

Mémoire de recherche présenté à l'Université  
Du Québec à Trois-Rivières

Exigence partielle de la maîtrise en  
Biophysique et biologie cellulaires

Par  
Carl Shooner

Le rôle et l'importance du Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) et de la voie de survie Akt dans l'utérus de rat au cours de la  
gestation

Décembre 2004

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 à remercier mon directeur de recherche, le docteur Éric Asselin, tout d'abord pour m'avoir engagé et par le fait même pour m'avoir accordé sa plus totale et absolue confiance, et pour m'avoir permis de développer mon autonomie de même que la confiance en soi. De nos jours, on a toujours besoin d'un gars dans le laboratoire au cas où il faudrait déménager! Sincèrement, merci de m'avoir fait découvrir le monde de la recherche et permis d'assister à de nombreux congrès internationaux.

Je remercie toutes mes collègues de travail pour leur aide et leur support durant ces deux années : Marie-Ève, Marie-Claude, Véronique, Émilie, Kim, Isabelle et bien sûr Sophie qui m'a beaucoup guidé à travers les protocoles les plus obscurs. Un merci particulier à Madame Rolande Caron pour la quantité phénoménale de travail qu'elle a accompli avec nous à l'animalerie et merci à l'équipe du laboratoire du Docteur Marc Sirois pour les fréquents emprunts de matériel et pour leur humanisme!

Un merci à tous les gens que j'ai eu le bonheur de côtoyer durant mes études, qui me sont venus en aide et qu'il m'a fait plaisir d'aider. Enfin, un énorme merci à ma collègue (dans un premier temps) et monoureuse (finalement!) de m'avoir permis de traverser toutes ces épreuves et sans qui je n'aurais probablement pas eu la force de tout terminer; à mon amour, ma belle Valérie.

Merci infiniment.

## Résumé

Lors de l'implantation embryonnaire chez le rat, les cellules trophoblastiques du blastocyste en développement viennent en contact direct avec la surface de la paroi utérine; au cours de ce processus, les cellules épithéliales de l'endomètre de l'utérus se trouvant en contact avec ces cellules embryonnaires entrent dans un processus apoptotique ayant pour but de laisser place à l'embryon pour que celui-ci s'implante. Une fois implanté, l'embryon progresse à l'intérieur de la paroi utérine jusqu'à son recouvrement complet. Pendant ce temps, les cellules trophoblastiques (qui formeront le placenta) amorcent la formation du syncytiotrophoblaste qui mènera ultérieurement à la formation du système circulatoire utéro-placentaire permettant les échanges nutritifs et gazeux entre la mère et l'embryon. Au cours de son développement, l'embryon continue de grossir et lorsqu'il atteint le jour 14 de la gestation, une autre vague d'apoptose se produit pour lui permettre de continuer son développement. Ce second phénomène apoptotique se produit au niveau des cellules déciduales d'origine stromales de l'utérus, cellules qui ont subi un processus de transformation sous l'effet des hormones sexuelles femelles soit l'oestrogène et la progestérone. Cette transformation s'appelle la décidualisation et la phase apoptotique qui survient au jour 14 de la gestation chez le rat se nomme la régression déciduale.

Jusqu'à maintenant, nous détenons très peu d'information sur les mécanismes intracellulaires qui sont impliqués dans la régulation de l'apoptose dans l'utérus durant la gestation. L'importance des stéroïdes sexuels (estrogènes et progestérone) dans la régulation de l'implantation et de la décidualisation est bien établie; cependant, le processus concernant la voie de signalisation impliquant le Transforming Growth Factor- $\beta$  et la façon dont ces divers éléments interagissent dans la régulation intracellulaire pour déterminer la mort ou la survie cellulaire est bien peu documentée.

La voie de signalisation de TGF- $\beta$  est impliquée dans plusieurs processus cruciaux tels régulation de la croissance, la différenciation, l'adhésion, la motilité cellulaire de même que dans le phénomène de l'apoptose et de l'angiogénèse. Ces facteurs sont évidemment



très importants au cours du développement de l'embryon. L'objectif de cette étude est de mieux comprendre les mécanismes de régulation de l'apoptose chez le rat durant la gestation. Beaucoup de voies cellulaires sont impliquées dans ce processus mais nous nous concentrerons sur la voie de survie cellulaire phosphatidylinositol-3 kinase/Akt et de son interaction avec la voie du TGF- $\beta$ . Bien des études ont démontré le rôle et l'importance de certaines molécules de la voie de survie cellulaire phosphatidylinositol-3 kinase durant le phénomène de mort cellulaire programmée; de plus, des molécules récentes découvertes depuis peu dans cette même voie de signalisation font encore l'objet de bien des questionnements (XIAP, Smac/DIABLO, les caspases, etc.). Pour ce faire, des techniques *in vivo* et *in vitro* ont été utilisées : immunohistochimie, technique TUNEL, extraction de protéines pour l'immunobuvardage de type western, coloration de l'ADN par la technique Hoechst, vérification de la viabilité des cellules par la technique Trypan Blue , ovariectomies sur les rats et induction de la pseudo-gestation pour la culture cellulaire.

Les travaux obtenus ont permis, dans un premier temps, de caractériser l'expression de protéines clés de la voie de survie phosphatidylinositol-3 kinase/Akt et dans un deuxième temps de démontrer leur interaction avec TGF- $\beta$ . Les résultats *in vitro* démontrent clairement l'action de TGF- $\beta$  sur les protéines Akt, P-Akt, XIAP et CDC47. L'expression de la protéine P-Akt, protéine clé pour le processus de survie cellulaire, s'est trouvée fortement diminuée durant les phénomènes apoptotiques de même que CDC47/MCM7, un facteur de prolifération. XIAP, une protéine anti-apoptotique, s'est avérée fortement exprimée durant la régression déciduale. Une partie de la réponse venait du fait que les isoformes de TGF- $\beta$  ( $\beta$ 1,  $\beta$ 2 et  $\beta$ 3) sont fortement exprimés durant cette période (des études menées dans d'autres laboratoires ont démontré que TGF- $\beta$  est en mesure de réguler XIAP). Notre laboratoire a aussi démontré que la protéine Smac/DIABLO, un inhibiteur de XIAP, est faiblement exprimée durant certaines phases apoptotiques.

