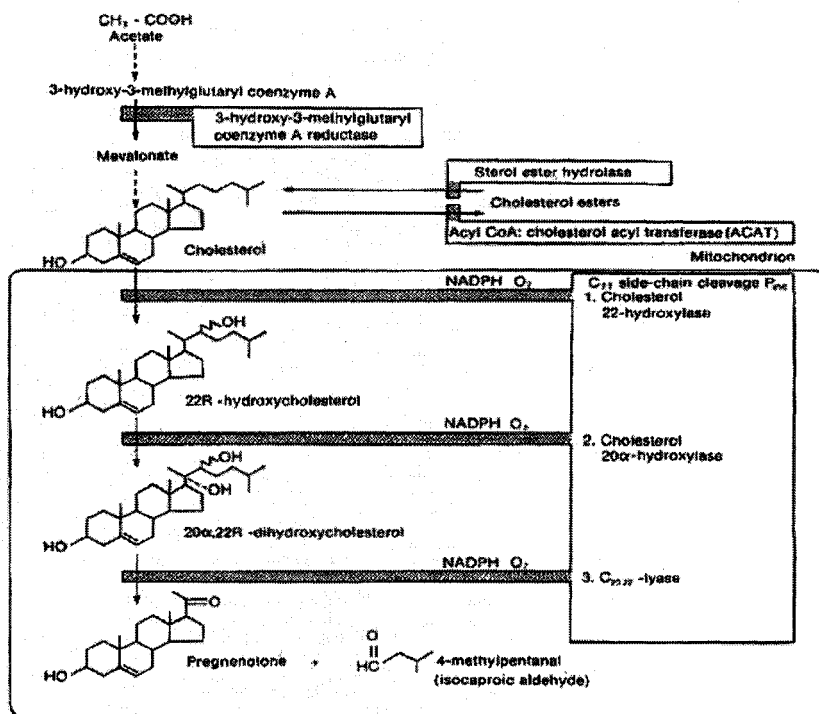


FIGURE 1.4 Les différentes étapes de la synthèse des hormones stéroïdiennes (Knobil et al. 1994).

et le maintien des structures reproductrices, (b) contribuent à la régulation de l'équilibre hydro-électrolytique et (c) augmentent l'anabolisme des protéines. La progestérone, qui est produite par le corps jaune, puis plus tard au cours de la gestation par le placenta, collabore avec les oestrogènes à préparer l'endomètre pour la nidation de l'ovule fécondé afin de permettre l'établissement et le maintien de la gestation. Elle inhibe également la prolifération cellulaire induite par les oestrogènes dans l'endomètre et joue un rôle dans la régulation hydrique de l'unité foeto-placentaire (Tortora et Grabowski 1994, Thibault et Levasseur 2001).

L'ensemble du processus d'implantation embryonnaire (voir section 1.7) ne peut avoir lieu sans une action préalable sur l'utérus des stéroïdes ovariens (E_2 et P_4) au cours du cycle et des premiers stades de la gestation. La montée pré-ovulatoire de E_2 assure la mise en place des récepteurs de la P_4 , hormone indispensable à l'établissement de la gestation. La P_4 agit sur l'activité sécrétoire de l'endomètre, ce qui assure un environnement favorable pour le développement et l'implantation de l'embryon. Chez la rate, l'hormone stéroïdienne E_2 est indispensable. L'embryon se développe jusqu'au stade de blastocyste mais ne peut s'implanter sans que le E_2 en déclenche le processus (Thibault et al 2001).

1.5 Régulation du cycle hormonal

L'endomètre est un système dynamique et l'état de différenciation cellulaire dans ces tissus dépend de la phase spécifique du cycle oestral, lequel est contrôlé par la libération cyclique des hormones ovariennes. Le cycle de reproduction, la croissance folliculaire et la maturation de l'ovocyte sont régulés par l'interaction de quatre hormones : (a) l'hormone folliculostimulante (FSH), (b) l'hormone lutéinisante (LH), (c) les oestrogènes et (d) la progestérone. Pendant l'enfance chez la femme, les ovaires croissent et sécrètent un peu d'oestrogènes, qui inhibent la libération de LH-RH par

l'hypothalamus. À l'approche de la puberté, l'hypothalamus devient moins sensible aux œstrogènes et commence alors à sécréter de la LH-RH de façon cyclique. Cette dernière stimule la libération de la LH et de la FSH par l'adénohypophyse qui agiront sur les ovaires afin de stimuler la croissance et la maturation du follicule (Figure 1.5). La LH stimule les cellules thécales qui sécrètent des androgènes qui seront ensuite transformés en œstrogènes par les cellules de la granulosa préalablement sensibilisées par la FSH.

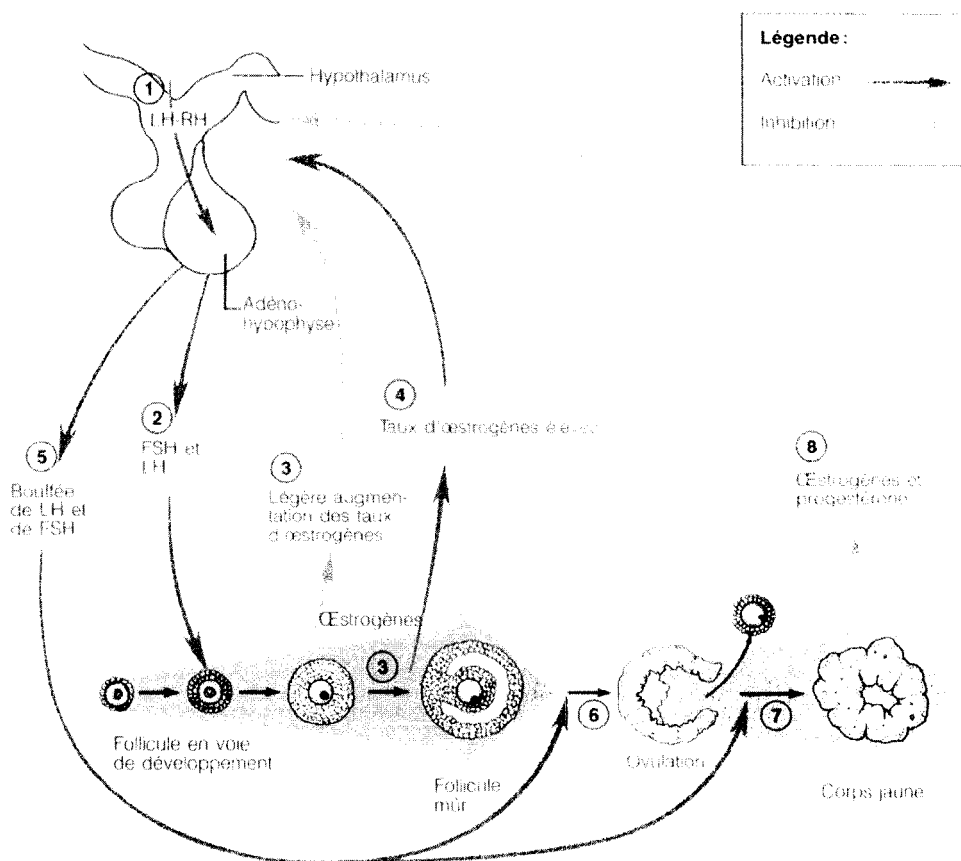


FIGURE 1.5

Schéma démontrant les rétroactions qui régulent la fonction ovarienne (Marieb et al. 1993).

L'augmentation de la concentration plasmatique des œstrogènes ainsi que la sécrétion d'inhibine par les cellules de la granulosa exercent une rétro-inhibition sur l'adénohypophyse, ce qui empêche la libération de la FSH et de la LH par l'hypophyse, mais continuent tout de même d'être synthétisées et accumulées. Les concentrations élevées d'œstrogènes déclenchent une brusque libération de la LH qui provoque la rupture de la paroi ovarienne et l'ovulation. Peu après l'expulsion de l'ovule, les taux d'œstrogènes diminuent. De plus, la LH favorise également la transformation du follicule rompu en corps jaune qui sécrète, dès sa formation, de la progestérone et une petite quantité d'œstrogènes qui exercent une puissante rétro-inhibition sur la libération de la LH et de la FSH. La diminution graduelle du taux sanguin de LH supprime le stimulus de l'activité du corps jaune qui commence à dégénérer. Cependant, dans le cas où un embryon s'est implanté, l'activité du corps jaune est maintenue par la gonadotrophine chorionique humaine (HCG) jusqu'à ce que le placenta soit prêt à prendre en charge la sécrétion de P_4 et de E_2 pour le reste de la gestation. À la fin du cycle, la diminution prononcée des hormones ovariennes entraîne l'arrêt de l'inhibition de la sécrétion de la FSH et de la LH permettant le début d'un nouveau cycle (Marieb 1993).

Le cycle hormonal de la rate possède deux caractéristiques particulières, ce qui n'est pas le cas des autres mammifères à ovulation spontanée (Figure 1.6). (a) Tout d'abord, un deuxième pic de FSH suit l'ovulation stimulant ainsi la formation de l'antrum des follicules qui ovuleront au cycle suivant, soit 3 jours plus tard. La croissance des follicules provoquent l'élévation d'oestradiol (E_2) en début de proestrus et l'élévation régulière d'inhibine. À ce moment, l'augmentation de la progestérone est responsable de l'apparition de l'oestrus et de l'ovulation. Suite à l'ovulation, les concentrations d'inhibine, une protéine sécrétée au niveau des cellules de la granulosa permettant d'inhiber la production de la FSH, chutent brutalement, ce qui permet la sécrétion du deuxième pic de FSH. (b) L'autre particularité vient du fait que le corps jaune possède une activité fonctionnelle très brève. Les niveaux de progestérone ne sont élevés qu'entre l'après-midi du metestrus et le matin du diestrus. Cependant, bien que

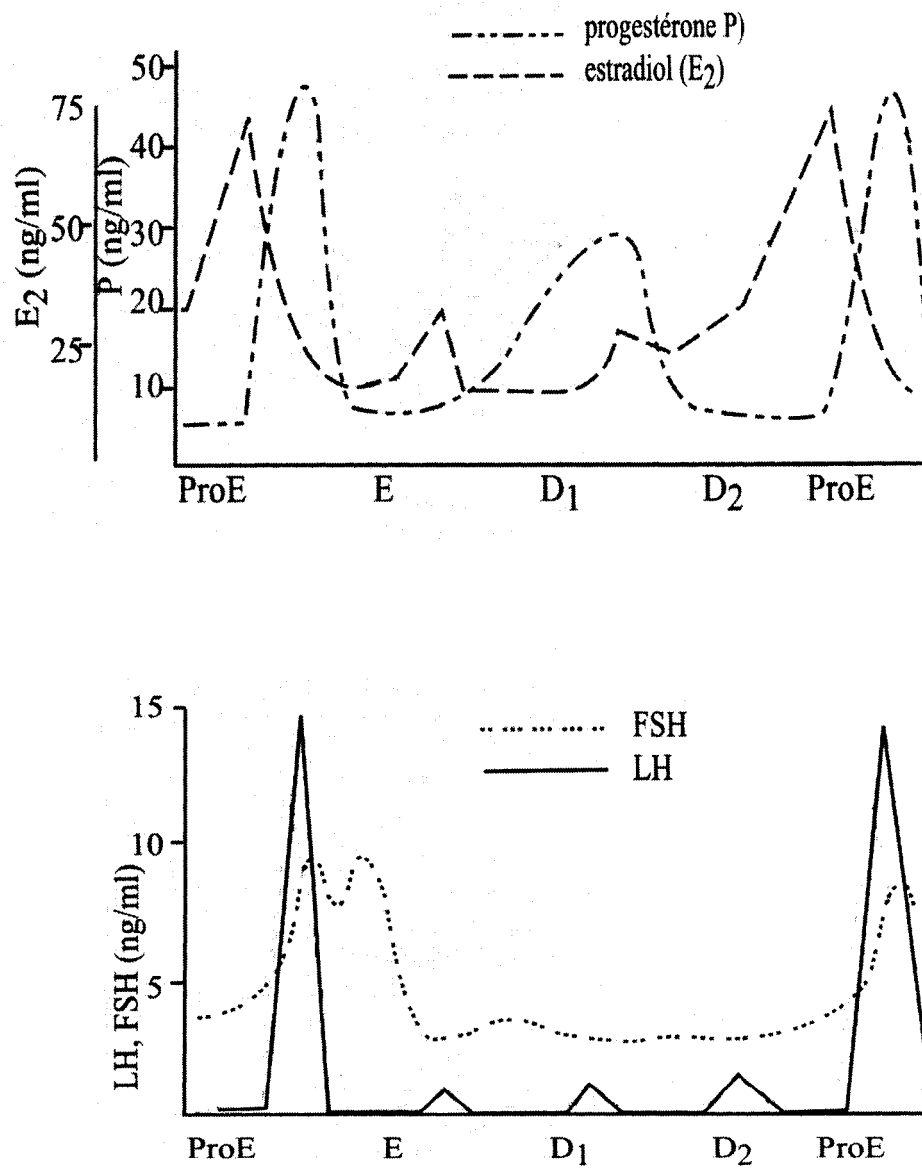


FIGURE 1.6

Variation des hormones stéroïdiennes et des gonadotropines durant le cycle oestral chez la rate (Thibault et Levasseur 2001) (ProE : proestrus, E : oestrus, D1 : metestrus, D2 : diestrus).

non fonctionnels, les corps jaunes ne régressent que très lentement et plusieurs populations de corps jaunes d'âges décroissants sont visibles sur l'ovaire (Thibault et Levasseur 2001).

1.6 Le cycle oestral

Chez les mammifères, le cycle de reproduction est caractérisé par l'apparition périodique soit d'un comportement d'oestrus (élimination des couches externes de l'endomètre sans phénomène vasculaire visible) ou soit par un saignement utérin (menstruation) (Thibault et Levasseur 2001). Par contre, chez la rate, il n'y a pas de menstruation. Les cellules endométriales des couches externes meurent par un processus de mort cellulaire programmé, l'apoptose, dont on discutera dans la section 1.9. Le cycle oestral de la rate est de courte durée soit de 4 à 5 jours et est caractérisé par la présence de quatre phases différentes qui se répètent avec une grande régularité pouvant s'étendre de la puberté jusque vers la fin de la vie.

Dans la plupart des espèces à ovulation spontanée, le cycle d'activité de l'ovaire (cycle ovarien) ne peut être identifié que par les variations cycliques des niveaux plasmatiques des hormones ovariennes, l'œstrogène et la progestérone (Thibault et Levasseur 2001). Cependant, chez la rate, l'identification et la durée des quatre phases du cycle oestral sont basées sur la cytologie des frottis vaginaux (Figure 1.7), ce qui nous permet de déterminer la période de réceptivité pendant laquelle la rate peut être accouplée. Tout d'abord, le début du cycle oestral survient suite de la décharge de FSH/LH qui entraîne l'ovulation et permet ainsi de débiter l'oestrus. Il est caractérisé par la présence unique de cellules épithéliales cornifiées ou kératinisées (cellules sans noyau ou anucléées) et peut durer entre dix et vingt heures. La phase qui suit est le metestrus d'une durée d'environ huit heures. On y observe la présence de cellules cornifiées, de cellules nucléées et de polymorphonucléaires neutrophiles (PMN) en faible quantité. Le diestrus est surtout marqué par la très grande majorité de PMN dans la lumière vaginale qui

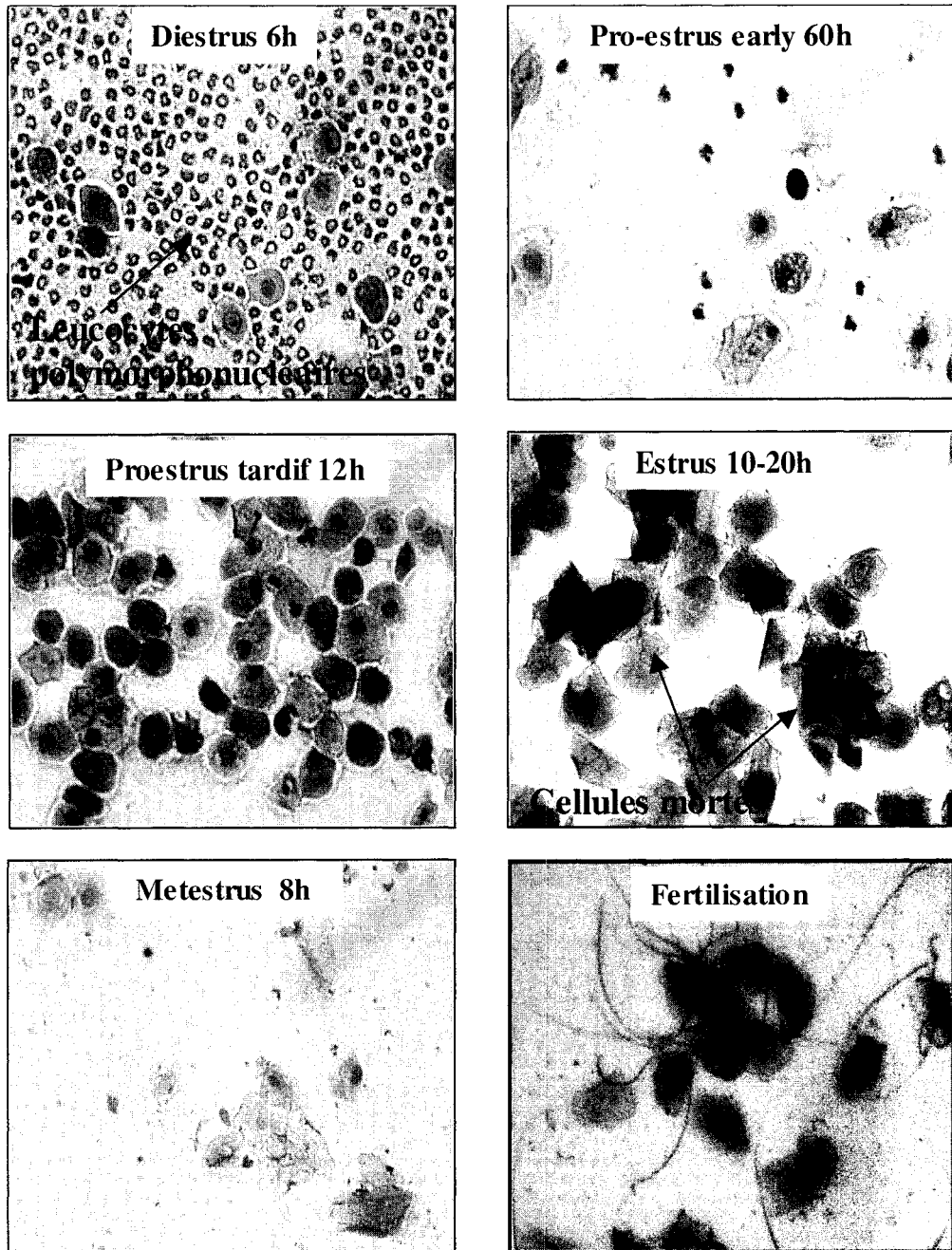


FIGURE 1.7 Frottis vaginaux colorés à l'aide du bleu de méthylène. Les différents types cellulaires y sont présentés ainsi que la confirmation de la fertilisation. (photos provenant du laboratoire du Dr Éric Asselin)

détuisent les cellules cornifiées, mais on y retrouve également quelques cellules nucléées. Cette phase a une durée d'environ six heures. Finalement, le proestrus qui a une durée totale de soixante-douze heures est une phase de prolifération cellulaire au niveau de la muqueuse utérine et peut être divisé en deux étapes : l'une précoce (soixante heures) et l'autre tardive (douze heures). Le proestrus précoce (early) se caractérise par la présence de PMN provenant du diestrus précédant, de cellules nucléées, de quelques cellules cornifiées et de grande quantité de mucus. Le proestrus tardif (late) constitue la période de réceptivité de la rate face au mâle ; c'est à ce moment et jusqu'au début de l'oestrus que peut avoir lieu l'accouplement. Durant cette phase, on retrouve principalement des cellules nucléées en très grande quantité (Waynforth et Flecknell 1992).

Les frottis vaginaux nous permettent également de vérifier la réussite de l'accouplement. Dans ce cas, le matin suivant l'accouplement, on observe, lors de l'analyse des frottis vaginaux, une grande quantité de spermatozoïdes (oestrus) (Figure 1.7). La présence d'un bouchon vaginal, composé de mucus et de sperme, est aussi un indicatif de la réussite de l'accouplement. À partir de ce moment, on considère que la rate est gestante et on estime cette journée comme étant le premier jour de la gestation (jour 1). Les rates sont euthanasiées au temps de gestation désiré les utérus sont prélevés et les protéines extraites pour des analyses ultérieures.

1.7 Implantation embryonnaire

Durant le cycle de reproduction, de nombreux changements surviennent au niveau des tissus utérins afin que l'endomètre soit réceptif à l'implantation de l'embryon. La réceptivité de l'endomètre est assurée par un mécanisme précis de sécrétion d'œstrogène et de progestérone (Duc-Goiran et al 1999). De plus, une synchronisation précise entre le développement du blastocyste et la réceptivité utérine

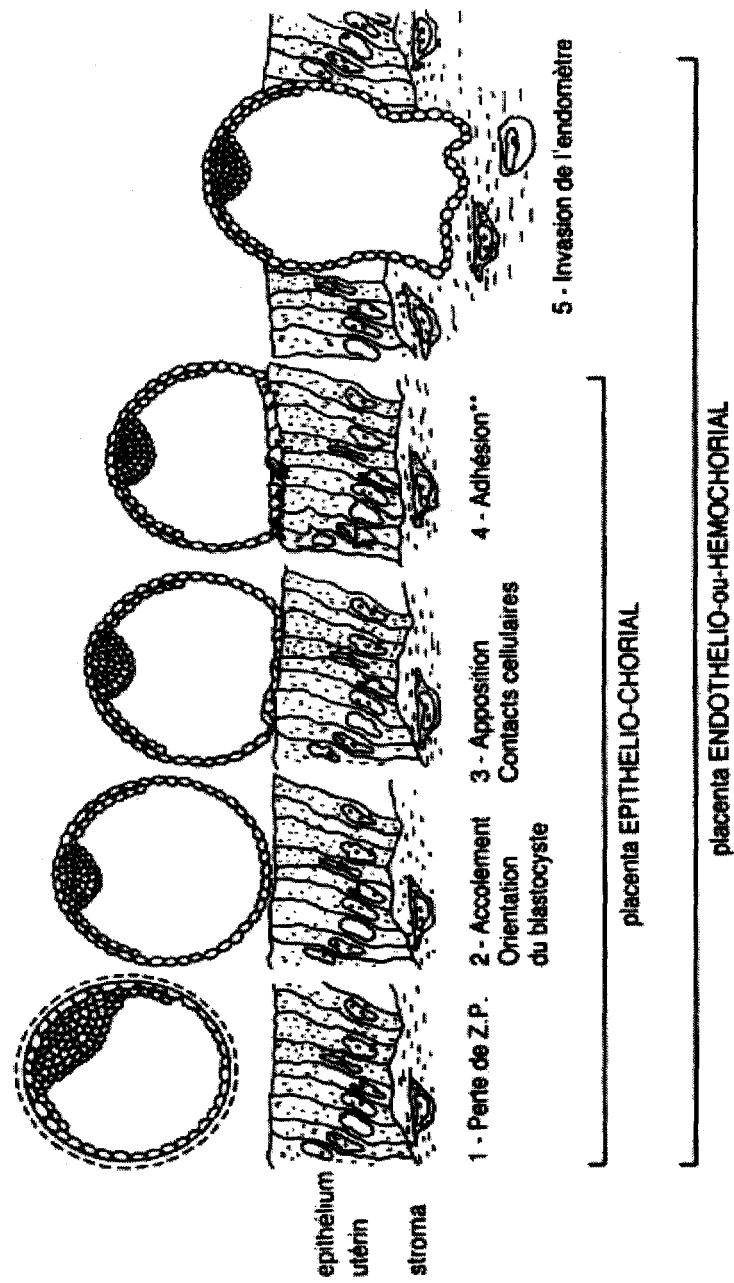
est nécessaire à la réussite de l'implantation. Une transformation profonde de l'endomètre, l'acquisition de propriétés adhésives des cellules trophoblastiques et utérines, et l'invasion contrôlée de l'endomètre par le trophoblaste sont également nécessaires à cette réussite (Thibault et Levasseur 2001).

La fécondation se produit lorsqu'un spermatozoïde entre en contact avec les récepteurs de la membrane pellucide de l'ovocyte. Celle-ci se dépolarise et permet l'entrée du spermatozoïde à l'intérieur de l'ovocyte. Suite à la fécondation, l'ovocyte achève sa deuxième division méiotique. Le matériel génétique de l'ovule s'unit à celui du spermatozoïde pour former un seul noyau; le noyau situé dans la tête du spermatozoïde forme une structure appelée pronucléus mâle et le noyau de l'ovule constitue le pronucléus femelle. Lorsque ces deux pronucléi sont formés, ils s'unissent en un seul noyau appelé noyau de segmentation. L'ovule ainsi fécondé, nommé zygote, contient un cytoplasme, un noyau de segmentation et une membrane pellucide (Tortora et Grabowski 1994, Marieb 1993). Le zygote subit alors une série de divisions cellulaires passant de deux à quatre puis à huit cellules jusqu'à l'obtention d'une masse de 16 cellules appelée morula (Lee et DeMayo 2004). Ces divisions mitotiques se déroulent pendant que le zygote est transporté vers la cavité utérine. Chez la rate, le stade de morula est atteint au troisième jour de gestation (Thibault et Levasseur 2001) et c'est à ce moment que le zygote fait son apparition dans la lumière utérine. Le zygote subit plusieurs autres divisions mitotiques et se transforme en une sphère creuse qui porte le nom de blastocyte. Ce dernier est composé d'une couche de cellules externes appelée trophoblaste, qui deviendra par la suite le placenta, et d'une masse cellulaire interne, l'embryoblaste ou bouton embryonnaire qui formera éventuellement l'embryon (Marieb 1993, Tortora et Grabowski 1994, Lee et DeMayo 2004). Celui-ci s'implante dans la paroi utérine au stade de blastocyste seulement suite à la perte de la zone pellucide qui survient vers le cinquième jour de gestation.

L'implantation de l'embryon dans la paroi utérine est une étape cruciale pour la reproduction des mammifères. Elle est le résultat d'une suite d'interactions complexes débutant avec la fixation du blastocyste à l'intérieur de l'utérus et finissant avec la formation du placenta. L'implantation se déroule selon une succession d'étapes caractérisées par le degré de contact entre les cellules épithéliales utérines et trophoblastiques : (a) la perte de la membrane pellucide, (b) l'orientation du blastocyste, (c) l'apposition, (d) l'adhésion et (e) l'invasion de l'endomètre (Figure 1.8)

Au début de la gestation, la lumière utérine, de forme irrégulière retrouvée chez les rates non-gestantes, est modifiée; des cavités se forment au niveau de l'épithélium selon une orientation méso-antimésométriale (Abrahamsohn et Zorn 1993). Une fois arrivé dans l'utérus, les blastocystes se positionnent le long des cornes utérines selon les contractions du myomètre qui permettent l'espacement des divers sites d'implantation. Chez la rate, l'implantation est dite excentrée, c'est-à-dire qu'il y a formation d'une chambre d'implantation enfermant le blastocyste, et antimésométriale, c'est-à-dire que le disque embryonnaire est situé à l'opposé du site d'implantation (Thibault et Levasseur 2001; Abrahamsohn et Zorn 1993).

Pour que l'implantation réussisse, le blastocyste doit avoir atteint un stade précis de développement. La perte de la zone pellucide est probablement la dernière étape avant le début de l'implantation (Abrahamsohn et Zorn 1993). Chez l'homme et les rongeurs, l'élimination de la zone pellucide qui se produit par protéolyse permet un contact direct entre les cellules trophoblastiques et l'épithélium utérin. Il est à noter que seuls les blastocystes ne possédant plus leur zone pellucide pourront s'implanter. La perte de la membrane pellucide et l'implantation ont lieu la même journée, vers le cinquième jour de gestation. Les premiers contacts entre les deux types cellulaires (trophoblastiques et utérins) constituent la phase d'apposition. Au cours de cette phase, les contacts cellulaires sont assurés par l'interdigitation des microvillosités ou l'apposition des deux épithéliums. La phase d'adhésion est en fait la continuité de



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

FIGURE 1.8

Les différentes étapes de la gestation (Thibault et Levasseur 2001).

l'apposition. À ce moment, l'interdigitation des microvillosités des membranes plasmiques des deux épithéliums devient plus étroite. Il est alors impossible de déplacer les embryons sans causer de dommages aux tissus (Thibault et Levasseur 2001). Il est bien établi que l'adhésion de l'embryon et la poursuite de la gestation dépendent d'une élévation subite de la sécrétion d'œstrogène qui agit sur l'endomètre préparé par la progestérone (Finn et Martin 1970, 1972; Glasser et Clark 1975). L'absence de cette élévation, qui se produit durant la lactation ou suite à une ovariectomie, entraîne un état d'implantation différée. Dans ce cas, le développement de l'embryon s'arrête au stade de l'apposition (Abrahamsohn et Zorn 1993).

Suite à l'adhésion, le trophoblaste pénètre plus ou moins profondément dans l'endomètre utérin selon les espèces. Chez la rate, l'invasion de l'endomètre est maximale et on y observe une érosion de l'endothélium vasculaire, caractéristique d'un placenta de type hémochorial. De plus, elle est limitée à la partie du trophoblaste qui participera à la formation du placenta. L'invasion de l'endomètre par le blastocyste se fait par déplacement ou substitution (Schlafke et Enders 1975, Thibault et Levasseur 2001); une fois au contact de la membrane basale, le trophoblaste émet des prolongements cytoplasmiques qui facilitent le décollement des cellules épithéliales, qui meurent par apoptose, ou mort cellulaire programmée (voir section 1.9), avant d'être phagocytées, (Pampfer et al 1999, Thibault et Levasseur 2001) laissant ainsi un espace pour l'embryon qui s'implante. Au moment de l'invasion, les cellules stromales se trouvant sous l'épithélium ont été transformées en cellules déciduales (Abrahamsohn et Zorn 1993) (voir section 1.8). Les cellules trophoblastiques pénètrent entre les cellules déciduales et forment une couche étroite non-vascularisée autour de l'embryon appelée la décidue primaire. Ces cellules pénètrent ensuite entre les cellules endothéliales et en remplacent quelques-unes créant ainsi un réseau à l'intérieur duquel circule le sang maternel (Welsh et Enders 1987) permettant ainsi les échanges nécessaires au développement de l'embryon. Ce processus, appelé décidualisation, sera l'objet de discussion de la section suivante.

1.8 La décidualisation

L'implantation du blastocyste dans la paroi utérine implique des remaniements profonds de l'endomètre dont une modification de la forme, de l'organisation et du métabolisme des cellules stromales formant un tissu tout à fait distinct, le tissu décidual également appelé la décidue. Sous l'action d'un stimulus utérin (embryonnaire ou artificiel), les cellules stromales prolifèrent et se différencient en cellules déciduales (Figure 1.9) afin de former, autour du site d'implantation de l'embryon, la décidue primaire. Chez la rate, la décidualisation comporte des caractéristiques importantes : (a) les cellules stromales doivent avoir été préparées adéquatement par les hormones ovariennes, (2) la décidualisation survient seulement au site d'implantation de l'embryon (les régions de l'endomètre entre les embryons ne subissent pas la décidualisation), (c) elle survient à un moment très précis de la gestation et (d) elle peut être induite de façon artificielle en absence d'embryon à l'aide d'une suite d'injections d'hormones stéroïdiennes (E_2 et P_4) résultant à la formation d'un tissu similaire à la décidue (discuté à la section 1.8.2) (Abrahamsohn et Zorn 1993).

La décidue primaire, formée suite à la décidualisation des cellules stromales fibroblastiques, est entourée d'une région de cellules complètement transformées, les cellules déciduales matures. Entre les cellules stromales fibroblastiques et les cellules déciduales matures se trouve une couche de cellules possédant une morphologie intermédiaire à ces deux types cellulaires, que l'on nomme cellules pré-déciduales. Ces dernières sont entourées de fibroblastes, ou plus précisément de cellules stromales indifférenciées, adjacentes au myomètre et forment le stroma non-décidualisé du site d'implantation. Il a été démontré que ces cellules stromales résistent à la régression déciduale (Kleinfeld et O'Shea 1983) et servent à la repopulation de l'endomètre suite à la parturition (Abrahamsohn et Zorn 1993). Les cellules déciduales, retrouvées pendant la gestation, représentent une population de cellules endométriales uniques et

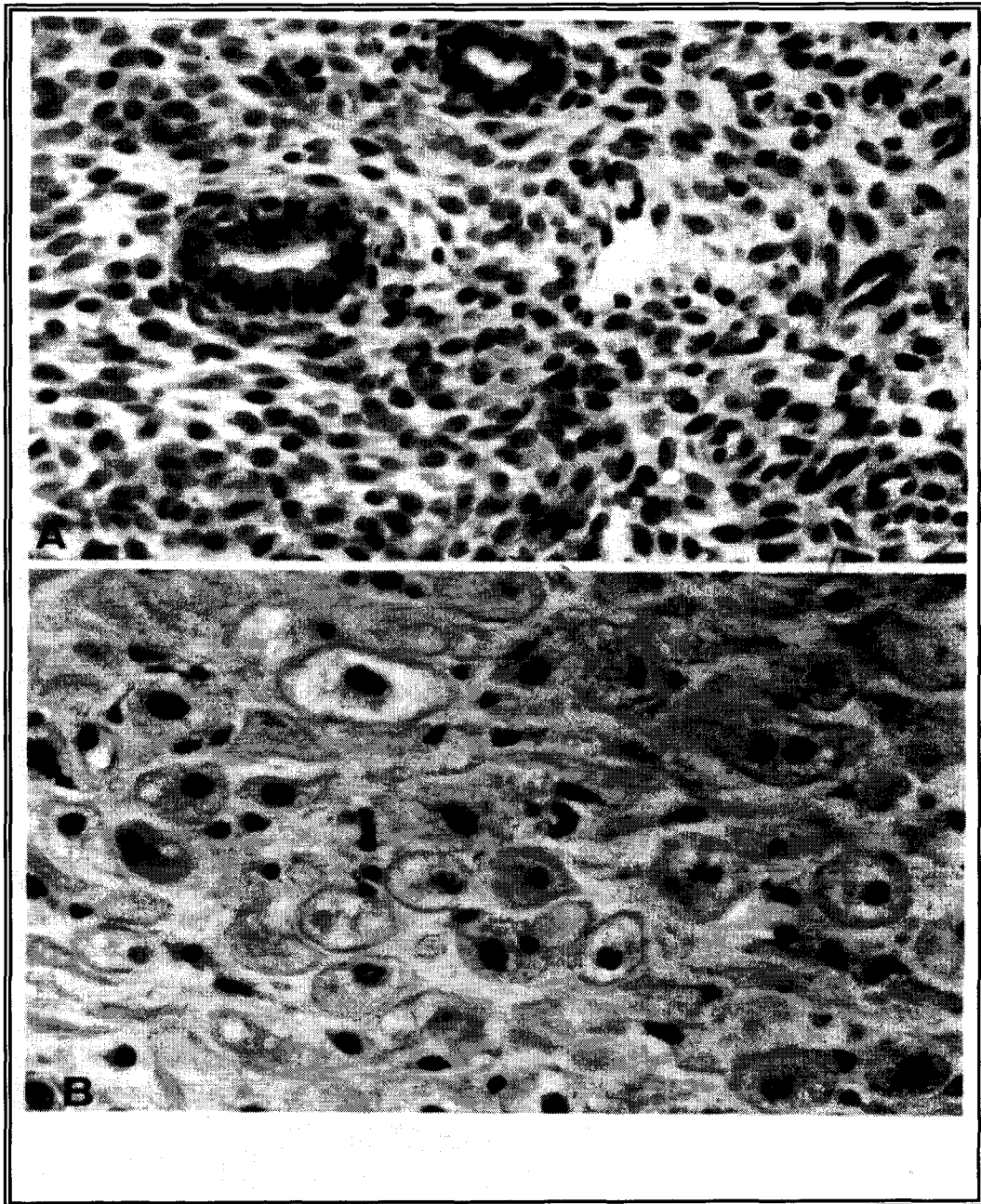


FIGURE 1.9 (A) Les cellules stromales de l'endomètre utérin humain, (B) les cellules déciduales suite à la décidualisation. (Thibault et Levasseur 2001).

morphologiquement distinctes puisqu'elles ont la faculté de proliférer, de se différencier et de mourir dans un intervalle de temps bien spécifique (Tarachand 1985). La morphologie des cellules déciduales est caractérisée par leur forme polyédrique et par la présence d'un grand noyau pouvant contenir jusqu'à deux nucléoles proéminents. Le cytoplasme de ces cellules contient un grand nombre (a) de réticulum endoplasmique rugueux, (b) d'appareils de golgi, (c) de mitochondries, (d) de filaments intermédiaires et (e) une accumulation de glycogène et de gouttelettes lipidiques. De plus, les cellules déciduales sont en contact entre elles grâce à la formation de jonctions serrées et de jonctions communicantes qui diminuent l'espace intercellulaire (Tarachand 1985, 1986, Abrahamsohn et Zorn 1993 Knobil et Neill 1994).

Plusieurs fonctions ont été suggérées pour les cellules déciduales et pour la décidue. Tout d'abord, les cellules déciduales sont nécessaires à la nutrition de l'embryon. Elles sont riches en glycogène, ce qui procure une excellente source d'hydrates de carbone pour l'embryon en développement. La décidue est également nécessaire à la production de facteurs tel que le IGFBP-1 permettant l'invasion du trophoblaste. D'autres rôles leur ont été attribués dont: (a) la protection des tissus maternels contre l'invasion excessif du trophoblaste et (b) la protection de l'embryon contre les microorganismes et les cellules immunitaires maternelles dont les lymphocytes T (Tarachand 1985, Abrahamsohn et Zorn 1993, Duc-Goiran et al 1999, King 2000, Fazleabas et Strakova 2002).

Tout au long de la gestation, on observe autour du site d'implantation un gonflement de l'utérus causé par une hypertrophie et une prolifération des cellules déciduales déjà présentes et par l'addition de nouvelles cellules déciduales suite à la prolifération et la différenciation des cellules stromales (hyperplasie). Cependant, l'embryon qui grossit nécessite de plus en plus d'espace afin de poursuivre son développement. Les cellules déciduales doivent alors mourir par apoptose afin de libérer l'espace requis par l'embryon, un processus nommé régression déciduale.

1.8.1 La régression déciduale

La régression déciduale est un processus apoptotique observé en fin de gestation. Autour du 14^e jour de gestation, les cellules déciduales meurent par apoptose (Shooner et al 2005) puis sont ensuite phagocytées par les cellules trophoblastiques géantes afin de libérer plus d'espace pour la croissance de l'embryon. La mort graduelle des cellules déciduales permet donc de contrôler l'invasion de l'endomètre utérin par le trophoblaste (Abrahamsohn et Zorn 1993, Gu et al 1994, Moulton 1994). Cependant, les mécanismes exacts impliqués dans la régression des cellules déciduales sont mal connus.

La régression déciduale est une étape cruciale de la gestation impliquant un nombre important de facteurs dont la protéine de survie cellulaire Akt et les isoformes du TGF- β . L'augmentation de l'expression des trois isoformes du TGF- β au moment de la régression déciduale et l'augmentation de l'apoptose induite par le TGF- β 1 dans les cellules déciduales en culture révèlent que les TGF- β jouent un rôle important dans la régression de la décidue (Shooner et al 2005). De plus, puisque l'activité de Akt diminue au 14^e jour de gestation (Fréchette-Frigon et al, Résultats non-publiés) ainsi que dans le processus apoptotique des cellules déciduales en culture (Shooner et al 2005), il est possible qu'il y ait une interaction entre la voie de survie cellulaire de la PI3-K/Akt et celle du TGF- β conduisant à l'apoptose des cellules déciduales et permettant du même coup la régression du tissu décidual.

1.8.2 Induction de la décidualisation (pseudogestation)

La transformation des cellules stromales en cellules déciduales survient normalement, pendant la gestation, lorsque le blastocyste débute son implantation dans la paroi utérine. Il est possible d'induire la décidualisation des cellules stromales de

l'endomètre de la rate à l'aide d'injections successives d'hormones stéroïdiennes (estrogène et progestérone) (Sananès et al 1978) afin de reproduire les conditions hormonales *in vivo*, sans fécondation, donc sans embryon. Des concentrations d'œstrogène de 0.1 à 0.3 µg et de progestérone de 1 à 4 mg sur une période de 9 jours suffisent à induire la pseudogestation. Cette pseudogestation permet d'étudier les mécanismes de signalisation intracellulaire spécifique à l'endomètre utérin. Ainsi, avec ce model *in vivo*, nous sommes en mesure de vérifier que la présence et l'expression de certains facteurs de croissance, dont le TGF-β, dans l'endomètre utérin sont indépendante de l'embryon ou des signaux embryonnaires.

1.8.3 Culture cellulaire

Durant la gestation, de nombreux signaux tant maternels qu'embryonnaires interagissent afin d'assurer le développement normal de l'embryon. Il devient alors difficile de distinguer l'origine de certaines molécules (embryonnaires ou maternelles) ou de certains signaux et de déterminer leurs effets spécifiques sur les cellules. La culture cellulaire est donc une technique qui nous permet d'étudier les effets spécifiques de certains facteurs sans la présence de signaux embryonnaires. Il est bien établi que plusieurs facteurs de croissance tels que les PDGF (platelet-derived growth factor), EPF (Early pregnancy factor), EGF (epidermal growth factor), PIF (Preimplantation factor) et TGF-β1, 2, 3 sont sécrétés par l'endomètre utérin et par l'embryon (Dey 1996, Edwards 1995, Duc-Goiran et al 1998.). Ainsi, l'utilisation de notre modèle *in vitro*, la culture de cellules déciduales, nous permet d'étudier les effets d'un traitement au TGF-β sur la survie de ces cellules et de déterminer les interactions entre la voie de survie cellulaire de la PI3-K/Akt et celle du TGF-β mais sans l'interférence des signaux embryonnaires. Pour ce faire, des rates Sprague-Dawley sont ovariectomisées et suite à un repos d'au moins 10 jours, elles subissent une série d'injections de E₂ et de P₄ selon un protocole très rigoureux (Shooner et al 2005) afin d'induire *in vivo* la décidualisation des cellules stromales. Chez la rate, la décidualisation survient suite à un stimulus utérin soit

embryonnaire ou artificiel (voir section 1.8). Les rates sont ensuite euthanasiées et les cornes utérines sont prélevées pour la culture cellulaire primaire. Lorsque la confluence des cellules est atteinte, nous pouvons effectuer les traitements au TGF- β pour une période de 24 heures. Les cellules sont finalement récoltées et les protéines extraites pour des analyses ultérieures.

1.9 L'apoptose

La balance entre la prolifération et la mort cellulaire est une caractéristique importante de plusieurs processus physiologiques. Cet équilibre est particulièrement important dans l'homéostasie des tissus permettant de contrôler le nombre de cellules présentes à l'intérieur d'un tissu. Le renouvellement cellulaire à l'intérieur des tissus résulte de la division des cellules (mitose ou prolifération cellulaire) et de leur mort. De plus, les cellules s'autodétruisent lorsqu'elles deviennent endommagées, incapables de fonctionner correctement ou encore inutiles. Les cellules possèdent donc la capacité de se détruire elles-mêmes par une forme de mort cellulaire appelée apoptose (Lea et al 1999).

L'apoptose est un processus primordial dans le développement normal et dans la régulation de l'homéostasie cellulaire des organismes. Il répond à deux fonctions majeures : (a) antagoniste de la mitose afin de contrôler l'élimination des cellules devenues inutiles pour l'organisme et (b) système de défense de l'organisme contre les maladies afin d'éliminer les cellules endommagées (Bursch et al. 2000). Ainsi, plusieurs situations nécessitent l'apoptose. Le développement embryonnaire en est un exemple. Lors de l'implantation de l'embryon, les cellules épithéliales entrent en apoptose afin de permettre à l'embryon de s'implanter dans la paroi utérine (Abrahamsohn et Zorn 1993, Pampfer et Donnay 1999). Par la suite, les cellules stromales qui ont proliféré et qui se sont différenciées en cellules déciduales subiront également l'apoptose (régression

déciduale) afin de permettre à l'embryon de poursuivre son développement dans la paroi utérine (Gu et al 1994, Joswig et al 2003). Nous avons démontré que l'apoptose est induite dans les cellules stromales déciduales suite à des traitements au TGF- β 1 (Shooner et al 2005). Il a également été observé durant le cycle oestral de la souris (Dharma et al. 2001) et de la rate (Sato et al 1997) que les cellules endométriales meurent par apoptose au moment de l'oestrus permettant la reconstruction de l'endomètre utérin. De plus, l'apoptose ne survient pas seulement durant le développement embryonnaire mais joue aussi un rôle dans le maintien de la balance cellulaire dans les tissus comme l'intestin (Merrit et al 1994), dans l'involution du thymus (Cohen et Duke 1994) et de la glande mammaire (Lund et al 1996) et dans la régulation du système immunitaire (Mitra et al 1996).

L'apoptose est un mécanisme de mort cellulaire programmée par lequel des cellules individuelles meurent et sont ensuite retirées du tissu sans qu'il y ait de réponse inflammatoire. Cette mort programmée peut être induite de deux façons : (a) par la présence d'un signal pro-apoptotique ou (b) par l'absence de signaux de survie cellulaire (Geske et al 2001).

Au cours des 150 dernières années, la mort cellulaire a été décrite dans plusieurs processus physiologiques et pathologiques chez les organismes multicellulaires (Bursch et al. 2000). En 1863, Weismann observe une perte cellulaire pendant le développement embryonnaire des diptères qu'il nomma histolyse (Rango et al 1998). Ensuite, en 1871, Virchow décrivit deux types différents de mort cellulaire soit la nécrose et la nécrobiose. Par la suite, Glucksmann (1951) et Sanders (1966) ont observé un type de mort cellulaire pendant le développement normal des mammifères, des vertébrés et de certains invertébrés (Gerschenson et Rotello 1992). Au début des années 1970, Farber et ses collègues ont décrit, sur la base de la morphologie caractéristique de la mort cellulaire, une forme de suicide cellulaire survenant à l'intérieur du foie, des intestins et de plusieurs autres organes suite à des traitements avec des molécules cytotoxiques anti-

cancéreuses. Ce n'est qu'en 1972 que la mort cellulaire programmée a été finalement reconnue par Kerr, Wyllie et Currie qui ont proposé une classification de la mort cellulaire en deux catégories très distinctes, la nécrose et l'apoptose. Le terme nécrose, qui était utilisé pour tous les types de mort cellulaire, a été restreint à la mort des cellules causée par des perturbations environnementales. Par contre, le terme apoptose, un ancien mot Grec signifiant la chute des feuilles d'un arbre (Lodish et al 2000), permis de décrire une mort cellulaire jouant un rôle complémentaire mais opposé à la mitose dans la régulation des populations cellulaires animales (Bursch et al. 2000).

1.9.1 Caractéristiques biochimiques et morphologiques

La mort cellulaire n'est pas nécessairement un synonyme d'apoptose. Il est donc important de bien différencier la nécrose et l'apoptose. La nécrose est un phénomène de mort cellulaire accidentelle non-spécifique et désordonnée où les cellules sont détruites suite à un traumatisme, souvent causé par de très forte concentration d'agent toxique. La nécrose est caractérisée par un gonflement cellulaire, la dégradation des organelles, un gonflement des mitochondries et la perte de l'intégrité de la membrane plasmique qui entraîne le déversement des composantes intracellulaires dans le tissu environnant et qui provoque l'inflammation. La nécrose, qualifiée de passive, est une conséquence d'une condition physiopathologique comme une infection, une ischémie ou encore, l'inflammation. Ce dérèglement de la physiologie normale est essentiel au maintien de l'homéostasie cellulaire (Darzynkiewicz et al 1992, Okada et Mak 2004).

Contrairement à la nécrose, l'apoptose est un mécanisme de mort cellulaire ordonné, programmé et régulé. Ce type de mort cellulaire programmée est caractérisé par une séquence bien définie de changements biochimiques et morphologiques (Figure 1.10). Tout d'abord, les premières manifestations morphologiques observées consistent en une condensation de la chromatine et du cytoplasme, ainsi qu'une diminution du

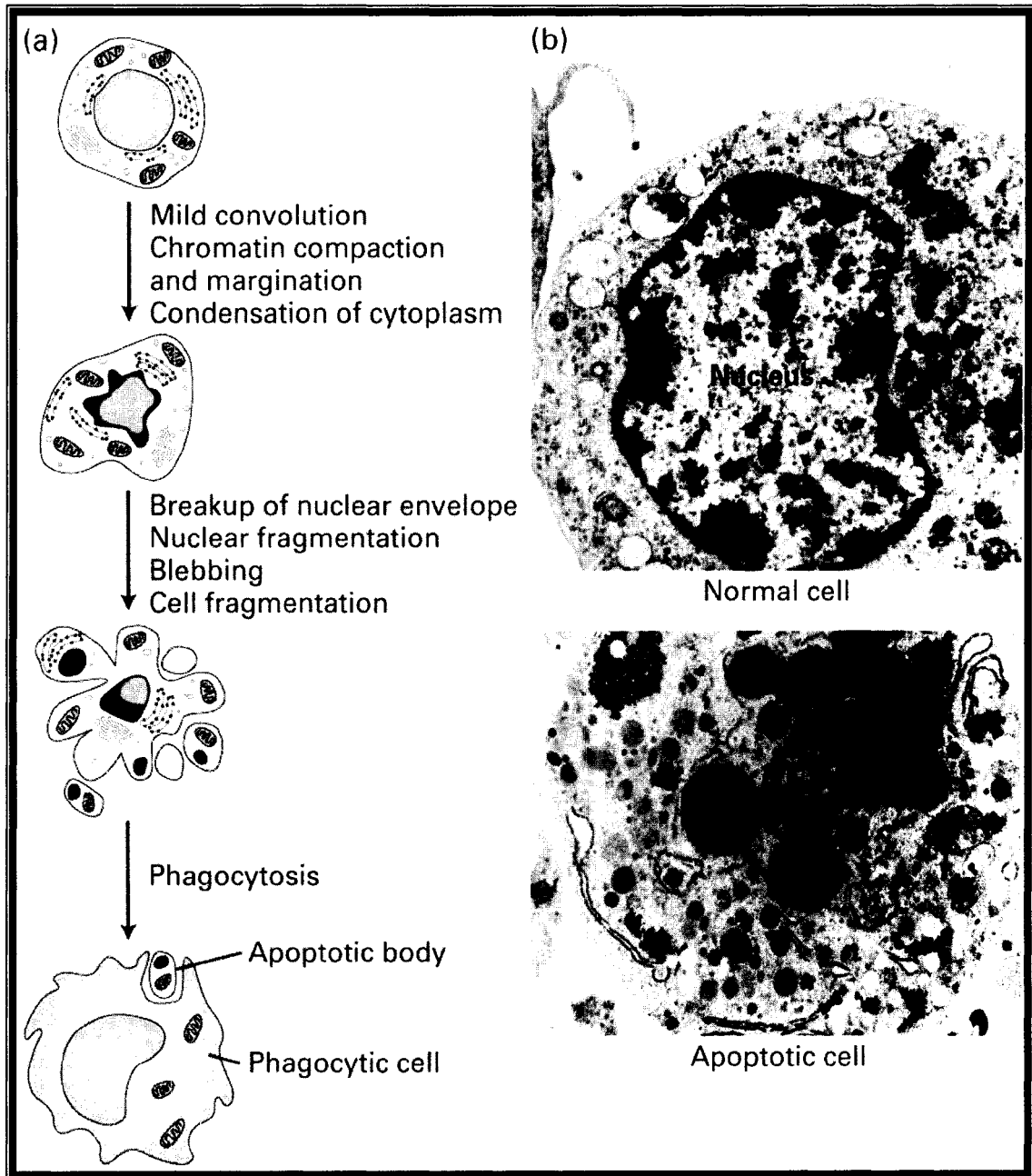


FIGURE 1.10(A) Schéma montrant les différents changements morphologiques d'une cellule en apoptose, **(B)** comparaison entre une cellule normale et une cellule apoptotique (Lodish et al. 2004).

volume cellulaire. Le noyau se fragmente par la suite en petits fragments entourés d'une membrane de phospholipides formant des vésicules appelées corps apoptotiques (Lodish et al 2000, Okada et Mak 2004). La fragmentation de l'ADN est une importante caractéristique biochimique de l'apoptose. Elle résulte de l'action des endonucléases qui permettent la coupure du double brin d'ADN dans les régions situées entre les nucléosomes créant ainsi de petits fragments d'ADN d'environ 180 à 200 paires de bases. Ces petits fragments d'ADN caractéristique de l'apoptose peuvent être visualisés sur un gel d'agarose où ils apparaissent selon un patron spécifique (échelle d'ADN) alors que pendant la nécrose, les fragments d'ADN sont produits de façon aléatoire et apparaissent comme un sillon continu et non-défini sur le gel d'électrophorèse (Gerschenson et Rotello 1992). Les corps apoptotiques, formés de composantes nucléaires et d'organites cytoplasmiques intacts, sont phagocytés par les cellules avoisinantes et par les macrophages prévenant ainsi toute réaction inflammatoire (Rango et al 1998, Lodish et al 2000).

1.9.2 Signalisation et caspases

La régulation de l'apoptose est un phénomène très complexe impliquant un grand nombre de molécules. Il existe deux voies de signalisation par lesquelles l'apoptose peut être induite : la voie intrinsèque et extrinsèque. La voie de signalisation intrinsèque implique la mitochondrie. Suite à un stimulus apoptotique, plusieurs protéines sont relâchées à l'intérieur du cytoplasme à partir de la mitochondrie dont le cytochrome c et Smac/DIABLO (second mitochondria-derived activator). Une fois dans le cytoplasme, le cytochrome c se lie à la protéine Apaf-1 (apoptotic protease activating factor 1) qui subit un changement de conformation permettant, suite à la liaison de la pro-caspase-9 et d'ATP (adénosine triphosphate), la formation d'un complexe oligomérique appelé apoptosome. La caspase-9 activée procède ensuite à l'activation de caspases effectrices dont la caspase-7 et la caspase-3 qui mène au processus apoptotique (Zhou et al 2000, Shiozaki et Shi 2004) (Figure 1.11).

Les caspases (cysteine aspartic acid-specific proteases) sont les principaux exécuteurs de l'apoptose. Ces protéines sont synthétisées sous forme de pro-enzymes inactives appelées pro-caspases et sont activées suite à un clivage au niveau d'un résidu aspartate (Asp). Les caspases sont divisées en trois classes distinctes : (a) interleukin-1 β -converting enzyme (ICE)-like, (b) les caspases initiatrices et (c) les caspases effectrices. Les caspases initiatrices regroupent les caspases-2, -8, -9 et -10. Elles sont activées suite à un signal pro-apoptotique et ont pour but de cliver et d'activer les caspases effectrices. Ces dernières regroupent les caspases-3, -7 et -9. Lorsqu'elles sont activées, ces caspases sont responsables du déclenchement de l'apoptose par le clivage de plusieurs protéines nécessaire au maintien de l'intégrité de la cellule dont l'enzyme nucléaire PARP (poly(ADP-ribose) polymerase) qui est impliquée dans la réparation de l'ADN (Cohen 1997, Shiozaki et Shi 2004). Dans plusieurs cellules, l'activation des caspases est amplifiée par la libération de molécules mitochondriales dont le cytochrome c qui active l'apoptosome (Esposti 2004).

1.10 Le Transforming Growth Factor- β

Durant la reproduction, plusieurs molécules dont les cytokines, les facteurs de croissance et les hormones jouent un rôle important dans la communication fœto-maternelle (Duc-Goiran et al 1999, Dey et al 2004) afin de permettre l'établissement de la gestation et le bon déroulement du développement embryonnaire. Le Transforming growth factor- β est l'un de ces facteurs de croissance. Les premiers membres de la grande famille des Transforming growth factor- β ont été identifiés à partir de leur habileté à induire une transformation du phénotype de certaines cellules fibroblastiques en culture (Roberts et al 1978, Moses et al 1981). Les TGF- β sont des polypeptides multifonctionnels impliqués dans plusieurs processus biologiques dont la prolifération et la différenciation cellulaire, l'angiogenèse, la formation de la matrice extracellulaire, la motilité cellulaire, le remodelage des tissus et dans certaines fonctions immunitaires (Massague 1990, 1998, Barnard et al 1990, Attisano et al 1994). Ils sont également

connus en tant qu'inhibiteurs de la croissance cellulaire ou de facteurs pro-apoptotiques (Hu et al 1998, Sánchez-Capelo 2005). Il existe au total cinq isoformes du TGF- β dont seulement trois sont exprimés chez les mammifères et leurs poids moléculaires sont légèrement différents : TGF- β 1 (15 kDa), TGF- β 2 (12,5 kDa) et TGF- β 3 (12 kDa). Ces trois isoformes présentent une homologie d'environ 80% entre leurs séquences d'acides aminés et sont localisés sur trois chromosomes différents : les chromosomes 19, 1 et 14 chez l'humain pour les TGF- β 1, TGF- β 2 et TGF- β 3 respectivement (Massague 1990, Barnard et al 1990, Govinden et Bhoola 2003). Les TGF- β s sont d'abord sécrétés sous une forme latente inactive qui requiert une maturation/activation pour se fixer au récepteur et induire une réponse cellulaire (Lutz et Knaus 2002). De plus, les isoformes du TGF- β sont très conservés d'une espèce à l'autre laissant croire qu'ils possèdent d'importantes fonctions régulatrices propres à chacun (Yingling et al 1995).

Des études antérieures ont démontré que les trois isoformes du TGF- β sont exprimés différemment durant l'embryogenèse (Pelton et al 1991, Attisano et al 1994), dans l'utérus de la souris (Das et al 1992) et à l'interface foeto-maternelle chez le porc (Gupta et al 1998, 1998a) et le bovin (Munson et al 1996). Une étude récente dans notre laboratoire a également révélé que les TGF- β s sont régulés différemment dans l'endomètre utérin de la rate pendant la gestation (Shooner et al 2005). En effet, les TGF- β 1 et TGF- β 2 sont exprimés à la fois au début et à la fin de la gestation alors que le TGF- β 3 est absent en début de gestation. De plus, durant la gestation tardive, le TGF- β 1 est exprimé principalement dans les cellules stromales de l'endomètre alors que le TGF- β 2 est plutôt localisé dans les cellules épithéliales.

1.10.1 Activation et liaison du TGF- β à son récepteur

Le TGF- β est sécrété sous la forme d'un précurseur latent inactif qui doit être activé pour être en mesure d'induire un effet biologique. Le précurseur inactif est composé d'un peptide signal de sécrétion dans sa région N-terminale, d'un peptide central contenant de 50 à 375 acides aminés appelé LAP (Latency-Associated Peptide) qui confère la latence du complexe et d'un domaine C-terminal mature constituant la forme active du TGF- β . Cependant, ce domaine mature ne peut être reconnu par les récepteurs cellulaires dû à la présence du peptide LAP (Lodish et al 2000, Massague 2000, Javelaud et Mauviel 2003). Suite à sa sécrétion, le précurseur inactif est clivé au niveau de l'appareil de Golgi dans la cellule libérant le TGF- β mature du propeptide N-terminal latent. La forme biologiquement active du TGF- β est constituée de deux monomères identiques liés par des ponts disulfures (Barnard et al 1990). Une fois activé, le ligand induit une réponse cellulaire en se fixant à des récepteurs transmembranaires spécifiques ayant une activité de type sérine/thréonine kinase. Cette famille de récepteurs au TGF- β est constituée de deux sous-familles similaires du point de vue structural, les récepteurs de type I et de type II (T β RI et T β RII) (Javelaud et Mauviel, 2004).

La signalisation intracellulaire débute avec la liaison du TGF- β avec le récepteur de type II (Figure 1.12). Suite à la liaison avec le TGF- β , le récepteur de type II recrute le récepteur de type I formant ainsi un complexe hétéromérique. Le récepteur de type II possède une activité kinase intrinsèque, donc actif de façon constitutive, alors que le récepteur de type I est activé par la phosphorylation de résidus sérines et thréonines dans une région appelée domaine GS. Ce domaine, riche en glycine et en sérine, est voisin du domaine kinase du T β RI et contrôle son activité catalytique et la spécificité de ses substrats. Une fois activé, suite à sa phosphorylation, le T β RI permet la transduction du signal des récepteurs jusqu'au noyau par la phosphorylation d'une famille de protéines

conservées au cours de l'évolution, les protéines Smads (Schuster et Krieglstein 2002, Lutz et Knaus 2002, Javelaud et Mauviel 2004).

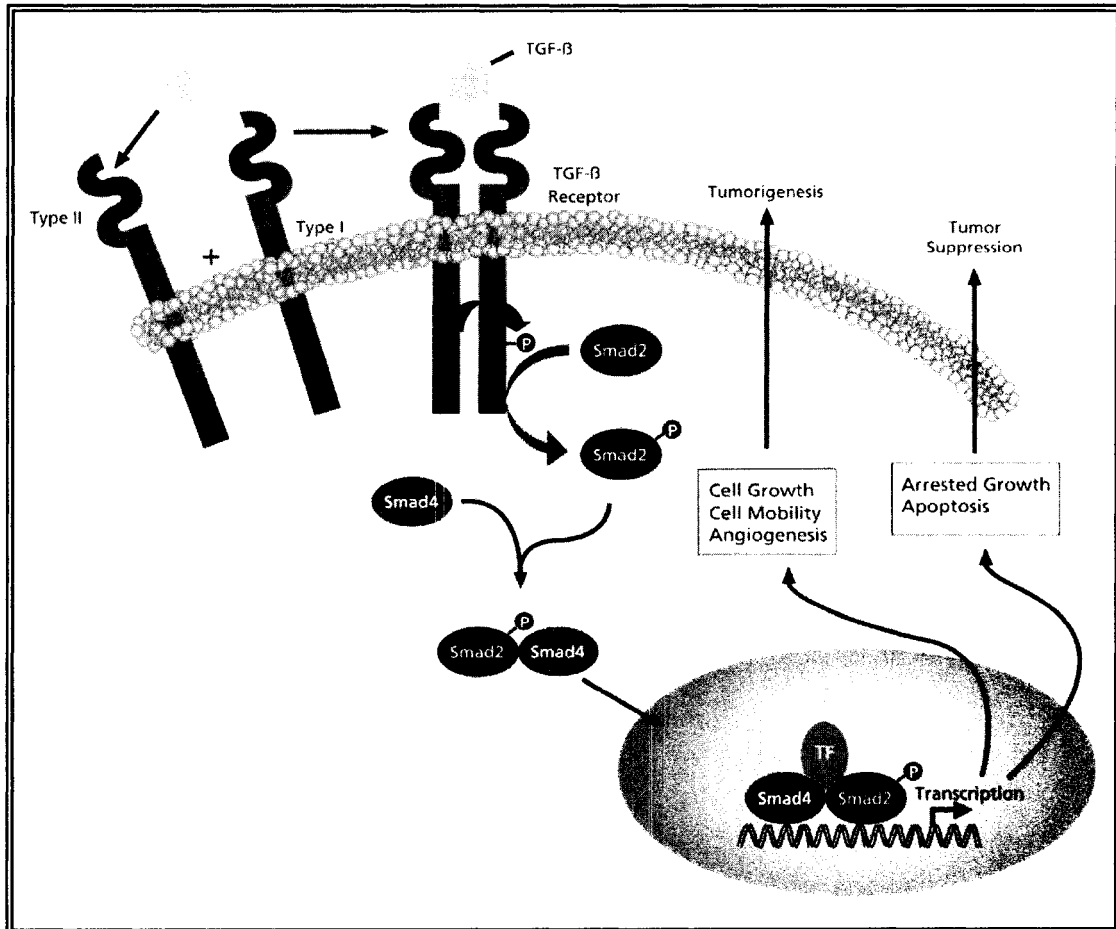


FIGURE 1.12 Schéma de la voie de signalisation intracellulaire du transforming growth factor-β (Schéma obtenu de Cell Signaling Technology).

1.10.2 La signalisation intracellulaire du TGF- β et les protéines Smads

Les protéines Smads sont les médiateurs intracellulaires de la voie de signalisation du TGF- β . Leur principale fonction est de transmettre le signal induit par le TGF- β du cytoplasme vers l'intérieur du noyau afin de produire une réponse biologique. Cette famille de protéines est divisée en trois groupes fonctionnels différents : (a) les R-Smads (receptor-activated Smads), incluant Smad2 et Smad3, interagissent directement et de façon spécifique avec le T β RI (b) le Co-Smad (common mediator Smad), représenté par Smad4 qui est le médiateur commun pour tous les TGF- β s, et (c) les I-Smads (inhibitory Smads) qui comprennent Smad6 et Smad7, s'associent avec le T β RI et préviennent l'activation des R-Smads par le récepteur (Lutz et Knaus 2002, Javelaud et Mauviel 2004). De plus, Smad6 peut interagir avec les R-Smads et interférer dans la formation d'un complexe avec Smad4 (Imamura et al 1997). Les protéines Smads sont caractérisées par la présence de deux domaines conservés, les domaines d'homologie à Mad (MH1 et MH2) reliés par une région intermédiaire riche en proline. Le domaine MH1 est présent dans la région aminoterminal et est très conservé entre les R-Smads et les Co-Smads. Il permet de réguler l'importation nucléaire et la transcription par sa liaison à l'ADN ainsi que son interaction avec les protéines nucléaires. Le domaine MH2, situé dans la région carboxyterminale, est hautement conservé entre tous les Smads. Il régule l'oligomérisation des Smads, la reconnaissance par le récepteur de type I et interagit avec les adaptateurs cytoplasmiques et plusieurs facteurs de transcription (Moustakas et al 2001, Miyazawa et al 2002).

En réponse au TGF- β , le T β RI phosphoryle Smad2 et Smad3 sur deux résidus sérines situés à l'extrémité C-terminale du domaine MH2. Les R-Smads sont retenus au niveau de la membrane plasmique par la protéine SARA (Smad-Anchored for Receptor Activation) qui les présente au récepteur. Suite à la phosphorylation/activation par le récepteur, les R-Smads s'associent avec Smad4 pour former un complexe oligomérique (Smad2/Smad3/Smad4) qui est ensuite transporté à l'intérieur du noyau afin de réguler

la transcription de gènes cibles (Lutz et Knaus 2002, Ten Dijke et al 2002, Javelaud et Mauviel 2004). Smad4 est importé à l'intérieur du noyau uniquement lorsqu'il est associé aux R-Smads, alors que Smad2 et Smad3 peuvent être importés à l'intérieur du noyau de façon indépendante de Smad4. Par contre, en l'absence de Smad4, Smad2 et Smad3 ne possèdent pas d'activité transcriptionnelle, suggérant que le rôle de Smad4 est de réguler la transcription plutôt que de permettre la transduction des signaux du cytoplasme jusqu'au noyau (Fink et al 2003, Javelaud et Mauviel 2004). Une fois à l'intérieur du noyau, le complexe R-Smads-Co-Smad s'associe avec des protéines se liant à l'ADN de la famille Fast et active la transcription. De plus, les R-Smads et le Co-Smad peuvent se lier à des co-activateurs ou des co-répresseurs transcriptionnels qui induisent respectivement l'acétylation et la déacétylation des histones et ainsi, jouent un rôle très important dans la régulation de la transcription (Massague 2000a, Miyazawa et al 2002, Javelaud et Mauviel 2004).

La perte de l'inhibition de la croissance cellulaire médiée par le TGF- β contribue au développement et à la progression des tumeurs (Hu et al 1998, Hata et al 1998). En effet, il a été démontré que le TGF- β 3 augmente l'invasion des cellules cancéreuses endométriales (Van Themsche et al. 2006). Un taux élevé d'apoptose a été démontré pendant la régression déciduale. Une étude récente dans notre laboratoire révèle que l'expression du TGF- β est augmentée lors de l'implantation embryonnaire et de la régression déciduale. Également, il a été démontré que le TGF- β provoque l'apoptose des cellules stromales de l'endomètre utérin *in vitro* (Moulton 1994). Nous avons démontré dans notre laboratoire que le TGF- β 1 induit l'apoptose des cellules déciduales en culture (Shooner et al 2005). Ainsi, la présente étude est centrée sur cette capacité du TGF- β à induire l'apoptose des cellules endométriales chez la rate.

1.11 La voie de survie cellulaire de la PI3-K

La mort cellulaire programmée, ou apoptose, joue un rôle important dans le développement et l'homéostasie des tissus (Korsmeyer 1995, Steller 1995). Plusieurs facteurs de croissance et de cytokines envoient des signaux mitogéniques et anti-apoptotiques au niveau des cellules et ont ainsi une fonction importante dans le maintien de l'équilibre entre la survie et la mort cellulaire (Raff et al 1993). Bien que la voie de signalisation menant aux effets mitogéniques de ces facteurs est bien documentée, celle conduisant à l'inhibition de la mort cellulaire programmée des cellules est peu connue.

La phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-K) est un effecteur de signalisation intracellulaire permettant la transmission des signaux de survie cellulaire grâce à une interaction avec les récepteurs transmembranaires de plusieurs facteurs de croissance (Figure 1.11) (Rodriguez-Vicana et al 1994, 1996). Elle est formée d'une sous-unité régulatrice (p85) possédant deux domaines SH2 (SRC homology 2) et d'une sous-unité catalytique (p110) permettant la phosphorylation de la phosphatidylinositol 4,5 diphosphate (PIP₂) en phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate (PIP₃) (Kandel et Hay 1999). Les domaines SH2 permettent à la PI 3-K de se fixer sur ses récepteurs préalablement stimulés par des facteurs de croissance, ce qui entraîne sa translocation du cytoplasme vers la membrane plasmique (Vanhaesebroeck et Alessi 2000).

La liaison d'un facteur de croissance avec un récepteur de type tyrosine kinase (activité kinase intrinsèque) ou un récepteur couplé à une protéine G permet de recruter la PI 3-K au niveau de la surface interne de la membrane plasmique. Une fois localisé à la membrane, la sous-unité catalytique de la PI 3-K catalyse le transfert d'un phosphate à partir de l'ATP vers la position D-3 de l'anneau inositol des phosphoinositides. La phosphorylation des phosphoinositides permet de générer les produits lipidiques de la PI 3-K : (a) les phosphatidylinositol 3 phosphate (PIP), (b) les phosphatidylinositol 4,5

diphosphate (PIP₂) et (c) les phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate (PIP₃). Par la suite, la PIP₃ agit comme second messenger afin de réguler la cascade de signaux intracellulaires. La PIP₃ possède une grande affinité pour les PDKs (phosphoinositide dependent kinase), protéines responsables de la phosphorylation/activation de Akt. La protéine Akt/PKB est ensuite transloquée du cytoplasme à la membrane plasmique où elle sera activée par les PDKs (Datta et al 1999, Vanhaesebroeck et Alessi 2000).

Il existe deux inhibiteurs spécifiques de la PI 3-K : la Wortmannin et la LY294002 (Vlahos et al. 1994; Woscholski et al. 1994). Ces deux inhibiteurs entraînent une diminution de la phosphorylation/activation de la protéine Akt, ce qui révèle que l'activation de Akt est dépendante de la PI 3-K.

1.11.1 La protéine Akt/PKB/Rac

Akt est une protéine sérine/thréonine kinase de 60 kDa qui est l'homologue cellulaire du «transforming oncogene» du rétrovirus AKT8 causant le lymphome des cellules T des souris (Staal 1987). Aussi connue sous le nom de PKB ou Rac (related to A and C protein kinase) (Bellacosa et al 1991), Akt est une protéine cytosolique inactive qui est recrutée à la surface interne de la membrane plasmique par les sous-produits lipidiques de la PI3-K (PIP₃). Elle est activée suite à la phosphorylation de la thréonine 308 et de la sérine 473 par les PDKs en réponse à certains facteurs de croissance et de certaines cytokines (Andjelkovic et al 1997, Alessi et al 1996). Il existe chez les mammifères trois isoformes de la protéine Akt : Akt1, Akt2 et Akt3. Ces deux derniers isoformes possèdent respectivement 81% et 83% d'homologie avec Akt1 (Konishi et al 1995, Jones et al 1991). Les trois isoformes de Akt sont constitués d'un domaine PH (pleckstrin homology) à l'extrémité N-terminale, d'un domaine kinase central et d'un domaine régulateur hydrophobe et riche en proline à l'extrémité C-terminale. Le domaine kinase central possède une spécificité pour les résidus sérines et thréonines

dans les substrats protéiques (Coffer et Woodgett 1991, Bellacosa et al 1991) alors que le domaine PH permet les interactions lipides/protéines et protéines/protéines (Mayer et al 1993, Musacchio et al 1993). En effet, ce domaine PH interagit avec les produits lipidiques de la PI3-K, dont la PIP₂ et la PIP₃, au niveau de la membrane cellulaire permettant la translocation de la protéine Akt à la membrane afin d'être phosphorylée/activée par les PDKs (Andjelkovic et al. 1997, Hanada et al 2004). L'activation complète de la protéine Akt repose sur la phosphorylation de deux sites spécifiques : une dans le domaine kinase central (thréonine 308) et l'autre dans la région régulatrice C-terminale (sérine 473) (Vanhaesebroeck et Alessi 2000). En fait, Akt possède quatre sites de phosphorylations : la thréonine 308 et la sérine 473 qui sont les sites de phosphorylations spécifiques activés suite à un stimulus ainsi que la sérine 124 et la thréonine 450 qui sont constamment phosphorylées (Alessi et al 1996).

À la suite de son activation par les PDKs, la protéine Akt est relarguée à l'intérieur du cytoplasme permettant ainsi la transduction de signaux de survie cellulaire et d'inhibition de l'apoptose. Une fois dans le cytoplasme, Akt phosphoryle, entre autre, la protéine pro-apoptotique BAD (membre de la famille Bcl-2) sur la sérine 136 empêchant la formation d'un hétérodimère avec Bcl-xL, une protéine anti-apoptotique située au niveau de la membrane mitochondriale, et prévenant du même coup la libération du cytochrome c de la mitochondrie. Lorsque BAD est phosphorylée, elle s'associe immédiatement avec la protéine cytosolique 14-3-3 qui séquestre BAD et empêche sa déphosphorylation (Datta et al 1997). Cette séquestration prévient la liaison de BAD aux protéines Bcl-xL et Bcl-2 ainsi que leur activation, l'inhibition de la cascade des événements apoptotiques conduisant à la mort cellulaire et faisant intervenir la protéine Apaf-1 et les caspases (voir section 1.9.2).

L'activation de la protéine Akt permet également d'altérer l'activité de plusieurs autres facteurs apoptotiques dont NF- κ B et la caspase-9 (Khwaja 1999). Akt induit la phosphorylation de la pro-caspase-9 (forme inactive de la protéine) sur la sérine 196, ce

qui empêche le clivage de la protéine en sa forme active (caspase-9) par le cytochrome c. Cependant, la phosphorylation de la caspase-9 par Akt n'est pas observée chez la souris et le rat, ce qui indique qu'elle ne semble pas être conservée chez toutes les espèces (Hanada et al 2004, Vanhaesebroeck et Alessi 2000). D'un autre côté, la protéine Akt est une cible pour les caspases. En effet, nous avons démontré dans notre laboratoire que Akt est inhibée (clivée) par la forme active de la caspase-3 (caspase-3 clivée) (Asselin et al. 2001).

Plusieurs études sur la protéine Akt ont été menées par notre laboratoire. Nous avons démontré que durant le cycle oestral chez la rate, la forme phosphorylée de Akt (forme active) est exprimée tout au long du cycle de reproduction sauf lors de l'oestrus (Déry et al 2003), période pendant laquelle une grande proportion de cellules épithéliales sont en apoptose (Sato et al 1997). De plus, les estrogènes affectent la phosphorylation de Akt. En effet, nous avons démontré que la phosphorylation de Akt est fortement augmentée en présence d'estrogène (Déry et al 2003), une hormone induisant la prolifération cellulaire. Dans une étude plus récente, nous avons remarqué que la phosphorylation de Akt dans les cellules déciduales en culture diminue de façon dose-dépendante suite à des traitements au TGF- β 1, lequel induit également l'apoptose de ces mêmes cellules (Shooner et al 2005). L'ensemble de ces résultats indique que la voie de la PI3-K/Akt joue un rôle crucial dans la survie cellulaire afin de permettre l'homéostasie entre la mort et la survie des cellules endométriales chez la rate.

1.11.2 XIAP

XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein) est une protéine inhibitrice de l'apoptose de 53 kDa présente à l'intérieur du cytoplasme et faisant partie de la famille des IAPs (inhibitor of apoptosis proteins). Cette famille de protéines intracellulaires anti-apoptotiques a été identifiée pour la première fois chez les baculovirus (Crook et al

1993). Présentement, huit membres de la famille des IAPs ont été identifiés : XIAP, IAP1, IAP2, ILP2, NAIP (neuronal apoptosis inhibitory protein), BRUCE, survivin et livin (Kasof et al 2001, Schimmer et al. 2004). Les IAPs sont caractérisés par une séquence répétée de 70 acides aminés très conservée appelée domaine BIR (Baculoviral inhibitory repeat) qui est responsable, en grande partie, de l'action anti-apoptotique des IAPs. Le nombre de domaines BIR varie entre un et trois selon les IAPs. En effet, XIAP possède trois domaines BIR : BIR1, BIR2 et BIR3. Un seul domaine BIR est nécessaire à l'inhibition des caspases (Takahashi et al 1998). Le domaine BIR2 est responsable de l'inhibition des caspases 3 et 7 alors que le domaine BIR3 permet l'inhibition de la caspase-9 (Devereaux et al 1999, Sun et al 1999). En plus des domaines BIR présents en N-terminal, XIAP possède également un domaine «Ring zinc finger» à l'extrémité C-terminale dont l'activité ligase permet la dégradation de XIAP par les protéosomes suite à un stimulus apoptotique (Yang et 2000, Holcik et al 2001). De plus, il a été démontré que XIAP peut être clivée par les caspases, séparant ainsi les domaines BIR2 et BIR3 (Devereaux et al 1999), domaines correspondant aux sites de liaison de XIAP. Cependant, les deux fragments possèdent toujours une activité anti-apoptotique. Le fragment N-terminal constitué des domaines BIR1 et BIR2 inhibe l'apoptose médié par la protéine Fas, mais avec une efficacité réduite comparativement à la protéine complète. Le second fragment formé du domaine BIR3 et du domaine «Ring zinc finger» offre une protection quasi complète de l'apoptose induite par Bax mais est inefficace contre la voie de Fas (Holcik et al 2001). Deux inhibiteurs de XIAP ont été identifiés : XAF1 et Smac/DIABLO. XAF1 (XIAP Associated Factor 1) est une protéine située à l'intérieur du noyau qui empêche XIAP de supprimer l'effet pro-apoptotique des caspases. Smac/DIABLO est une protéine mitochondriale qui est relâchée de la mitochondrie suite à un stimulus apoptotique en même temps que le cytochrome c. Une fois activée, Smac/DIABLO se lie au domaine BIR3 de XIAP et empêche ainsi XIAP de s'associer aux caspases (Holcik et al 2001).