Les trois isoformes de TGF- $\beta$  démontrent une forte expression durant les phases apoptotiques ce qui nous amène à penser que TGF- $\beta$  s'avère être une protéine clé lors de ce processus; d'autant plus que l'ajout de TGF- $\beta$ 1 dans les cultures cellulaires diminuent

directement l'expression de XIAP et P-Akt, deux protéines importantes pour la survie cellulaire. Des analyses supplémentaires s'avèreront nécessaires pour déterminer avec plus de précision l'effet des isoformes  $\beta 2$  et  $\beta 3$  sur la voie de survie phosphatidylinositol-3 kinase/Akt lors des analyses *in vitro*. Ces études démontrent l'importance du TGF- $\beta$  lors des processus apoptotiques reliés à l'implantation et pendant la grossesse; un dérèglement de ces processus pourraient entraîner un échec au niveau de l'implantation du blastocyste et ainsi provoquer des problèmes d'infertilité.

# Table des matières

|                                                                                  | Pages     |
|----------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Remerciements .....</b>                                                       | <b>2</b>  |
| <b>Résumé .....</b>                                                              | <b>3</b>  |
| <b>Table des matières.....</b>                                                   | <b>6</b>  |
| <b>Liste des figures.....</b>                                                    | <b>9</b>  |
| <b>Liste des symboles et abréviations.....</b>                                   | <b>11</b> |
| <br><b>Chapitre I</b>                                                            |           |
| <b>Introduction .....</b>                                                        | <b>13</b> |
| <b>1.1 L'infertilité féminine.....</b>                                           | <b>14</b> |
| <b>1.2 L'anatomie de l'utérus chez le rat .....</b>                              | <b>15</b> |
| <b>1.3 L'implantation embryonnaire.....</b>                                      | <b>15</b> |
| 1.3.1 Les étapes de l'implantation.....                                          | 17        |
| <b>1.4 La décidualisation .....</b>                                              | <b>20</b> |
| <b>1.5 L'apoptose.....</b>                                                       | <b>22</b> |
| 1.5.1 Historique de l'apoptose.....                                              | 22        |
| 1.5.3 Principaux rôles de l'apoptose.....                                        | 25        |
| <b>1.6 Le Transforming Growth Factor-<math>\beta</math>.....</b>                 | <b>26</b> |
| 1.6.1 Activation du TGF- $\beta$ et liaison à son récepteur .....                | 27        |
| 1.6.2 Transduction du signal induit par TGF- $\beta$ : les protéines Smads ..... | 28        |
| <b>1.7 Voie de survie phosphatidylinositol 3-kinase/Akt (PI3-K/Akt) .....</b>    | <b>29</b> |
| 1.7.1 Les caspases .....                                                         | 33        |
| 1.7.2 X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein.....                               | 34        |

|       |                                                               |           |
|-------|---------------------------------------------------------------|-----------|
| 1.7.3 | Bcl-2, protéine anti-apoptotique .....                        | 36        |
| 1.7.4 | PTEN, homologue de la phosphatase et de la tensine .....      | 37        |
| 1.7.5 | CDC47/MCM7, protéine régulatrice du cycle cellulaire .....    | 37        |
| 1.8   | <b>Le modèle animal .....</b>                                 | <b>38</b> |
| 1.8.1 | Détermination du cycle oestral en vue de l'accouplement ..... | 38        |
| 1.8.2 | Induction de la pseudo-gestation et culture cellulaire .....  | 41        |
| 1.9   | <b>Hypothèse et objectifs .....</b>                           | <b>42</b> |

## **Chapitre II**

|                                                                                                            |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>TGF-<math>\beta</math> expression during rat pregnancy and activity on decidual cell survival .....</b> | <b>44</b> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|

|                           |    |
|---------------------------|----|
| Préface .....             | 45 |
| Résumé de l'article ..... | 46 |
| ABSTRACT .....            | 49 |
| INTRODUCTION .....        | 50 |
| MATERIAL AND METHOD ..... | 51 |
| RESULTS .....             | 56 |
| DISCUSSION .....          | 59 |
| ACKNOWLEDGMENTS .....     | 63 |
| REFERENCES .....          | 64 |
| FIGURE LEGEND .....       | 69 |

## **Chapitre III**

|                                                                                                                                                                     |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Regulation of XIAP expression and Akt activity are important mechanisms to control apoptosis and cell survival in the endometrium during rat pregnancy .....</b> | <b>78</b> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|

|                           |    |
|---------------------------|----|
| Préface .....             | 78 |
| Résumé de l'article ..... | 80 |

|                                 |           |
|---------------------------------|-----------|
| <b>ABSTRACT .....</b>           | <b>82</b> |
| <b>INTRODUCTION.....</b>        | <b>83</b> |
| <b>MATERIAL AND METHOD.....</b> | <b>85</b> |
| <b>RESULTS .....</b>            | <b>89</b> |
| <b>DISCUSSION .....</b>         | <b>90</b> |
| <b>ACKNOWLEDGMENTS .....</b>    | <b>93</b> |
| <b>REFERENCES .....</b>         | <b>94</b> |
| <b>FIGURE LEGEND .....</b>      | <b>98</b> |

## **Chapitre IV**

|                                                  |            |
|--------------------------------------------------|------------|
| <b>Discussion et perspectives d'avenir .....</b> | <b>105</b> |
| <b>4.1 Discussion.....</b>                       | <b>106</b> |
| <b>4.2 Perspectives d'avenir .....</b>           | <b>115</b> |
| <b>RÉFÉRENCES .....</b>                          | <b>117</b> |

# Liste des figures

|                                                                                                                                                                                    | Pages |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| <b>Figure 1.1</b> Structure anatomique du système reproducteur interne chez la femelle du rat.....                                                                                 | 16    |
| <b>Figure 1.2</b> Coupe histologique d'une corne d'utérus de rat.....                                                                                                              | 18    |
| <b>Figure 1.3</b> Apposition, adhésion et invasion du trophoblaste durant l'implantation embryonnaire .....                                                                        | 19    |
| <b>Figure 1.4</b> Cellules stromales et déciduales de l'utérus.....                                                                                                                | 21    |
| <b>Figure 1.5</b> Différences physiologiques lors de la mort cellulaire par apoptose et nécrose .....                                                                              | 24    |
| <b>Figure 1.6</b> Schéma général de la voie de signalisation de TGF- $\beta$ .....                                                                                                 | 30    |
| <b>Figure 1.7</b> Schéma général de la voie de signalisation de PI3-K/Akt.....                                                                                                     | 32    |
| <b>Figure 1.8</b> Schéma général de la voie de signalisation de XIAP et de l'action des caspases.....                                                                              | 35    |
| <b>Figure 1.9</b> Les différents types de placentation.....                                                                                                                        | 39    |
| <b>Figure 1.10</b> Les étapes du cycle oestral chez le rat .....                                                                                                                   | 40    |
| <b>Figure 1.11</b> Grille chronologique du temps de gestation chez le rat.....                                                                                                     | 43    |
| <b>Figure 2.1</b> Detection of apoptosis in pregnant endometrial tissues demonstrated by Western and TUNEL analyses.....                                                           | 71    |
| <b>Figure 2.2</b> TGF- $\beta$ 1, - $\beta$ 2 and - $\beta$ 3 expression in rat endometrium during rat pregnancy.....                                                              | 72    |
| <b>Figure 2.3</b> Immunohistochemistry of TGF- $\beta$ 1, - $\beta$ 2 and - $\beta$ 3 in rat endometrium during pregnancy.....                                                     | 73    |
| <b>Figure 2.4</b> Smad2 and phospho-Smad2 (P-Smad2) expression in rat endometrium during rat pregnancy.....                                                                        | 74    |
| <b>Figure 2.5</b> Measurement of apoptosis in rat decidual cells as demonstrated by Hoechst staining, TUNEL and trypan blue exclusion analyses in response to TGF- $\beta$ 1 ..... | 75    |

|                   |                                                                                                                               |     |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figure 2.6</b> | Expression of Smad2, P-Smad2 and CDC47 in rat decidual cells<br><i>in vitro</i> as demonstrated by Western blot analyses..... | 76  |
| <b>Figure 2.7</b> | Expression of Akt, P-Akt and XIAP in rat decidual cells <i>in vitro</i> as<br>demonstrated by Western blot analyses.....      | 77  |
| <b>Figure 3.1</b> | Immunohistochemistry of CDC47/MCM7 proliferation marker in rat<br>endometrium during pregnancy.....                           | 100 |
| <b>Figure 3.2</b> | Akt and phospho-Akt expression in rat endometrium during rat<br>pregnancy .....                                               | 101 |
| <b>Figure 3.3</b> | Bcl-2 and PTEN expression in rat endometrium during rat<br>pregnancy.....                                                     | 102 |
| <b>Figure 3.4</b> | XIAP and CDC47/MCM7 expression in rat endometrium during rat<br>pregnancy.....                                                | 103 |
| <b>Figure 3.5</b> | Effect of PI 3-K inhibitor (LY294002) on Akt, phospho-Akt and XIAP<br>expression in rat decidual cells.....                   | 104 |

## Liste des symboles et abréviations

|                |                                                              |
|----------------|--------------------------------------------------------------|
| aa             | Acide aminé                                                  |
| ADN            | Acide désoxyribonucléique                                    |
| Akt            | Activated by kinase tyrosine                                 |
| Apaf-1         | Apoptotic protease-activating factor-1                       |
| Bad            | Bcl-2-antagonist of cell death                               |
| Bax            | Bcl-2-associated X protein                                   |
| Bcl-2          | B-cell lymphoma 2                                            |
| Bcl-XL         | Bcl-2-like 1                                                 |
| BIRs           | Baculovirus Iap repeats                                      |
| BSA            | Bovine serum albumin                                         |
| C-             | Contrôle négatif                                             |
| Caspase        | Cysteine aspartic acid-specific proteases                    |
| CDC47/MCM7     | Cell division cycle 47/ Minichromosome maintenance protein 7 |
| cIAP-1         | Mammalian IAP homolog B                                      |
| cIAP-2         | Mammalian IAP homolog C                                      |
| COX-2          | Cyclooxygénase-2                                             |
| CSF            | Colony-stimulating factor                                    |
| DAB            | 3,3'-diaminobenzidine                                        |
| E <sub>2</sub> | 17 $\beta$ -estradiol                                        |
| EGF            | Epidermal growth factor                                      |
| EPF            | Early pregnancy factor                                       |
| et al.         | Plus d'un auteur                                             |
| FAS            | Fatty acid synthase                                          |
| FGF            | Fibroblast growth factor                                     |
| g              | Gramme                                                       |
| IAP            | Inhibitor of apoptosis protein                               |
| IGF            | Insuline-like growth factor                                  |
| kb             | Kilobase                                                     |



|                  |                                                                                |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| kDa              | Kilodalton                                                                     |
| kg               | Kilogramme                                                                     |
| LIF              | Leukémie inhibitory factor                                                     |
| LY294002         | 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-chromone                                            |
| mM               | Millimolaire                                                                   |
| NAIP             | Neuronal apoptosis inhibitory protein                                          |
| NF- $\kappa$ B   | Nuclear factor kappa B                                                         |
| P <sub>4</sub>   | Progesterone                                                                   |
| P-Akt            | Phosphorylated Akt                                                             |
| PARP             | Poly (ADP-ribose) polymerase                                                   |
| PBS              | Phosphate buffer salt                                                          |
| PDGF             | Platelet-derived growth factor                                                 |
| PDK              | Phosphoinositide dependant kinase                                              |
| PIF              | Preimplantation factor                                                         |
| PI3-K            | Phosphatidylinositol 3-kinase                                                  |
| PIP <sub>2</sub> | Phosphoinositol diphosphate                                                    |
| PIP <sub>3</sub> | Phosphoinositol triphosphate                                                   |
| PKB              | Protein B kinase                                                               |
| POD              | Peroxidase oxydo-reductase                                                     |
| PTEN             | Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten                       |
| Région GS        | Richesse en glycine et sérine                                                  |
| SDS              | Sodium dodecyl sulfate                                                         |
| Smac/DIABLO      | Second mitochondrial activator of caspases / Direct Iap binding protein low pI |
| TGF- $\beta$     | Transforming growth factor- $\beta$                                            |
| TNF- $\alpha$    | Tumor necrosis factor alpha                                                    |
| TUNEL            | Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling          |
| $\mu$ g          | Microgramme                                                                    |
| $\mu$ m          | Micromètre                                                                     |
| XIAP             | X-linked inhibitor of apoptosis protein                                        |