Il a été démontré que la surexpression de XIAP induit la phosphorylation/activation de Akt dans les cellules de la granulosa (Asselin et al 2001a)

et dans le cancer des cellules épithéliales de l'ovaire (Asselin et al 2001). Une étude récente dans notre laboratoire démontre que, durant le cycle oestral, XIAP est régulée de façon opposée à Smac/DIABLO dans l'endomètre de la rate; l'expression de la protéine XIAP est élevée pendant l'oestrus alors que la protéine Smac/DIABLO est faiblement exprimée à ce moment (Leblanc et al 2003). Plus récemment, nous avons démontré une diminution de l'expression de la protéine XIAP suite à des traitements au TGF- β 1 sur des cellules déciduales en culture (Shooner et al 2005). En effet, des études révèlent que XIAP agit comme un cofacteur dans la voie de signalisation du TGF- β (Birkey Reffey et al 2001, Herrera et 2002).

1.11.3 CDC47/MCM7

CDC47/MCM7 (Cell Division Cycle 47/Mini Chromosome Maintenance protein 7) est une protéine du cycle cellulaire appartenant à la famille des polypeptides « Mini Chromosome Maintenance ». Cette protéine est essentielle à la formation d'un complexe de pré-réplication ainsi que dans l'initiation de la réplication de l'ADN pendant la phase S du cycle cellulaire. Juste avant la mitose, lors de la phase G1 du cycle cellulaire, ces polypeptides sont rapidement transportés du cytoplasme vers le noyau où ils demeurent jusqu'au moment de l'initiation de la phase S. Lorsque la réplication de l'ADN commence, les polypeptides MCM sont retournés vers le cytoplasme où ils attendront d'être importés à nouveau dans le noyau lors du cycle cellulaire ultérieur. Puisque la protéine CDC47/MCM7 joue un rôle dans la réplication de l'ADN, elle est utilisée en tant que marqueur de prolifération cellulaire (Dalton et Hopwood 1997).

Une étude antérieure dans notre laboratoire a révélé une diminution de l'expression de CDC47/MCM7 au moment de l'oestrus lors du cycle oestral de la rate, période durant laquelle les niveaux d'apoptose sont élevés (Déry et al 2003). De plus,

nous avons démontré que l'expression de ce marqueur de prolifération cellulaire est diminuée de façon significative dans les cellules déciduales suite à des traitements au TGF- β 1 indiquant que celui-ci induit bien l'apoptose de ces cellules (Shoener et al 2005).

1.12 Hypothèse et objectifs

Une première étude réalisée dans notre laboratoire sur le rôle et l'importance du Transforming growth factor- β (TGF- β) et de la voie de survie Akt dans l'utérus de la rate au cours de la gestation a permis de démontrer que les trois isoformes du TGF- β sont régulés différemment durant la gestation. Il a été démontré que ces isoformes (TGF- β 1, TGF- β 2 et TGF- β 3) sont fortement exprimés durant les phases apoptotiques de la gestation dont l'implantation embryonnaire et la régression déciduale, laissant croire que les TGF- β sont des protéines importantes lors de ces processus. De plus, nous avons démontré que l'ajout de TGF- β 1 dans les cultures de cellules déciduales entraînait directement la diminution de certaines protéines de survie cellulaire dont P-Akt et XIAP. Nous avons donc poursuivi cette étude en émettant l'hypothèse selon laquelle les trois isoformes du TGF- β pourraient également être impliqués dans la régulation du cycle oestral de la rate et que les TGF- β 2 et TGF- β 3 pourraient avoir un effet similaire au TGF- β 1, ce qui confirmerait l'interaction du TGF- β dans la voie de survie cellulaire de la PI3-K/Akt. Ainsi, les objectifs de cette étude sont : (a) caractériser l'expression et la localisation des trois isoformes du TGF- β dans l'endomètre utérin durant le cycle oestral, (b) déterminer les effets spécifiques du TGF- β 2 et du TGF- β 3 dans la régulation de l'apoptose dans les cellules déciduales et, (c) déterminer l'interaction entre la voie de signalisation intracellulaire du TGF- β et la voie de survie cellulaire de la PI3-K/Akt.

CHAPITRE II
EXPRESSION DU TGF- β DURANT LA GESTATION CHEZ LA RATE ET SON
ACTIVITÉ SUR LA SURVIE DES CELLULES DÉCIDUALES

PRÉFACE

Les auteurs de cet article (déjà publié, Shooner et al 2005) sont : (a) Carl Shooner qui a effectué les expérimentations en relation avec les jours de gestation, les ovariectomies, a participé à la mise en place de la banque de protéines, a effectué la rédaction de l'article (b) Pierre-Luc Caron, qui a participé à la récolte des tissus, à la mise en place de la banque de protéines, aux cultures cellulaires et à l'immunofluorescence, (c) Guylaine Fréchette-Frigon qui a participé à la mise en place de la banque de protéines ainsi qu'aux cultures cellulaires, (d) Valérie Leblanc qui a grandement contribué à la récolte des tissus, aux cultures cellulaires, à l'immunofluorescence et l'obtention des figures, (e) Marie-Claude Déry qui a effectué les expériences préliminaires et la récolte des tissus, (f) Dr Éric Asselin, directeur de recherche, a effectué l'encadrement et la supervision de cette recherche et la révision de cet article.

RÉSUMÉ

Durant les premières étapes de la gestation, les cellules trophoblastiques de l'embryon entrent en contact avec l'endomètre où les cellules épithéliales meurent par apoptose permettant ainsi l'implantation de l'embryon. Vers la fin de la gestation chez la rate, un autre phénomène apoptotique est observé lors de la régression déciduale, soit du jour 14 au jour 20. Cependant, les mécanismes intracellulaire et moléculaire impliqués dans la régulation de l'apoptose dans l'utérus de la rate durant la gestation sont peu documentés. Ainsi, l'objectif de cette étude est de caractériser la présence et l'expression des isoformes du Transforming growth factor- β (TGF- β , un facteur de différenciation cellulaire bien connu) dans l'endomètre du rat tout au long de la gestation et de déterminer *in vitro* les effets du TGF- β 1 sur des cellules stromales endométriales (cellules déciduales) en culture. Les rates ont été accouplées et euthanasiées aux différents jours de la gestation (jour 2 à 20) et les utérus ont été recueillis soit afin de prélever les cellules endométriales pour en extraire les protéines pour des analyses de type Western Blot ou soit pour être fixés et préparés pour les techniques d'immunohistochimie et de détection de l'apoptose (TUNEL : TdT-mediated dUTP nick end labelling). Nous avons observé une forte augmentation de l'apoptose durant la régression déciduale aux jours 14, 16 et 18. La protéine clivée de la caspase-3 a été clairement détectée durant la régression déciduale par les techniques d'immunobuvardage de type Western Blot et d'immunofluorescence. Dans la même optique, les analyses de type Western ont révélé que les TGF- β 1, TGF- β 2 et TGF- β 3 sont fortement exprimés durant la régression déciduale (jour 14). Au début de la gestation, les TGF- β 1 et TGF- β 2 augmentent du jour 5.5 au jour 6.5 alors que le TGF- β 3 est complètement absent. Les analyses immunohistochimiques ont révélé que les TGF- β 1 et TGF- β 2 sont localisés dans les cellules épithéliales et glandulaires de même que dans les cellules stromales alors que le TGF- β 3 se retrouve principalement au niveau des cellules épithéliales de l'endomètre. De plus, la phosphorylation de Smad2 est élevée durant la régression déciduale. Les études *in vitro* avec des cultures de cellules déciduales ont révélé que le TGF- β 1 induit l'apoptose et la

phosphorylation/activation de Smad2. Également, le TGF- β 1 induit la diminution de l'expression de la protéine Akt phosphorylée/activée, un facteur de survie cellulaire bien connu, et de Xiap (X-linked inhibitor of apoptosis protein) dans les cellules déciduales *in vitro*. Ces résultats suggèrent que les isoformes du TGF- β 1 sont régulés différemment durant la gestation de la rate et peuvent avoir un rôle important dans le contrôle de l'apoptose et de la survie des cellules à différents moments de la gestation.

TGF-beta expression during rat pregnancy and activity on decidual cell survival

Carl Shooner, Pierre-Luc Caron, Guylaine Fréchette-Frigon, Valérie Leblanc, Marie-Claude Déry 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**

*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

ABSTRACT

Background: During early rat pregnancy, trophoblast of the tiny embryo joins with the endometrium and epithelial cells undergo apoptosis. Near the end of pregnancy, regression of the decidua basalis (DB) is also observed (from day 14 to 20). However, little is known about the intra-cellular and molecular mechanisms involved in apoptosis regulation in the uterus during pregnancy. The objective of the present study was to investigate the presence and the developmental expression of transforming growth factor-beta isoforms (TGF-beta well known differentiation factor) in the rat endometrium throughout pregnancy and its action in vitro using cultured endometrial stromal cells. **Methods:** In vivo: Rats were killed at different days of pregnancy (days 2-20) and uteri removed to collect endometrial protein extracts or the uteri were fixed, embedded and sectioned for immunohistochemistry (IHC) and in situ cell death analyses using TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL). In vitro: Rats were ovariectomized and decidualization was induced using sex steroids. Endometrial stromal decidual cells were then collected and cultured. **Results:** An increase of apoptosis in the DB on days 14, 16 and 18 was observed. Cleaved caspase-3 was clearly detected during regression of the DB by Western analysis and immunofluorescence. Western analyses using endometrial protein extracts demonstrated that TGF-beta1, TGF-beta2 and TGF-beta3 were highly expressed at the time of DB regression (day 14). During early pregnancy, TGF-beta1 and -beta2 expressions raised at days 5.5 to 6.5. TGF-beta3 protein was not detected during early pregnancy. IHC analyses revealed that TGF-beta1 and -2 were found surrounding both epithelium (luminal and glandular) in the stroma compartment at the implantation site, and TGF-beta3 was mainly located surrounding endometrial epithelium in the stroma compartment. Smad2 phosphorylation was increased at the time of DB regression. In vitro studies using decidual endometrial stromal cells revealed that TGF-beta1 induced apoptosis and Smad2 phosphorylation. Moreover, TGF-beta1 reduced both Akt (a well known survival factor) phosphorylation and XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein) expression in decidual endometrial stromal cells in vitro. **Conclusion:** Taken together, these results suggest that TGF-beta

isoforms are regulated differently during pregnancy and may have an important role in the control of apoptosis and cell survival at specific stages during pregnancy.

BACKGROUND

Apoptosis is a type of programmed cell death and is a natural phenomenon occurring when the cells are subjected to stress such as DNA damage, death signals or lack of growth factor. Apoptotic stimuli allow an intracellular cascade of signals such as the caspases, a family of cysteine proteases implicated in the cleavage of a number of important proteins which results in cell disassembly and cell death, phagocytosis and removal of cell debris by immune cells. Apoptosis plays an important role during embryo implantation in rodents where morphological characteristics of apoptosis are observed in endometrial epithelial cells at the embryo implantation site [1-3]. Moreover, this phenomenon also occurs during late pregnancy, especially during regression of the decidua basalis (DB) in the rat endometrium [4;5]. Two decidual zones are formed during pregnancy: the primary decidual zone on the antimesometrial side of the uterus and the secondary decidual zone (or antimesometrial decidua) which is formed following expansion of the primary decidual zone [5;6]. The secondary decidual zone eventually transforms stromal cells in the mesometrial region to form the DB that regresses following day 14 of pregnancy [7]. Whether the phenomenon of growing size of embryo is a cause or correlation to the increase of apoptosis remains to be elucidated.

The first members of the transforming growth factor-beta (TGF- β) superfamily were identified on the basis of their ability to induce a transformed phenotype of certain cells in culture [8]. They are now known as multifunctional polypeptides involved in the regulation of cell proliferation and differentiation, immunoregulation, angiogenesis and the regulation of extracellular matrix [9;10]. They act via cellular signalling through Smads and Phosphorylated-Smads (P-Smads), the active form of Smads. Those proteins are translocated to the nucleus and activate transcription factors which in turn activate

caspsases and other regulation proteins [11;12]. Another characteristic of TGF- β is its capacity to induce apoptosis in several cell types [7;13]; in fact, TGF- β was shown to have a pro-apoptotic function mediated by caspsases [14-16]. Genes encoding the three isoforms are localized on different chromosomes and the isoforms molecular weights are slightly different : 15, 12.5 and 12 KDa for TGF- β 1, β 2 and β 3 respectively; they share 80 % sequence identity and are produced in latent forms which are activated into a 112-amino acid mature peptide [17]. Multiplicity of TGF- β isoforms and sequence conservation within each form through evolution suggests important specific roles. Moreover, it has been demonstrated that TGF- β 1, - β 2 and - β 3 are differently expressed in the mouse uterus [18] and porcine conceptus-maternal interface [19;20].

The uterus is a hormone-dependent organ and it is subject to an abundant amount of cellular proliferation and cell death. Studies have shown that apoptosis is increased in the rat endometrium during implantation and regression of the decidual basalis in the rat [1;2;21]. The mRNA for TGF- β 1 has been shown to be present within the uterus during rat pregnancy and was localized to the luminal and glandular epithelial cells during early and late pregnancy [22]. TGF- β 1 and - β 2 mRNAs were also found in the mouse uterus during pregnancy [23-25]. Expression of TGF- β 2 and TGF- β 3 mRNAs were also shown to be expressed in the mouse periimplantation uterus [18]. A study showed that TGF- β 1 and - β 2 treatments on cultured endometrial rat stromal cells induced apoptosis [7]. These studies suggest that TGF- β isoforms might be involved specifically in the control of apoptosis in the uterus during pregnancy. However, the mechanisms involved in the control of apoptosis in the endometrium during pregnancy are poorly documented. Studies suggesting the importance of TGF- β isoforms at specific time of pregnancy were done at the mRNA level and it is important to determine their presence at the protein level. Thus, the aim of this study was to determine the expression and the developmental expression of TGF- β 1, β 2 and β 3 proteins in the rat uterus throughout pregnancy and to further determine *in vitro*, the effect of TGF- β in determining decidual cell fate. We found that the three isoforms of TGF- β were expressed and regulated differently in

epithelial and stromal endometrial cells during rat pregnancy and showed using primary decidual cell cultures the involvement of TGF- β in the regulation of programmed cell death. Moreover, the present study shows that TGF- β signals through Smad2, which coincide with XIAP and Akt down regulation and induction of apoptosis.

METHODS

Reagents

TGF- β 1 (sc-146, lot # F262, 200 μ g/ml), TGF- β 2 (sc-90, lot # B202, 200 μ g/ml) and TGF- β 3 (sc-82, lot # A222, 200 μ g/ml) polyclonal antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc (Santa Cruz, CA, USA). CDC47/MCM7 antibody was obtained from Medicorp (Montréal, QC, Canada). Phospho-Akt (Ser 473), Akt, XIAP, Cleaved caspase-3, and Phospho-Smad2 (Ser 465 / 467) antibodies were obtained from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA). The Keratin 8/18 antibody used to determine cell culture purity was donated by Dr Monique Cadrin (Univ. of Québec at Trois-Rivières, QC, Canada). Anti-Smad2/3 antibody was purchased from Calbiochem (San Diego, CA, USA). Vectastain ABC Kit for rabbit IgG was purchased from Vector Laboratories Inc. (Burlingame, CA, USA). *In Situ* Cell Death detection kit (TUNEL), POD and DAB substrate was obtained from Roche (Laval, QC, Canada). TGF- β 1 recombinant protein was purchased from Biosource (Cat # PHG9104, lot # 16865-01S, 5 μ g, diluted at 50 μ g/ml, QC, 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 mice 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 day 2, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 and 20 of pregnancy at 10:00 h in the morning and at 18:00 h for days 5.5 and 6.5. Six to 8 different rats were used for each time of pregnancy. Uteri were collected and fixed for immunohistochemical staining (IHC) and apoptotic cell death detection by [TdT]-mediated deoxyuridinetriphosphate nick end-labeling (TUNEL) or endometrial protein extracts collected for Western blot analysis.

Rat pretreatments and decidual endometrial stromal cell culture

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, PQ) to induce decidualization as described previously [26]: 1) 0.2 ug estradiol injection per day for three days (in the morning, day -2,-1 and 0); 2) On the third day (day 0 of pseudopregnancy), another injection in the afternoon of estradiol (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). All endometrial stromal cells collected for cultures were recovered from rats treated with the protocol described above.

Uteri were removed and horns taken and immersed in HBSS solution containing HEPES (20mM), 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 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 for 5 sec and supernatant containing epithelial cells was discarded. Uterine horns were washed three times with 2.5ml 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 2.5ml of HBSS and the supernatant was mixed with 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 diluted with DMEM-F12 (Ph 7.1) (Invitrogen, ON, Canada) containing 2.438 g/L NaHCO₃, 10% FBS D.C. and gentamycine 50 µg/ml. Cells were incubated at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂. Cells were plated in 6-well plates (Corning plates) at a density of 50% (4x10⁵ cells per well). The medium was changed two hours after the first incubation in order to eliminate epithelial cell contamination from stromal cell cultures. The purity of stromal cells was more than 97%: cell culture contamination with epithelial cells was evaluated by cellular morphology and immunofluorescence using a 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 TGF-β recombinant protein. Total proteins from treated cell cultures were extracted using TRIZOL (Invitrogen, ON, Canada). For Western blot analyses, 15 µg of total protein was used for each analysis.

Immunohistochemical staining

The uterus was fixed in 4% paraformaldehyde solution and embedded in paraffin. Tissue sections 7µm thick were mounted on polylysine-coated slides, deparaffinized, rehydrated, and then heated in 10 mM citrate buffer (pH 6) containing triton X-100 (Sigma-Aldrich) 0.1% (v/v). After two washes with PBS, slides were then incubated with 0.3 % hydrogen peroxide in methanol for 30 min to quench endogenous peroxidase activity. After washing with PBS, tissues were incubated with blocking serum (Vectastain ABC Kit) at room temperature for 1 h. Then, a primary antibody diluted in

blocking serum (TGF- β 1, β 2 or β 3; 1:50 dilution or CDC47/MCM7; 1:100 dilution) was added to the slides and incubated at 4°C overnight in a humidified chamber. After washing 5 min. in PBS, tissue sections were incubated for 30 min. with 3 μ g/ml biotinylated antibody (anti-rabbit or anti-mouse). Subsequently, slides were washed with PBS and incubated with avidin-biotin complex reagent containing horseradish peroxidase for 30 min. Slides were washed with PBS for 5 min and color development was achieved using DAB substrate. The tissue sections were counterstained with haematoxylin. Negative controls were performed using the same protocol but substituting the primary antibody with normal rabbit IgG (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA).

Immunofluorescence

Tissues were prepared as described in the immunohistochemical section. Cleaved caspase-3 antibody was diluted 1:100 in blocking serum and slides were incubated at 4°C overnight. After washing twice for 5 min. in PBS, tissue sections were incubated for 30 min. at room temperature with 2 mg/ml Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit (1:50). Subsequently, slides were washed with PBS and mounted. Negative controls were performed using the same protocol but substituting the primary antibody with normal rabbit IgG. Sections were examined using an Olympus BX60 microscope equipped with a Coolsnap-pro CF digital camera (Carsen Group, ON, Canada).

TdT-mediated deoxyuridinetriphosphate nick end-labeling (TUNEL)

Tissue sections were deparaffinized, rehydrated and rinsed with PBS. They were incubated with proteinase K (20 μ g/ml) for 30 min. at room temperature. Slides were washed twice with PBS, the endogenous peroxidase was quenched with 0.3 % hydrogen peroxide in methanol for 30 min. The slides were rinsed and incubated with 10 mM citrate solution for two min on ice. Then, tissue sections were rinsed with PBS and incubated with TdT labelling reaction (*In Situ* Cell Death Detection, POD) for 30 min at 37 °C in humidified environment. Slides were washed three times in PBS and tissue

sections were blocked with 3% BSA for 20 min. at room temperature. Converter-POD solution was added to the slides and incubated for 30 min. at 37 °C in humidified environment. Slides were washed for 5 min. in PBS, colour development was achieved using DAB substrate and counterstained with haematoxylin. Negative controls were performed using the same protocol without TdT enzyme.

Protein extraction and Western analysis

Protein homogenates from pregnant endometrium were isolated according to a protocol previously described [27]. Briefly, uteri from Day 2 to Day 20 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. In early pregnancy (Day 2 to 5.5), total endometrium was scraped using a microscope glass and collected. Uteri from Day 6 to 10 the placenta and decidua were at an early stage of differentiation and could not be reliably separated. For this reason, DB dissected from animals between these days of pregnancy contain some chorioallantoic cells, but antimesometrial decidua, choriovitelline tissues, fetus, and myometrium were removed. Even though we carefully dissected DB from these tissues, it is a possibility that a contamination with some antimesometrial decidual cells that regress to form the deciduas capsularis (DC) would occur. This is an important fact that we need to take into consideration. In uteri collected from Day 12 to 20 pregnant rats, DB were isolated by gently separating the placenta and myometrial regions with 23-gauge needles. Additionally, the DB began to regress on Day 14 and became too thin to reliably dissect after Day 17. The protocol for DB isolation was described previously by Ogle and George [28].

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; Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche Diagnostics Canada, PQ). Homogenates were centrifuged (12,000 X g for 20 min at 4°C) to remove insoluble material. The supernatant was recovered and stored at -20 °C pending analysis. Protein

content was determined with the Bio-Rad DC Protein Assay. Protein extracts (50 μ g) were heated at 94°C for 3 min, resolved by 10% SDS-PAGE and electrotransferred to nitrocellulose membranes using a semidry transfer (Bio-Rad, Mississauga, ON). The membranes were then blocked 2 h at room temperature with PBS containing 5 % milk powder, then incubated with anti TGF- β 1-2-3 1:1000 ; P-Smad2 (Ser 465 / 467) 1:1000 and Smad 2/3 1:1000 and subsequently with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse secondary antibody (1:3000; room temperature for 45 min). All membranes were stripped with Restore western blot stripping buffer (Pierce, # 21059, lot # FH71541), reprobed with an antibody specific to β -actin which was used as an internal standard. 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 analyses were performed (protein of interest and β -actin) using the GelDoc 2000 and the Quantity One software (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada). Results are expressed as a ratio (protein of interest/ β -actin) to correct for loading for each endometrial sample.

Hoechst and trypan blue exclusion staining

Following TGF- β treatment, both floating and attached cells were resuspended in PBS containing Hoechst 33258 for 24 hours at 4°C or resuspended in trypan blue solution (0,4%) for 5 minutes. Hoechst nuclear staining was viewed and photographed using a Olympus BX60 fluorescence microscope and a Coolsnap-Pro CF digital Camera (Carsen Group, ON, Canada). Cells with typical apoptotic nuclear morphology (nuclear shrinkage, condensation and fragmentation) were identified and counted using randomly selected fields on numbered photographic slides, of which the “counter” was not aware of the treatment, so as to avoid experimental bias. A minimum of 200 cells per treatment group were counted in each experiment. For trypan blue exclusion test, blue cells were counted under a regular microscope and were counted as non-living cells.

Statistical analysis

Western analyses of pregnant animals were repeated six to eight times (6 to 8 different endometrial extract per day of pregnancy from 6 to 8 different rats). Endometrial extracts from each rat were assessed individually. Western analyses of cultured decidual cells were repeated 5 times for each TGF- β dose (for each culture experiment, decidual cells were recovered from a pool of ten different ovariectomized/treated rats). Results subjected to statistical analyses were expressed as mean \pm SEM. Data were subjected to one-way ANOVA (PRISM software version 4.0; GraphPad, San Diego, CA). Differences between experimental groups were determined by the Tukey's test.

RESULTS

Apoptosis expression during pregnancy

In order to confirm the presence of apoptosis in DB, the presence of the activated form of caspase-3 was measured by Western analysis (Fig. 1A) and immunofluorescence (Fig. 1B) using a day 14 pregnant uterine section. TUNEL measurement was also performed using a day 14 pregnant uterine section (Fig. 1C). As demonstrated by Western analysis, Fig. 1A clearly demonstrates that apoptosis was present in the endometrium at day 14: the 17 KDa cleaved caspase-3 fragment was significantly and gradually increased from day 8 and was maximal at day 14. Cleaved caspase-3 fragment was observed in the cytoplasm of apoptotic cells as demonstrated by immunofluorescence (Fig. 1B) and TUNEL positive cells were also found in the in the endometrium at day 14 (Fig. 1C).

Expression of TGF- β 1, β 2 and β 3 in the rat uterus during pregnancy

To document the presence and expression of TGF- β proteins in the uterus throughout pregnancy, IHC and Western analyses were performed on uterine sections and lysate of pregnant rats respectively. It was important to document the presence of TGF- β proteins since the information found in the literature shows principally mRNA expression of

different TGF- β isoforms in specific periods of pregnancy rather than in the whole gestation period. Western blot analyses shown in figure 2 demonstrate that TGF- β 1 and β 2 are both expressed in a similar pattern. Their expression is increased following implantation (days 5.5 to 6.5) and is maximal during regression of the DB (day 14; $p < 0.01$). However, the localization of the expression of those two isoforms during pregnancy is slightly different (Fig. 3 and 4 respectively): immunohistochemicals analysis confirms that during early pregnancy the signal is found in both epithelial and stromal cells, but during late pregnancy TGF- β 1 is expressed mainly in stromal cells while TGF- β 2 is located in epithelial cells. It is interesting to see that both TGF- β 1 and β 2 isoforms are clearly present in the epithelial cells and in stroma at the time of implantation (day 5.5) all around the uterine lumen surrounding the implanting conceptus. On the opposite, TGF- β 3 has not been found during early pregnancy (Fig. 2 and 5). However, TGF- β 3 was increased and present at the time of DB regression (days 12 to 16; $p < 0.001$) suggesting that its action might be limited to decidual regression during pregnancy.

Expression of Smad2 and Phospho-Smad2 during pregnancy

TGF- β signal transduction is mediated intracellularly by Smad proteins, including the R-Smads (receptor regulated Smads including Smad2), the I-Smads (inhibitor Smads), and the Co-Smad (common Smad). The triggering event in Smad activation is the type I receptor-dependent sequential phosphorylation of the two C-terminal serine residues in Smads [29]. Therefore, phosphorylation of the C-terminus of receptor-activated Smads, particularly Smad2, is crucial for initiation of the TGF- β signaling. Western blot analyses of Smad2 and phospho-Smad2 on endometrial cell lysate from pregnant rats were carried out to confirm that TGF- β isoforms present in the endometrium during pregnancy have an activity on those cells. The results demonstrate that Smad2 expression is regulated throughout pregnancy (Figure 6). Its expression is high from day 5 to 10 and is dramatically reduced from day 12 to the end of pregnancy ($p < 0.05$). However the levels of phospho-Smad2, the activated form, are high on days 12 and 14 and are gradually reduced to the end of pregnancy. The presence of high levels of

phospho-Smad2 correlates with the high expression of the three TGF- β isoforms and the presence of apoptosis, with an exception on day 2 of pregnancy (Figure 6). Although high levels of phospho-Smad2 are observed, levels of TGF- β 1 and -2 isoforms are higher when compared to days 4 and 5 and caspase-3 cleaved fragment is also present.

TGF- β action *in vitro* on decidual endometrial stromal cell fate

As demonstrated previously by Moulton in 1994 [7], TGF- β 1 induces DNA cleavage in rat decidual cells. To confirm that TGF- β 1 is responsible for the induction of apoptosis, three different techniques were used to measure apoptosis (Figure 7). Hoechst nuclear staining (Figure 7A) and TUNEL analysis (Figure 7C) clearly demonstrated that TGF- β 1 induced apoptosis in a dose-dependent manner ($p < 0.0001$). Apoptosis was increased to 20% at 1 ng/ml of TGF- β 1 and up to 30% at 10 ng/ml. Trypan Blue exclusion staining assay was used to test for viability and cell death; even though this test is not an apoptotic specific test, it shows a direct effect of TGF- β 1 on cell survival and viability. A dose-dependent increase of cell death was observed in response to TGF- β 1 treatment (Figure 7B).

Effect of TGF- β on Akt, P-Akt, CDC-47 and XIAP expression *in vitro* on decidual endometrial stromal cells

To further determine how TGF- β might act at the intra-cellular level to induce apoptosis in decidual cells, experiments were carried out to determine the possible interaction of TGF- β and the PI3K/Akt survival pathway. Recent studies have suggested and demonstrated that TGF- β directly acts with Smad3 to regulate the sensitivity to TGF- β induced apoptosis [30;31] and another study showed that TGF- β exerts a largely inhibitory effect on basal meningioma proliferation possibly through Smad 2/3 [32]. Since Smad3 is directly involved in TGF- β signaling, a similar mechanism might be involved in the control of decidual cell fate. Another study has shown that Akt activity might in turn be affected by the presence or absence of inhibitor of apoptosis proteins

such as XIAP [33;34]. Figure 8 shows that Phospho-Smad2, the activated form, is significantly increased in response to TGF- β 1. However, the concentration-response relationship in term of Smad phosphorylation appears to be biphasic, with 1 ng/ml stimulating, while 10 ng/ml having a significant effect compared to control ($p < 0.05$) but lower than the 1ng/ml dose. There was no significant difference observed in term of Smad2 protein expression in response to TGF- β 1. As demonstrated in Figure 8, the proliferation marker CDC-47 was significantly decreased in response to TGF- β 1 treatment. Figure 9 demonstrates that Phospho-Akt, the active form of Akt, was highly expressed in control cells, indicating that this pathway is active and important in cell proliferation and cell survival. However, in the presence of TGF- β 1, Phospho-Akt was significantly decreased suggesting an interaction of TGF- β and the PI3K/Akt survival pathway. Total Akt protein expression was not influenced by TGF- β 1 treatment. Moreover, XIAP protein expression, a well known inhibitor of apoptosis protein, was significantly reduced in response to increasing doses of TGF- β .

DISCUSSION

Transforming growth factor- β isoforms have been known to be expressed and regulated differently in several types of tissues such as ovine uterus [35], human colon carcinoma [36] and at the porcine conceptus-maternal interface [19]. They are also recognized as pro-apoptotic factors in many cell types including fetal rat hepatocytes [14] and human leiomyoma smooth muscle cells [37]. However, little is known about the role of TGF- β isoforms in the rat uterus during pregnancy. The aim of the present study was to investigate the pro-apoptotic functions of TGF- β isoforms in rat uterus during pregnancy and also to determine more precisely the different patterns of expression of those isoforms in pregnant endometrium. The results presented in this study demonstrate that, as observed in other tissues, TGF- β isoforms (β 1, β 2 and β 3) are differently regulated in rat uterus throughout pregnancy.

It is already known that apoptosis is induced during embryo implantation and decidualization in rodents [1;2;7]. Our results confirm that apoptosis is induced in the pregnant rat uterus especially during regression of the decidua basalis. Caspases are well known executioners of apoptosis [15;38]. The highest concentration of cleaved caspase-3 protein, the activated form of caspase-3, was found on day 14 of pregnancy, at the time of DB regression. The presence of active caspase-3 shows that this pathway might be important to induce cleavage of critical survival proteins and to further stimulate apoptosis during the regression of DB. However, caspase-3 activation was weakly observed at the time of implantation and this might be explained by the fact that, although uterine epithelium undergoes degeneration in the presence of embryo [4-6], only some epithelial cells undergo apoptosis during this process at the implantation site. Western blot and IHC analyses might not be sensitive enough techniques to detect the presence of small levels of cleaved caspase-3 in epithelial cells at implantation. It is also a possibility that degeneration of the epithelium may also involve non-apoptotic pathways.

The logical pursuit of this study was to determine the expression of TGF- β isoforms during those critical stages of pregnancy. The present results are consistent with previous work published in regards to TGF- β isoforms in other systems and in mouse uterus [18;22;39], where expression and regulation is different for each isoform. TGF- β 1 was already known to induce apoptosis in human [40] and rat [7] endometrial stromal cells. In the present study, TGF- β 1 and TGF- β 2 were found throughout pregnancy and were particularly strong during apoptotic phases such as regression of the DB. On the other hand, using both IHC and Western analyses, TGF- β 3 protein was undetectable in the early stages of gestation, suggesting that TGF- β 3 may not be required in the regulation of cell death during embryo implantation and early pregnancy. This result supports a study performed by Das et al. [18] showing that TGF- β 3 mRNA was absent during early pregnancy. Nevertheless, the three mammalian forms of TGF- β are strongly expressed during regression of the DB suggesting they could all play an important role during the regulation of programmed cell death to induced regression of DB. Those

three isoforms are also expressed differently in distinct cells of the same tissues; similarities have been observed in human normal and malignant prostate epithelial cells [39] as TGF- β 2 and TGF- β 3 are more expressed in epithelial cells than in stromal cells during late pregnancy. The strong expression of TGF- β 1 during rat early pregnancy (day 5.5 to 6.5) may be explained by the fact that this isoform could be necessary to initiate embryo implantation processes during the periimplantation period, a similar situation that is observed during trophoblast invasion at the time of human embryo implantation [41].

The next logical step of the present study was to determine if the TGF- β isoforms present during pregnancy were active. A lot of information can be found in many physiological systems regarding TGF- β and its cellular receptors [8;10] and Smad proteins responsible for its intracellular signal transduction [42-44]. Recent studies have suggested and demonstrated that TGF- β directly acts with Smad3 to regulate the sensitivity to TGF- β induced apoptosis [30;31] and another study showed that TGF- β exerts a largely inhibitory effect on basal meningioma proliferation possibly through Smad 2/3 [32]. Since Smad3 is directly involved in TGF- β signaling, a similar mechanism might be involved in the control of decidual cell fate. Since it is well known that TGF- β signals through Smads proteins, Western blot and IHC analyses were performed on pregnant endometrial cell lysates to measure Smad2 and phospho-Smad2 (the activated form) to test this hypothesis. The results showed that Smad2 protein was increased and stronger at the time of embryo implantation and that Smad2 phosphorylation was gradually increased during regression of the DB, which correlates with the presence of TGF- β isoforms. These results suggest that TGF- β isoforms present during these two critical stages of pregnancy might act through Smads proteins to induce apoptosis or to induce other genes known to be regulated by TGF- β s. Smad2 protein is relatively low during regression of the DB compared to early stages of pregnancy. This result is supported by a recent study showing that increased Smad2 expression is probably caused by the invasion of the trophoblast resulting in the formation of the first decidual zone [45]. However, Smad2 phosphorylation is not as much increased during

early pregnancy as compared to late pregnancy. It is again a possibility that, since only epithelial cells undergo apoptosis at the time of embryo implantation, the possible increase of Smad2 phosphorylation induced by TGF- β might only be observed in a small number of cells which was undetectable with the techniques used.

To better understand the effect of TGF- β at the cellular level, decidual cell cultures were used to further investigate the interaction of TGF- β and the PI 3-K/Akt survival pathway. Although a recent study showed the possibility that cells obtained following artificial decidualization might be different from those obtained from pregnant animals [46], this model is an excellent alternative to obtain sufficient material to test the role of TGF- β and to correlate the data with the physiologic situation. It has been demonstrated recently that Akt phosphorylation is directly induced by 17 β -estradiol in the ovariectomized rat uterus indicating that sex steroids have an important influence on endometrial cell fate [47]. Very recent studies have shown that TGF- β might directly block Akt activity through Smad activation [30]. Thus, stromal decidual cells were treated with different doses of TGF- β 1 to determine if Smad activation might in turn block Akt survival pathway to induce cell death. TGF- β 1 induced Smad2 phosphorylation in cultured endometrial stromal cell *in vitro* and triggered apoptosis in a dose-dependent manner, which was accompanied by a reduction of cell proliferation, confirming TGF- β as an apoptotic factor in rat decidual endometrial stromal cells. In response to TGF- β 1, Akt phosphorylation was significantly decreased indicating that Akt activity inhibition might be an important mechanism for TGF- β -induced apoptosis in this model. Other studies have shown that Akt activity might in turn be affected by the presence or absence of inhibitor of apoptosis proteins such as XIAP [33;34] and cIAP-1 [48]. The results support the hypothesis that TGF- β action via Smads not only acts at the transcriptional level to induce production of apoptotic factors in decidual cells but also at the protein level to block activation of survival factors.

Akt phosphorylation was recently shown to be regulated by XIAP, a well known inhibitor of apoptosis protein, in human ovarian epithelial surface cells and in rat granulosa cells [33;34]. The present results show a possible interaction (direct or indirect) between TGF- β 1 and XIAP protein expression. TGF- β 1 reduced XIAP expression *in vitro* in a dose dependent manner. Recent studies have demonstrated that XIAP can act as a cofactor in the regulation of gene expression induced by TGF- β and is independent of Smad4 [14;49]. Because TGF- β 1 reduced Akt phosphorylation and that XIAP was shown to induce Akt phosphorylation [34], it is possible that TGF- β action in this case might be through Smad2 activation and XIAP gene expression which in turn would act on Akt phosphorylation. Further experiments will be necessary to have a better understanding of the interactions between TGF- β and Akt survival pathway. In particular, how specifically Smads act on XIAP expression and how XIAP acts on the PI 3-K/Akt survival pathway activity. Other factors such as Smac/Diablo, a XIAP intracellular inhibitor, which was demonstrated as being regulated by 17 β -estradiol in the rat during estrous cycle [50], might also be a putative candidate for regulation of TGF- β activity in decidual cells.

CONCLUSIONS

In conclusion, this study demonstrates that the three isoforms of TGF- β are differently localized and regulated in endometrial cells of pregnant rats, particularly at the time of implantation and regression of the DB. The present study also showed that TGF- β plays an important role in the control of cell survival and cell death and that it may interact with the PI 3-K/Akt survival pathway through Smad activation to allow apoptosis induction. Further experiments will be necessary to understand more precisely the effect of other Smads and/or co-Smads proteins during TGF- β -induced apoptosis. Other investigations will also be required to better understand the specific roles of TGF- β 2 and

TGF- β 3 at the intracellular and molecular level *in vitro* to determine how and if these isoforms control cell survival through Smad signal transducers.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

CS drafted the paper. CS, PLC, GFF, VL and MCD performed the experiments. EA conceived the study, participated in its design and coordination, and wrote final version of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

This work has been supported by a grant from NSERC (238501-01). Eric Asselin is a chercheur-boursier from the Fond de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) and New Investigator of the Canadian Institute of Health Research of Canada (CIHR). Marie-Claude Déry is recipient of a FRSQ and NSERC studentships. We are grateful to Mrs Rollande Caron for the contribution of her precious time and expertise to our projects. We thank also Mrs Sophie Parent and Mrs Daphne Efford for reviewing the manuscript.