# **Chapitre I**

## **Introduction**

## 1.1 L'infertilité féminine

Le succès de la reproduction chez les mammifères dépend d'une association très intime entre les tissus embryonnaires et maternels ; un système de communication très sophistiqué est donc nécessaire pour permettre ce processus complexe. Différents types de conditions peuvent causer des problèmes d'infertilité : des désordres hormonaux ou ovulatoires eux-mêmes provoqués par des problèmes au niveau de la glande thyroïde (Poppe et al. 2002) ou encore des infections bactériennes créant de l'inflammation au niveau de l'utérus ou des trompes utérines (salpingite) (Sharma et al. 2003). Des fibromes peuvent également interférer au niveau de l'implantation embryonnaire ou du développement de l'embryon de même que certaines maladies auto-immunes attaquant les spermatozoïdes du partenaire (Domagala et al. 1997). L'endométriose, un état dans lequel du tissu utérin (muqueuse utérine) se développe en dehors de l'utérus, peut provoquer des lésions et ainsi bloquer les trompes utérines ou gêner la fonction ovulatoire. Ces lésions peuvent être à l'origine de douleurs et de dommages importants conduisant à l'infertilité. De plus, il a été découvert récemment que le mouvements des cils des trompes utérines diminue de façon considérable chez les femmes atteintes d'endométriose (Lyons et al. 2002), nuisant ainsi au déplacement de l'ovule jusque dans l'utérus. Beaucoup de cas d'infertilité féminine sont liés à des problèmes au niveau de l'implantation de l'embryon: c'est au niveau de cette problématique que cette étude s'avérera importante.

Pour une implantation réussie, l'utérus doit être réceptif et avoir été préalablement préparé par la production de progestérone; de ce fait, une défectuosité de la phase lutéale peut mener à un échec de l'implantation embryonnaire. Si ce phénomène se répète trop souvent, plusieurs échecs consécutifs peuvent mener à la formation de tissus cicatriciels sur la paroi utérine et de ce fait limiter encore plus le phénomène d'implantation. Approximativement 80% des pertes embryonnaires sont dues à des malfunctions ou à des problèmes de communications entre les tissus embryo-maternels durant les premières étapes de la gestation (Bulletti et al. 1996; Webb et al. 1984). La période de l'implantation et celle du maintien de la gestation sont cruciales pour assurer un succès reproductif. On estime chez l'humain que seulement trois embryons sur huit pourront dépasser la huitième

semaine de grossesse (Bulletti et al. 1996; Webb et al. 1984). La compréhension des mécanismes impliqués dans ce phénomène est donc primordiale dans la lutte contre l'infertilité féminine.

## **1.2 L'anatomie de l'utérus chez le rat**

Étant donné la difficulté de faire des recherches sur des tissus humains, notre choix s'est porté sur le rat comme modèle animal (ce choix repose sur différents critères expliqués au chapitre 1.8). L'utérus du rat est constitué de deux cornes parallèles d'environ cinq centimètres chacune; ces cornes sont situées sur chaque côté de la cavité abdominale au-dessus du vagin. Une veine et une artère principales se retrouvent sur toute la longueur de l'utérus et se termine dans les ovaires à l'extrémité de chacune des cornes utérines. Les deux ovaires sont de petite taille, de forme circulaire et sont situés juste sous les reins. Chaque ovaire est attaché à l'utérus via les oviductes regroupés en petits paquets très denses sous les ovaires (Waynforth et al. 1992; voir figure 1.1 pour l'anatomie générale). L'implantation et le développement des embryons se fait sur toute la longueur des cornes utérines, une portée pouvant comporter entre dix et quinze embryons.

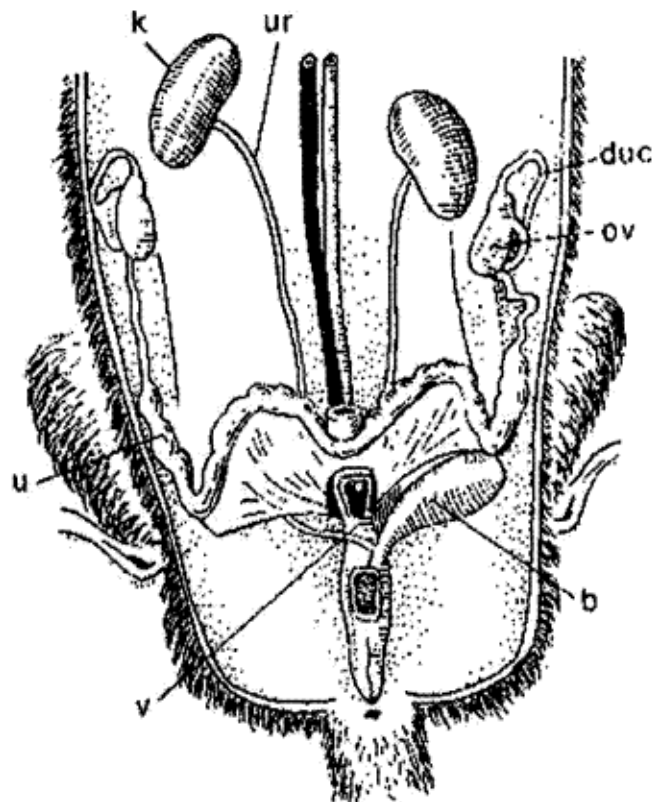
## **1.3 L'implantation embryonnaire**

Après la fécondation (formation du zygote), la membrane pellucide de l'ovocyte devient infranchissable pour d'autres spermatozoïdes. Le noyau de l'ovocyte termine alors sa deuxième division méiotique. Dans la cellule, les deux pronucléïs, mâle et femelle, se rapprochent, fusionnent et entreprennent la première division du zygote. Les divisions cellulaires successives aboutissent à la formation d'un amas cellulaire soit le stade morula; ces divisions cellulaires se font à volume constant, la morula ayant à peu près la même taille que l'ovule. Chez le rat, le stade morula est atteint au troisième jour de gestation (Thibeault et al. 2001) et c'est sous cette forme que l'embryon pénètre dans l'utérus de la femelle. Il y a perte de la zone pellucide vers le cinquième jour de la gestation et l'implantation a lieu cette même journée (Thibeault et al. 2001). Lors de l'implantation, l'embryon a atteint le stade de blastocyste (les cellules se différencient en une couche