REFERENCES

1. Abrahamsohn PA, Zorn TM: **Implantation and decidualization in rodents.** *J Exp Zool* 1993, **266**:603-628.
2. Pampfer S, Donnay I: **Apoptosis at the time of embryo implantation in mouse and rat.** *Cell Death Differ* 1999, **6**:533-545.
3. Parr EL, Tung HN, Parr MB: **Apoptosis as the mode of uterine epithelial cell death during embryo implantation in mice and rats.** *Biol Reprod* 1987, **36**:211-225.
4. Welsh AO, Enders AC: **Chorioallantoic placenta formation in the rat. III. Granulated cells invade the uterine luminal epithelium at the time of epithelial cell death.** *Biol Reprod* 1993, **49**:38-57.
5. Welsh AO: **Uterine cell death during implantation and early placentation.** *Microsc Res Tech* 1993, **25**:223-245.
6. Welsh AO, Enders AC: **Light and electron microscopic examination of the mature decidual cells of the rat with emphasis on the antimesometrial decidua and its degeneration.** *Am J Anat* 1985, **172**:1-29.
7. Moulton BC: **Transforming growth factor-beta stimulates endometrial stromal apoptosis in vitro.** *Endocrinology* 1994, **134**:1055-1060.
8. Lutz M, Knaus P: **Integration of the TGF-beta pathway into the cellular signalling network.** *Cell Signal* 2002, **14**:977-988.
9. Rich J, Borton A, Wang X: **Transforming growth factor-beta signaling in cancer.** *Microsc Res Tech* 2001, **52**:363-373.
10. Attisano L, Wrana JL, Lopez-Casillas F, Massague J: **TGF-beta receptors and actions.** *Biochim Biophys Acta* 1994, **1222**:71-80.

11. Kretschmar M, Doody J, Massague J: **Opposing BMP and EGF signalling pathways converge on the TGF-beta family mediator Smad1.** *Nature* 1997, **389**:618-622.
12. Imamura T, Takase M, Nishihara A, Oeda E, Hanai J, Kawabata M, Miyazono K: **Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily.** *Nature* 1997, **389**:622-626.
13. Perlman R, Schiemann WP, Brooks MW, Lodish HF, Weinberg RA: **TGF-beta-induced apoptosis is mediated by the adapter protein Daxx that facilitates JNK activation.** *Nat Cell Biol* 2001, **3**:708-714.
14. Herrera B, Fernandez M, Benito M, Fabregat I: **cIAP-1, but not XIAP, is cleaved by caspases during the apoptosis induced by TGF-beta in fetal rat hepatocytes.** *FEBS Lett* 2002, **520**:93-96.
15. Inman GJ, Allday MJ: **Apoptosis induced by TGF-beta 1 in Burkitt's lymphoma cells is caspase 8 dependent but is death receptor independent.** *J Immunol* 2000, **165**:2500-2510.
16. Boone DL, Tsang BK: **Caspase-3 in the rat ovary: localization and possible role in follicular atresia and luteal regression.** *Biol Reprod* 1998, **58**:1533-1539.
17. Massague J: **The transforming growth factor-beta family.** *Annu Rev Cell Biol* 1990, **6**:597-641.
18. Das SK, Flanders KC, Andrews GK, Dey SK: **Expression of transforming growth factor-beta isoforms (beta 2 and beta 3) in the mouse uterus: analysis of the periimplantation period and effects of ovarian steroids.** *Endocrinology* 1992, **130**:3459-3466.

19. Gupta A, Dekaney CM, Bazer FW, Madrigal MM, Jaeger LA: **Beta transforming growth factors (TGFbeta) at the porcine conceptus-maternal interface. Part II: uterine TGFbeta bioactivity and expression of immunoreactive TGFbetas (TGFbeta1, TGFbeta2, and TGFbeta3) and their receptors (type I and type II).** *Biol Reprod* 1998, **59**:911-917.
20. Gupta A, Ing NH, Bazer FW, Bustamante LS, Jaeger LA: **Beta transforming growth factors (TGFss) at the porcine conceptus-maternal interface. Part I: expression of TGFbeta1, TGFbeta2, and TGFbeta3 messenger ribonucleic acids.** *Biol Reprod* 1998, **59**:905-910.
21. Gu Y, Jow GM, Moulton BC, Lee C, Sensibar JA, Park-Sarge OK, Chen TJ, Gibori G: **Apoptosis in decidual tissue regression and reorganization.** *Endocrinology* 1994, **135**:1272-1279.
22. Chen HL, Yelavarthi KK, Hunt JS: **Identification of transforming growth factor-beta 1 mRNA in virgin and pregnant rat uteri by in situ hybridization.** *J Reprod Immunol* 1993, **25**:221-233.
23. Lea RG, Flanders KC, Harley CB, Manuel J, Banwatt D, Clark DA: **Release of a transforming growth factor (TGF)-beta 2-related suppressor factor from postimplantation murine decidual tissue can be correlated with the detection of a subpopulation of cells containing RNA for TGF-beta 2.** *J Immunol* 1992, **148**:778-787.
24. Manova K, Paynton BV, Bachvarova RF: **Expression of activins and TGF beta 1 and beta 2 RNAs in early postimplantation mouse embryos and uterine decidua.** *Mech Dev* 1992, **36**:141-152.
25. Tamada H, McMaster MT, Flanders KC, Andrews GK, Dey SK: **Cell type-specific expression of transforming growth factor-beta 1 in the mouse uterus during the periimplantation period.** *Mol Endocrinol* 1990, **4**:965-972.

26. Kennedy TG, Ross HE: **Effect of prostaglandin E2 on rate of decidualization in rats.** *Prostaglandins* 1993, **46**:243-250.
27. Dai D, Ogle TF: **Progesterone regulation of epidermal growth factor receptor in rat decidua basalis during pregnancy.** *Biol Reprod* 1999, **61**:326-332.
28. Ogle TF, George P: **Regulation of the estrogen receptor in the decidua basalis of the pregnant rat.** *Biol Reprod* 1995, **53**:65-77.
29. Macias-Silva M, Abdollah S, Hoodless PA, Pirone R, Attisano L, Wrana JL: **MADR2 is a substrate of the TGFbeta receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling.** *Cell* 1996, **87**:1215-1224.
30. Conery AR, Cao Y, Thompson EA, Townsend CM, Jr., Ko TC, Luo K: **Akt interacts directly with Smad3 to regulate the sensitivity to TGF-beta induced apoptosis.** *Nat Cell Biol* 2004, **6**:366-372.
31. Remy I, Montmarquette A, Michnick SW: **PKB/Akt modulates TGF-beta signalling through a direct interaction with Smad3.** *Nat Cell Biol* 2004, **6**:358-365.
32. Johnson MD, Okediji E, Woodard A: **Transforming growth factor-beta effects on meningioma cell proliferation and signal transduction pathways.** *J Neurooncol* 2004, **66**:9-16.
33. Asselin E, Wang Y, Tsang BK: **X-linked inhibitor of apoptosis protein activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in rat granulosa cells during follicular development.** *Endocrinology* 2001, **142**:2451-2457.
34. Asselin E, Mills GB, Tsang BK: **XIAP regulates Akt activity and caspase-3-dependent cleavage during cisplatin-induced apoptosis in human ovarian epithelial cancer cells.** *Cancer Res* 2001, **61**:1862-1868.

35. Dore JJ, Jr., Wilkinson JE, Godkin JD: **Ovine endometrial expression of transforming growth factor beta isoforms during the peri-implantation period.** *Biol Reprod* 1996, **54**:1080-1087.
36. Bellone G, Carbone A, Tibaudi D, Mauri F, Ferrero I, Smirne C, Suman F, Rivetti C, Migliaretti G, Camandona M, Palestro G, Emanuelli G, Rodeck U: **Differential expression of transforming growth factors-beta1, -beta2 and -beta3 in human colon carcinoma.** *Eur J Cancer* 2001, **37**:224-233.
37. Arici A, Sozen I: **Transforming growth factor-beta3 is expressed at high levels in leiomyoma where it stimulates fibronectin expression and cell proliferation.** *Fertil Steril* 2000, **73**:1006-1011.
38. Cohen GM: **Caspases: the executioners of apoptosis.** *Biochem J* 1997, **326**:1-16.
39. Perry KT, Anthony CT, Steiner MS: **Immunohistochemical localization of TGF beta 1, TGF beta 2, and TGF beta 3 in normal and malignant human prostate.** *Prostate* 1997, **33**:133-140.
40. Chatzaki E, Kouimtzoglou E, Margioris AN, Gravanis A: **Transforming growth factor beta1 exerts an autocrine regulatory effect on human endometrial stromal cell apoptosis, involving the FasL and Bcl-2 apoptotic pathways.** *Mol Hum Reprod* 2003, **9**:91-95.
41. Slater M, Murphy CR: **Transforming growth factors alpha and beta-1 are co-expressed in the uterine epithelium during early pregnancy.** *Cell Tissue Res* 2000, **300**:315-320.
42. Ingman WV, Robertson SA: **Defining the actions of transforming growth factor beta in reproduction.** *Bioessays* 2002, **24**:904-914.
43. Javelaud D, Mauviel A: **Mammalian transforming growth factor-betas: Smad signaling and physio-pathological roles.** *Int J Biochem Cell Biol* 2004, **36**:1161-1165.

44. Akhurst RJ, Derynck R: **TGF-beta signaling in cancer--a double-edged sword.** *Trends Cell Biol* 2001, **11**:S44-S51.
45. Lin HY, Wang HM, Li QL, Liu DL, Zhang X, Liu GY, Qian D, Zhu C: **Expression of Smad2 and Smad4, transforming growth factor-beta signal transducers in rat endometrium during the estrous cycle, pre-, and peri-implantation.** *Anim Reprod Sci* 2004, **80**:303-316.
46. Wang X, Matsumoto H, Zhao X, Das SK, Paria BC: **Embryonic signals direct the formation of tight junctional permeability barrier in the decidualizing stroma during embryo implantation.** *J Cell Sci* 2004, **117**:53-62.
47. Dery MC, Leblanc V, Shooner C, Asselin E: **Regulation of Akt expression and phosphorylation by 17beta-estradiol in the rat uterus during estrous cycle.** *Reprod Biol Endocrinol* 2003, **1**:47.
48. Gagnon V, St Germain ME, Parent S, Asselin E: **Akt activity in endometrial cancer cells: regulation of cell survival through cIAP-1.** *Int J Oncol* 2003, **23**:803-810.
49. Birkey RS, Wurthner JU, Parks WT, Roberts AB, Duckett CS: **X-linked inhibitor of apoptosis protein functions as a cofactor in transforming growth factor-beta signaling.** *J Biol Chem* 2001, **276**:26542-26549.
50. Leblanc V, Dery MC, Shooner C, Asselin E: **Opposite regulation of XIAP and Smac/DIABLO in the rat endometrium in response to 17beta-estradiol at estrus.** *Reprod Biol Endocrinol* 2003, **1**:59.

FIGURE LEGEND

- Figure 1: Detection of apoptosis in pregnant endometrial tissues as demonstrated by Western and TUNEL analyses. A) Apoptosis as determined by Western analysis of cleaved caspase-3 (one blot presented out of 6). β -actin blots shown were used as controls to correct for loading in each lane. Blots shown are from one representative experiment. Graphics represent Western blot densitometrical analysis of the 17KDa cleaved fragment. B) Cleaved caspase-3 immunofluorescence at day 14 of pregnancy. Magnification: control: 10X ; inset and Day 14: 40X. C) TUNEL analysis at day 14 of pregnancy. B) and C) One representative section is presented out of 6 experiments. C-: negative control. Magnification: control: 10X ; inset and Day 14: 40X. Arrows indicate positive staining.
- Figure 2: TGF- β 1, - β 2 and - β 3 expressions in rat endometrium during rat pregnancy. Total endometrial proteins were collected at different days of pregnancy. β -actin blots shown were used as controls to correct for loading in each lane. Blots shown are from one representative experiment. Graphics represent Western blot densitometrical analysis. Data represent the mean \pm SEM of six independent experiments (six different rats). C+: positive control (day 14 endometrial protein extract).
- Figure 3: Immunohistochemistry of TGF- β 1 in rat endometrium during pregnancy. IHC shown are from one representative experiment and were repeated 6 times using 6 different uterine sections from 6 different rats per day of pregnancy. Representative days of pregnancy are presented (A: day 4; B: day 5.5; C: day 6.5; D: day 10; E: day 14; F: negative control in which

primary antibody was absent). le: luminal epithelium; em: embryo; s: stroma. Magnification: 40X.

Figure 4: Immunohistochemistry of TGF- β 2 in rat endometrium during pregnancy. IHC shown are from one representative experiment and were repeated 6 times using 6 different uterine sections from 6 different rats per day of pregnancy. Representative days of pregnancy are presented (A: day 4; B: day 5.5; C: day 6.5; D: day 10; E: day 14; F: negative control in which primary antibody was absent). le: luminal epithelium; em: embryo; s: stroma. Magnification: 40X.

Figure 5: Immunohistochemistry of TGF- β 3 in rat endometrium during pregnancy. IHC shown are from one representative experiment and were repeated 6 times using 6 different uterine sections from 6 different rats per of day pregnancy. Representative days of pregnancy are presented (A: day 4; B: day 5.5; C: day 6.5; D: day 10; E: day 14; F: negative control in which primary antibody was absent). le: luminal epithelium; em: embryo; s: stroma. Magnification: 40X.

Figure 6: Smad2 and phospho-Smad2 (P-Smad2) expressions in rat endometrium during pregnancy. Total endometrial proteins were collected at different days of pregnancy. β -actin blots shown were used as controls to correct for loading in each lane. Blots shown are from one representative experiment. Graphics represent Western blot densitometrical analysis. Data represent the mean \pm SEM of six independent experiments (six different rats).

Figure 7: Effect of TGF- β 1 (ng/ml) on cell survival in cultured rat endometrial cells as demonstrated by Hoechst staining, TUNEL and trypan blue exclusion analyses. A) Apoptosis as determined by Hoechst nuclear staining. Data represent the mean \pm SEM of six independent experiments. All doses are significantly different from control ($p < 0.001$). B) Cell viability as determined by trypan blue exclusion assay. Data represent the mean \pm SEM of six independent experiments. 1, 5 and 10 ng/ml TGF- β 1 doses are significantly different from control ($p < 0.0001$). C) Apoptosis as determined by TUNEL assay. Representative fields are presented out of 6 experiments. Arrows indicate positive staining.

Figure 8: Expression of Smad2, P-Smad2 and CDC47 in cultured rat endometrial cells *in vitro* as demonstrated by Western blot analyses in response to TGF- β 1 (ng/ml). β -actin blots shown were used as controls to correct for loading in each lane. Blots shown are from one representative experiment. Graphics represent Western blot densitometrical analysis and are the mean \pm SEM of four independent experiments.
*Significantly different from control ($p < 0.05$).

Figure 9: Expression of Akt, P-Akt and XIAP in cultured rat endometrial cells *in vitro* as demonstrated by Western blot analyses in response to TGF- β 1 (ng/ml). β -actin blots shown were used as controls to correct for loading in each lane. Blots shown are from one representative experiment. Graphics represent Western blot densitometrical analysis and are the mean \pm SEM of four independent experiments.
*Significantly different from control ($p < 0.05$).

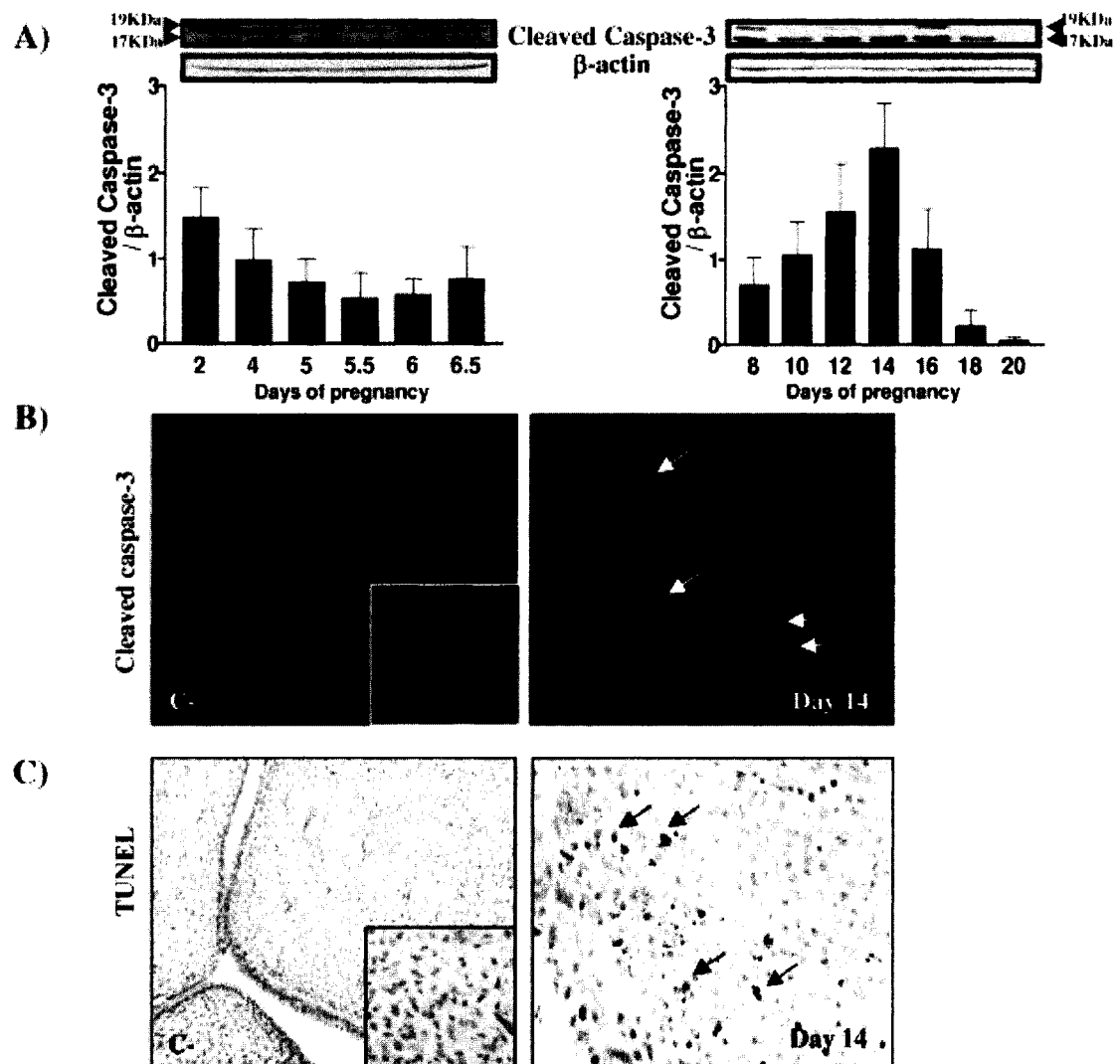


Figure 1; Shooner et al.

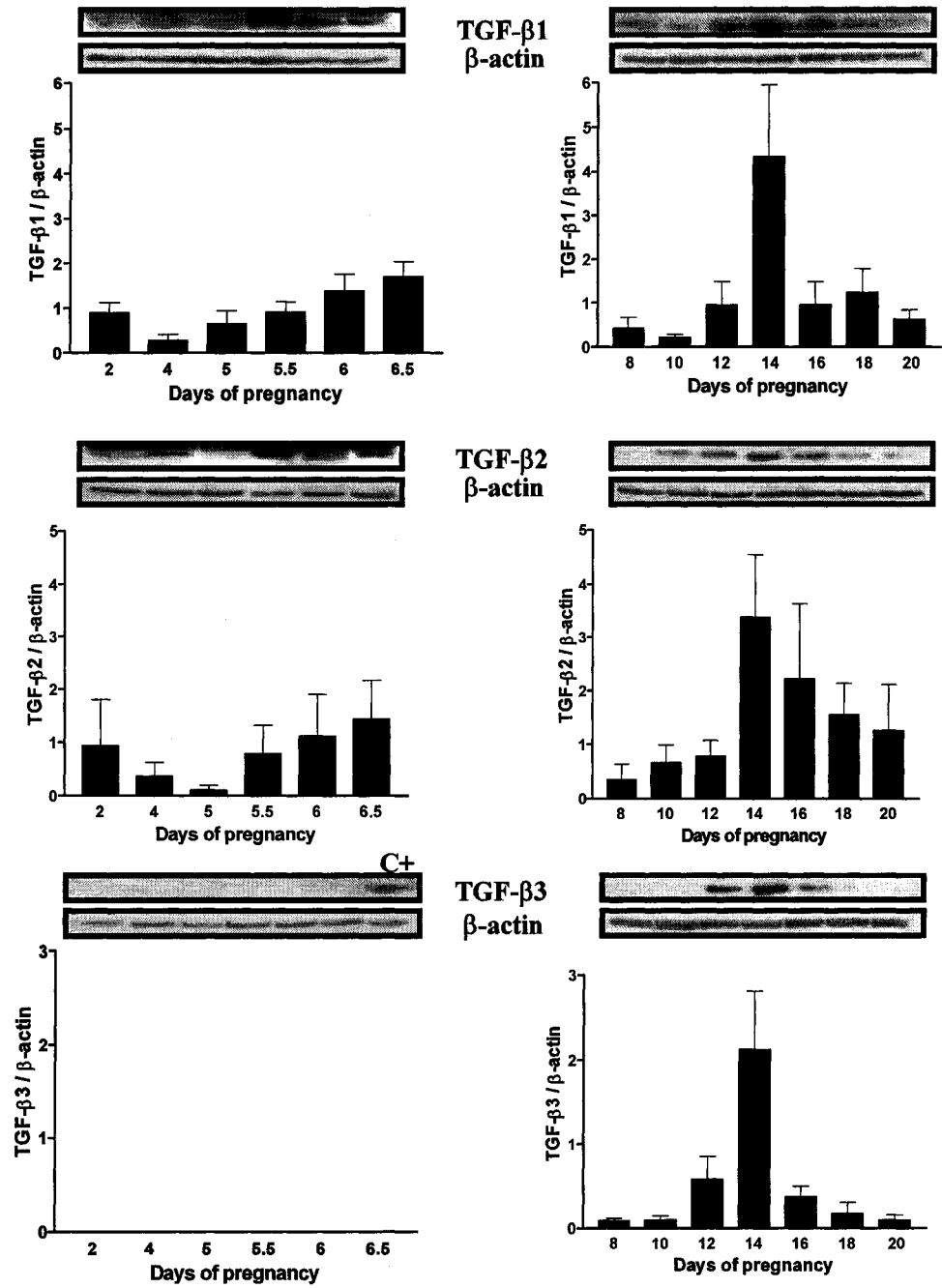


Figure 2; Shooner et al.

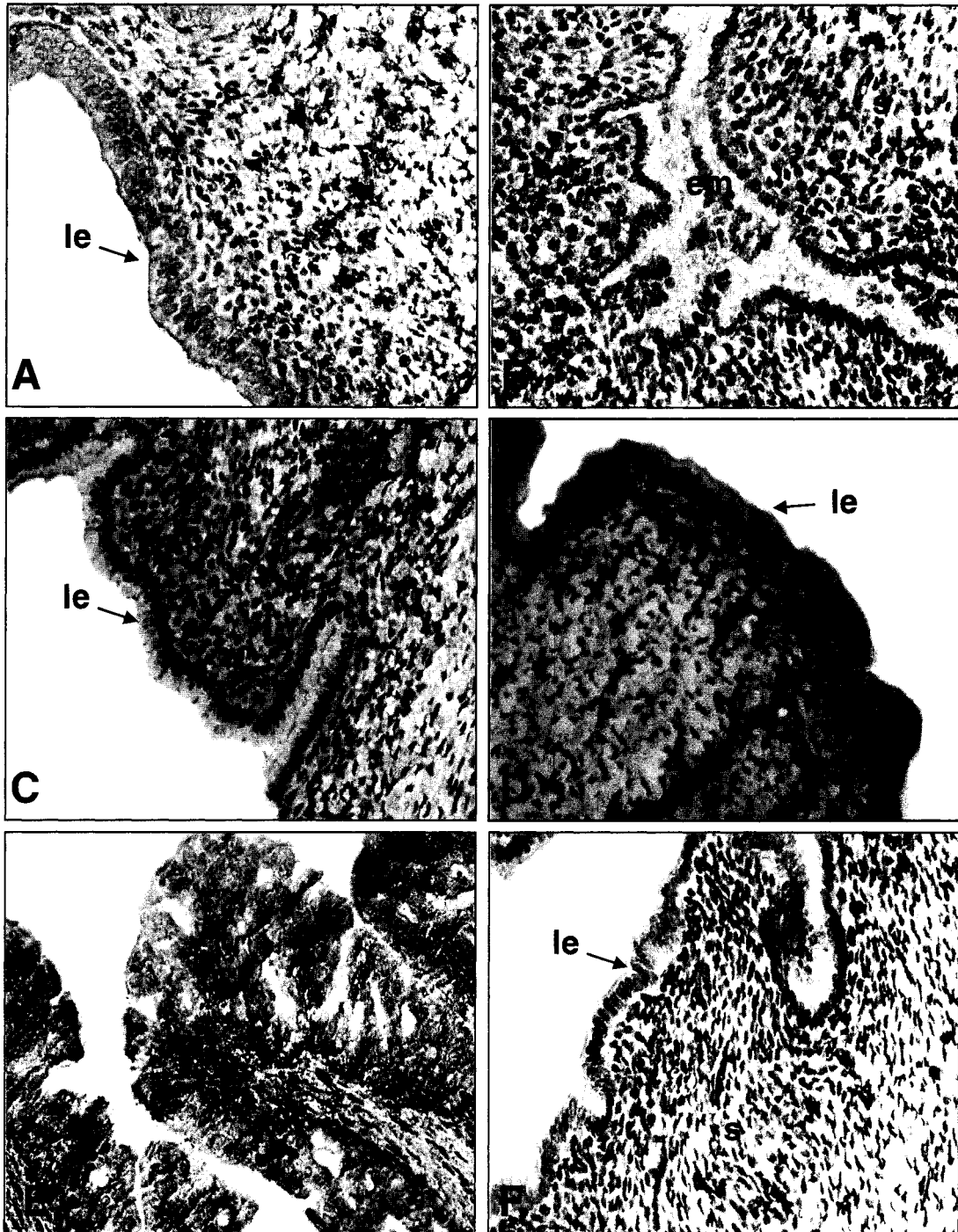


Figure 3; Shooner et al.

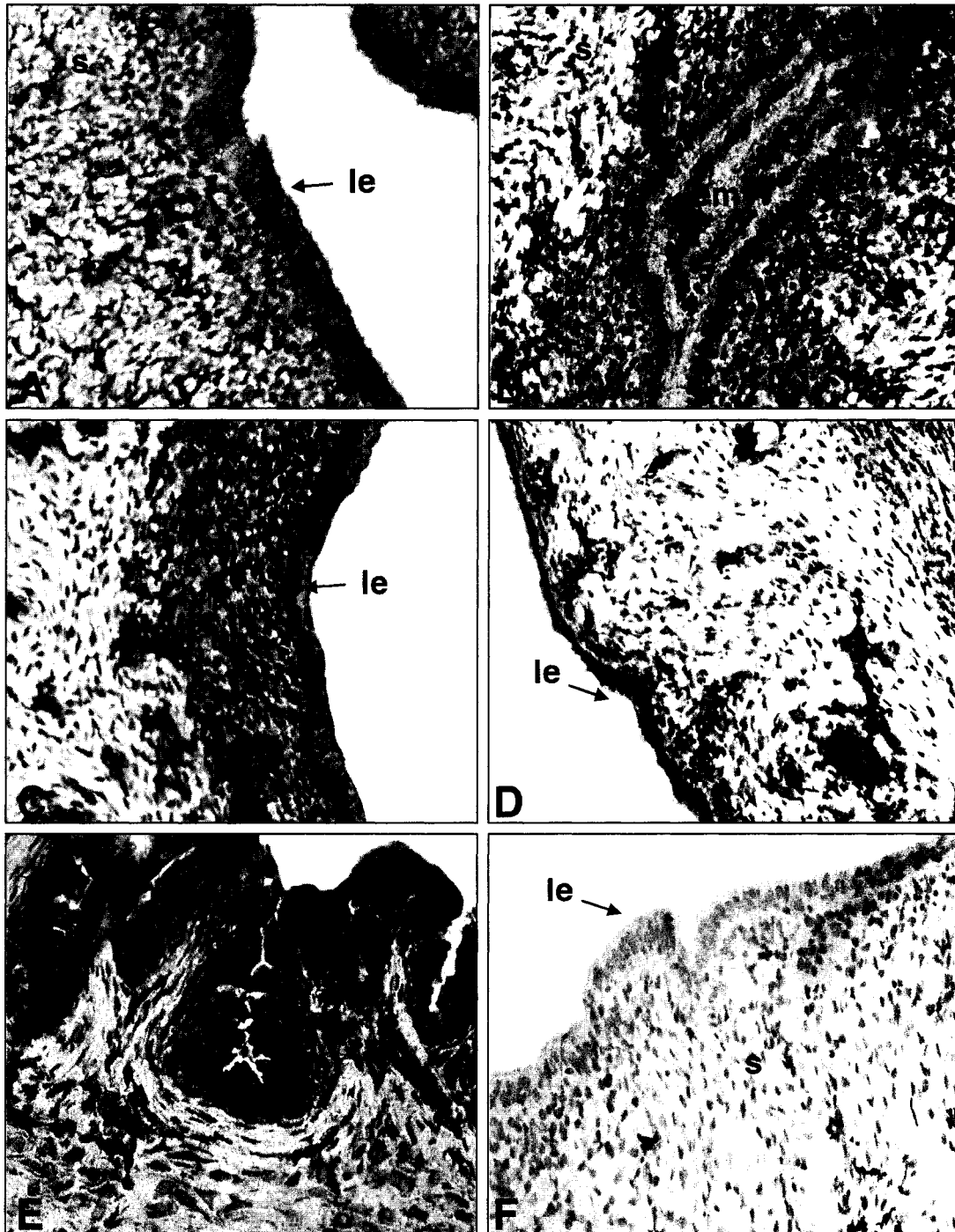


Figure 4; Shooner et al.

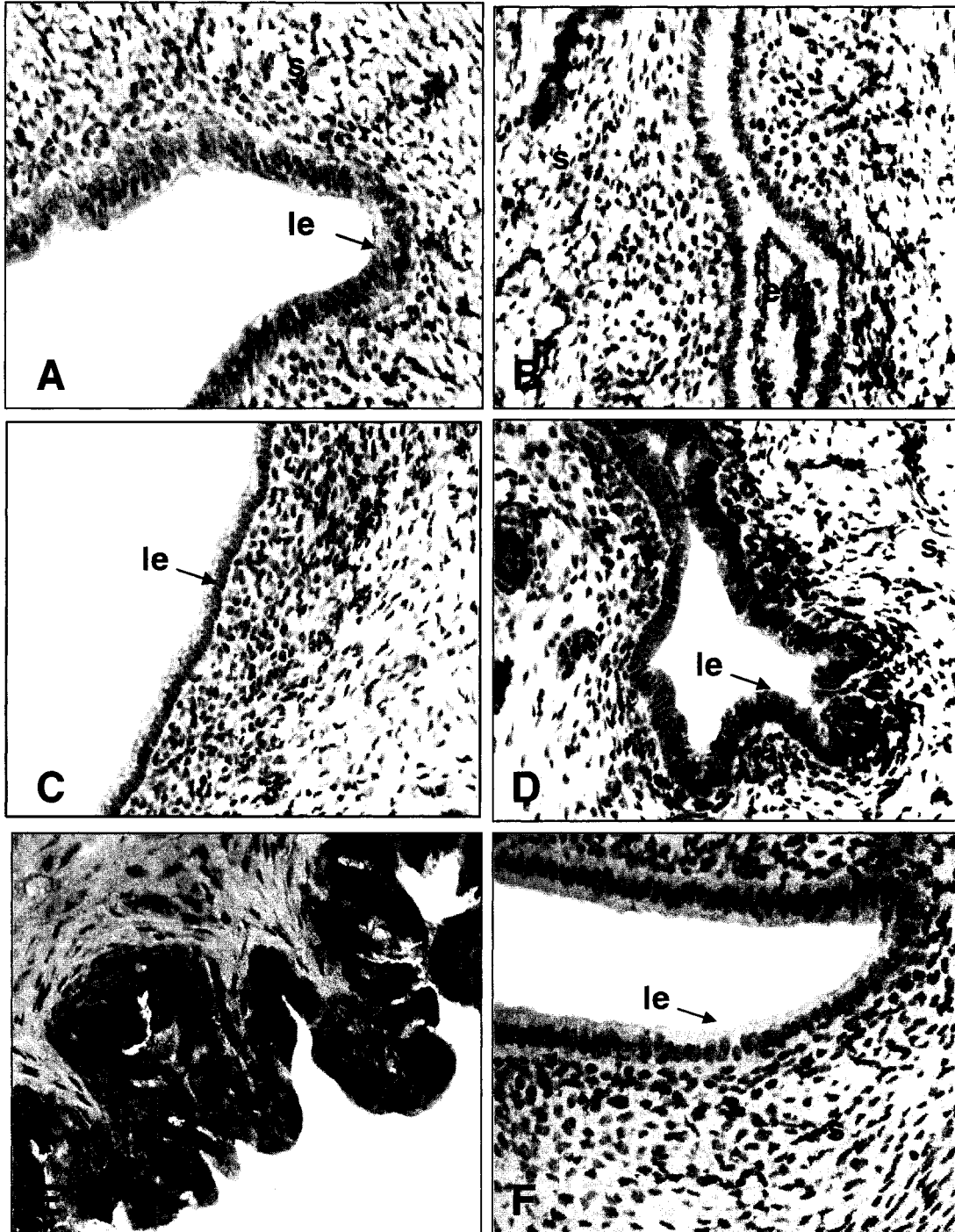


Figure 5; Shooner et al.

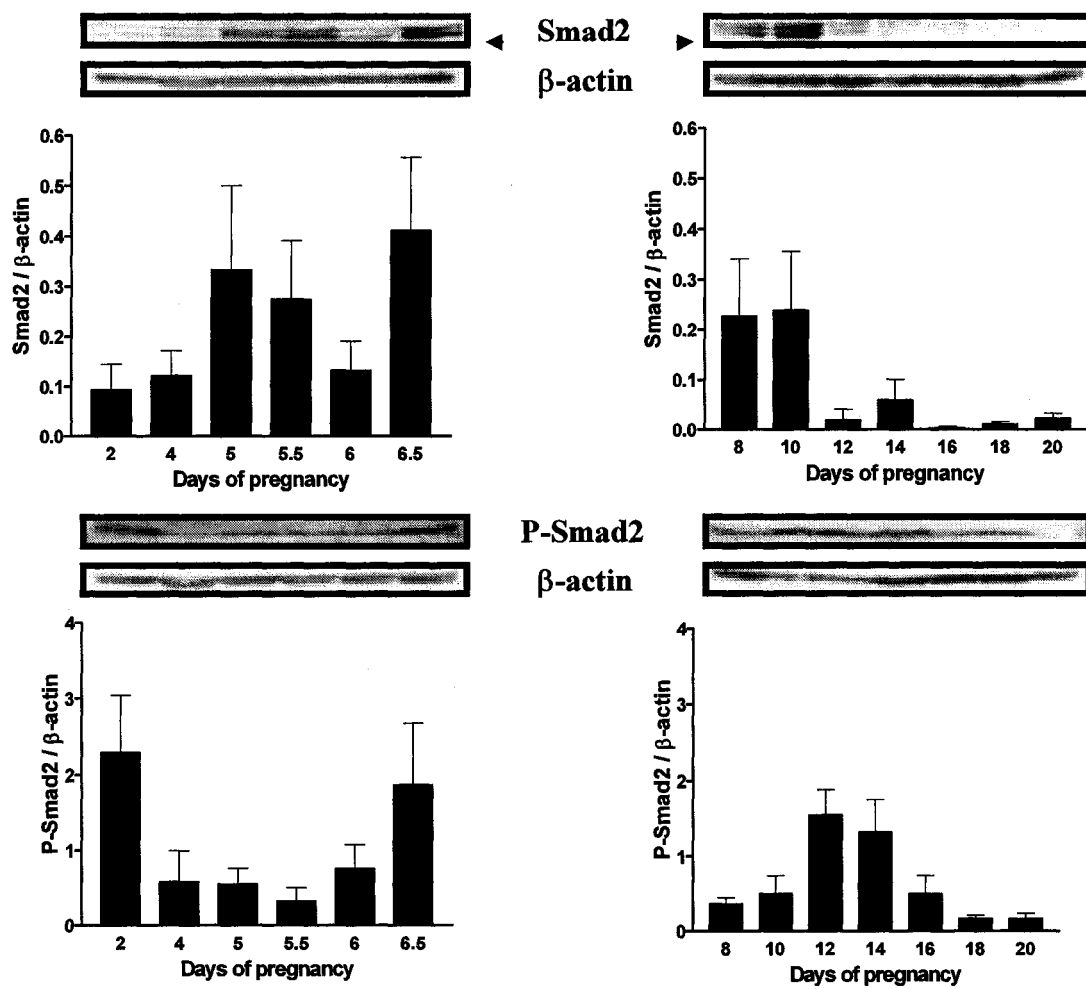


Figure 6; Shooner et al.

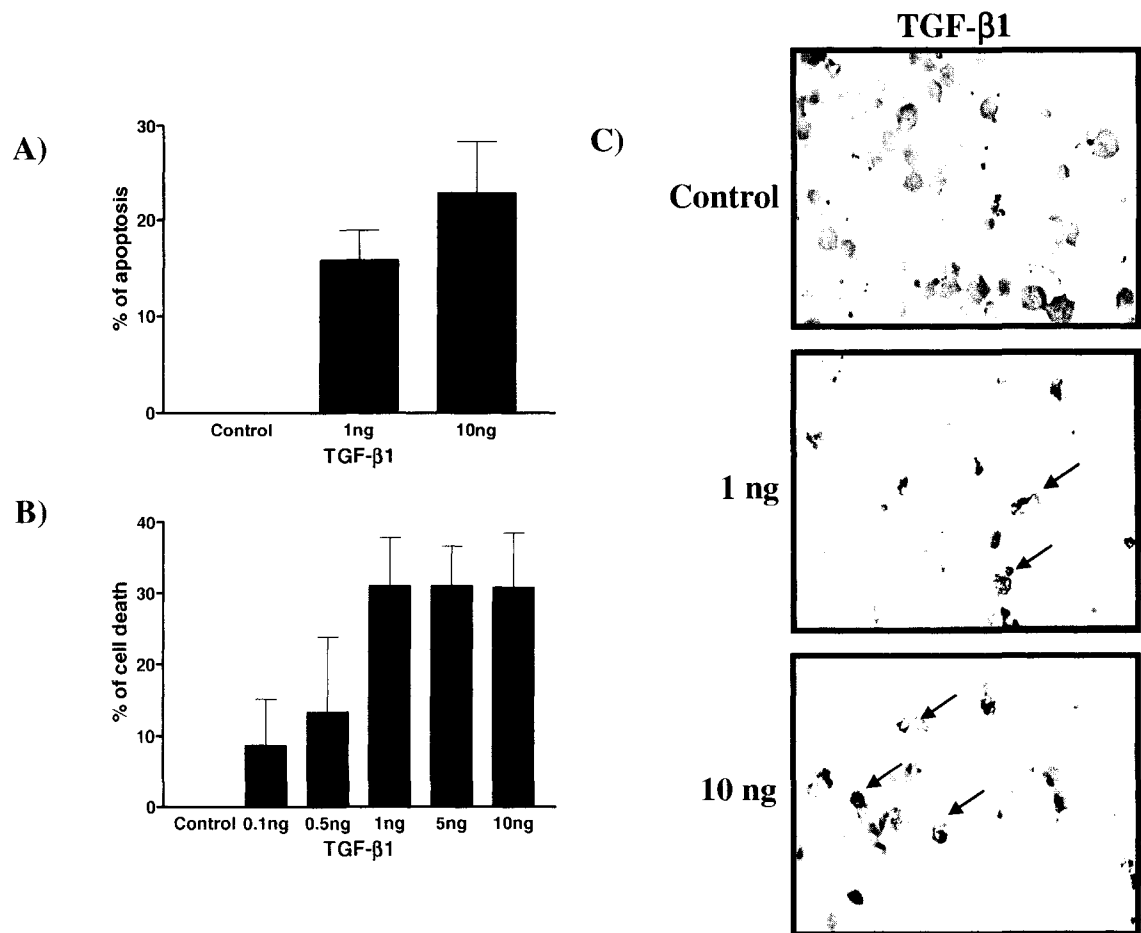


Figure 7; Shooner et al.