Reproductive organs of the female rat, *Rattus norvegicus*.  
b—bladder, duc—oviduct, k—kidney, ov—ovary, u—uterus, ur—ureter, v—vagina

Légende:

b : vessie  
v : vagin  
u : utérus  
ov : ovaire  
duc : oviducte  
ur : uretère  
k : rein



(from Kowalski, 1976)

**Figure 1.1 : Structure anatomique du système reproducteur interne chez la femelle du rat.**

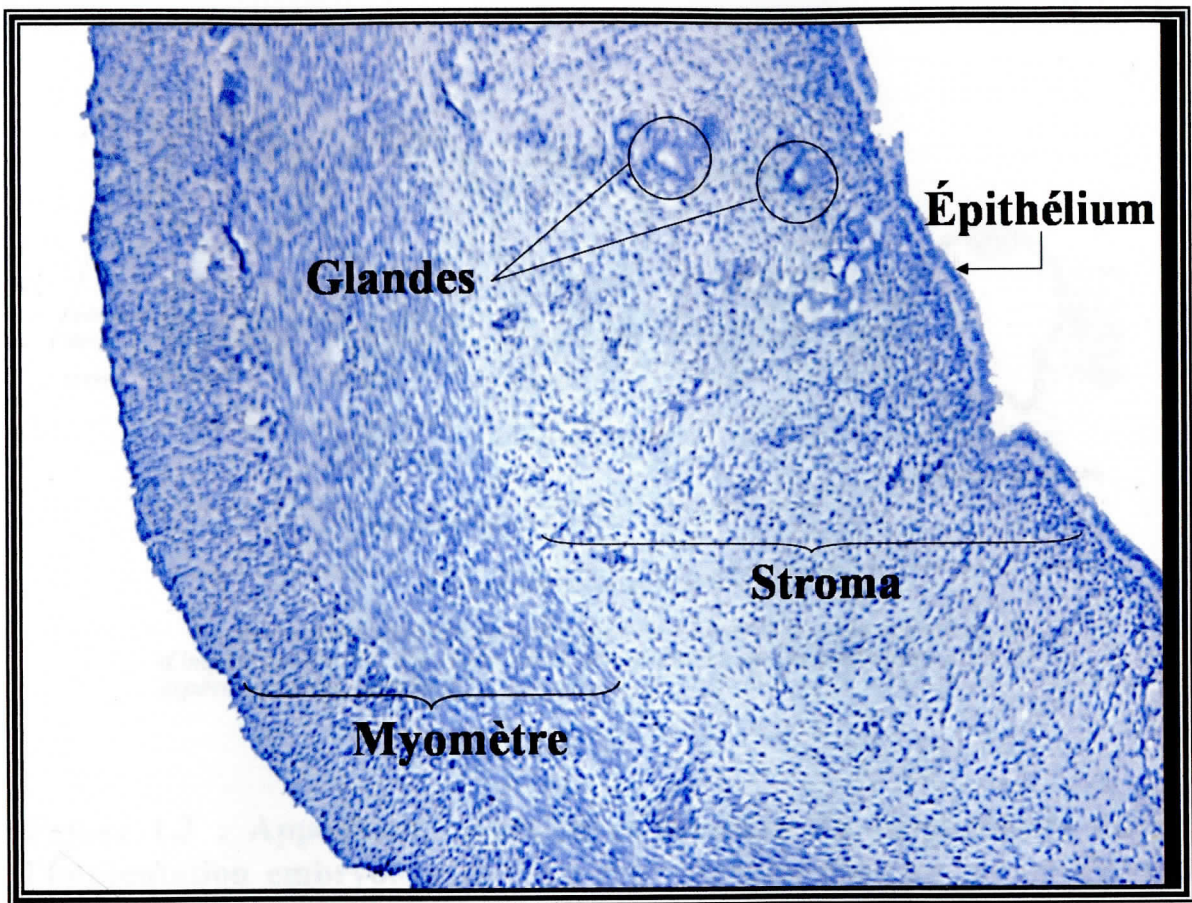
externe), le trophoblaste (qui deviendra le placenta et ses annexes), et une masse cellulaire interne, l'embryoblaste (ou bouton embryonnaire) à partir duquel l'embryon se développera) afin de s'accoler à la surface de la paroi utérine. L'accolement de l'embryon est facilité par les mouvements du myomètre (Abrahamson et al. 1993). Cette contractilité du myomètre permet l'espacement des divers sites d'implantation chez le rat.

Les cellules du trophoblaste qui se retrouvent à la surface du blastocyste vont entrer en contact avec l'endomètre (voir figure 1.2 pour la structure de l'utérus). Durant quelques jours, ces cellules trophoblastiques se multiplient et s'incrudent en profondeur dans l'endomètre afin de mettre en place, avec l'organisme maternel, les échanges nécessaires au développement de l'embryon. Il s'agit d'une sorte de semi allogreffe qui ne peut réussir que grâce à l'action "anti-rejet" du trophoblaste qui tend à "masquer" les antigènes embryonnaires par la production de facteurs immunosuppresseurs (progestérone, LIF; Ragusa et al. 2004; Thellin et al. 2000) . Sans cette action, l'embryon qui a un patrimoine génétique en partie différent de celui de sa mère, devrait être reconnu comme un corps étranger et rejeté par le système immunitaire maternel.