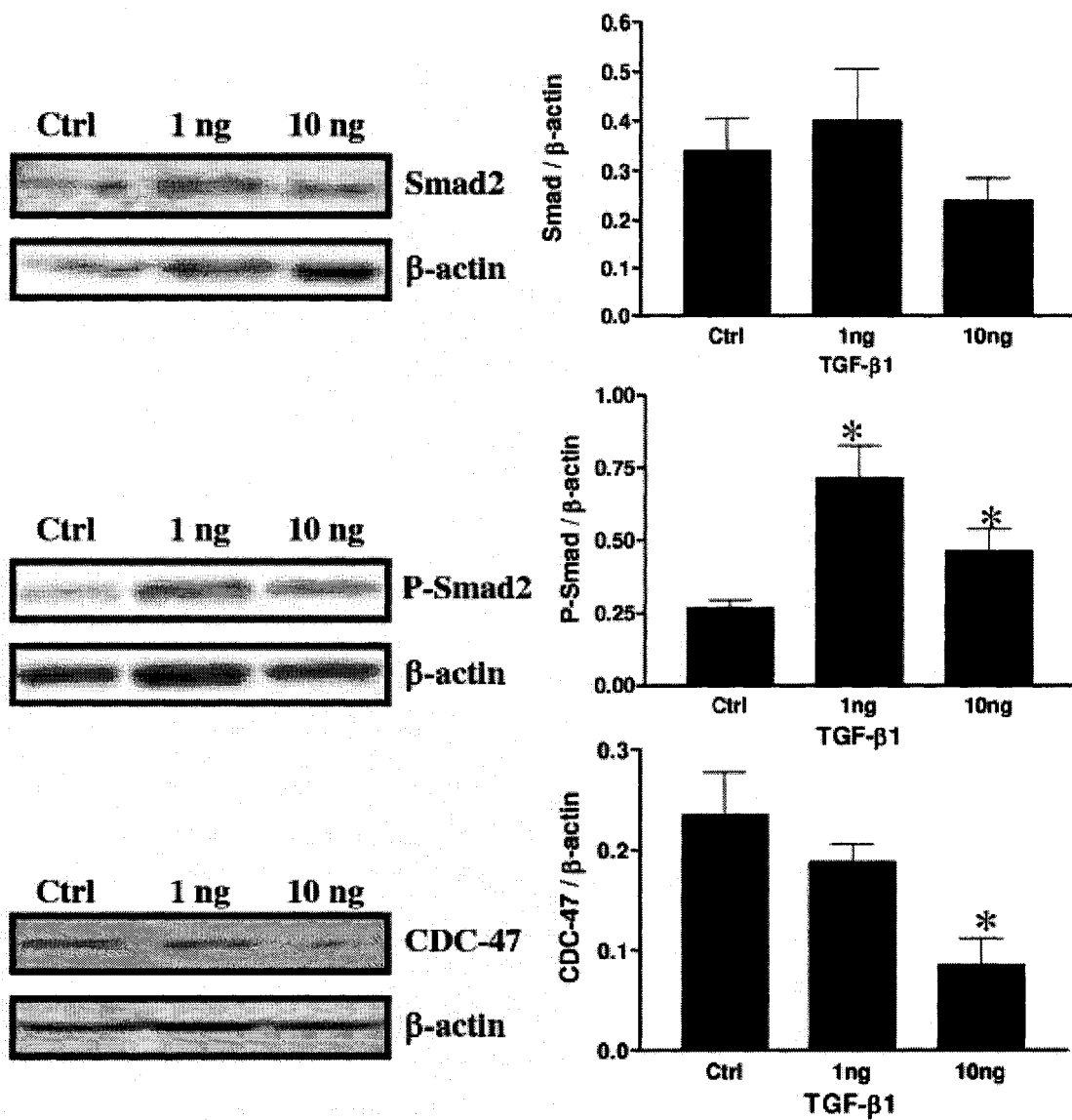


Figure 8; Shooner et al.

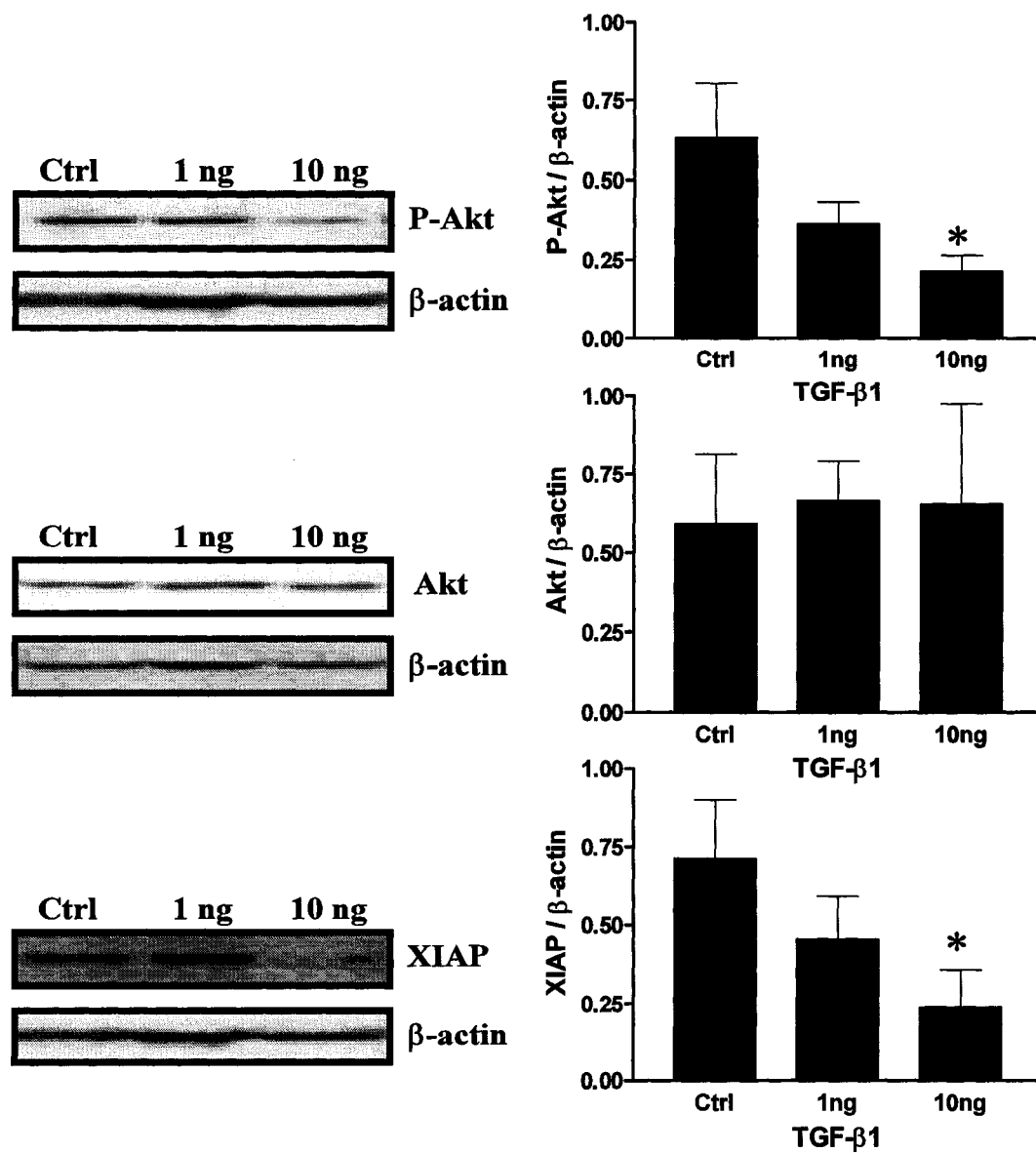


Figure 9; Shooner et al.

CHAPITRE III

TRANSFORMING GROWTH FACTOR- β 1, 2, 3 ISOFORMS INHIBIT AKT ACTIVITY, DOWNREGULATE XIAP LEVELS AND INDUCE APOPTOSIS IN RAT DECIDUAL CELLS

PRÉFACE

Les auteurs de cet article sont : (a) Pierre-Luc Caron qui a effectué les expérimentations, le traitement des données, la rédaction de l'article et a participé à la mise en place de la banque de protéines, (b) Guylaine Fréchette-Frigon qui a grandement participé aux ovariectomies, aux cultures cellulaires et à la banque de protéines ; (c) Carl Shooner qui a participé à la mise en place de la banque de protéines, a effectué la première partie de cette étude concernant le Transforming growth factor- β 1 sur des cultures de cellules déciduales (article déjà publié, Shooner et al 2005), (d) Valérie Leblanc qui a élaboré la banque de protéines provenant des utérus de rates pseudogestantes et qui a participé aux ovariectomies et aux cultures cellulaires (e) Dr Éric Asselin, qui est le directeur de cette recherche, a, par conséquent, élaboré cette étude, effectué la supervision des travaux ainsi que la révision de cet article.

RÉSUMÉ

Durant le cycle de reproduction (cycle oestral), l'endomètre utérin de la rate subit de nombreux changements morphologiques dont la prolifération cellulaire et la mort cellulaire programmée, ou apoptose, afin de créer un environnement propice pour l'implantation de l'embryon. Une fois l'implantation réussie, les cellules stromales prolifèrent et se différencient pour former les cellules déciduales. Vers la fin de la grossesse, ces cellules meurent par apoptose, permettant ainsi le développement de l'embryon dans la paroi utérine. La réussite de la grossesse dépend de ce processus étroitement régulé, nommé régression déciduale. Nous avons démontré récemment que les TGF- β 1, TGF- β 2 et TGF- β 3 sont exprimés dans l'endomètre durant la régression déciduale. Cependant, même si nous avons démontré que le TGF- β 1 est impliqué dans la régulation de l'apoptose des cellules déciduales, la manière dont les TGF- β 2 et TGF- β 3 déclenchent les mécanismes apoptotiques dans ces cellules demeure inconnue. De plus, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle les isoformes du TGF- β seraient aussi présents et régulés dans l'endomètre de la rate non-gestante lors du cycle oestral. L'objectif de cette étude est donc de déterminer et de comparer les effets spécifiques de chaque isoforme du TGF- β dans la régulation de l'apoptose des cellules déciduales *in vitro*, et d'étudier la régulation des différents TGF- β dans l'endomètre durant le cycle oestral *in vivo*. Nous avons donc utilisé un modèle *in vivo*, les rates cyclées. Les rates avec des cycles oestraux (de reproduction) réguliers (4 jours) ont été euthanasiées aux différents jours du cycle (diestrus, proestrus, estrus et metestrus). De plus, la décidualisation a été induite chez des rates ovariectomisées, lesquelles sont ensuite euthanasiées aux différents jours de la pseudogestation (jour 1 à 9). Les utérus ont été prélevés et 1) fixés pour des analyses d'immunohistochimie ou 2) les cellules endométriales ont été recueillies pour en extraire les protéines et les ARN pour des analyses de type Western blot et RT-PCR respectivement. Nos résultats ont démontré que les trois isoformes du TGF- β sont présents mais localisés différemment dans l'endomètre durant le cycle oestral et sont régulés différemment lors de la pseudogestation. Notre deuxième modèle, la culture cellulaire, a été obtenue à partir de

rates ovariectomisées et traitées avec du 17β -estradiol et de la progestérone afin d'induire la décidualisation. Au moment de la confluence, les cellules déciduales ont été traitées avec différentes doses de TGF- β 2 et de TGF- β 3 pour une période de 24 heures. Nous avons observé que le TGF- β 3 induit la phosphorylation de Smad2 indiquant que la voie des Smads est activée par le TGF- β 3 dans ces cellules. De plus, les TGF- β 2 et TGF- β 3 induisent une augmentation dose-dépendante de l'apoptose dans les cultures de cellules déciduales comme démontré par une coloration du noyau au Hoechst. Également, les isoformes du TGF- β diminuent la phosphorylation/activation de Akt, une protéine de survie cellulaire bien connue, d'une façon dose-dépendante. Ces résultats suggèrent que le TGF- β peut exercer un rôle important dans le remodelage de l'endomètre utérin durant le cycle oestral ainsi que dans la régulation de l'apoptose des cellules déciduales, dans laquelle l'inhibition de la voie de survie cellulaire de Akt peut être un important mécanisme contrôlant l'apoptose.

Transforming growth factor- β 1, 2, 3 isoforms inhibit Akt activity, downregulate XIAP levels and induce apoptosis in rat decidual cells[†]

Pierre-Luc Caron, Guylaine 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 : Expression of TGF- β in the rat endometrium.

Key words : Apoptosis, TGF- β , Smad, PI3-K/Akt, XIAP, estrous cycle, implantation, decidualization

*Corresponding Author : Eric Asselin, Ph.D.

Département de Chimie-Biologie

Section Biologie Médicale

Université du Québec à Trois-Rivières, C.P.500

Trois-Rivières, Québec, Canada G9A 5H7

E-mail : Eric.Asselin@uqtr.ca

[†] This work has been supported by a grant from NSERC (238501-01). Eric Asselin is a Chairholder of the Canada Research Chair in Molecular Gyneco-Oncology. We are grateful to Mrs Rollande Caron for the contribution of her precious time and expertise to our projects. We thank also Ms. Celine Van Themsche, Ph.D. for reviewing the manuscript.

Abstract

During the estrous cycle, the rat uterine endometrium undergoes many changes such as cell proliferation and apoptosis. If implantation occurs, stromal cells differentiate in decidual cells and near the end of pregnancy, a second wave of apoptosis occurs later. This process called decidual regression is tightly regulated as is it crucial for successful pregnancy. We have previously shown that TGF- β 1, TGF- β 2 and TGF- β 3 are expressed in the endometrium during decidual basalis regression, but although we had demonstrated that TGF- β 1 was involved in the regulation of apoptosis in decidual cells, the ability of TGF- β 2 and TGF- β 3 isoforms to trigger apoptotic mechanisms in these cells remains unknown. Moreover, we hypothesized that the TGF- β s were also present and regulated in the non-pregnant endometrium during the estrous cycle. The aim of the present study was to determine and compare the specific effect of each TGF- β isoform in the regulation of apoptosis in sensitized stromal cells *in vitro*, and to investigate the regulation of TGF- β isoforms in the endometrium during the estrous cycle *in vivo*. Rats with regular estrous cycle (4 days) were killed at different days of estrous cycle (diestrus, proestrus, oestrus and metestrus), pseudopregnancy was induced in ovariectomized rats and were killed at different days (days 1-9) and uteri were collected and either fixed for immunohistochemical staining (IHC) or processed for RT-PCR and Western analysis. Our results showed that all three TGF- β isoforms are present, but are localized differently in the endometrium during the estrous cycle and are regulated differently during pseudopregnancy. In cultured stromal cells, we found that TGF- β 3 isoform induced Smad2 phosphorylation, indicating that the Smad pathway is activated by TGF- β 3 in these cells. Furthermore, TGF- β 2 and TGF- β 3 induced a dose-dependant increase of apoptosis in cultured stromal cells, as demonstrated by Hoechst nuclear staining. Noteworthy, TGF- β 2 and TGF- β 3 reduced the level of the anti-apoptotic XIAP protein, as well as the level of phosphorylated/active Akt, a well known survival protein, in a dose-dependent manner. Those results suggest that TGF- β might play an important role in the remodelling endometrium during the estrous cycle and in the regulation of apoptosis in rat decidual cells, in which inhibition of Akt survival pathway might be an important mechanism involved in the regulation of apoptosis.

Introduction

During the pre-implantation period, the uterine endometrium undergoes morphological and histological changes including cell proliferation, differentiation and apoptosis to provide the best environment for embryo implantation. The sex steroids estrogen and progesterone are responsible for these changes during the estrous cycle. Estrogen stimulate cell proliferation whereas progesterone inhibits it (1-2). Luminal and glandular epithelium as well as stromal cells proliferate and degenerate in response to cyclic changes in serum steroids hormones (3-4). In absence of embryonic factors, endometrial cells undergo apoptosis or programmed cell death. However, when embryo implantation occurs, many changes begin in the endometrium in which stromal cells proliferate in response to estrogen and progesterone to form the decidual cells, a process called decidualization. (5-6). Near the end of the pregnancy, on day 14, the decidual cells regress by apoptosis, a phenomenon called decidual regression (5,7-8). Our group and others have shown apoptosis in the luminal epithelium at estrus in mice (4) and rats (9-11) during the estrous cycle; apoptosis was also found in stromal cells at diestrus in mice (4). We have previously shown that Akt, an important kinase involved in the control of endometrial cell proliferation, was decreased at estrus and was accompanied by an increase in apoptosis in luminal epithelial cells (10). Studies have shown that apoptosis is increased in the rat endometrium during the decidual regression (5,12-13). Although changes in uterine endometrium are regulated by steroids hormones (4), they are also regulated by growth factors, such as transforming growth factor- β (TGF- β).

Transforming growth factor- β was originally identified by its ability to induce a transformed phenotype in normal rat kidney fibroblasts in culture (14-16). TGF- β s are now known to be multifunctional proteins involved in many biological processes such as cell proliferation and differentiation, tissue remodelling, angiogenesis, immunoregulation and regulation of extracellular matrix (17-20). They are also inhibitors of cellular growth in many cell types (21). It has been shown that they induce

apoptosis (8) and it might be through the caspases pathway (22-23). Three TGF- β isoforms are found in mammals and their molecular weights are slightly different: TGF- β 1 (15 kDa), TGF- β 2 (12.5 kDa) and TGF- β 3 (12 kDa). They share 80% sequence homology and genes encoding these isoforms are located on different chromosomes (chromosomes 19, 1 and 14 for TGF- β 1, TGF- β 2 and TGF- β 3 respectively) (17,19,24). TGF- β are produced in an inactive form which is activated by proteolytic cleavage (25). Bioactive TGF- β signals through transmembrane serine/threonine kinase receptors to phosphorylate Smads proteins, the TGF- β intracellular effectors. Once activated, these proteins translocate to the nucleus, bind to DNA binding proteins and activate transcription of target genes (18,25). Loss of TGF- β -mediated growth inhibition contributes to the development and progression of tumors (21,26). The high degree of conservation of these isoforms among species and through evolution suggests an important regulation function (27). Indeed, it has been shown that all three TGF- β isoforms are differently expressed during embryogenesis (20,28), in porcine (29-30) and bovine (31) conceptus-maternal interface and in the mouse uterus (32). Moreover, we have shown in our laboratory that TGF- β isoforms efficiently inhibit cellular proliferation in human endometrial carcinoma cell lines and that TGF- β 3 increases invasiveness of endometrial carcinoma cells through PI 3-K upregulation of XIAP and protein kinase C induction of MMP-9 (33).

Chegini *et al* showed by immunohistochemical analysis (IHC) that TGF- β 1, TGF- β 2 and TGF- β 3 are expressed in the rat estrous cycle (34). Studies have also shown that apoptosis is increased during the decidual regression (5,12-13). TGF- β 1 and TGF- β 2 mRNA are expressed in mouse uterus during pregnancy (35-36), and TGF- β 1 and TGF- β 2 have been shown to induce apoptosis in human (37) and rat cultured (8) endometrial stromal cells. Recently, we showed that TGF- β isoforms are differently localized and regulated in endometrial cells of pregnant rats during implantation and decidual regression, and that TGF- β 1 is involved in the regulation of apoptosis in cultured decidual cells (38). Although the expression of TGF- β isoforms has been described in

uterus of pregnant rats, their expression during the estrous cycle and their effect on decidual cell regression remain to explore.

The aim of this study was to investigate and characterize the expression of all three TGF- β isoforms in the rat uterus during the estrous cycle and to determine *in vitro* the specific effect of TGF- β 2 and TGF- β 3 on apoptosis of decidual cells.

Materials and Methods

Reagents

TGF- β 1 (sc-146, lot # F262, 200 μ g/ml), TGF- β 2 (sc-90, lot # B202, 200 μ g/ml) and TGF- β 3 (sc-82, lot # A222, 200 μ g/ml) polyclonal antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc (Santa Cruz, CA, USA). CDC47/MCM7 antibody was obtained from Medicorp (Montréal, QC, Canada). Phospho-Akt (Ser 473), Akt, XIAP, and Phospho-Smad2 (Ser 465 / 467) antibodies were obtained from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA). Anti-Smad2 antibody was purchased from Zymed (San Francisco, CA, USA). β -actin antibody was purchased from Sigma-aldrich (St-Louis, Missouri, USA). Vectastain ABC Kit for rabbit IgG and NovaRed substrate were purchased from Vector Laboratories Inc. (Burlingame, CA, USA). Harris modified haematoxylin solution was obtained from Sigma-aldrich (St-Louis, Missouri, USA). TGF- β 2 recombinant protein was purchased from Biosource (Cat # PHG9114, lot # 19698-04S, 5 μ g, diluted at 50 μ g/ml, QC, Canada) and TGF- β 3 recombinant protein was purchased from Calbiochem (Cat # PF073, lot # D24438, 2 μ g, diluted at 50 μ g/ml, San Diego, CA, USA). 17 β -estradiol (E2) was purchased from Sigma-aldrich (St-Louis, Missouri, USA) and progesterone (P4) from Laboratoire Mat (Québec, QC).

Animals

Sprague-Dawley female rats, 200–225 g, were obtained from Charles River Laboratories Canada. Animals were maintained on standard chow and water, which were available *ad libitum*, in animal facilities illuminated on a normal 12 hour cycle. All procedures were performed in accordance with guidelines of the Canadian Council on Animal Care for the handling and training of laboratory animals and the Good Health and Animal Care Committee of the Université du Québec à Trois-Rivières. Stages of the estrous cycle were confirmed by vaginal smears. Rats with three regular cycles of four days were used in these experiments and killed at various stages of the estrous cycle (diestrus, proestrus, estrus, metestrus). Uteri were collected and fixed for immunohistochemical staining (IHC) or endometrial RNA and protein extracts collected by scraping the endometrium for RT-PCR and Western analysis. To induce pseudopregnancy, rats were ovariectomized for at least 10 days and then injected with E₂ and P₄ as described previously (39) : 1) 0.2 ug estradiol injection per day for three days (in the morning, day -2,-1 and 0); 2) On the third day (day 0 of pseudopregnancy), another injection in the afternoon of estradiol (0.2 µg) and progesterone (1 mg) was performed; 3) No treatment for the next day; 4) Injections of progesterone (4 mg) for two days (day 2 and 3 of pseudopregnancy); 5) Injections of estradiol (0.3 µg) and progesterone (4 mg) for one day (day 4 of pseudopregnancy); 6) Injections of estradiol (0.1 µg) and progesterone (4 mg) for 5 days (days 5 to 9 of pseudopregnancy); 7) Rats were killed on day 1, 3, 5, 7 and 9 of pseudopregnancy. Three different rats were used for each time of pseudopregnancy. Endometrial protein extracts were collected by scraping the endometrium for Western analysis. E₂ and P₄ were dissolved with sesame oil, and administered by subcutaneous injection.

Rat pretreatments and decidual endometrial stromal cell culture

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-3,17β-diol, Sigma-aldrich) and progesterone (Laboratoire Mat, PQ) to induce decidualization as described previously (40): 1) 0.2 ug estradiol injection

per day for three days (in the morning, day -2,-1 and 0); 2) On the third day (day 0 of pseudopregnancy), another injection in the afternoon of estradiol (0.2 µg) and progesterone (1 mg) was performed; 3) No treatment for 2 days (day 1 and 2 of pseudopregnancy); 4) Injections of estradiol (0.1 µg) and progesterone (4 mg) for three days (day 3, 4 and 5 of pseudopregnancy); 5) Another injection of estradiol (0.1 µg) in the afternoon on day 7 (day 4 of pseudopregnancy); 6) Rats were killed on day 8 (day 5 of pseudopregnancy). All endometrial stromal cells collected for cultures were recovered from rats treated with the protocol described above.

Uteri were removed and horns taken and immersed in HBSS solution containing HEPES (20 mM), penicillin (100 units/ml), streptomycin (100 µg/ml) and fungizone (1,25 µl/ml) (Invitrogen, ON, Canada). Further manipulations were performed in a sterile environment. The uterine horns were transferred into a sterile petri 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 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 mixed with 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 diluted with DMEM-F12 (pH 7.1) (Invitrogen, ON, Canada) containing 2.438 g/L NaHCO₃, 10% FBS D.C. and gentamycine 50 µg/ml. Cells were incubated at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂. Cells were plated in 6-well plates (Corning plates) at a density of 50% (4×10^5 cells per well). The medium was changed two hours after the first incubation in order to eliminate epithelial cell contamination from stromal cell cultures. The purity of stromal cells was

more than 97%: cell culture contamination with epithelial cells was evaluated by cellular morphology and immunofluorescence using a 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 TGF- β 2 and TGF- β 3 recombinant proteins. Total proteins from treated cell cultures were extracted using TRIZOL (Invitrogen, ON, Canada). For Western blot analyses, 10-15 μ g of total protein was used for each analysis.

Immunohistochemical staining

The uterus was fixed in 4% paraformaldehyde solution and embedded in paraffin. Tissue sections 7 μ m thick were mounted on polylysine-coated slides, deparaffinized, rehydrated, and then heated in 10 mM citrate buffer (pH 6) containing triton X-100 (Sigma-Aldrich) 0.1% (v/v). After two washes with PBS, slides were then incubated with 0.3 % hydrogen peroxide in methanol for 30 min to quench endogenous peroxidase activity. After washing with PBS, tissues were incubated with blocking serum (Vectastain ABC Kit) at room temperature for 1h. Then, a primary antibody diluted in blocking serum (TGF- β 1, β 2 or β 3; 1:50 dilution) was added to the slides and incubated at 4°C overnight in a humidified chamber. After washing 5 min. in PBS, tissue sections were incubated for 30 min. with 3 μ g/ml biotinylated antibody (anti-rabbit or anti-mouse). Subsequently, slides were washed with PBS and incubated with avidin-biotin complex reagent containing horseradish peroxidase for 30 min. Slides were washed with PBS for 5 min and color development was achieved using NovaRed substrate. The tissue sections were counterstained with haematoxylin. Negative controls were performed using the same protocol but without the presence of primary antibody.

mRNA extraction and semi-quantitative RT-PCR analysis

Endometrium from each uterus of cycling rats was scraped using a glass microscope slide and homogenized using a pipette in TRIZOL (Invitrogen, ON, Canada). mRNA extraction was performed according to the manufacturer's instructions and diluted in

RNAse-free water DEPC treated. In order to measure abundance of TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 mRNAs, primers were chosen as described below and tested with different primer concentrations. Total RNA (0.2 μ g/ μ l) was used for preparation of first strand cDNA by reverse transcriptase (RT). The RNA samples were incubated (65 $^{\circ}$ C, 10 min) with 2 μ l oligo dT (deoxythymidine) primers in a final volume of 10 μ l. Samples were then incubated (37 $^{\circ}$ C, 60 min) in 20 μ l of a reaction buffer (1x) containing dithiothreitol (DTT; 100 mM), deoxynucleotide triphosphates (dNTPs; 5 mM), and Muloney murine leukemia virus reverse transcriptase (MMLV-RT; 200 U/ μ l). After DNA synthesis, the reaction volumes were brought up to 60 μ l with autoclaved water. A negative control as also included, using the same reaction mixture but without RNA to ensure absence of any contaminating genomic DNA in the RNA template. Rat TGF- β 1 a 501pb mRNA (572-1072 bp) was amplified using sense primer 5'-CTGTCCAAACTAAGGCTCGC-3' and antisense primer 5'-ACTGAAGCGAAAGCCCTGTA-3'. For TGF- β 2 mRNA, the expression was determined by amplification of 707 bp (143-849 bp) and the sequence of the primers were 5'-ATCCTAGCCAGGGACGTTTT-3' (sense) and 5'-CGAAAGACCCTGAACTCTGC-3' (antisense). Expression of TGF- β 3 mRNA was determined by amplification of 681 bp (663-1343 bp). Amplification was carried out using the sense upstream sequence 5'GAAGGCTGCACTCAGGAAAC-3' and the antisense downstream sequence 5'-GCAGTTCTCCTCCAAGTTGC-3'. Bovine β -actin mRNA was amplified using sense primer 5'-GAGGATCTTCATGAGGTAGTCTGTCAGGTC-3' and antisense primer 5'-CAACTGGAACGACATGGAGAAGATCTGGCA-3'. Each reaction mixture (final volume 50:1) contains RT template or negative control (5:1), MgCl₂ (50 mM), primers (2,5:1 each), and Taq DNA polymerase (5 U/ μ l). The PCR cycling conditions (35 cycles) chosen were 30 sec at 94 $^{\circ}$ C, 30 sec at 58 $^{\circ}$ C (TGF- β 1 and TGF- β 2) and 55 $^{\circ}$ C (TGF- β 3) and 30 sec (TGF- β 1) and 1 min (TGF- β 2 and TGF- β 3) at 72 $^{\circ}$ C, followed by a 5 min extension at 72 $^{\circ}$ C. Reaction products were analyzed on 1.0% agarose gels. Bands were visualized by ethidium bromide staining. Densitometrical analyses were performed (protein of interest and β -actin) using the GelDoc 2000 and the Quantity One

software (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada). Results are expressed as a ratio (mRNA of interest/ β -actin) to correct for loading for each endometrial sample.

Protein extraction and Western analysis

Endometrium from each uterus of cycling and pseudopregnant rats was scraped using a glass microscope slide and homogenized using a pipette in TRIZOL (Invitrogen, ON, Canada). Protein extraction was achieved according to the manufacturer's instructions and diluted in 1% SDS. Homogenates were centrifuged to remove insoluble material. The supernatant was recovered and stored at -20°C pending analysis. Protein content was determined with the Bio-Rad DC Protein Assay. Protein extracts (50 μg) were heated at 94°C for 3 min, resolved by 12-15% SDS-PAGE and electrotransferred to nitrocellulose membranes using a semidry transfer (Bio-Rad, Mississauga, ON). The membranes were then blocked 2 h at room temperature with PBS containing 5 % milk powder, then incubated with TGF- β 1, TGF- β 3 1:750; TGF- β 2 1:2000; P-Smad2 (Ser 465 / 467) 1:1000; Smad2 1:1000; Akt 1:1000; Phospho-Akt 1:1000; XIAP 1:1500; CDC47/MCM7 1:1000 and cleaved caspases-3 1:1000 and subsequently with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse secondary antibody (1:3000; room temperature for 45 min). All membranes were stripped with Restore western blot stripping buffer (Pierce, # 21059, lot # FH71541), reprobed with an antibody specific to β -actin which was used as an internal standard. 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 analyses were performed (protein of interest and β -actin) using the GelDoc 2000 and the Quantity One software (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada). Results are expressed as a ratio (protein of interest/ β -actin) to correct for loading for each endometrial sample.

Hoechst nuclear staining

Following TGF- β treatment, both floating and attached cells were resuspended in PBS containing Hoechst 33258 for 24 hours at 4°C. Hoechst nuclear staining was viewed and photographed using a Olympus BX60 fluorescence microscope and a Coolsnap-Pro CF digital Camera (Carsen Group, ON, Canada). Cells with typical apoptotic nuclear morphology (nuclear shrinkage, condensation and fragmentation) were identified and counted using randomly selected fields on numbered photographic slides, of which the "counter" was not aware of the treatment, so as to avoid experimental bias. A minimum of 200 cells per treatment group were counted in each experiment.

Statistical analysis

Western analyses of cycling and pseudopregnant animals were repeated three to four times (3 to 4 different endometrial extract per day of pregnancy from 3 to 4 different rats). Endometrial extracts from each rat were assessed individually. Western analyses of cultured decidual cells were repeated 4 times for each TGF- β dose (for each culture experiment, decidual cells were recovered from a pool of ten different ovariectomized/treated rats). Results subjected to statistical analyses were expressed as mean \pm SEM. Data were subjected to one-way ANOVA (PRISM software version 4.0; GraphPad, San Diego, CA). Differences between experimental groups were determined by the Tukey's test.

Results

Regulation of TGF- β 1, β 2 and β 3 in the rat endometrium during the estrous cycle

To evaluate gene expression of TGF- β isoforms in rat endometrium during the estrous cycle, rat uteri were collected at each stage of the estrous cycle, total RNA was extracted and RT-PCR analysis was carried out using specific primers from rat DNA sequences. Our results showed that all three TGF- β isoforms were expressed throughout the estrous cycle. TGF- β 1 transcript levels tended to be higher at proestrus and estrus

(Fig. 1A). TGF- β 2 mRNA levels was similar at all days of estrous cycle, except at proestrus where it tended to decrease (Fig. 1B), and TGF- β 3 mRNA levels were significantly increased ($p < 0.05$) on diestrus compared to other stages of the cycle (Fig. 1C).

To characterize TGF- β protein expression in rat endometrium during the estrous cycle, Western Blot and immunohistochemical analysis was performed on lysate and uterine sections, respectively, of reproductive cycling rats. Western blot analyses confirm that TGF- β isoforms are present during the estrous cycle. TGF- β 1 protein levels tended to increase, although not significantly, during proestrus (Fig. 2A) as we observed with RT-PCR studies. The expression of TGF- β 2 proteins were increased during diestrus but decreased at estrus (Fig. 2B). TGF- β 3 proteins were expressed in a similar pattern as observed with mRNA expression; they were significantly increased during diestrus (Fig. 2C), suggesting a possible role for this isoform at diestrus.

As TGF- β 2 and TGF- β 3 seem to be regulated in a similar pattern, we have carried out immunohistochemical analysis to determine their localization into the non-pregnant endometrium (Fig. 3). TGF- β 2 and TGF- β 3 were found both in epithelial and stromal cells at all days of the reproductive cycle. However, it is interesting to observe that TGF- β 1 is also found at each days of the estrous cycle but only in the stromal cells (Fig. 3) suggesting that the action of TGF- β 1 might be limited to the stromal compartment.

Regulation of TGF- β s and apoptosis in the rat endometrium during pseudopregnancy

In order to determine if the expression of TGF- β isoforms in the endometrium during pregnancy is dependent on the presence of a conceptus, we performed western blot analysis on endometrial protein extracts from pseudopregnants rats. TGF- β 1 expression

was detected at all days of pseudopregnancy without significant difference and levels tended to increase on days 5 (implantation) and was maximal at day 9 (Fig. 4A). TGF- β 2 was present only from day 7 of pseudopregnancy where its expression increased strongly on day 9 (Fig. 4B). However, TGF- β 3 was not expressed during pseudopregnancy (Fig. 4C) suggesting that it may not be involved during early pregnancy.

It has been shown that apoptosis of epithelial endometrial cells is required for embryo implantation (13). To determine the presence of apoptosis in the endometrium during pseudopregnancy, we have measured the levels of cleaved caspase-3, a well known executioner of apoptosis (41). Our results show that cleaved caspase-3 is increased from day 5, day at which embryo implantation occurs, to day 9 of pseudopregnancy (Fig. 4D), indicating that apoptosis can occur during the implantation period in the absence of embryonic factors.

Effect of TGF- β 2 and TGF- β 3 on P-Akt and XIAP protein levels in decidual cells

We have previously shown that TGF- β 1 down-regulates p-Akt (phosphorylated/activated form of the cell survival factor Akt) and XIAP (x-linked inhibitor of apoptosis) levels in rat decidual cells (38). To determine the effect of TGF- β 2 and TGF- β 3 isoforms on the expression of cell survival protein, such as Akt and XIAP, and to further characterize the relationship between TGF- β and PI3-K/Akt pathways in decidual cells, Western blot analysis was performed on cultured decidual stromal cells treated with different doses of TGF- β 2 and TGF- β 3. The results showed that total Akt protein level is not influenced by TGF- β 2 and TGF- β 3 treatments and no significant variation was observed (Fig. 5A and 6A, respectively). However, phosphorylated Akt (p-Akt), the active form of Akt, was decreased in a dose-dependent manner in response to TGF- β 2 and TGF- β 3 treatments (Fig. 5B and 6B respectively), suggesting an interaction between TGF- β isoforms and PI3-K/Akt pathway in these cells. TGF- β has been reported to regulate XIAP levels in several cell types such as in endometrial carcinoma cells (33), and we investigated whether down-regulation of Akt

survival pathway activity in rat decidual cells by TGF- β 2 and TGF- β 3 was accompanied by a decrease in the levels of anti-apoptotic XIAP protein. Similar to TGF- β 1, which we previously shown to reduce XIAP levels in rat cultured decidual cells (38), we found that XIAP levels were also reduced in a dose-dependent manner in response to TGF- β 2 and TGF- β 3 treatments (Fig. 5C and 6C respectively).

TGF- β 3 activates Smad2 in rat decidual cells

Smads proteins are known so far to be the TGF- β type I receptor substrates that elicit signalling function in response to TGF- β (25). Western blot analysis was carried out to determine the intracellular mechanism of TGF- β isoforms action in rat decidual cells, and we specifically investigated Smad signalling components. Figure 7 show that there is no significant difference in the expression of Smad2 protein tended in response to TGF- β 2 treatment (Fig. 7A) whereas it was not influenced by TGF- β 3 treatment (Fig. 8A). Phospho-Smad2, the activated form of Smad2 protein, is reduced in the 10 ng / ml dose compared to control and 1ng / ml dose (Fig. 7B). However, P-Smad2 is significantly increased in response to TGF- β 3 treatment (Fig. 8B), indicating that TGF- β 3 triggers Smad signalling in rat decidual cells, notably involving Smad2.

TGF- β 2 and β 3 isoforms effect on decidual endometrial stromal cell fate

Transforming growth factor-beta isoforms are multifunctional proteins involved in many cellular processes like cell proliferation, differentiation and apoptosis and these actions are tissue-specific (17). We have previously determined that TGF- β 1 decreased decidual cell proliferation (38). We have performed Western blot analysis using CDC-47, a cell proliferation marker, to determine the proliferative action of the TGF- β 2 and TGF- β 3 isoforms on decidual stromal cells. Results show that CDC-47 levels were not significantly modulated in response to TGF- β 2 and TGF- β 3 treatments (Fig. 9A and B) suggesting that TGF- β 2 and TGF- β 3 do not influence decidual cell growth.

It was already demonstrated that TGF- β induces apoptosis in rat endometrium (8). To evaluate whether TGF- β 2 and TGF- β 3 induce apoptosis in rat decidual cells, we have carried out Hoechst nuclear staining on cultured decidual cells treated with different doses of TGF- β 2 and TGF- β 3. Our results demonstrate that both TGF- β isoforms induced apoptosis in a dose-dependent manner (Fig. 9C and D). Moreover, DNA fragmentation showed an increase of apoptosis in a dose-dependant manner in response to TGF- β s isoforms (data not shown).

Discussion

Although TGF- β isoforms have been shown to be regulated in the rat endometrium during pregnancy (38), little is known about their expression during the estrous cycle and their action on endometrial decidual cell regression. The aim of this study was to investigate and characterize the expression of TGF- β isoforms in the rat endometrium throughout the estrous cycle and during pseudopregnancy and to determine the specific effect of TGF- β 2 and TGF- β 3 *in vitro* on rat endometrial decidual cell fate. The present results revealed that TGF- β isoforms are differently regulated during the estrous cycle and pseudopregnancy and they mediate apoptosis of decidual cells.

During the estrous cycle, the uterine endometrial cells undergo proliferation, differentiation and apoptosis in response to the steroids hormones, estrogen and progesterone, to create a suitable environment for blastocyst implantation (42). Moreover, a complex, precise, and highly interactive array of biological communication pathways involving the action of steroids in concert with local growth factors and cytokines is required to orchestrate the controlled growth and differentiation of the endometrial cells in the uterus (43). TGF- β isoforms are known to be implicated in diverse physiological processes and they regulate cell proliferation, differentiation and

apoptosis. Since all of these events take place in the endometrium during the estrous cycle (44), TGF- β isoforms must be an important growth factor involved during the reproductive cycle. We have thus characterized the expression of TGF- β in the endometrium of cycling rats. Our results show that the three mammalian TGF- β isoforms are present during all stage of the estrous cycle, which is consistent with a previous study that showed, using immunohistochemical analysis that TGF- β isoforms are expressed in rat endometrium during the cycle (34). It is known that apoptosis is present in rat endometrium during the estrous cycle (9) and that TGF- β induce apoptosis in rat endometrial stromal cells (8). In the present study, TGF- β 1 expression tended to be increased during proestrus even though no significant difference was observed and it was localized only in stromal cells suggesting a role for this isoform in the remodelling of stromal tissue. On the other hand, we have demonstrated that TGF- β 2 and TGF- β 3 expression was increased during diestrus, which is in accordance with the results of Chegini et al (34), and they were localized in both epithelial and stromal cells suggesting that these two isoforms might be necessary to induce apoptosis in stromal cells during diestrus stage. This result is in accordance with a previous study that showed that apoptosis was increased in stromal cells during diestrus in the mouse (4). However, we and other have previously shown the presence of apoptosis in rat uterine epithelial cells at estrus (10, 45), but we found no increase in TGF- β levels during estrus suggesting that TGF- β 2 and TGF- β 3 might be involved in cellular processes other than apoptosis in rat epithelial endometrial cells during the estrous cycle; alternatively, downstream components of TGF- β receptor could be differently regulated in distinct cells of the same tissue resulting in increased sensitivity to TGF- β induced apoptosis in rat stromal endometrial cells during diestrus.

The high levels of TGF- β 2 and TGF- β 3 at diestrus are correlated with elevated levels of serum progesterone at this time. Indeed, Dharma et al (4) showed in the uterine endometrium of the mouse that serum progesterone levels were high during metestrus, the day before diestrus. Moreover, studies showed that estrogen induces uterine

epithelial cell proliferation and estrogen withdrawal results in cell death (10,46), which might suggest that epithelial cell apoptosis in the uterine endometrium is regulated by estrogen while stromal cell apoptosis might be regulated by progesterone (4). Since some evidence suggests that steroid action stimulates the local production of growth factors and their receptors (47-48) and that growth factors have been implicated in mediating the action of steroid hormones (47-49), TGF- β might play a similar role in the induction of progesterone-mediated apoptosis during the estrous cycle. A recent study showed that Smad2, a component of the TGF- β intracellular signaling pathway, was highly expressed in the luminal and glandular epithelium at diestrus and proestrus while it was decreased at estrus and metestrus (50) suggesting that TGF- β might play an important role through Smad2 in tissue remodelling in the cycling rat endometrium.

Other roles than apoptosis induction can be suggested for TGF- β during the estrous cycle. It has been shown that TGF- β is a potent chemoattractant for monocyte-derived macrophages (19,20). Phagocytic macrophages are known to be a major source of MMPs during tissue remodelling and repair. This suggests a role for TGF- β in the elimination of dead cells before the next cycle (the next ovulation) and in wound repair. Furthermore, it has been shown that matrix metalloproteinase (MMP), an important class of proteases involved in endometrial remodelling, was present in the rat endometrium during the estrous cycle; the presence of MMP-3, MMP-9 and MMP-13 (primary source of collagenase activity first associated with uterine involution) has been demonstrated in the stromal cells of non-pregnant rat endometrium, while epithelial cell-specific MMP-7 (first MMP protein linked to matrix remodelling in the rodent uterus) has also been demonstrated in the non-pregnant rat uterus (43). A previous study showed that MMP-7 mRNA levels were dependent on the estrous cycle and it was 3 to 4 fold higher at estrus and diestrus compared to metestrus (51). Both TGF- β and MMPs are recognized to have an action on tissue remodelling, and TGF- β might act through the regulation of MMP activity; in fact, it has been shown that TGF- β play an important role in the regulation of MMP production in the endometrium during the menstrual cycle in women (43, 52). However, little is known about the interaction between TGF- β and matrix

metalloproteinase in the remodelling uterus in cycling rats and further investigations have to be carried out.

During early pregnancy, uterine endometrium is alternatively remodelled by sex steroid and growth factors to allow embryo implantation and then decidual regression near the end of pregnancy. Apoptosis has been shown to occur during these two important processes (5,8,13). Several growth factors are produced and secreted by both conceptus and maternal uterine tissues in embryo-endometrial interactions during implantation and decidual regression. We have previously demonstrated that TGF- β isoforms are present and expressed differently in the rat endometrium during pregnancy (38). Since the induction of TGF- α gene expression has been shown to be independent of the conceptus (53), we hypothesized that it might be similar for TGF- β . Using the rat pseudopregnancy model, which involves pregnancy-like remodelling of the endometrium following exposure to steroid hormones, we showed that TGF- β isoforms are differently expressed and regulated in rat endometrial cells during pseudopregnancy in a pattern similar to pregnant uterus (38). Notably, we have demonstrated that TGF- β 1 was present in all days of pseudopregnancy but its expression was increased on day 5, day at which embryo implantation occurs, and on was maximal on day 9 in a similar pattern as compared to normal pregnancy (38), strengthening our hypothesis that TGF- β 1 might be involved in the regulation of apoptosis during embryo implantation and decidual regression, without the need for signals from the embryo. TGF- β 2 levels were shown to be elevated only on day 9 of pseudopregnancy, and TGF- β 3 has not been detected during pseudopregnancy, similarly to what was observed during normal pregnancy (38), confirming that this isoform does not play a crucial role during early pregnancy. This result is also supported by a previous work demonstrating that TGF- β 3 was absent during early pregnancy in the mouse (32). Altogether, our results indicate that TGF- β isoforms expression is independent of the conceptus (embryonic factors) and it might be regulated by steroid hormones. Moreover, this differential expression of TGF- β isoforms in the uterus suggests distinctive functions of these growth factors during early pregnancy.

Our results also show that apoptosis is induced during pseudopregnancy. We have demonstrated that cleaved caspase-3, a well known executioner of apoptosis (41), was present in days 5 to 9 of pseudopregnancy. Its levels were increased in a similar pattern than what was observed during pregnancy (38) from day 5, day at which embryo implantation occurs, to day 9 of pseudopregnancy, indicating that the caspases pathway might be an important mechanism of cell death involved in implantation and decidual regression.

Akt kinase is a key regulator of cell fate in numerous cell types, including endometrial cells (10); since TGF- β signalling pathway component Smad3 can directly interact with Akt (53), we hypothesized that a crosstalk between TGF- β and PI3-K/Akt signalling pathways could occur in decidual cells which could dictate cell fate during pregnancy. It is already known that TGF- β 1 induce apoptosis in human (37) and rat (8) endometrial stromal cells, and we have demonstrated in a previous work that TGF- β 1 regulates the activity of PI3-K/Akt pathway, inducing a decrease of Akt phosphorylation through a mechanism involving Smad2 activation (38). The present study shows that, similar to TGF- β 1 (38), TGF- β 3 induces the phosphorylation/activation of Smad2 and decreases Akt phosphorylation/activation in a dose-dependant manner, and that TGF- β 2 also decreases Akt phosphorylation, although in a Smad2-independent fashion. It is possible that upon binding to its ligand TGF- β 2, TGF- β receptor signals through Smad3 rather than Smad2; indeed, a recent study showed that Akt interacts directly with Smad3 to regulate the sensitivity to TGF- β -induced apoptosis (55), and we hypothesize that TGF- β 2 might decrease P-Akt levels through Smad3 activation in rat decidual cells. Moreover, the reduction of Akt phosphorylation in response to TGF- β 2 and TGF- β 3 suggest that inhibition of Akt activity might be an important mechanism by which these TGF- β isoforms induce apoptosis in rat decidual cells.

Recent studies have shown the important interaction between Akt and XIAP, a well known inhibitor of caspases. It was shown that Akt phosphorylation is regulated by

XIAP in human ovarian epithelial cancer cells (56) and in rat granulosa cells (57) and that phosphorylated Akt is affected by the presence of cIAP-1 in endometrial cancer cells (58). We have previously shown that TGF- β 1 reduced XIAP protein levels in rat decidual cells, suggesting the presence of a functional link between these two proteins (38). Here, we show that, in response to TGF- β 2 and TGF- β 3, XIAP levels are decreased in a dose-dependant manner. Studies have shown that XIAP can act as a cofactor in the TGF- β signalling pathway (22, 59). Downregulation of the anti-apoptotic factor XIAP is accompanied by a modest but significant induction of apoptosis in rat decidual cells exposed to TGF- β 2 and TGF- β 3, suggesting that XIAP can inhibit apoptotic mechanisms in rat decidual cells.

A study showed that TGF- β 1 and TGF- β 2 treatments on cultured stromal cells induce apoptosis (8). In this paper, we show that TGF- β 2 and TGF- β 3 have no effect on the expression of CDC-47, a proliferation cell marker, suggesting that these isoforms do not modulate cell proliferation of endometrial decidual cells although they weakly induce apoptosis in a dose-dependant manner as demonstrated by Hoechst nuclear staining. This is a surprising observation, since increased apoptosis is usually accompanied by a decrease in cellular proliferation marker levels. It is possible that other proliferation markers different than CDC47 would be more relevant to decidual cells, such as the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) (60). Moreover, the weak increase of apoptosis observed with Hoechst staining might be accompanied by other types of cell death such as autophagy, mitotic catastrophe or senescence. Indeed, TGF- β has been showed to induce senescence phenotype or to have a cytostatic action (cell cycle arrest) on mammalian tissues (61).

Further investigation is needed to better understand the interaction between TGF- β s and PI3-K/Akt pathway. Since we have demonstrated that the pro-apoptotic protein Smac/DIABLO is regulated during the estrous cycle in the rat endometrium (11) and since Akt has been shown to activate NF- κ B signalling pathway (62), it will be

necessary to determine how these factors might be involved in the regulation of TGF- β -mediated apoptosis of decidual cells.

Conclusion

Taken together, these results show that the three TGF- β isoforms are expressed and differently localized in the epithelial and stromal cells during the estrous cycle, and that they are differently regulated during pseudopregnancy in a steroid hormone-dependent manner. Moreover, this study shows that TGF- β signalling plays an important role in the remodelling of rat endometrium by modulating the activity of PI 3-K/Akt survival pathway, down-regulating the anti-apoptotic XIAP levels and inducing apoptosis in decidual cells. Future experiments will aim at better characterize the underlying mechanisms such as the possible interaction between TGF- β 2 and Smad3 protein in the TGF- β -mediated apoptosis and the mechanism by which TGF- β and Smads transducer proteins interact with PI 3-K/Akt survival pathway to induce apoptosis. Additional investigations will allow us to determine the presence of other type of programmed cell death such as autophagy, senescence and mitotic catastrophe and how they are involved in the rat endometrial decidual cell death.

Acknowledgements

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. Graham JD, Clarke CL: **Physiological action of progesterone in target tissues.** *Endocr Rev* 1997, **18**:502-19.
2. Martin L, Das RM, Finn CA: **The inhibition by progesterone of uterine epithelial proliferation in the mouse.** *J Endocrinol* 1973, **57**:549-54.
3. Mendoza-Rodriguez CA, Monroy-Mendoza MG, Morimoto S, Cerbon MA: **Pro-apoptotic signals of the bcl-2 gene family in the rat uterus occur in the night before the day of estrus and precedes ovulation.** *Mol Cell Endocrinol* 2003, **208**:31-9.
4. Dharma SJ, Kholkute SD, Nandedkar TD: **Apoptosis in endometrium of mouse during estrous cycle.** *Indian J Exp Biol* 2001, **39**:218-22.
5. Abrahamsohn PA, Zorn TM: **Implantation and decidualization in rodents.** *J Exp Zool* 1993, **266**:603-628.
6. Nuttall RK, Kennedy TG: **Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor increase the production of matrix metalloproteinases during in vitro decidualization of rat endometrial stromal cells.** *Endocrinology* 2000, **141**:629-36.
7. Welsh AO: **Uterine cell death during implantation and early placentation.** *Microsc Res Tech* 1993, **25**:223-245.
8. Moulton BC: **Transforming growth factor-beta stimulates endometrial stromal apoptosis in vitro.** *Endocrinology* 1994, **134**:1055-1060.

9. Sato T, Fukazawa Y, Kojima H, Enari M, Iguchi T, Ohta Y: **Apoptotic cell death during the estrous cycle in the rat uterus and vagina.** *Anat Rec* 1997, **248**:76-83.
10. Dery MC, Leblanc V, Shoener C, Asselin E: **Regulation of Akt expression and phosphorylation by 17beta-estradiol in the rat uterus during estrous cycle.** *Reprod Biol Endocrinol* 2003, **1**:47.
11. Leblanc V, Dery MC, Shoener C, Asselin E: **Opposite regulation of XIAP and Smac/DIABLO in the rat endometrium in response to 17beta-estradiol at estrus.** *Reprod Biol Endocrinol* 2003, **1**:59.
12. Gu Y, Jow GM, Moulton BC, Lee C, Sensibar JA, Park-Sarge OK, Chen TJ, Gibori G: **Apoptosis in decidual tissue regression and reorganization.** *Endocrinology* 1994, **135**:1272-1279.
13. Pampfer S, Donnay I: **Apoptosis at the time of embryo implantation in mouse and rat.** *Cell Death Differ* 1999, **6**:533-545.
14. Moses HL, Branum EL, Proper JA, Robinson RA: **Transforming growth factor production by chemically transformed cells.** *Cancer Res* 1981, **41**:2842-8.
15. Roberts AB, Anzano MA, Lamb LC, Smith JM, Sporn MB: **New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981, **78**:5339-43.
16. Roelen BA, Lin HY, Knezevic V, Freund E, Mummery CL: **Expression of TGF-beta s and their receptors during implantation and organogenesis of the mouse embryo.** *Dev Biol* 1994, **166**:716-28.

17. Massague J: **The transforming growth factor-beta family.** *Annu Rev Cell Biol* 1990, **6**:597-641.
18. Massague J: **TGF-beta signal transduction.** *Annu Rev Biochem* 1998, **67**:753-91.
19. Barnard JA, Lyons RM, Moses HL: **The cell biology of transforming growth factor beta.** *Biochim Biophys Acta* 1990, **1032**:79-87.
20. Attisano L, Wrana JL, Lopez-Casillas F, Massague J: **TGF-beta receptors and actions.** *Biochim Biophys Acta* 1994, **1222**:71-80.
21. Hu PP, Datto MB, Wang XF: **Molecular mechanisms of transforming growth factor-beta signaling.** *Endocr Rev* 1998, **19**:349-63.
22. Herrera B, Fernandez M, Benito M, Fabregat I: **cIAP-1, but not XIAP, is cleaved by caspases during the apoptosis induced by TGF-beta in fetal rat hepatocytes.** *FEBS Lett* 2002, **520**:93-96.
23. Inman GJ, Allday MJ: **Apoptosis induced by TGF- β 1 in Burkitt's lymphoma cells is caspase 8 dependent but is death receptor independent.** *J Immunol* 2000, **165**:2500-2510.
24. Govinden R, Bhoola KD: **Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-beta.** *Pharmacol Ther* 2003, **98**:257-65.
25. Lutz M, Knaus P: **Integration of the TGF- β pathway into the cellular signalling network.** *Cell Signal* 2002, **14**:977-988.
26. Hata A, Shi Y, Massague J: **TGF-beta signaling and cancer: structural and functional consequences of mutations in Smads.** *Mol Med Today* 1998, **4**:257-62.

27. Yingling JM, Wang XF, Bassing CH : **Signaling by the transforming growth factor-beta receptors.** *Biochim Biophys Acta* 1995, **1242**:115-36.
28. Pelton RW, Saxena B, Jones M, Moses HL, Gold LI : **Immunohistochemical localization of TGF beta 1, TGF beta 2, and TGF beta 3 in the mouse embryo: expression patterns suggest multiple roles during embryonic development.** *J Cell Biol* 1991, **115**:1091-105.
29. Gupta A, Ing NH, Bazer FW, Bustamante LS, Jaeger LA: **Beta transforming growth factors (TGFss) at the porcine conceptusmaternal interface. Part I: expression of TGFbeta1, TGFbeta2, and TGFbeta3 messenger ribonucleic acids.** *Biol Reprod* 1998, **59**:905-910.
30. Gupta A, Dekaney CM, Bazer FW, Madrigal MM, Jaeger LA: **Beta transforming growth factors (TGFbeta) at the porcine conceptus-maternal interface. Part II: uterine TGFbeta bioactivity and expression of immunoreactive TGFbetas (TGFbeta1, TGFbeta2, and TGFbeta3) and their receptors (type I and type II).** *Biol Reprod* 1998, **59**:911-917.
31. Munson L, Wilhite A, Boltz VF, Wilkinson JE: **Transforming growth factor beta in bovine placentas.** *Biol Reprod* 1996, **55**:748-55.
32. Das SK, Flanders KC, Andrews GK, Dey SK: **Expression of transforming growth factor-beta isoforms (beta 2 and beta 3) in the mouse uterus: analysis of the periimplantation period and effects of ovarian steroids.** *Endocrinology* 1992, **130**:3459-3466.

33. Van Themsche C, Mathieu I, Parent S, Asselin E: **Transforming growth factor-beta3 increases the invasiveness of endometrial carcinoma cells through phosphatidylinositol 3-kinase-dependent upregulation of X-linked inhibitor of apoptosis and protein kinase C-dependent induction of matrix metalloproteinase-9.** *J Biol Chem* 2006, sous presse.
34. Chegini N, Gold LI, Williams RS: **Localization of transforming growth factor beta isoforms TGF-beta 1, TGF-beta 2, and TGF-beta 3 in surgically induced endometriosis in the rat.** *Obstet Gynecol*. 1994, **83**:455-61.
35. Tamada H, McMaster MT, Flanders KC, Andrews GK, Dey SK: **Cell type-specific expression of transforming growth factor-beta1 in the mouse uterus during the periimplantation period.** *Mol Endocrinol* 1990, **4**:965-972.
36. Manova K, Paynton BV, Bachvarova RF: **Expression of activins and TGF beta 1 and beta 2 RNAs in early postimplantation mouse embryos and uterine decidua.** *Mech Dev* 1992, **36**:141-152.
37. Chatzaki E, Kouimtzoglou E, Margioris AN, Gravanis A: **Transforming growth factor beta1 exerts an autocrine regulatory effect on human endometrial stromal cell apoptosis, involving the FasL and Bcl-2 apoptotic pathways.** *Mol Hum Reprod* 2003, **9**:91-95.
38. Shooner C, Caron PL, Frechette-Frigon G, Leblanc V, Dery MC, Asselin E : **TGF-beta expression during rat pregnancy and activity on decidual cell survival.** *Reprod Biol Endocrinol* 2005, **3**:20.
39. Kennedy TG, Ross HE : **Temporal- and hormone-dependent changes in uterine sensitization for the decidual cell reaction and decidualization in vitro of rat endometrial stromal cells.** *J Reprod Fertil* 1997, **109**:129-36.

40. Kennedy TG, Ross HE: **Effect of prostaglandin E2 on rate of decidualization in rats.** *Prostaglandins* 1993, **46**:243-250.
41. Cohen GM: **Caspases: the executioners of apoptosis.** *Biochem J* 1997, **326**:1-16.
42. Erickson GF, Fuqua L, Shimasaki S : **Analysis of spatial and temporal expression patterns of bone morphogenetic protein family members in the rat uterus over the estrous cycle.** *J Endocrinol* 2004, **182**:203-17.
43. Curry TE Jr, Osteen KG: **The matrix metalloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle.** *Endocr Rev* 2003, **24**:428-65.
44. Godkin JD, Dore JJ: **Transforming growth factor beta and the endometrium.** *Rev Reprod* 1998, **3**:1-6.
45. Lai MD, Lee LR, Cheng KS, Wing LY: **Expression of proliferating cell nuclear antigen in luminal epithelium during the growth and regression of rat uterus.** *J Endocrinol* 2000, **166**:87-93.
46. Finn CA, Publicover M: **Hormonal control of cell death in the luminal epithelium of the mouse uterus.** *J Endocrinol.* 1981, **91**:335-40.
47. Giudice LC : **Growth factors and growth modulators in human uterine endometrium: their potential relevance to reproductive medicine.** *Fertil Steril* 1994, **61**:1-17.
48. Ignar-Trowbridge DM, Nelson KG, Bidwell MC, Curtis SW, Washburn TF, McLachlan JA, Korach KS: **Coupling of dual signaling pathways: epidermal growth factor action involves the estrogen receptor.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, **89**:4658-62.

49. Piva M, Flieger O, Rider V : **Growth factor control of cultured rat uterine stromal cell proliferation is progesterone dependent.** *Biol Reprod* 1996, **55**:1333-42.
50. Lin HY, Wang HM, Li QL, Liu DL, Zhang X, Liu GY, Qian D, Zhu C: **Expression of Smad2 and Smad4, transforming growth factor-beta signal transducers in rat endometrium during the estrous cycle, pre-, and peri-implantation.** *Anim Reprod Sci* 2004, **80**:303-316.
51. Wolf K, Sandner P, Kurtz A, Moll W: **Messenger ribonucleic acid levels of collagenase (MMP-13) and matrilysin (MMP-7) in virgin, pregnant, and postpartum uterus and cervix of rat.** *Endocrinology*. 1996, **137**:5429-34.
52. Bruner KL, Rodgers WH, Gold LI, Korc M, Hargrove JT, Matrisian LM, Osteen KG: **Transforming growth factor beta mediates the progesterone suppression of an epithelial metalloproteinase by adjacent stroma in the human endometrium.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, **92**:7362-6.
53. Bonvissuto AC, Lala PK, Kennedy TG, Nygard K, Lee DC, Han VK : **Induction of transforming growth factor-alpha gene expression in rat decidua is independent of the conceptus.** *Biol Reprod* 1992, **46**:607-16.
54. Remy I, Montmarquette A, Michnick SW: **PKB/Akt modulates TGF-beta signalling through a direct interaction with Smad3.** *Nat Cell Biol* 2004, **6**:358-365.
55. Conery AR, Cao Y, Thompson EA, Townsend CMJ, Ko TC, Luo K: **Akt interacts directly with Smad3 to regulate the sensitivity to TGF-beta induced apoptosis.** *Nat Cell Biol* 2004, **6**:366-372.

56. Asselin E, Mills GB, Tsang BK: **XIAP regulates Akt activity and caspase-3-dependent cleavage during cisplatin-induced apoptosis in human ovarian epithelial cancer cells.** *Cancer Res* 2001, **61**:1862-1868.
57. Asselin E, Wang Y, Tsang BK: **X-linked inhibitor of apoptosis protein activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in rat granulosa cells during follicular development.** *Endocrinology* 2001, **142**:2451-2457.
58. Gagnon V, St-Germain ME, Parent S, Asselin E: **Akt activity in endometrial cancer cells: regulation of cell survival through cIAP-1.** *Int J Oncol* 2003, **23**:803-10.
59. Birkey Reffey S, Wurthner JU, Parks WT, Roberts AB, Duckett CS: **X-linked inhibitor of apoptosis protein functions as a cofactor in transforming growth factor-beta signaling.** *J Biol Chem.* 2001, **276**:26542-9.
60. Ogle TF, George P, Dai D: **Progesterone and estrogen regulation of rat decidual cell expression of proliferating cell nuclear antigen.** *Biol Reprod* 1998, **59**:444-50.
61. Siegel PM, Massague J: **Cytostatic and apoptotic actions of TGF- β in homeostasis and cancer.** *Nat. Rev. Cancer* 2003, **3**:807-820.
62. Kane LP, Shapiro VS, Stokoe D and Weiss A: **Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB Kinase.** *Curr Biol* 1999, **9**:601-604.

Figure legend

Figure 1 : TGF- β 1 (A), TGF- β 2 (B) and TGF- β 3 (C) mRNAs abundance during the estrous cycle as demonstrated by RT-PCR analysis. Total mRNA extracts from rat uteri were collected at each day of the estrous cycle. Data analyses were performed by the Quantity One software and are presented as a ratio (value / β -actin). β -actin blots shown were used as controls to correct for loading in each lane. Results represent the mean \pm SEM of four independent experiments (four different rats for each day of the estrous cycle). Columns with different letters are significantly different from each other ($P < 0.05$)

Figure 2 : TGF- β 1 (A), TGF- β 2 (B) and TGF- β 3 (C) protein expression during the estrous cycle as determined by Western blot analysis. Total proteins extracts from rat uteri were collected at each days of the estrous cycle. β -actin blots shown were used as controls to correct for loading in each lane. Blots shown are from one representative experiment. Graphics represent Western blot densitometrical analysis. Data represent the mean \pm SEM of four independent experiments (four different rats for each day of the estrous cycle). Columns with different letters are significantly different from each other ($P < 0.05$).

Figure 3 : Immunohistochemistry of TGF- β 1 (A), TGF- β 2 (B) and TGF- β 3 (C) in rat endometrium during the estrous cycle. IHC shown are from one representative experiment and were repeated four times using four different uterine sections from four different rats per day of the estrous cycle. Representative days of estrous cycle are presented (A: diestrus; B: proestrus; C: estrus; D: metestrus E: negative control in which primary antibody was absent). le: luminal epithelium; s: stroma. Magnification: 400 \times .

Figure 4 : TGF- β 1 (A), TGF- β 2 (B), TGF- β 3 (C) and Cleaved Caspase-3 proteins expression during the pseudopregnancy as determined by Western blot analysis. Total proteins extracts were collected from uteri at each days of the pseudopregnancy. β -actin blots shown were used as controls to correct for loading in each lane. Blots shown are from one representative experiment. Graphics represent Western blot densitometrical analysis. Data represent the mean \pm SEM of four independent experiments (four different rats for each day of the pseudopregnancy). Columns with different letters are significantly different from each other ($P < 0.05$).

Figure 5 : Expression of Akt (A), Phospho-Akt (B) and XIAP (C) in cultured rat decidual cells *in vitro* in response to TGF- β 2 (ng/mL) as demonstrated by Western blot analysis. β -actin blots shown were used as controls to correct for loading in each lane. Blots shown are from one representative experiment. Graphics represent Western blot densitometrical analysis. Data represent the mean \pm SEM of four independent experiments.

Figure 6 : Expression of Akt (A), Phospho-Akt (B) and XIAP (C) in cultured rat decidual cells *in vitro* in response to TGF- β 3 (ng/ml) as demonstrated by Western blot analysis. β -actin blots shown were used as controls to correct for loading in each lane. Blots shown are from one representative experiment. Graphics represent Western blot densitometrical analysis. Data represent the mean \pm SEM of four independent experiments. Columns with different letters are significantly different from each other ($P < 0.05$).

Figure 7 : Expression of Smad2 (A) and Phospho-Smad2 (B) in cultured rat decidual cells *in vitro* in response to TGF- β 2 (ng/ml) as demonstrated by Western blot analysis. β -actin blots shown were used as controls to correct for loading in

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

Figure 8 : Expression of Smad2 (A) and Phospho-Smad2 (B) in cultured rat decidual cells *in vitro* in response to TGF- β 3 (ng/ml) as demonstrated by Western blot analysis. β -actin blots shown were used as controls to correct for loading in each lane. Blots shown are from one representative experiment. Graphics represent Western blot densitometrical analysis. Data represent the mean \pm SEM of four independent experiments. Columns with different letters are significantly different from each other ($P < 0.05$).

Figure 9 : (A, B) Expression of CDC-47 in cultured rat decidual cells *in vitro* in response to TGF- β 2 (A) and TGF- β 3 (B) (ng/ml) as demonstrated by Western blot analysis. β -actin blots shown were used as controls to correct for loading in each lane. Blots shown are from one representative experiment. Graphics represent Western blot densitometrical analysis. Data represent the mean \pm SEM of four independent experiments. (C, D) Effect of TGF- β 2 (C) and TGF- β 3 (D) (ng/ml) on cell survival in cultured rat decidual cells as demonstrated by Hoechst nuclear staining. Data represent the mean \pm SEM of four independent experiments. Columns with different letters are significantly different from each other ($P < 0.05$).

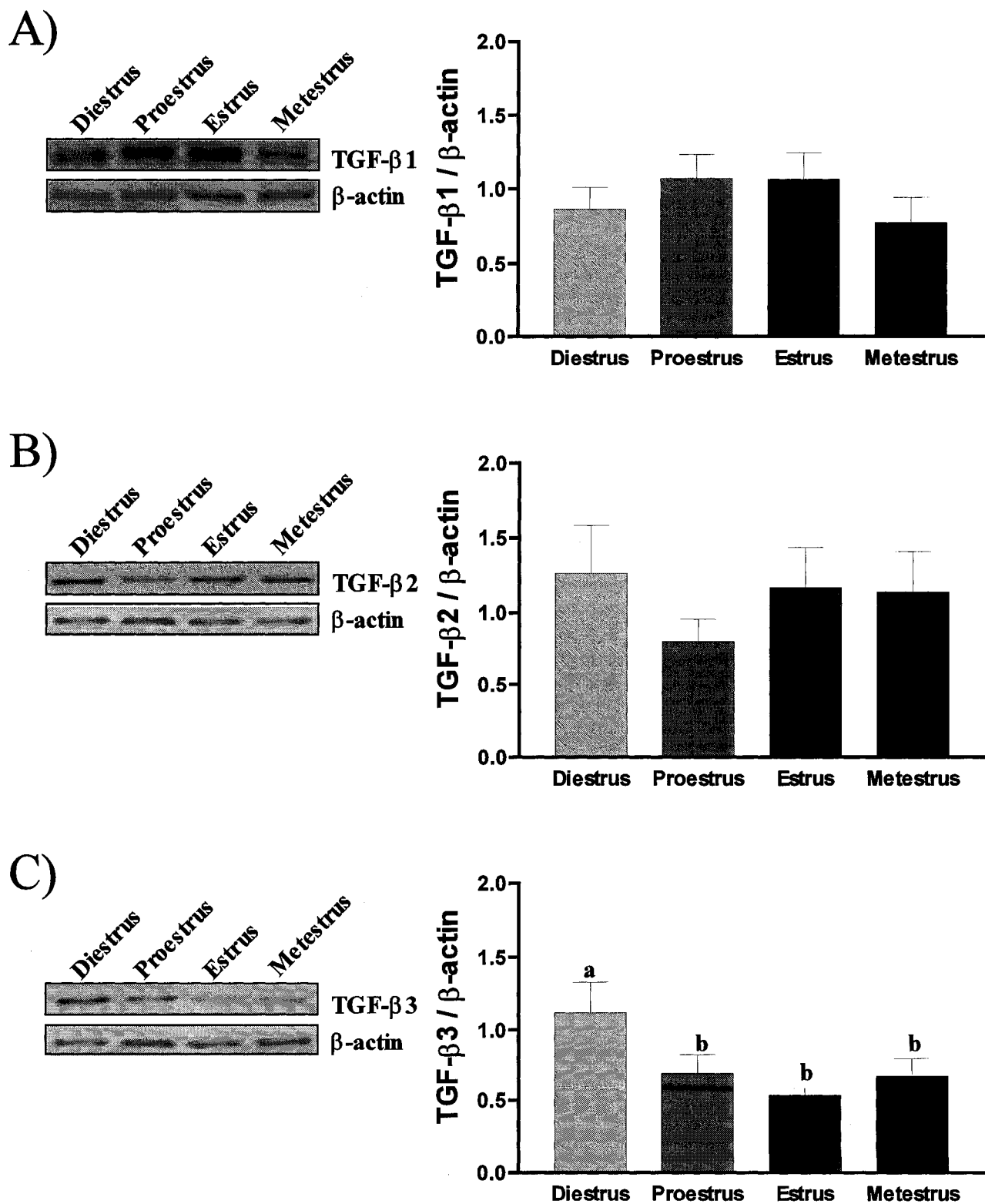


Figure 1; Caron et al.

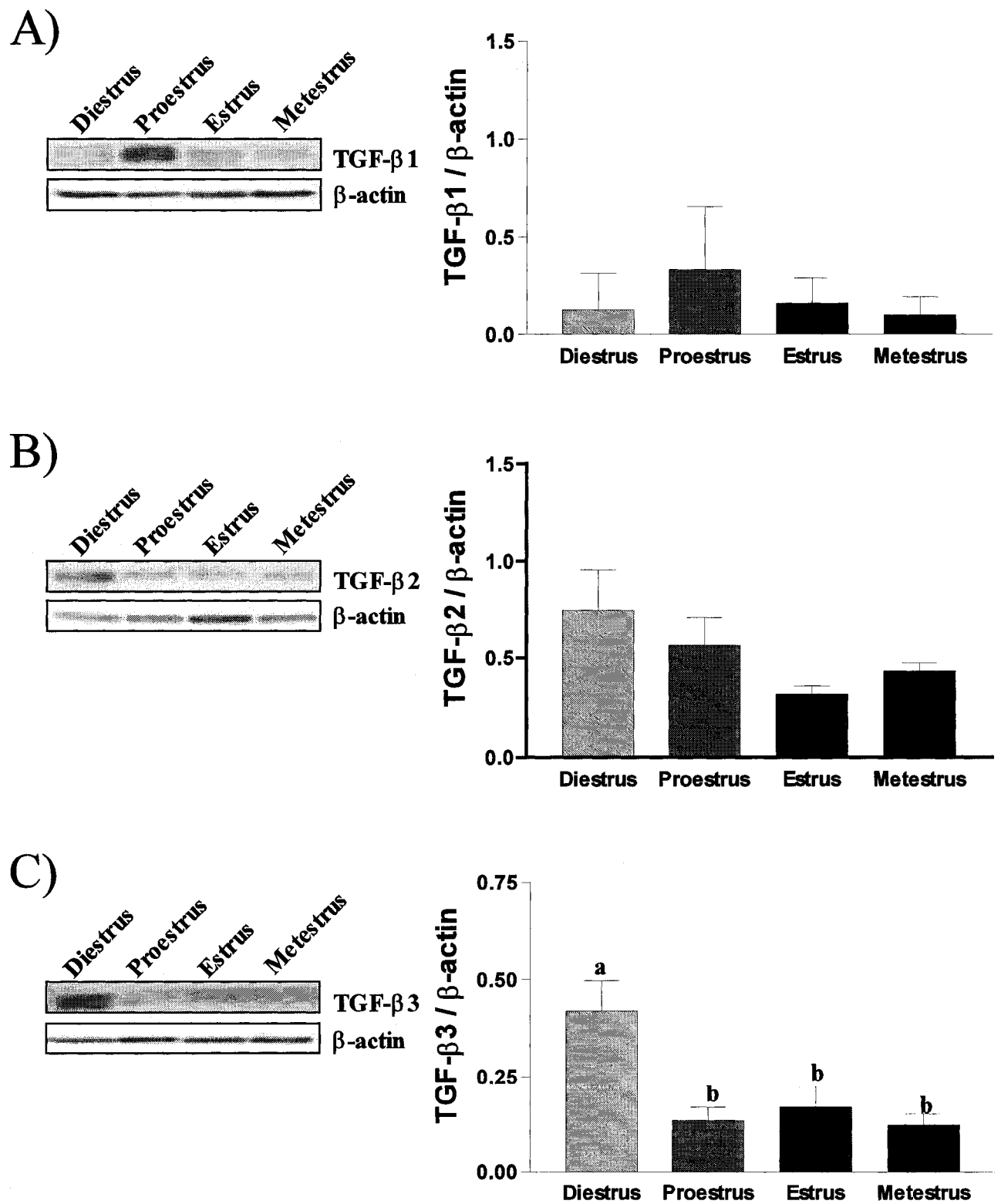


Figure 2; Caron et al.

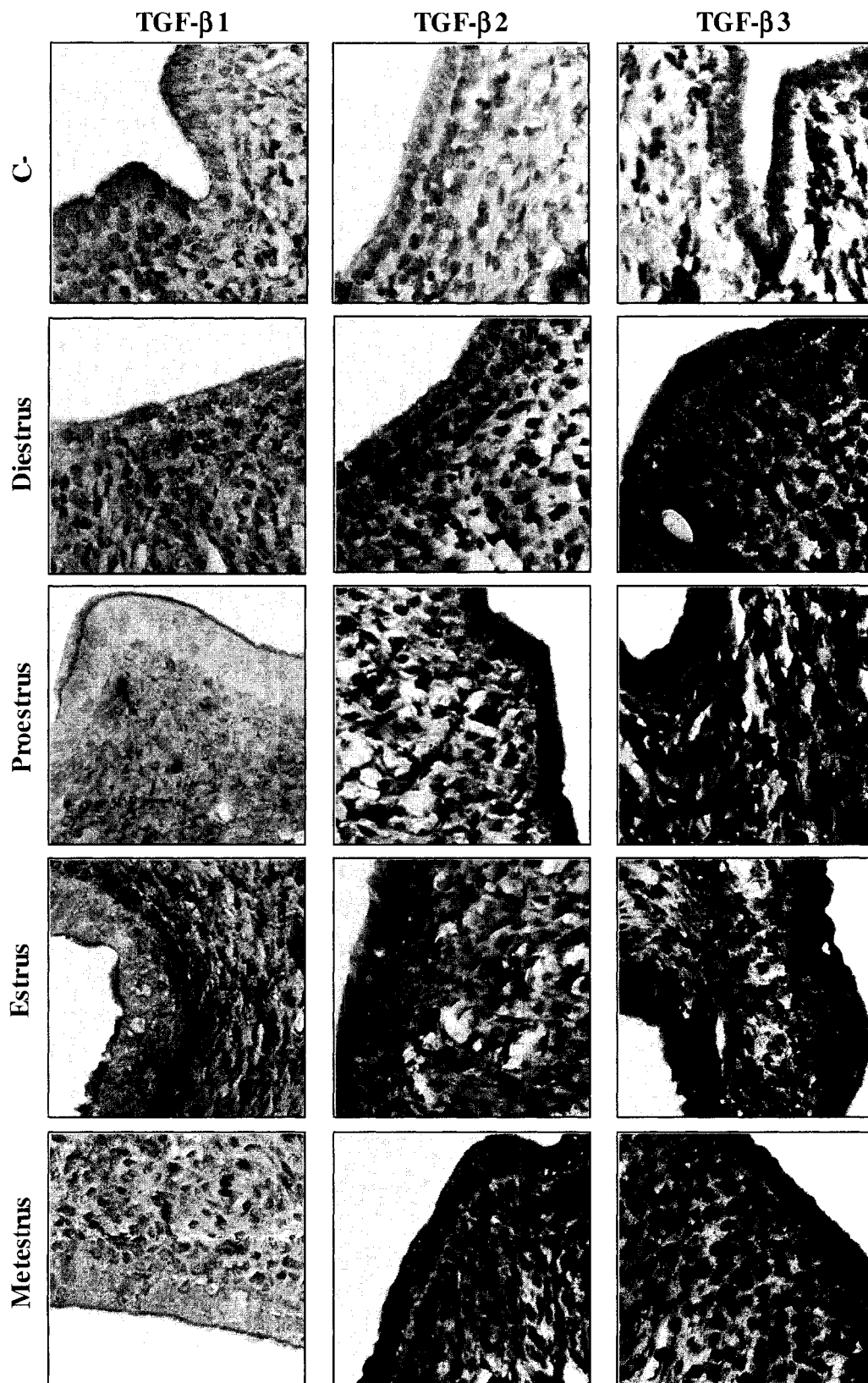


Figure 3; Caron et al.