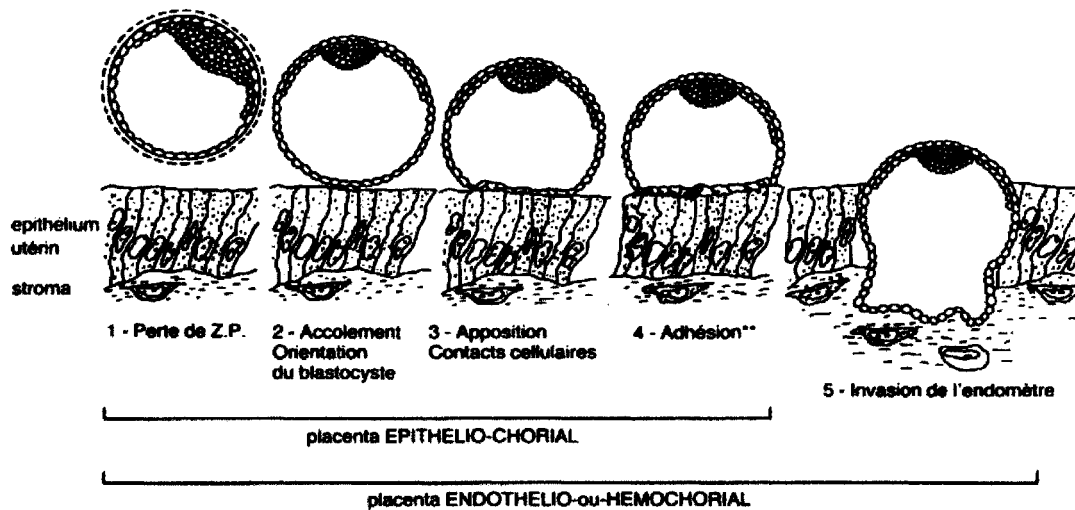
### **1.3.1 Les étapes de l'implantation**

L'implantation se déroule en trois phases (Thibeault et al. 2001) soit 1) l'apposition, qui constitue un contact entre le trophoblaste et l'endomètre, 2) l'adhésion, où l'interdigitation des membranes plasmiques de l'utérus et du trophoblaste est plus étroite (à ce stade, le déplacement de l'embryon endommagerait les tissus) 3) l'attachement (invasion) : le chorion émet des villosités et s'ancre véritablement dans la paroi de l'utérus (voir figure 1.3). L'importance des dégâts occasionnés à l'utérus varie en fonction du type de placentation. Cet attachement constitue également un processus relativement peu documenté sur le plan immunitaire.

Pour que cette implantation réussisse, il faut aussi que l'endomètre soit prêt à se laisser coloniser par le trophoblaste embryonnaire : l'implantation ne peut en effet se faire que lorsque la muqueuse a reçu les stimulations hormonales idéales, essentiellement par les oestrogènes dans un premier temps, et suivi par la progestérone (Ogle 2002). Les



**Figure 1.2 : Coupe histologique d'une corne d'utérus de rat (photo obtenue dans le laboratoire du Dr Éric Asselin).**



*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 1.3 : Apposition, adhésion et invasion du trophoblaste durant l'implantation embryonnaire ("La reproduction chez les mammifères et l'homme" Thibault 2001).**



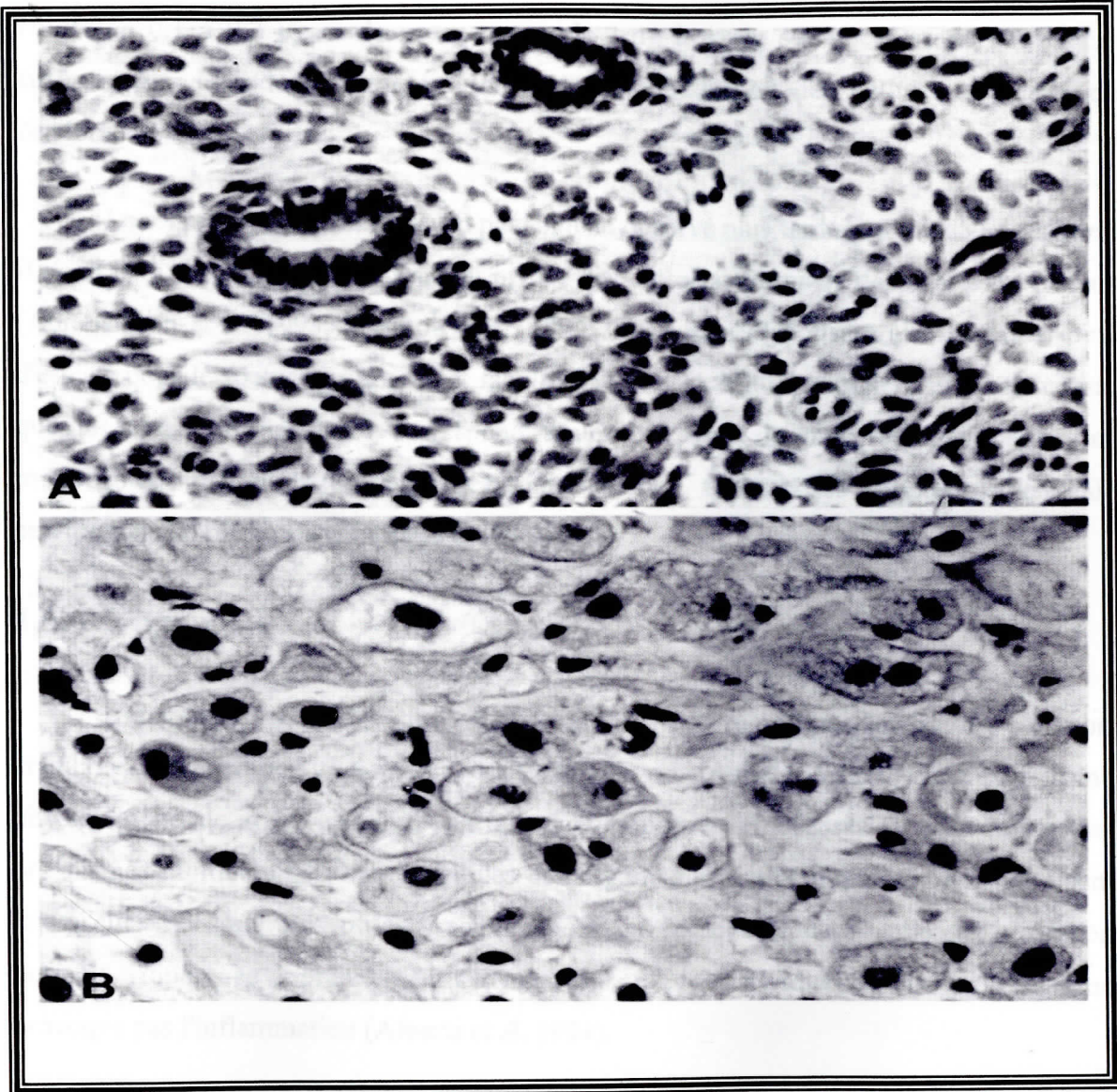
principaux facteurs responsables de la préparation de l'implantation sont les hormones sexuelles, oestrogène et progestérone, de même que plusieurs facteurs de croissance tel que EGF, PIF, EPF, IGF, TGF- $\alpha$  et TGF- $\beta$ 1,2,3, CSF, FGF et PDGF. Ces facteurs (sécrétés par l'endomètre utérin et par le blastocyste lui-même) ont été établis et bien documentés chez l'humain de même que chez les rongeurs (Dey 1996; Edwards 1995; Goiran et al. 1999).

L'implantation est une étape cruciale dans le processus de reproduction. Chez le rat, l'implantation a lieu entre le cinquième et le sixième jour (Abrahamson et al. 1993; Dey et al. 1996). Lorsque la paroi utérine et l'embryon sont prêts à entrer en contact, l'embryon va s'accoler puis s'implanter profondément dans l'endomètre utérin (Tabibzadeh et al. 1995; Barkai et al. 1996). Pour ce faire, les cellules de surface de l'utérus (cellules épithéliales) entrent dans une phase apoptotique (mort cellulaire programmée), laissant ainsi un espace pour que les cellules trophoblastiques de l'embryon s'implantent (Pampfer et al. 1999). Le processus apoptotique sera abordé en détail un peu plus loin (chapitre 1.5.2).

#### **1.4 La décidualisation**

L'implantation embryonnaire dans la paroi utérine est accompagnée par une transformation au niveau des cellules stromales de l'endomètre, soit les cellules du tissu utérin se retrouvant directement sous les cellules épithéliales de la paroi utérine (voir figure 1.4 pour la décidualisation). Cette transformation, qui s'opère sous l'effet des hormones ovariennes soit les oestrogène et la progestérone, consiste en la modification de la forme, de l'organisation et du métabolisme des cellules stromales de l'utérus conduisant ainsi à la formation de la décidue (Ogle et al. 2002; Kennedy et al. 1997; Sherwood 1997).

La décidualisation possède quelques caractéristiques importantes : 1) les cellules stromales endométriales doivent avoir été préalablement et adéquatement préparées par les stéroïdes ovariens (Ogle 2002), 2) le processus de décidualisation n'apparaît que dans la région directement adjacente à la région d'implantation (Dey 1996), 3) la transformation peut être induite artificiellement dans l'utérus sans l'implantation d'un embryon par l'injection d'hormones stéroïdes (Kennedy et al. 1997).



**Figure 1.4 : Cellules stromales de l'utérus (A); cellules déciduales après transformation ("La reproduction chez les mammifères et l'homme" Thibault 2001).**

L'induction de la pseudo-gestation se fait au moyen d'injections d'estrogènes et de progestérone afin de mimer les concentrations de ces hormones stéroïdes. Les stéroïdes étant liposolubles, les injections se font avec de l'huile de sésame pour ainsi favoriser la pénétration des hormones dans les tissus. Chez le rat, des concentrations d'estrogènes de l'ordre de 0.1 à 0.2 µg et de progestérone de 1mg à 4 mg sur une période de 8 jours suffisent à induire la pseudo-gestation et la décidualisation des cellules stromales de l'endomètre.

La régression déciduale est un phénomène observé plus tard au cours de la gestation; il s'agit d'un processus apoptotique au niveau des cellules stromales déciduales de l'utérus (Abrahamson et al. 1993; Moulton et al, 1994; Gu et al. 1994) visant ainsi à laisser plus d'espace pour le fœtus qui grossit et faciliter la suite de son développement. Il est connu que la régression déciduale correspond à un processus de mort cellulaire mais les mécanismes intracellulaires concernés sont inconnus. Cette phase apoptotique cruciale servira donc de référence dans cette étude.

## **1.5 L'apoptose**

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est un phénomène naturel de mort cellulaire et constitue un domaine de recherche relativement récent. C'est une forme physiologique de mort cellulaire parfaitement contrôlée et nécessaire à la survie des organismes multicellulaires. Les cellules des organismes multicellulaires s'autodétruisent lorsqu'elles ne sont plus utiles, endommagées ou incapables de fonctionner de façon normale. L'apoptose implique habituellement des cellules individuelles dans un tissu et ne provoque pas l'inflammation (Alberts et al. 1994).

### **1.5.1 Historique de l'apoptose**

Un des premiers documents à relater le processus de mort cellulaire programmée a été écrit en 1842 par Carl Vogt (Peter et al. 1997). Il décrivait comment les cellules mouraient de façon naturelle au cours du développement des nerfs et des os. Il y eut par la suite Weismann (1863), qui décrivit une déprivation cellulaire au moment du