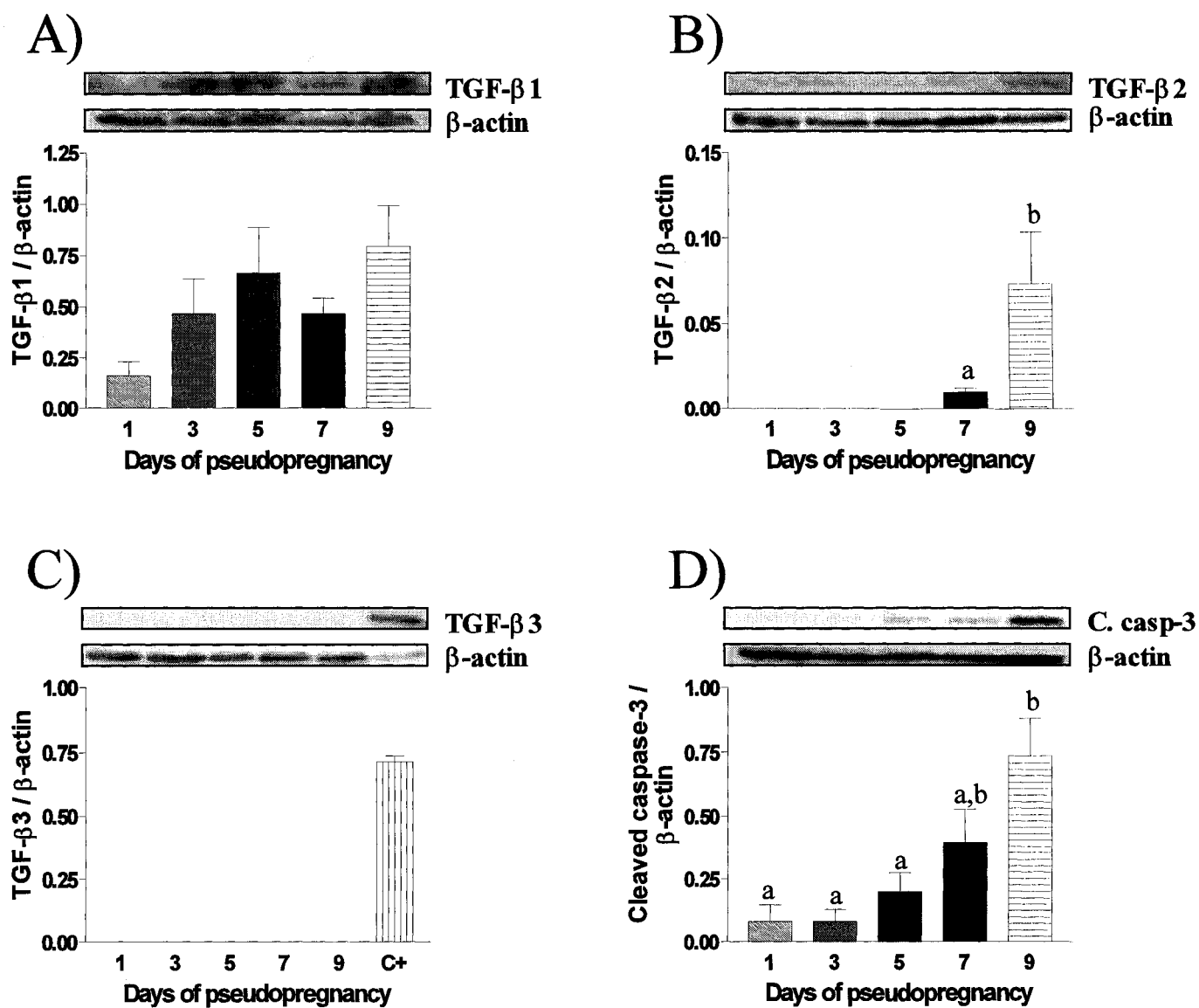


Figure 4; Caron et al.

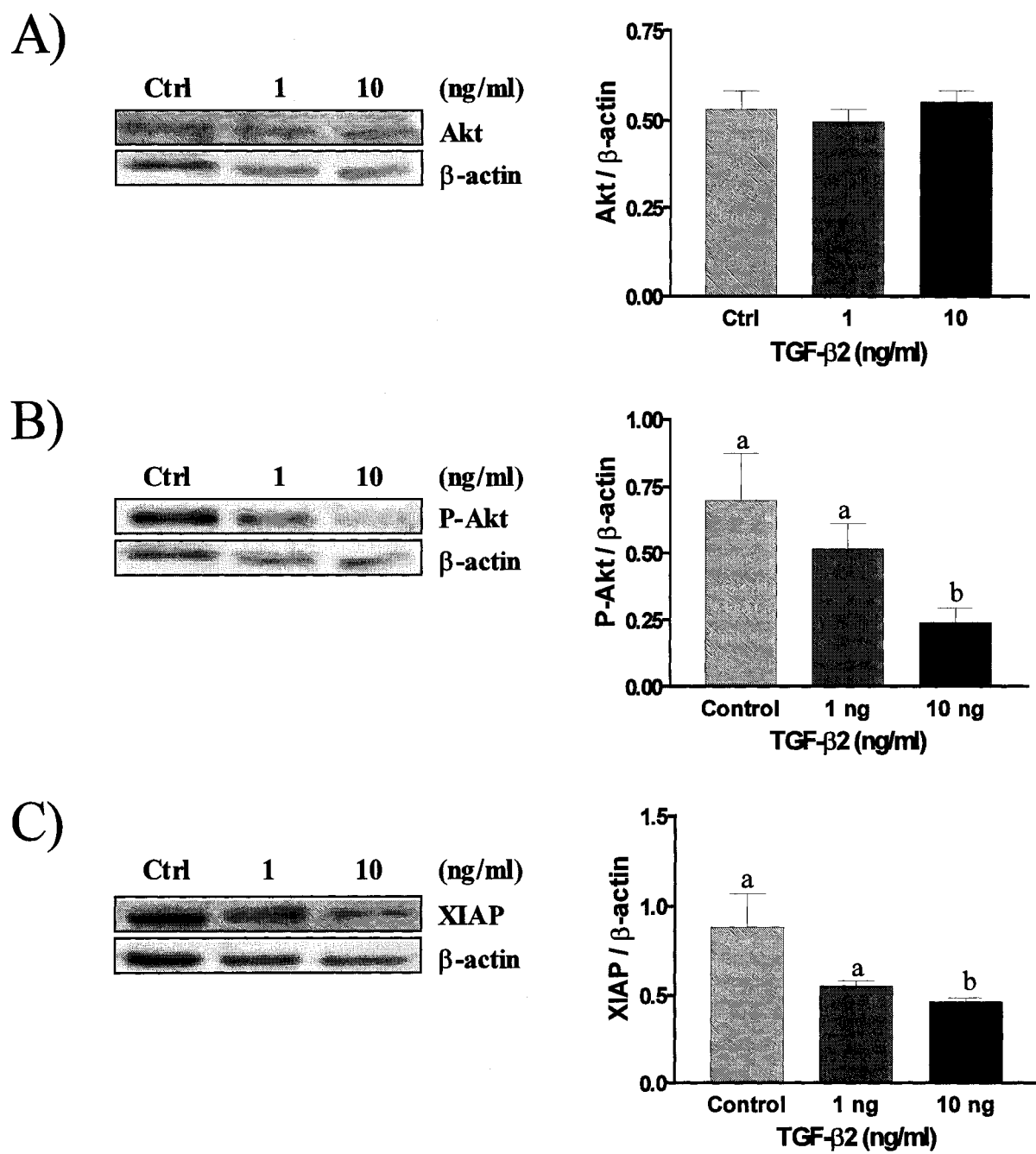


Figure 5; Caron et al.

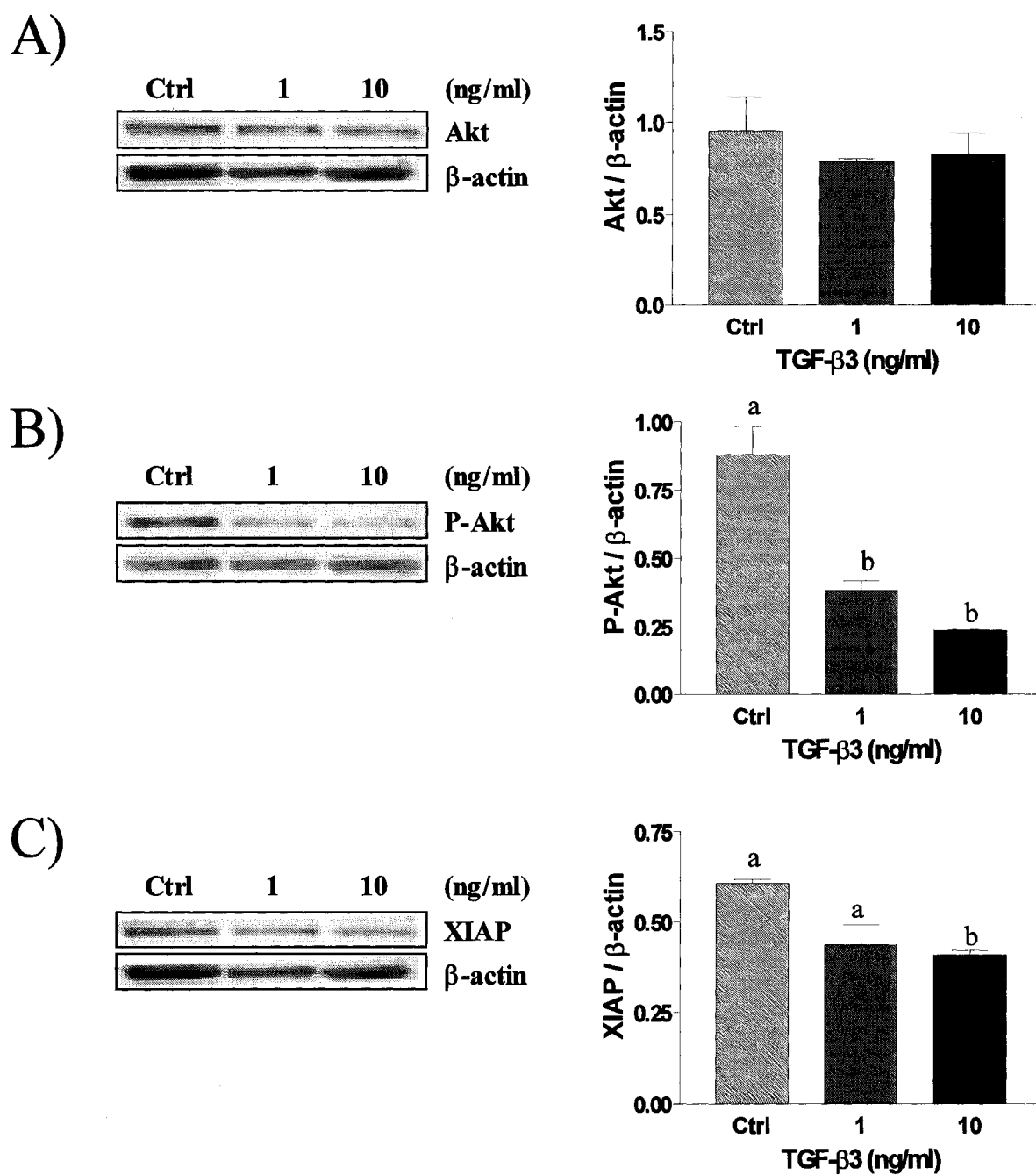


Figure 6; Caron et al.

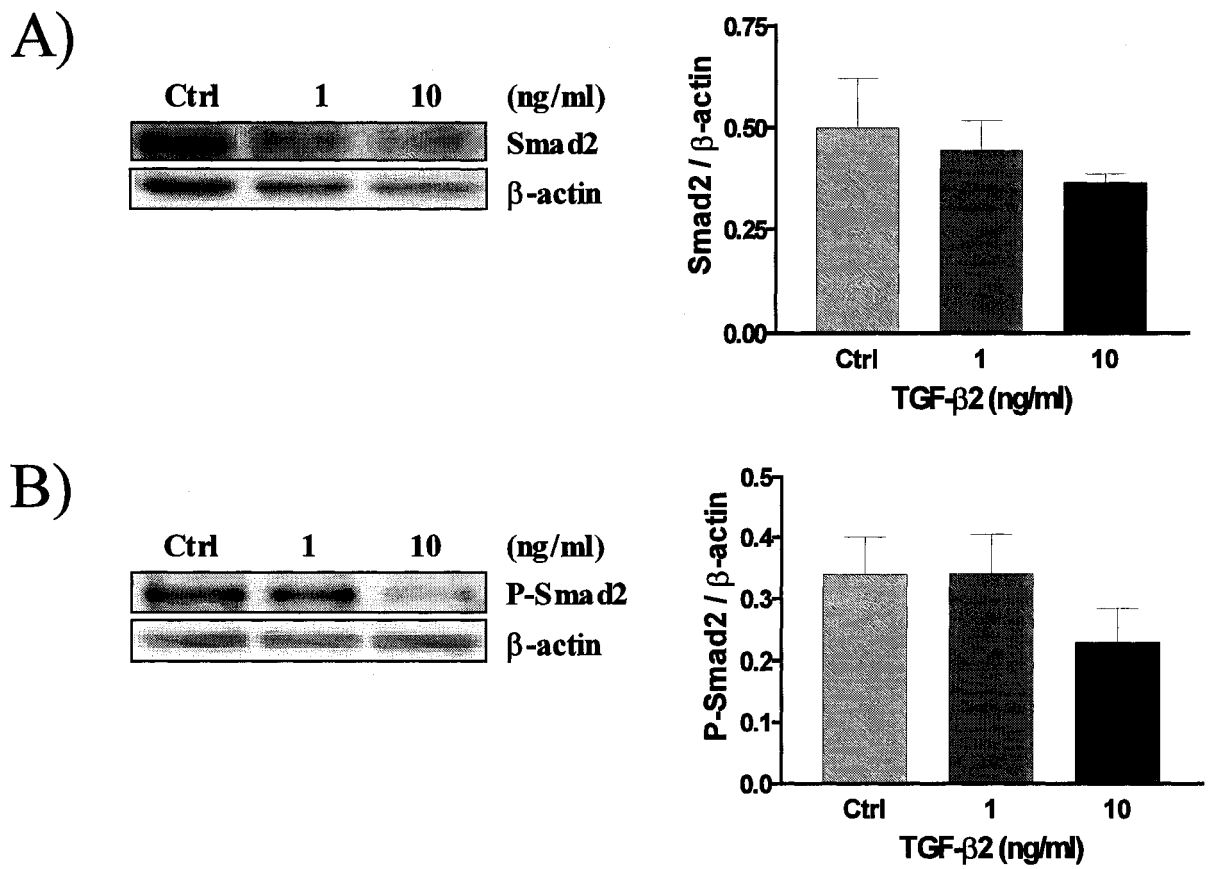


Figure 7; Caron et al.

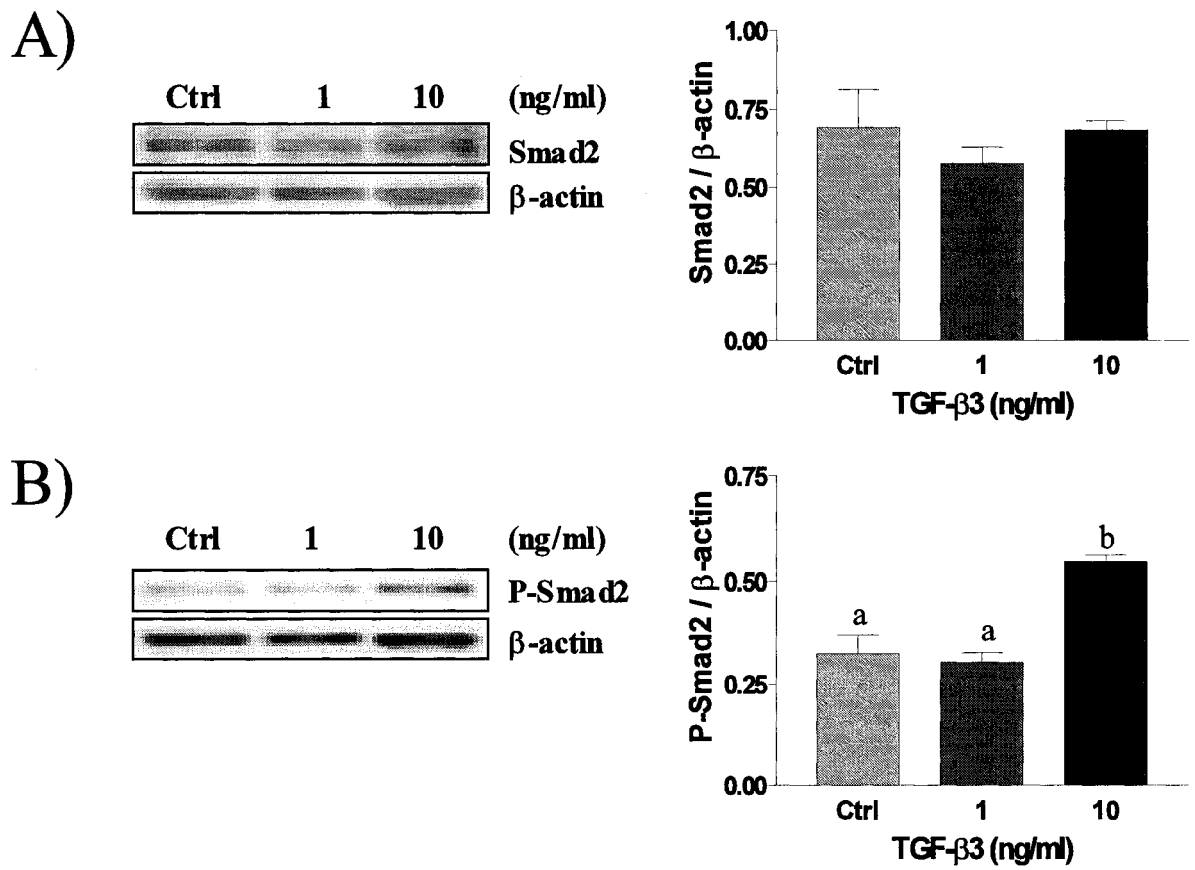


Figure 8; Caron et al.

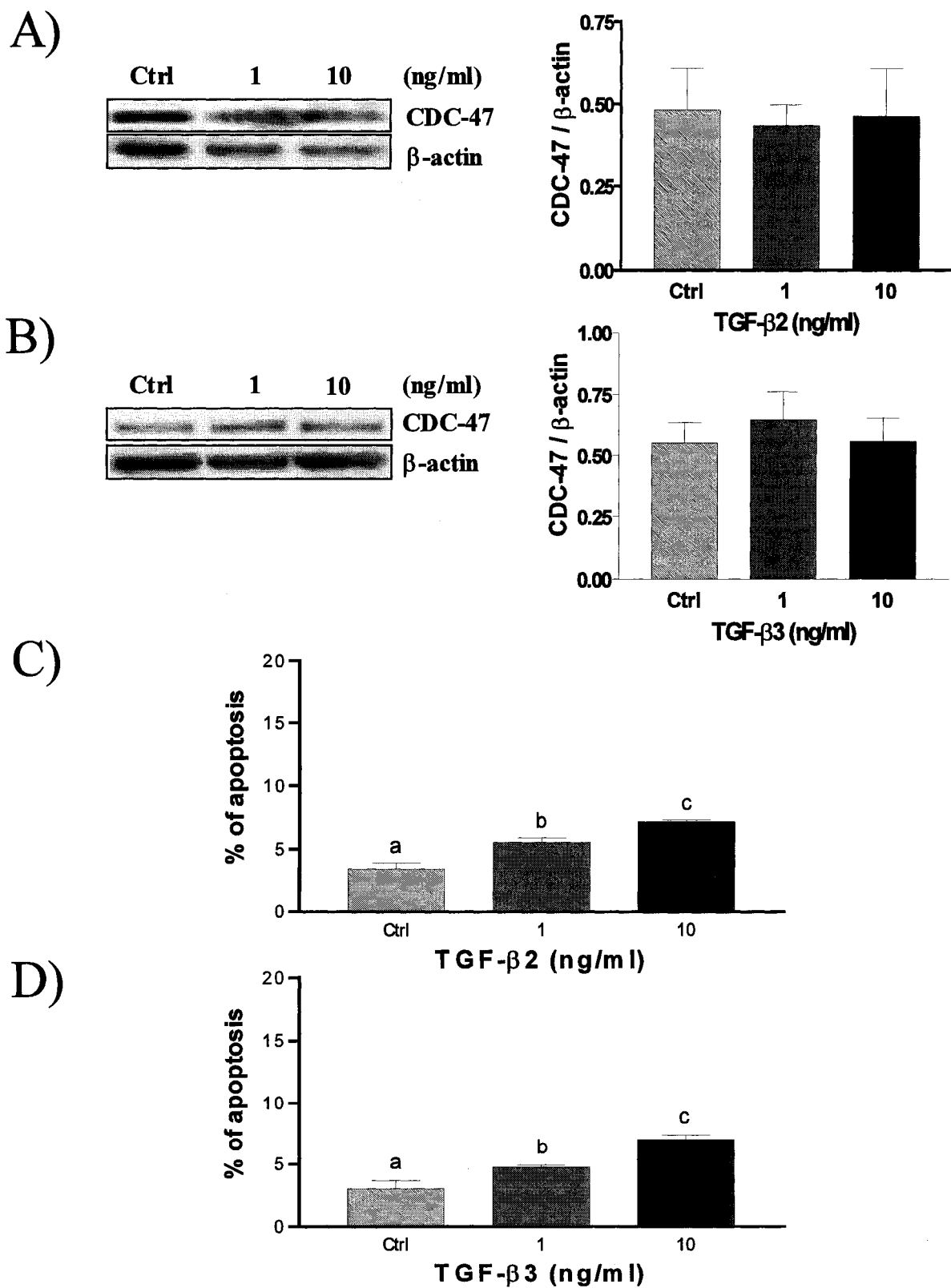


Figure 9; Caron et al.

CHAPITRE IV

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

4.1 Conclusion

Les principales étapes de la gestation font intervenir un grand nombre de facteurs de croissance et de cytokines qui jouent un rôle important dans le développement normal de l'embryon. Le Transforming growth factor- β est un facteur de croissance impliqué dans plusieurs processus physiologiques dont la prolifération et la différenciation cellulaire, l'angiogenèse et l'apoptose. Puisque tous ces processus sont nécessaires au déroulement normal de la gestation, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle le TGF- β serait impliqué dans l'établissement et le maintien de la gestation surtout lors de deux phases importantes soit l'implantation embryonnaire et la régression déciduale. Les objectifs de la première étude de notre laboratoire, menée en 2005 par Shooner et ses collaborateurs, étaient de caractériser la voie de signalisation du TGF- β lors de la gestation et de déterminer les effets de ce facteur de croissance sur la voie de survie cellulaire de la PI 3-K/Akt.

L'implantation embryonnaire et la régression déciduale sont deux phases importantes de la gestation durant lesquelles survient le phénomène d'apoptose. En effet, il est bien établi que ce type de mort cellulaire programmée est impliqué dans l'implantation embryonnaire et la décidualisation (Abrahamson et Zorn 1993, Pampfer et Donnay 1999, Joswig et al 2003). Nous avons effectué des analyses dans notre laboratoire afin de déterminer la présence d'apoptose durant la gestation. Nous avons observé que l'expression de la caspase-3 clivée, une protéine importante de la cascade des caspases menant à l'apoptose, est à son maximum au 14^e jour de gestation, soit lors de la régression déciduale. Nous avons également observé par immunofluorescence la présence de la caspase-3 clivée dans le cytoplasme des cellules endométriales à ce même

moment. De plus, la technique de TUNEL a confirmé la présence des cellules apoptotiques lors de la régression déciduale. Ainsi, la présence de la caspase-3 clivée lors de cette phase apoptotique suggère que la voie des caspases est impliquée dans l'inhibition des protéines de survie cellulaire et par le fait même, dans l'activation de l'apoptose. Nous avons également vérifié la présence de prolifération cellulaire pendant la gestation grâce à la protéine CDC47/MCM7. Nous avons remarqué une diminution de son expression en fin de gestation particulièrement au jour 14 au même moment où les taux d'apoptose sont élevés. Contrairement à la régression déciduale, nos résultats démontrent que lors de l'implantation embryonnaire, les niveaux d'apoptose sont relativement faibles. Cette situation peut être expliquée par le fait que la quantité de cellules épithéliales qui subissent l'apoptose lors de l'implantation de l'embryon sont beaucoup moins nombreuses que les cellules déciduales lors de la régression de la décidue et sont limitées au site d'implantation.

Dans le but de caractériser la voie de signalisation du Transforming growth factor- β lors de la gestation, nous avons déterminé ses niveaux d'expression durant les deux principales phases de la gestation, l'implantation embryonnaire et la régression déciduale. Pour ce faire, nous avons utilisé la technique d'immunobuvardage de type Western. Nos résultats révèlent que les trois isoformes du TGF- β sont exprimés de façon différente dans l'utérus de la rate pendant la gestation, ce qui est en accord avec différentes études antérieures (Das et al 1992, Perry et al 1997, Godkin et al 1998). En effet, les TGF- β 1 et TGF- β 2 sont fortement exprimés lors de la régression déciduale chez la rate (Shooner et al. 2005). Contrairement aux deux premiers isoformes, le TGF- β 3 n'est pas exprimé au début de la gestation, ce qui suggère que cet isoforme n'est pas impliqué dans l'implantation de l'embryon. D'autres chercheurs ont observé un effet similaire avec l'ARNm du TGF- β 3 en début de gestation (Das et al 1992). Par contre, celui-ci est fortement exprimé lors de la régression déciduale, tout comme les TGF- β 1 et TGF- β 2. Ces résultats suggèrent que les trois isoformes du TGF- β jouent un rôle important dans la régulation de l'apoptose lors de la régression de la décidue.

De plus, il est connu que les isoformes du TGF- β sont exprimés et régulés de façon différente dans plusieurs types de tissu dont l'utérus du bovin (Doré et al 1996) et de la souris (Das et al 1992), à l'interface foëto-maternelle chez le porc (Gupta et al 1998, 1998b) et chez le bovin (Munson et al 1996) et dans le carcinome humain du côlon (Bellone et al 2001). Les résultats obtenus par Shooner et al (2005) démontrent que ces trois isoformes sont aussi exprimés différemment dans des cellules distinctes d'un même tissu. En effet, les TGF- β 1 et TGF- β 2 sont exprimés à la fois dans les cellules épithéliales et stromales en début de gestation. Par contre, en fin de gestation, le TGF- β 1 est principalement exprimé dans les cellules stromales alors que le TGF- β 2 est localisé dans les cellules épithéliales, ce qui indique que l'action de ces deux isoformes peut être limitée à un type cellulaire. Cette étude suggère également que le TGF- β 1, qui est fortement exprimé lors de l'implantation embryonnaire, est nécessaire à l'invasion du trophoblaste (Slater et al 2000, Ingman et al 2002).

La présence des isoformes du TGF- β pendant la gestation ne signifie pas que ceux-ci sont actifs. Pour en être certain, nous avons déterminé l'expression des protéines Smads, protéines responsables de la transduction des signaux du cytoplasme vers le noyau. Nous avons observés que l'expression de la protéine Smad2, la forme inactive de la protéine, est élevée au moment de l'implantation embryonnaire mais faible en fin de gestation. Cependant, l'expression de la forme active de Smad2, Smad2 phosphorylée (P-Smad2), est particulièrement élevée lors du 12^e et 14^e jour de la gestation, moment correspondant à la régression déciduale. Ainsi, la forte présence de la protéine Smad2 phosphorylée (activée) lors de cette période de la gestation correspond à la présence des trois isoformes du TGF- β . Ces résultats suggèrent que les isoformes du TGF- β agissent par la voie des Smads afin d'induire l'apoptose des cellules endométriales lors de ces deux phases cruciales de la gestation. De plus, une étude récente a suggéré que les niveaux élevés de Smad2 lors de l'implantation embryonnaire seraient liés à l'invasion du trophoblaste; elle permettrait ainsi la formation de la zone primaire de décidualisation (Lin et al 2004).

Le deuxième objectif de notre première étude était de déterminer les effets du TGF- β sur la voie de survie cellulaire de la PI 3-K/Akt. Pour ce faire, une culture primaire de cellules déciduales a été utilisée afin de mieux comprendre les effets du TGF- β au niveau cellulaire et de faire la lumière sur une possible interaction entre la voie de signalisation du TGF- β et la voie de la PI 3-K/Akt. Les cellules déciduales ont été traitées avec différentes doses de TGF- β 1 afin de déterminer si l'activation de la protéine Smad2 pouvait induire l'apoptose en bloquant la voie de Akt. Il a été démontré récemment que le TGF- β pouvait bloquer directement, par l'intermédiaire des protéines Smads, la phosphorylation/activation de Akt (Conery et al 2004). Les résultats de notre étude démontrent que le TGF- β 1 induit la phosphorylation de Smad2 ainsi qu'une augmentation de l'apoptose de façon dose-dépendante dans les cellules déciduales *in vitro*. De plus, nous avons observé une diminution de la prolifération cellulaire. La phosphorylation de la protéine Akt est également diminuée suite au traitement au TGF- β 1. Ces résultats révèlent que le TGF- β induit bien l'apoptose des cellules déciduales chez la rate et que l'inhibition de Akt pourrait être le mécanisme par lequel le TGF- β induit l'apoptose. Ces résultats démontrent également une interaction entre le TGF- β 1 et XIAP, une protéine inhibitrice de l'apoptose. En effet, nous avons observé une diminution de façon dose-dépendante de l'expression de XIAP dans les cellules déciduales suite au traitement avec le TGF- β 1. Ainsi, les résultats obtenus suggèrent que le TGF- β interagit directement avec la voie de la PI 3-K/Akt dans les processus apoptotiques de la gestation.

Les résultats obtenus lors de cette première étude nous ont permis de soulever deux principales hypothèses. Tout d'abord, les trois isoformes du TGF- β sont régulés différemment durant la gestation et les résultats suggèrent que ces protéines sont importantes lors des deux phases apoptotiques de la gestation, soit l'implantation embryonnaire et la régression déciduale. Ainsi, il est possible que ces trois isoformes soient également impliqués dans la régulation du cycle oestral de la rate. Ensuite, puisque le TGF- β 1 entraîne une diminution de la phosphorylation de la protéine de

survie cellulaire Akt (P-Akt) et de l'expression de XIAP dans les cellules déciduales en culture, nous croyons que les TGF- β 2 et TGF- β 3 pourraient avoir un effet similaire au TGF- β 1. Les objectifs de cette deuxième étude étaient de caractériser l'expression du TGF- β dans l'endomètre utérin de la rate lors du cycle oestral et de déterminer les effets des TGF- β 2 et TGF- β 3 dans la régulation de l'apoptose des cellules déciduales par l'interaction avec la voie de la PI 3-K/Akt.

La présence et la régulation des trois isoformes du TGF- β dans l'endomètre de la rate durant la gestation et dans d'autres tissus sont relativement bien documentées. Cependant, puisque leur expression pendant le cycle oestral et au moment de la régression déciduale est peu documentée, nous avons déterminé l'implication des isoformes du TGF- β . Il est bien établi que sous l'effet des hormones stéroïdiennes, les cellules endométriales prolifèrent, se différencient et meurent par apoptose afin de préparer l'endomètre utérin à l'arrivée de l'embryon. Puisque le TGF- β est impliqué dans la régulation de ces processus et que ces derniers sont observés lors du cycle oestral, il est possible que le TGF- β joue un rôle précis durant le cycle de reproduction. Afin de vérifier la présence, l'expression et la localisation de ce facteur de croissance pendant le cycle oestral, nous avons utilisé la technique de RT-PCR, d'immunobuvardage de type Western et d'immunohistochimie. Les rates qui possédaient un cycle régulier de 4 à 5 jours ont été euthanasiées et l'ARNm ainsi que les protéines endométriales ont été prélevées. Nos résultats démontrent que les trois isoformes du TGF- β sont présents tout au long du cycle oestral. Une étude effectuée par Chegini et ses collaborateurs confirme la présence des trois TGF- β durant le cycle oestral (Chegini et al 1994). Cependant, bien que tous présents dans l'endomètre lors du cycle oestral, les isoformes du TGF- β ne sont pas exprimés de la même façon. Nous avons démontré que l'expression du TGF- β 1 augmente très légèrement mais de façon non-significative lors du proestrus. De plus, il est localisé seulement dans les cellules stromales de l'endomètre, ce qui suggère que le TGF- β 1 joue un rôle dans la reconstruction de l'endomètre pour la prochaine ovulation (prochain cycle oestral). Contrairement au TGF- β 1, les TGF- β 2 et TGF- β 3 sont

fortement exprimés lors du diestrus et sont localisés à la fois dans les cellules épithéliales et stromales. De nombreuses études relatent la présence d'apoptose dans les cellules endométriales lors du cycle oestral chez la rate (Sato et al. 1997; Lai et al. 2000). Une étude antérieure a démontré la présence d'apoptose dans les cellules stromales au moment du diestrus (Dharma et al. 2001). Ainsi, ces résultats suggèrent que les TGF- β 2 et TGF- β 3 régulent l'apoptose des cellules stromales lors du diestrus. Une étude antérieure dans notre laboratoire a démontré la présence d'apoptose dans les cellules épithéliales lors de l'oestrus. En effet, nous avons observé que l'expression de la caspase-3 clivée est élevée à ce moment alors que la forme active de la protéine de survie cellulaire Akt (P-Akt) et le marqueur de prolifération cellulaire CDC47/MCM7 sont diminués pendant cette phase apoptotique (Déry et al. 2003). Cependant, nous n'avons observé aucune augmentation de l'expression des TGF- β lors de l'oestrus, ce qui suggère deux fonctions possibles pour les TGF- β 2 et TGF- β 3. Tout d'abord, ces deux isoformes pourraient être impliqués dans des phénomènes cellulaires autre que l'apoptose lors du cycle oestral. D'un autre côté, il est possible que l'apoptose des cellules épithéliales et stromales soit régulée de façon différente dans l'endomètre de la rate. Ainsi, les TGF- β 2 et TGF- β 3 pourraient être responsables de l'apoptose des cellules stromales lors du diestrus.

Les changements qui surviennent dans l'endomètre de la rate lors du cycle oestral sont régulés entre autre par les hormones stéroïdiennes, l'oestrogène et la progestérone. Dharma et son équipe ont démontré que les niveaux de progestérone étaient élevés lors du metestrus dans l'endomètre utérin de la souris (Dharma et al. 2001), soit quelques heures avant le diestrus. Nous avons démontré dans notre laboratoire que l'oestrogène induit la prolifération des cellules épithéliales de l'endomètre ; par contre, lorsque la sécrétion des oestrogènes est inhibée, ces mêmes cellules subissent l'apoptose. Les résultats de ces études révèlent que l'apoptose des cellules épithéliales serait régulée par les oestrogènes alors que l'apoptose des cellules stromales serait plutôt régulée par la progestérone (Dharma et al. 2001). Certaines études indiquent que les hormones stéroïdiennes seraient en mesure de stimuler la

production de facteurs de croissance ainsi que de leurs récepteurs membranaires (Ignar-Trowbridge et al. 1992 ; Giudice 1994). De plus, il a été démontré que certains facteurs de croissance pouvaient médier l'action des hormones stéroïdiennes (Ignar-Trowbridge et al. 1992 ; Giudice 1994 ; Piva et al. 1996). Ainsi, le Transforming growth factor- β pourrait jouer un rôle similaire. En effet, il a été démontré que l'expression de la protéine Smad2 est élevée lors du diestrus et du proestrus (Lin et al. 2004) suggérant que le TGF- β serait impliqué dans la reconstruction de l'endomètre et ce, par la voie des Smads.

D'un autre côté, nos résultats nous permettent de suggérer que le TGF- β exerce des fonctions autres que le déclenchement de l'apoptose pendant le cycle oestral. Les macrophages sont largement distribués dans les tissus de reproduction de la femelle. Les macrophages représentent un moyen efficace de défense de l'intégrité et de la fonctionnalité de l'endomètre utérin. Dans l'endomètre non-gestant, ils jouent un rôle dans la dégradation des débris cellulaires. Lors de la gestation, ils sont présents à l'interface fœto-maternelle suggérant un rôle dans les réactions immunitaires entre les tissus embryonnaires et maternels (Hunt et Robertson 1996 ; Arcuri et al. 2001). Une étude a démontré la présence de macrophages dans le stroma de l'endomètre au moment de l'oestrus chez la rate (Kaushic et al. 1998). Des études ont démontré que le TGF- β possède la capacité d'attirer les macrophages (monocytes différenciés) (Barnard et al. 1990 ; Attisano et al. 1994). De plus, les macrophages phagocytaires sont une source de MMPs durant le remodelage et la réparation des tissus, ce qui indique que le TGF- β pourrait jouer un rôle dans l'élimination des cellules mortes avant la prochaine ovulation. Une importante classe de protéase impliquée dans le remodelage de l'endomètre, les MMPs (matrix metalloproteinase), sont présents dans l'endomètre de la rate durant le cycle oestral. Il a été démontré que les MMP-3, MMP-9 et MMP-13, qui possèdent une activité collagénase, sont présents dans les cellules stromales endométriales de la rate non-gestante ; la MMP-7 qui est spécifique aux cellules épithéliales et associée au remodelage de la matrice cellulaire, a aussi été observée dans l'endomètre de la rate non-gestante (Curry et Osteen 2003). Wolf et ses collaborateurs

ont observé que l'expression de la MMP-7 était de trois à quatre fois plus élevée lors de l'oestrus et du diestrus comparativement au metestrus (Wolf et al. 1996). Puisque le TGF- β et les MMPs sont impliqués dans le remodelage des tissus, il est possible qu'il existe une interaction entre ces deux types de protéines. En effet, une étude a révélé que lors du cycle menstruel chez la femme, le TGF- β joue un rôle important dans la production des MMPs dans l'endomètre (Bruner et al. 1992). De plus, nous avons démontré très récemment que le TGF- β 3 induit l'expression de la MMP-9 dans les cellules cancéreuses endométriales (Van Themsche et al. 2006). Cependant, il existe très peu d'information sur l'interrelation possible entre le TGF- β et les MMPs. Ainsi, des analyses supplémentaires seront effectuées dans notre laboratoire afin de mieux comprendre les mécanismes intracellulaires qui permettraient cette interaction.

Il est bien établi que lors de la gestation, les hormones stéroïdiennes et des facteurs de croissance modifient l'intégrité de l'endomètre afin de permettre l'implantation de l'embryon et la régression de la décidue. Plusieurs facteurs de croissance sont produits et sécrétés à la fois par les tissus maternels et les tissus embryonnaires lors de l'interaction de l'embryon avec l'endomètre utérin. Une étude antérieure a démontré que l'expression du transforming growth factor- α était indépendante de l'embryon (Bonvissuto et al. 1992). Nous avons pensé que cette situation pourrait être similaire dans le cas du TGF- β . Pour vérifier l'exactitude de notre hypothèse, nous avons induit la pseudogestation chez notre modèle animal, c'est-à-dire un état semblable à la gestation mais sans la présence de l'embryon. Pour ce faire, nous avons effectué une série d'injection d'hormones stéroïdiennes afin de reproduire les conditions hormonales *in vivo* de la gestation et d'induire la décidualisation des cellules stromales. Dans la première étude sur le TGF- β (chapitre 2), nous avons démontré la présence d'apoptose lors de l'implantation embryonnaire et de la régression déciduale et que les trois isoformes étaient exprimés de façon différente dans l'endomètre lors de la gestation (Shooner et al. 2005). En effet, les TGF- β 2 et TGF- β 3 sont exprimés tout au long de la gestation et sont fortement exprimés lors des phases apoptotiques de la gestation (implantation embryonnaire et régression déciduale). Par contre, le TGF- β 3

est absent lors de l'implantation de l'embryon mais fortement exprimé au 14^e jour de gestation (Shooner et al. 2005) Nous avons démontré dans cette deuxième étude (chapitre 3) que les trois isoformes du TGF- β sont exprimés et régulés différemment dans les cellules endométriales lors de la pseudogestation, selon un patron similaire à la gestation normale (Shooner et al. 2005). Le TGF- β 1 est exprimé tout au long de la pseudogestation ; il est particulièrement élevé au jour 5, moment où survient l'implantation de l'embryon, et au jour 9. Ce résultat supporte l'hypothèse selon laquelle le TGF- β 1 est impliqué dans la régulation de l'apoptose lors de l'implantation embryonnaire et de la régression déciduale. Les niveaux d'expression du TGF- β 2 ne sont élevés qu'au jour 9 de la pseudogestation alors que le TGF- β 3 est absent, tout comme dans la gestation normale (Das et al. 1992 ; Shooner et al. 2005), indiquant que ce dernier n'a pas de fonction importante en début de gestation. Ces résultats indiquent que l'expression des isoformes du TGF- β est indépendante de l'embryon, confirmant ainsi notre hypothèse, et qu'elle pourrait être régulée par les hormones stéroïdiennes.

La présence de la caspase-3 clivée tout au long de la pseudogestation indique que l'apoptose est présente dans les cellules endométriales tout comme dans la gestation. En effet, nous avons observé que la caspase-3 clivée est présente lors de la gestation. Cependant, son expression est plus faible au moment de l'implantation embryonnaire que lors de la régression déciduale, ce qui peut s'expliquer par le fait que la quantité de cellules qui subissent l'apoptose à ce moment est plus faible que lors de la régression de la décidue (Shooner et al. 2005). L'augmentation de cette importante protéine exécutive de l'apoptose du jour 5, moment de l'implantation embryonnaire, au jour 9 de la pseudogestation suggère que l'activation de la cascade des caspases pourrait être un mécanisme important conduisant à la mort des cellules endométriales. De plus, il est envisageable que ce mécanisme soit engendré par les TGF- β 1 et TGF- β 2, puisque ces deux protéines sont fortement exprimées lors des jours 5 et 9 de gestation respectivement.

Pour mieux comprendre le rôle du TGF- β dans les cellules endométriales, nous avons procédé à des cultures primaires de cellules déciduales. Pour ce faire, les rates ont été ovariectomisées et nous avons ensuite induit la décidualisation des cellules stromales en cellules déciduales à l'aide d'injections successives de E_2 et de P_4 (Kennedy et Ross 1993). Les cellules déciduales ont été placées en culture et traitées avec différentes doses de TGF- β_2 et TGF- β_3 . Dans l'étude menée par Shooner et al (2005), nous avons démontré que le TGF- β_1 interfère avec la voie de la PI 3-K/Akt afin d'induire l'apoptose. Puisque Akt est une protéine importante dans la régulation du destin cellulaire (Dery et al. 2003) et que le TGF- β peut influencé directement Akt via la protéine Smad3 (Remy et al. 2004), nous avons émis l'hypothèse selon laquelle le TGF- β_2 et le TGF- β_3 interagissent avec la voie de la PI 3-K/Akt de façon similaire au TGF- β_1 , ce qui confirmerait l'interaction entre les deux voies de signalisation. Nos résultats démontrent que de façon similaire au TGF- β_1 (Shooner et al. 2005), les TGF- β_2 et TGF- β_3 induisent une diminution de la phosphorylation/activation de Akt. Le TGF- β_3 induit également une augmentation de la phosphorylation/activation de Smad2 alors que le TGF- β_2 en est indépendant. Puisque Smad2 et Smad3 sont très homologues, il est possible que, suite à la liaison avec son récepteur transmembranaire, l'effet du TGF- β_2 soit médié par Smad3 plutôt que Smad2. En effet, une étude récente démontre que Akt interagit directement avec Smad3 afin de réguler la sensibilité du signal d'apoptose induit par le TGF- β (Conery et al. 2004). Cette hypothèse fera l'objet d'analyses ultérieures dans notre laboratoire. Ces résultats suggèrent que l'inhibition de Akt peut être un important mécanisme par lequel le TGF- β induit l'apoptose des cellules déciduales.

D'autres études récentes ont démontré l'importance de l'interaction entre Akt et XIAP, une protéine inhibitrice de l'apoptose ; la phosphorylation de Akt est régulée par XIAP dans le cancer des cellules épithéliales de l'ovaire chez l'humain (Asselin et al. 2001) et dans les cellules de la granulosa (Asselin et al. 2001a). De plus, nous avons démontré que le TGF- β_1 induit une diminution de l'expression de XIAP (Shooner et al.

2005) suggérant une interaction entre ces protéines. Nos résultats démontrent que les TGF- β 2 et TGF- β 3 induisent une diminution de l'expression de la protéine XIAP d'une façon dose-dépendante. Une étude a révélé que XIAP pourrait agir en tant que cofacteur dans la signalisation intracellulaire du TGF- β (Birkey Reffey et al 2001 ; Herrera et al. 2002). Nous avons également remarqué que la diminution de XIAP est associée à une légère augmentation de l'apoptose, ce qui était prévisible puisque la principale fonction de XIAP est d'inhiber les caspases et par le fait même, l'apoptose. Dans une autre étude, nous avons démontré que XIAP est fortement exprimé dans les cellules endométriales de la rate en réponse à l'oestrogène (E_2), ce qui est en accord avec son effet mitotique et son rôle d'inhibition de l'apoptose (Leblanc et al. 2003). Cependant, nous avons observé une augmentation importante de XIAP lors de l'oestrus, moment où l'apoptose est élevée, alors qu'elle devrait en être diminuée considérant son rôle anti-apoptotique, ce qui suggère que cette augmentation de la protéine XIAP est nécessaire à la protection des cellules endométriales contre l'apoptose (Leblanc et al. 2003). Ainsi, XIAP est une importante protéine anti-apoptotique impliquée dans la survie cellulaire.

Nous avons démontré que le TGF- β 1 induisait une augmentation dose-dépendante de l'apoptose ainsi qu'une diminution du marqueur de prolifération cellulaire CDC47/MCM7 dans les cellules déciduales en culture (Shooner et al. 2005). Nous avons donc voulu vérifier si les TGF- β 2 et TGF- β 3 produisent le même effet que le TGF- β 1 sur les cellules en culture. Nous avons démontré que ces deux isoformes n'entraînent aucune modification significative de l'expression de la protéine CDC47/MCM7. Cependant, la technique de coloration des noyaux cellulaires au Hoechst révèle que ces deux protéines induisent une légère augmentation de l'apoptose de façon dose-dépendante dans ces mêmes cellules. Cette observation est surprenante puisqu'une augmentation de l'apoptose est généralement accompagnée d'une diminution de la prolifération cellulaire. Par contre, nous devons tenir compte du fait que la balance entre les facteurs de survie et de mort cellulaire détermine le destin des cellules et permet ainsi l'homéostasie des tissus. Dans ce cas, même si nous n'observons pas de diminution de la prolifération cellulaire, l'augmentation de l'apoptose fait en sorte que la

balance favorise la mort cellulaire. D'autres marqueurs de prolifération cellulaire sont peut-être plus adaptés pour les cellules déciduales, ce qui pourrait être le cas pour le «proliferating cell nuclear antigen» (PCNA), un facteur de réplication essentiel à la progression du cycle cellulaire, puisqu'il s'accumule à l'intérieur du noyau jusqu'à la mitose (Ogle et al. 1998). De plus, il est possible que l'apoptose soit accompagnée d'autres types de mort cellulaire programmée dont la catastrophe mitotique, la sénescence et l'autophagie. La catastrophe mitotique est en fait une mort cellulaire menant vers l'apoptose (présence de fragmentation nucléaire) et qui survient après la mitose suite à une mauvaise ségrégation des chromosomes ou simplement suite à une mitose incorrecte alors que la sénescence constitue un arrêt permanent du cycle cellulaire. L'autophagie est caractérisée par une condensation de la chromatine, une dégradation des protéines et des organelles de la cellule par les lysosomes entraînant ainsi la mort de la cellule (Okada et Mak 2004 ; Brown et Attardi 2005). Des analyses supplémentaires devront être effectuées dans ce sens.

En conclusion, les résultats obtenus dans cette étude démontrent que les trois isoformes du TGF- β sont d'importants facteurs impliqués dans la régulation du cycle oestral et dans les phases apoptotiques de la gestation chez la rate. De plus, cette étude révèle que les TGF- β modulent l'activation des protéines Akt et XIAP afin d'induire l'apoptose des cellules déciduales. Ainsi, la présente étude confirme l'existence d'une interaction entre la voie de signalisation du TGF- β et la voie de survie cellulaire de la PI 3-K/Akt.

4.2 Perspectives

Des analyses supplémentaires devront être effectuées afin de mieux comprendre le rôle du TGF- β dans l'endomètre utérin pendant le cycle oestral chez la rate. Plus précisément, il serait important de déterminer les niveaux d'expression des protéines

Smads, protéines responsables de la transmission du signal à partir des récepteurs transmembranaires jusqu'au noyau, lors du cycle oestral, afin de nous renseigner sur la signalisation du TGF- β . De plus, il serait primordial de réaliser des études plus approfondies pour connaître l'importance de l'implication du TGF- β pendant le cycle. Lors des études sur les cellules déciduales *in vitro*, nous avons observé que le TGF- β 2 n'induisait pas une augmentation de l'expression de Smad2 contrairement au TGF- β 1 et au TGF- β 3. D'autres expérimentations devront être accomplies afin de déterminer l'expression de la protéine Smad3 dans les cellules déciduales traitées au TGF- β . Il serait possible que le TGF- β 2 interagisse avec Smad3 afin d'induire l'apoptose de ces mêmes cellules.

Cette étude démontre clairement qu'il existe une interaction entre le TGF- β et la voie de survie cellulaire de la PI 3-K. Il s'avère nécessaire de vérifier l'implication d'autres protéines de cette voie de signalisation dont NF- κ B et la protéine pro-apoptotique Smac/DIABLO dans la régulation de l'apoptose des cellules déciduales via le TGF- β . Une étude menée dans notre laboratoire a révélé que la protéine Akt joue un rôle crucial dans la régulation de NF- κ B (St-Germain et al 2004), une protéine anti-apoptotique impliquée dans la transcription des IAPs (Inhibitor of Apoptosis Proteins) (Stehlik et al. 1998). Il serait intéressant de vérifier l'effet de la diminution de Akt induite par le TGF- β sur la protéine NF- κ B. De plus, il serait important de déterminer l'expression de la protéine Smac/DIABLO, une protéine pro-apoptotique, suite au traitement au TGF- β . Leblanc et ses collaborateurs ont démontré que Xiap et Smac/DIABLO était régulées de façon opposée lors du cycle oestral chez la rate. Il est possible qu'une situation similaire se produise dans les cellules déciduales. Il est également possible que d'autres protéines et même d'autres voies de signalisation puissent interagir avec celle du TGF- β pour induire l'apoptose. Pour ce faire, il serait possible d'utiliser la technique du microarray afin de connaître quels sont les gènes activés ou inactivés dans les cellules déciduales traitées au TGF- β . Également, il serait intéressant de vérifier l'effet de l'inhibition de l'activation de Akt par la LY294002 et la

wortmannin avant d'effectuer le traitement des cellules déciduales au TGF- β ainsi que leur effet *in vivo* sur l'expression du TGF- β lors de la gestation.

Une des caractéristiques majeures de l'apoptose est la fragmentation de l'ADN. Il s'avère donc essentiel de déterminer si l'ADN des cellules déciduales est fragmenté suite à un traitement au TGF- β , ce qui nous permettrait d'affirmer que celui-ci induit bel et bien l'apoptose de ces cellules endométriales. La faible augmentation de l'apoptose suite au traitement au TGF- β 2 et au TGF- β 3 laisse entrevoir la possibilité que d'autres types de mort cellulaire programmée interviennent dans la mort des cellules déciduales. À plus long terme, il serait intéressant de vérifier la présence d'autres types de mort cellulaire programmée telles que la catastrophe mitotique, la sénescence et l'autophagie. Ainsi, une meilleure connaissance des phénomènes de mort cellulaire programmée nous apportera une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires et intracellulaires impliqués dans l'implantation embryonnaire et la régression de la décidue.

Cette étude nous a permis de mieux comprendre les mécanismes intracellulaires et moléculaires des trois isoformes du TGF- β dans le cycle oestral, dans le processus d'implantation embryonnaire et dans la régression déciduale. Puisque la majorité des pertes embryonnaires sont causées par des défauts d'implantation en début de grossesse, la connaissance et la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires du «transforming growth factor- β » et de son implication dans les phénomènes embryonnaires nous permettront de mieux comprendre le phénomène des pertes embryonnaires qui est la cause première de l'infertilité chez la femme.

BIBLIOGRAPHIE

- Abrahamsohn, P.A., Zorn, T.M. (1993) "Implantation and decidualization in rodents", *J. Exp. Zool.* 266:603-628.
- 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.
- Allaire, C. (2006) "Endometriosis and infertility: a review", *J. Reprod. Med.* 51:164-168.
- 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.
- Arcuri, F., Ricci, C., Ietta, F., Cintorino, M., Tripodi, S.A., Cetin, I., Garzia, E., Schatz, F., Klemi, P., Santopietro, R., Paulesu, L. (2001) "Macrophage migration inhibitory factor in the human endometrium: expression and localization during the menstrual cycle and early pregnancy", *Biol. Reprod.* 64:1200-1205.
- Asselin, E., Mills, G.B., Tsang, B.K. (2001) "XIAP regulates Akt activity and caspase-3-dependent cleavage during cisplatin-induced apoptosis in human ovarian epithelial cancer cells", *Cancer Res.* 61:1862-1868.
- Asselin, E., Wang, Y., Tsang, B.K. (2001a) "X-linked inhibitor of apoptosis protein activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in rat granulosa cells during follicular development" *Endocrinology* 142:2451-2457.
- Attisano, L., Wrana, J.L., Lopez-Casillas, F., Massague, J. (1994) "TGF-beta receptors and actions". *Biochim. Biophys. Acta.* 1222:71-80.
- Barnard, J.A., Lyons, R.M., Moses, H.L. (1990) "The cell biology of transforming growth factor beta", *Biochim. Biophys. Acta.* 1032:79-87.
- 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.
- Birkey Reffey, S., Wurthner, J.U., Parks, W.T., Roberts, A.B., Duckett, C.S. (2001) "X-linked inhibitor of apoptosis protein functions as a cofactor in transforming growth factor-beta signaling", *J. Biol. Chem.* 276:26542-26549.

- Bonvissuto, A.C., Lala, P.K., Kennedy, T.G., Nygard, K., Lee, D.C., Han, V.K. (1992) "Induction of transforming growth factor-alpha gene expression in rat decidua is independent of the conceptus", *Biol. Reprod.* 46:607-616.
- Brock, D.J. and Holloway, S. (1990) "Fertility in older women", *Lancet* 335:1470.
- Brown, J.M, Attardi, L.D. (2005) "The role of apoptosis in cancer development and treatment response", *Nat. Rev. Cancer.* 5:231-237.
- Bruner, K.L., Rodgers, W.H., Gold, L.I., Korc, M., Hargrove, J.T., Matrisian, L.M., Osteen, K.G. (1995) "Transforming growth factor beta mediates the progesterone suppression of an epithelial metalloproteinase by adjacent stroma in the human endometrium", *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 92:7362-7366.
- Bulletti, C., Flamigni, C., Giacomucci, E. (1996) "Reproductive failure due to spontaneous abortion and recurrent miscarriage", *Hum. Reprod.* 2:118-136.
- Bursch, W., Ellinger, A., Gerner, C., Frohwein, U., Schulte-Hermann, R. (2000) "Programmed cell death (PCD). Apoptosis, autophagic PCD, or others?", *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 926:1-12.
- Chatzaki, E., Kouimtzoglou, E., Margioris, A.N., Gravanis, A. (2003) "Transforming growth factor beta1 exerts an autocrine regulatory effect on human endometrial stromal cell apoptosis, involving the FasL and Bcl-2 apoptotic pathways", *Mol. Hum. Reprod.* 9:91-95.
- Chegini, N., Gold, L.I., Williams, R.S. (1994) : "Localization of transforming growth factor beta isoforms TGF-beta 1, TGF-beta 2, and TGF-beta 3 in surgically induced endometriosis in the rat", *Obstet. Gyneco.* 83:455-461.
- Coffer, P.J., Woodgett, J.R. (1991) "Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families", *Eur. J. Biochem.* 201:475-481.
- Cohen, G.M.: "Caspases: the executioners of apoptosis", *Biochem. J.* 326:1-16.
- Cohen, J.C., Duke, R.C. (1994) "Glucocorticoid activation of calcium dependant endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death", *J. Immunol.*, 132:38-42.
- Conery, A.R., Cao, Y., Thompson, E.A., Townsend, C.M.J., Ko, T.C., Luo, K. (2004) "Akt interacts directly with Smad3 to regulate the sensitivity to TGF-beta induced apoptosis", *Nat. Cell. Biol.* 6:366-372.
- 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.

- Curry, T.E. Jr., Osteen, K.G. (2003) "The matrix metalloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle", *Endocr. Rev.* 24:428-465.
- Dalton, S., Hopwood, B. (1997) "Characterization of cdc47p-minichromosome maintenance complexes in *Saccharomyces cerevisiae*: Identification of Cdc45p as a subunit" *Mol. Cell. Biol.* 17:5867-5875.
- Darzynkiewicz, Z., Bruno, S., Del Bino, G., Gorczyca, W., Hotz, M.A., Lassota, P., Traganos, F. (1992) "Features of apoptotic cells measured by flow cytometry", *Cytometry*. 13:795-808
- Das, S.K., Flanders, K.C., Andrews, G.K., Dey, S.K. (1992) "Expression of transforming growth factor-beta isoforms (beta 2 and beta 3) in the mouse uterus: analysis of the periimplantation period and effects of ovarian steroids", *Endocrinology* 130:3459-3466.
- 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.
- Datta, S.R., Brunet, A., Greenberg, M.E. (1999) "Cellular survival: a play in three Akts", *Genes Dev.* 13:2905-2927.
- Dery, M.C., Leblanc, V., Shoener, 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.
- Dey, S.K. (1996) "Implantation" *Reproductive Endocrinology, Surgery and Technology*. Pp.422-433.
- 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.
- Duc-Goiran, P., Mignot, T.M., Bourgeois, C., Ferre, F. (1999) "Embryo-maternal interactions at the implantation site: a delicate equilibrium", *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 83:85-100.
- Dunson, D.B., Colombo, B., Baird, D.D. (2002) "Changes with age in the level and duration of fertility in the menstrual cycle", *Hum. Reprod.* 17:1399-1403.
- Edwards, R.G. (1995) "Physiological and molecular aspects of human implantation", *Hum. Reprod.* 10:1-13.

- Erickson, G.F., Fuqua, L., Shimasaki, S. (2004) "Analysis of spatial and temporal expression patterns of bone morphogenetic protein family members in the rat uterus over the estrous cycle", *J. Endocrinol.* 182:203-217.
- Degli Esposti, M. (2004) "Mitochondria in apoptosis: past, present and future", *Biochem. Soc. Trans.* 32:493-495.
- Fazleabas, A.T. and Strakova, Z. (2002) "Endometrial function: cell specific changes in the uterine environment", *Mol. Cell. Endocrinol.* 186:143-147.
- Fink, S.P., Mikkola, D., Willson, J.K., Markowitz, S. (2003) "TGF-beta-induced nuclear localization of Smad2 and Smad3 in Smad4 null cancer cell lines" *Oncogene.* 22:1317-1323.
- Finn, C.A., Martin, L. (1970) "The onset of progesterone secretion during pregnancy in the mouse", *J. Reprod. Fertil.* 25:299-300.
- Finn, C.A., Martin, L. (1972) "Endocrine control of the timing of endometrial sensitivity to a decidual stimulus", *Biol. Reprod.* 7:82-86.
- Finn, C.A., Publicover, M. (1981) "Hormonal control of cell death in the luminal epithelium of the mouse uterus", *J. Endocrinol.* 91:335-340.
- Gagnon, V., St-Germain, M.E., Parent, S., Asselin, E. (2003) "Akt activity in endometrial cancer cells: regulation of cell survival through cIAP-1", *Int. J. Oncol.* 23:803-810.
- Gerschenson, L.E., Rotello, R.J. (1992) "Apoptosis: a different type of cell death", *FASEB J.* 6:2450-2455.
- Geske, F.J. and Gerschenson, L.E. (2001) "The biology of apoptosis", *Hum. Pathol.* 32:1029-1038.
- Giudice, L.C. "Growth factors and growth modulators in human uterine endometrium: their potential relevance to reproductive medicine", *Fertil. Steril.* 61:1-17.
- Glasser, S.R., Clark, J.H. (1975) "A determinant role for progesterone in the development of uterine sensitivity to decidualization and ovo-implantation", In: *The Developmental Biology of Reproduction.* C.L. Markert and J. Papaconstantinou, ed. Academic Press, New York, pp.311-345.
- Godkin, J.D., Dore, J.J. (1998) "Transforming growth factor beta and the endometrium", *Rev. Reprod.* 3:1-6.
- Govinden, R., Bhoola, K.D. (2003) "Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-beta", *Pharmacol. Ther.* 98:257-265.

- Graham J.D., Clarke C.L. (1997) "Physiological action of progesterone in target tissues" *Endocr Rev*, 18:502-519.
- 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.
- Gupta, A., Ing, N.H., Bazer, F.W., Bustamante, L.S., Jaeger, L.A. (1998) "Beta transforming growth factors (TGFs) at the porcine conceptusmaternal interface. Part I: expression of TGFbeta1, TGFbeta2, and TGFbeta3 messenger ribonucleic acids", *Biol. Reprod.* 59:905-910.
- Gupta, A., Dekaney, C.M., Bazer, F.W., Madrigal, M.M., Jaeger, L.A. (1998) "Beta transforming growth factors (TGFbeta) at the porcine conceptus-maternal interface. Part II: uterine TGFbeta bioactivity and expression of immunoreactive TGFbetas (TGFbeta1, TGFbeta2, and TGFbeta3) and their receptors (type I and type II)", *Biol. Reprod.* 59:911-917.
- Hanada, M., Feng, J. and Hemmings, B.A. (2004) "Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target", *Biochim. Biophys. Acta.* 1697:3-16
- Harlap, S., Shino, P.H., Romchoran, S. (1989) "Life table of spontaneous abortion and the effects of age, parity and other variables", In Porter, I.H. and Hook, E.B. (eds), *Human Embryonic and Foetal Death*. Academic Press, New York, pp.104-106.
- Hata, A., Shi, Y., Massague, J. (1998) "TGF-beta signaling and cancer: structural and functional consequences of mutations in Smads", *Mol. Med. Today.* 4:257-262.
- Herrera, B., Fernandez, M., Benito, M., Fabregat, I.(2002) "cIAP-1, but not XIAP, is cleaved by caspases during the apoptosis induced by TGF-beta in fetal rat hepatocytes", *FEBS Lett.* 520:93-96.
- Hill, J.A., Anderson, D.J. (1990) "Immunological mechanisms in recurrent spontaneous abortion", *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 38:11-119.
- Holcik, M., Gibson, H., Korneluk, R.G. (2001) "XIAP: apoptotic brake and promising therapeutic target", *Apoptosis.* 6:253-261.
- Homburg R. (2003) "The management of infertility associated with polycystic ovary syndrome", *Reprod Biol Endocrinol* 1:109.
- Hu, P.P, Datto, M.B., Wang, X.F. (1998) "Molecular mechanisms of transforming growth factor-beta signaling", *Endocr. Rev.* 19:349-363.
- Hunt, J.S., Robertson, S.A. (1996) "Uterine macrophages and environmental programming for pregnancy success", *J. Reprod. Immunol.* 32:1-25.

- Ignar-Trowbridge, D.M., Nelson, K.G., Bidwell, M.C., Curtis, S.W., Washburn, T.F., McLachlan, J.A., Korach, K.S. (1992) "Coupling of dual signaling pathways: epidermal growth factor action involves the estrogen receptor", *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 89:4658-4662.
- Imamura, T., Takase, M., Nishihara, A., Oeda, E., Hanai, J., Kawabata, M., Miyazono, K. (1997) "Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily", *Nature.* 389:622-626.
- Inman, G.J., Allday, M.J. (2000) "Apoptosis induced by TGF- β 1 in Burkitt's lymphoma cells is caspase 8 dependent but is death receptor independent" *J. Immunol.* 165:2500-2510.
- Javelaud, D., Mauviel, A (2004) "Transforming growth factor-betas: smad signaling and roles in physiopathology", *Pathol Biol (Paris).* 52:50-54.
- Jones, P.F., Jakubowicz, T., Hemmings, B.A. (1991) "Molecular cloning of a second form of rac protein kinase", *Cell. Regul.* 2:1001-1009.
- Joswig, A., Gabriel, H.D., Kibschull, M., Winterhager, E. (2003) "Apoptosis in uterine epithelium and decidua in response to implantation: evidence for two different pathways" *Reprod. Biol. Endocrinol.* 26:1:44.
- Kandel, E.S., 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-kappaB by the Akt/PKB Kinase" *Curr. Biol.* 9:601-604.
- Kaushic, C., Frauendorf, E., Rossoll, R.M., Richardson, J.M., Wira, C.R. (1998) "Influence of the estrous cycle on the presence and distribution of immune cells in the rat reproductive tract", *Am. J. Reprod. Immunol.* 39:209-216.
- Kasof, G.M., Gomes, B.C. (2001) "Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member", *J. Biol. Chem.* 276:3238-3246.
- Kennedy, T.G., Ross, H.E. (1993) "Effect of prostaglandin E2 on rate of decidualization in rats", *Prostaglandins* 46:243-250.
- Kennedy, T.G., Ross, H.E. (1997) "Temporal- and hormone-dependent changes in uterine sensitization for the decidual cell reaction and decidualization in vitro of rat endometrial stromal cells", *J. Reprod. Fertil.* 109:129-136.
- Khwaja, A. (1999) "Akt is more than just a Bad kinase", *Nature.* 401:33-34.

- King, A. (2000) "Uterine leukocytes and decidualization", *Hum. Reprod. Update.* 6:28-36.
- Kleinfeld, R.G., O'Shea, J.D. (1983) "Spatial and temporal patterns of deoxyribonucleic acid synthesis and mitosis in the endometrial stroma during decidualization in pseudopregnant rat", *Biol. Reprod.* 28:691-702.
- Knobil, E., Neill, J.D. (1994) "The physiology of reproduction", 2e éd., Raven press, New York, U. S. A., pp. 403-404; 941-983.
- Konishi, 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.
- Korsmeyer, S.J. (1995) "Regulators of cell death", *Trends Genet.* 11:101-105.
- 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.
- Lea, R.G., Riley, S.C., Antipatis, C., Hannah, L., Ashworth, C.J., Clark, D.A., Critchley, H.O. (1999) "Cytokines and the regulation of apoptosis in reproductive tissues: a review", *Am. J. Reprod. Immunol.* 42:100-109.
- 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.
- Lee, K.Y., DeMayo, F.J. (2004) "Animal models of implantation", *Reproduction* 128:679-695.
- Lin, H.Y., Wang, H.M., Li, Q.L., Liu, D.L., Zhang, X., Liu, G.Y., Qian, D., Zhu, C. (2004) "Expression of Smad2 and Smad4, transforming growth factor-beta signal transducers in rat endometrium during the estrous cycle, pre-, and peri-implantation", *Anim. Reprod. Sci.* 80:303-316.
- Lund, L.R., Romer, J., Thomasset, N. (1996) "Two distinct phases of apoptosis in mammary gland involution: proteinase-independent and dependant pathways", *Development* 122:181-193.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Zipursky, S.L., Darnell, J. (2000) "Molecular cell biology", 4e éd., W.H. Freeman, New York, U. S. A., pp 924-925.

- Lutz, M., Knaus, P. (2002) "Integration of the TGF- β pathway into the cellular signalling network", *Cell Signal*. 14:977-988.
- Lyons, R.A., Djahanbakhch, O., Saridogan, E., Naftalin, A.A., Mahmood, T., Weekes, A., Chenoy, R. (2002) "Peritoneal fluid, endometriosis, and ciliary beat frequency in the human fallopian tube", *Lancet* 360:1221-1222.
- Manova, K., Paynton, B.V., Bachvarova, R.F. (1992) "Expression of activins and TGF beta 1 and beta 2 RNAs in early postimplantation mouse embryos and uterine decidua", *Mech. Dev.* 36:141-152.
- Marieb, E.N. (1993) «Anatomie et Physiologie Humaine» 1^e Édition française, Edition du Renouveau Pédagogique, pp.1014.
- Martin L., Das R.M., Finn C.A. (1973) "The inhibition by progesterone of uterine epithelial proliferation in the mouse" *J Endocrinol*, 57:549-554.
- Massague J. (1990) "The transforming growth factor-beta family" *Annu Rev Cell Biol*, 6:597-641.
- Massague J. (1998) "TGF-beta signal transduction" *Annu Rev Biochem*, 67:753-91.
- Mayer, B.J., Ren, R., Clark, K.L., Baltimore, D. (1993) "A putative modular domain present in diverse signaling proteins", *Cell* 73:629-630.
- Mendoza-Rodriguez C.A., Monroy-Mendoza M.G., Morimoto S., Cerbon M.A. (2003) "Pro-apoptotic signals of the bcl-2 gene family in the rat uterus occurs in the night before the day of estrus and precedes ovulation" *Mol Cell Endocrinol*, 208:31-39.
- Merritt, A.J., Potten, C.S., Kemp, C.J., Hickman, J.A., Balmain, A., Lane, D.P., Hall, P.A. (1994) "The role of p53 in spontaneous and radiation-induced apoptosis in the gastrointestinal tract of normal and p53-deficient mice", *Cancer Res.* 54:614-617.
- Mitra, D., Steiner, M., Lynch, D.H., Staiano-Coico, L., Laurence, J. (1996) "HIV-1 upregulates Fas ligand expression in CD4+ T cells in vitro and in vivo: association with Fas-mediated apoptosis and modulation by aurointricarboxylic acid", *Immunology*. 87:581-585.
- Miyazawa, K., Shinozaki, M., Hara, T., Furuya, T., Miyazono, K. (2002) "Two major Smad pathways in TGF-beta superfamily signalling", *Genes Cells*. 7:1191-1204.
- Moses H.L., Branum E.L., Proper J.A., Robinson R.A. (1981) "Transforming growth factor production by chemically transformed cells" *Cancer Res*, 41:2842-2848.

Moulton, B.C. (1994) "Transforming growth factor-beta stimulates endometrial stromal apoptosis in vitro", *Endocrinology* 134:1055-1060.

Moustakas, A., Souchelnytskyi, S., Heldin, CH. (2001) "Smad regulation in TGF-beta signal transduction", *J. Cell. Sci.* 114:4359-4369.

Munson, L., Wilhite, A., Boltz, V.F. and Wilkinson, J.E. (1996) "Transforming growth factor beta in bovine placentas", *Biol. Reprod.* 55:748-755.

Musacchio, A., Gibson, T., Rice, P., Thompson, J., Saraste, M. (1993) "The PH domain: a common piece in the structural patchwork of signalling proteins", *Trends Biochem. Sci.* 18:343-348.

Nuttall R.K., Kennedy T.G. (2000) "Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor increase the production of matrix metalloproteinases during in vitro decidualization of rat endometrial stromal cells" *Endocrinology*, 141:629-636.

Ogle, T.F., George, P., Dai, D. (1998) "Progesterone and estrogen regulation of rat decidual cell expression of proliferating cell nuclear antigen", *Biol. Reprod.* 59:444-450.

Okada, H., Mak, T.W. (2004) "Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells", *Nat. Rev. Cancer.* 4:592-603.

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

Paria, B.C., Ma, W., Tan, J., Raja, S., Das, S.K., Dey, S.K., Hogan, B.L. (2001) "Cellular and molecular responses of the uterus to embryo implantation can be elicited by locally applied growth factors", *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 98:1047-1052.

Pelton, R.W., Saxena, B., Jones, M., Moses, H.L., Gold, L.I. (1991) "Immunohistochemical localization of TGF beta 1, TGF beta 2, and TGF beta 3 in the mouse embryo: expression patterns suggest multiple roles during embryonic development", *J. Cell. Biol.* 115:1091-1105.

Piva, M., Flieger, O., Rider, V. (1996) "Growth factor control of cultured rat uterine stromal cell proliferation is progesterone dependent" *Biol. Reprod.* 55:1333-1342.

Raff, M.C., Barres, M.C., Burne, J.F., Coles, H.S., Ishizaki, Y., Jacobson, M.D. (1993) "Programmed cell death and the control of cell survival: Lessons from the nervous system", *Science* 262:695-700.

Rango, U., Linke, I., Krusche, C. and Beier, H. (1998) "The receptive endometrium is characterized by apoptosis in the glands" *Human Reproduction* 13:3177-3189.

- Remy, I., Montmarquette, A., Michnick, S.W. (2004) "PKB/Akt modulates TGF-beta signalling through a direct interaction with Smad3", *Nat. Cell. Biol.* 6:358-365.
- Roberts A.B., Anzano M.A., Lamb L.C., Smith J.M., Sporn M.B. (1981) "New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues" *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78:5339-5343.
- Rodriguez-Viciana, P., Wame, P.H., Dhand, R., Vanhaesebroeck, B., Gout, I., Fry, M.J., Waterfield M.D., Downward, J. (1994) "Phosphatidylinositol-3-OH Kinase as a direct target of Ras", *Nature* 370:527-532.
- Rodriguez-Viciana, P., Wame, P.H., Vanhaesebroeck, B., Waterfield M.D., Downward, J. (1996) "Activation of phosphoinositide 3-kinase by interaction with Ras and by point mutation", *EMBO. J.* 15:2442-2451.
- Roelen B.A., Lin H.Y., Knezevic V., Freund E., Mummery C.L. (1994) "Expression of TGF-beta s and their receptors during implantation and organogenesis of the mouse embryo" *Dev Biol*, 166:716-28.
- Sananès, N., Weiller, S., Baulieu, E.E., Le Goascogne, C. (1978) "In vitro decidualization of rat endometrial cells", *Endocrinology* 103:86-95.
- Sanchez-Capelo, A. (2005) "Dual role for TGF-beta1 in apoptosis", *Cytokine Growth Factor Rev.* 16:15-34.
- 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.
- Schimmer, A.D. (2004) "Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice", *Cancer Res.* 64:7183-7190.
- Shiozaki, E.N., Shi, Y. (2003) "Caspases, IAPs and Smac/DIABLO: mechanisms from structural biology", *Trends Biochem. Sci.* 29:486-494.
- Schlaflake, S., Enders, A.C. (1975) "Cellular basis of interaction between trophoblast and uterus at implantation", *Biol. Reprod.* 12:41-65.
- Shoener, 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.
- Siegel, P.M., Massague, J. (2003) "Cytostatic and apoptotic actions of TGF- β in homeostasis and cancer", *Nat. Rev. Cancer* 3:807-820.
- Shuster, N., Krieglstein, K. (2002) "Mechanisms of TGF-beta-mediated apoptosis", *Cell Tissue Res.* 307:1-14.

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.

Steller, H. (1995) "Mechanisms and genes of cellular suicide", *Science* 267:1445-1449.

Strom, C.M., Ginsberg, N., Applebaum, M., Bozorgi, N., White, M., Caffarelli, M., Verlinsky, Y. (1992) "Analyses of 95 first-trimester spontaneous abortions by chorionic villus sampling and karyotype", *J. Assist. Reprod. Genet.* 9:458-461.

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.

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

Tamada, H., McMaster, M.T., Flanders, K.C., Andrews, G.K., Dey, S.K. (1990) "Cell type-specific expression of transforming growth factor-beta1 in the mouse uterus during the periimplantation period", *Mol. Endocrinol.* 4:965-972.

Tarachand, U. (1985) "Morphogenesis and postulated functions of decidual cells", *Biol. Res. Pregnancy Perinatol.* 6:187-190.

Tarachand, U. (1986) "Decidualisation: origin and role of associated cells", *Biol. Cell.* 57:9-16.

Ten Dijke, P., Goumans, M.J., Itoh, F., Itoh, S. (2002) "Regulation of cell proliferation by Smad proteins", *J. Cell. Physiol.* 191:1-16.

Thibault, C., Levasseur, M.C. (2001) « La reproduction chez les mammifères et l'homme », Ellipses Édition Marketing S.A., pp. 460.

Tortora, G.J., Grabowski, S.R. (1994) « Principes d'anatomie et de physiologie », Éditions du Renouveau Pédagogique Inc. Ca., pp. 1204.

Trokoudes K.M., Skordis N., Picolos M.K. (2006) "Infertility and thyroid disorders", *Curr Opin Obstet Gynecol* 18:446-451.

Vanhaesebroeck, B., Alessi, D.R. (2000) "The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB", *Biochem. J.* 346:561-576.

Van Themsche, C., Mathieu, I., Parent, S., Asselin, E. (2006) "Transforming growth factor-beta3 increases the invasiveness of endometrial carcinoma cells through

phosphatidylinositol 3-kinase-dependent upregulation of X-linked inhibitor of apoptosis and protein kinase C-dependent induction of matrix metalloproteinase-9", *J. Biol. Chem.* Sous presse.

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.

Waynforth, H.B., Flecknell, P.A. (1992) "Experimental and surgical technique in the rat", 2e éd., Academic press, San Diego, U. S. A., pp. 256.

Webb, P.D., Glasser, S.R. (1984) "Implantation". In Wolf, D.P. and Quingley, M.M. (eds), *Human in Vitro Fertilization and Embryo Transfer*. Plenum Press, New York, p.341

Welsh A.O. (1993) "Uterine cell death during implantation and early placentation" *Microsc Res Tech*, 25:223-245.

Welsh, A.O., Enders, A.C. (1987) "Trophoblast-decidual cell interactions and establishment of maternal blood circulation in the parietal yolk sac placenta of rat", *Anat. Rec.* 217:203-219.

Wolf, K., Sandner, P., Kurtz, A., Moll, W. (1996) "Messenger ribonucleic acid levels of collagenase (MMP-13) and matrilysin (MMP-7) in virgin, pregnant, and postpartum uterus and cervix of rat", *Endocrinology* 137:5429-5434.

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.

Yang, Y., Fang, S., Jensen, J.P., Weissman, A.M., Ashwell, J.D. (2000) "Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli", *Science.* 288:874-877.

Yingling, J.M., Wang, X.F., Bassing, C.H. (1995) "Signaling by the transforming growth factor-beta receptors", *Biochim. Biophys. Acta.* 1242:115-136.

Zhou, H., Li, X.M., Meinkoth, J., Pittman, R.N. (2000) "Akt regulates cell survival and apoptosis at a postmitochondrial level", *J. Cell. Biol.* 151:483-494.