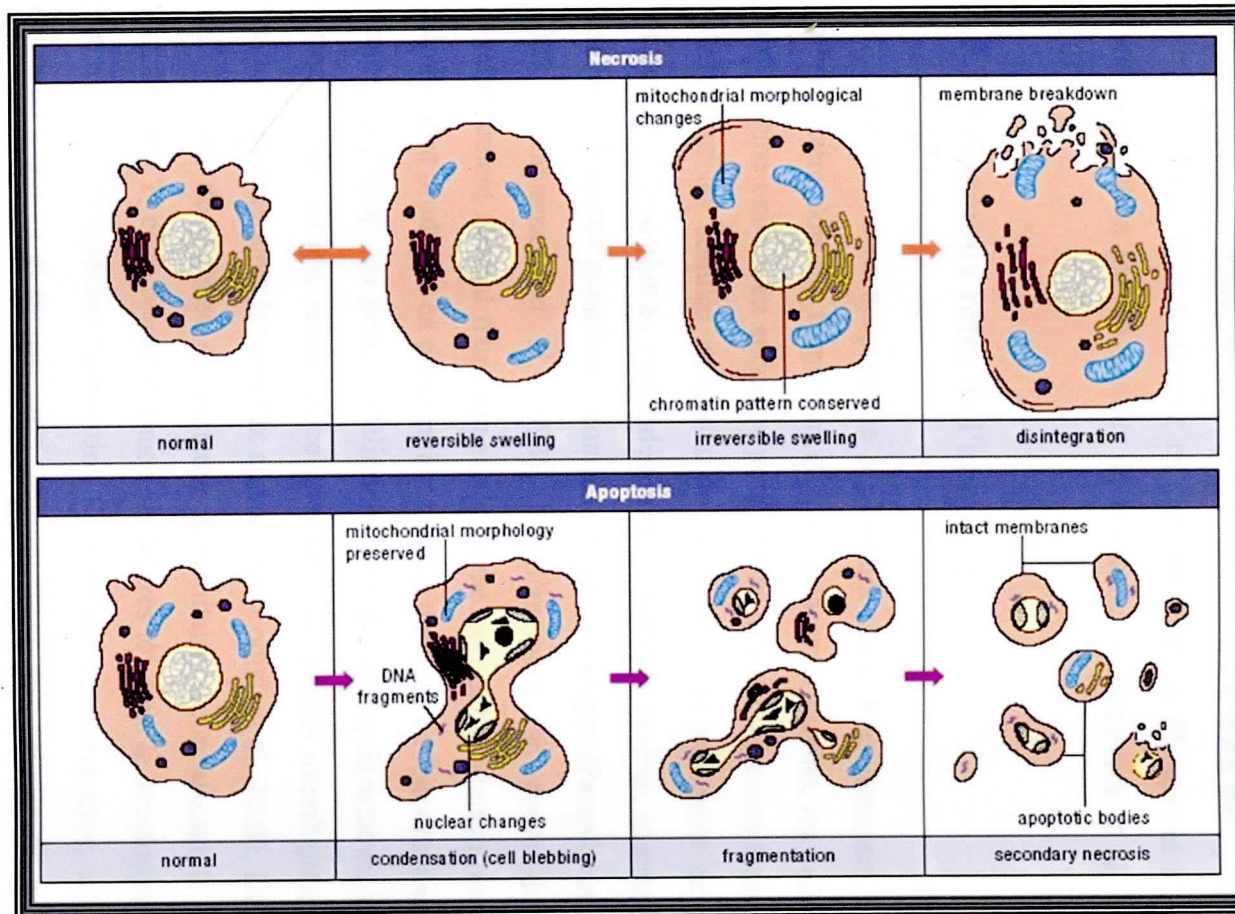
développement embryonnaire des diptères qu'il appela "hystolyse" (*hystolysis*) (Rango et al. 1998). En 1972, Kerr, Wyllie et Currie (Kerr et al. 1972) ont décrit une mort cellulaire du même type que plusieurs auteurs avaient préalablement observé dans divers tissus et divers types cellulaires. Ces cellules mourantes démontraient des caractéristiques morphologiques communes, mais cependant distinctes de celles observées chez les cellules mourant accidentellement par nécrose. Ce sont eux qui ont proposé le terme "apoptose", un ancien mot grec décrivant la chute des pétales d'une fleur ou des feuilles d'un arbre en faisant référence à une curiosité morphologique et physiologique produite par la mort cellulaire, processus qui jouait un rôle opposé et complémentaire à la mitose dans la régulation de la population des cellules animales (Hiramine 1997).

### **1.5.2 Processus biochimiques et morphologiques**

L'apoptose est un processus qu'il faut différencier de la nécrose, un phénomène dont la résultante est la destruction immédiate de tous les organites de la cellule (exception faite des mitochondries et du noyau) en laissant la forme de celle-ci plus ou moins intacte (voir figure 1.5). La nécrose est une mort cellulaire accidentelle qui survient lors d'un dommage tissulaire et elle implique des groupes de cellules. Lors de la nécrose, la cellule devient enflée, puis la membrane cellulaire éclate déversant le contenu cellulaire dans le tissu environnant et provoquant l'inflammation (Alberts et al. 1994; Lodish et al. 2000).

À la différence de la nécrose, l'apoptose affecte en général des cellules isolées, aboutissant à un processus de condensation et de fragmentation. Les premières manifestations morphologiques se caractérisent par une compaction et une marginalisation de la chromatine nucléaire (Grzanka et al. 2003), une convolution des membranes nucléaires et cytoplasmiques et une condensation du cytoplasme (Nezis et al. 2002; Lodish et al. 2000). Le noyau se fragmente par la suite et chaque fragment se retrouve entouré d'une double enveloppe de phospholipides. Des corps apoptotiques, qui sont des éléments cytoplasmiques et nucléaires, sont ensuite relargués et sont phagocytés par les cellules voisines sans aucune réaction inflammatoire (Lodish et al. 2000).





**Figure 1.5 : Différences physiologiques lors de la mort cellulaire par apoptose et nécrose (Tirée de "Apoptosis and Cell Proliferation" Roche MB )**

De nombreux facteurs interviennent pour susciter l'apoptose; les principaux mécanismes mettant en route le processus de mort cellulaire programmée sont les suivants: le stress, les traitements par des substances cytotoxiques ou des corticoïdes, l'atteinte de l'ADN par des neurotoxines ou des agents antimitotiques (Deckwerth et al. 1993), la transmission d'un signal de mort tel que le récepteur FAS des lymphocytes cytotoxiques, cellules Natural Killers, facteur de nécrose TNF-  $\alpha$  (Tewari et al. 1995) ou l'inhibition d'une stimulation par un facteur de croissance (Deckwerth et al. 1993; Thibeault et al. 2001).

### **1.5.3 Principaux rôles de l'apoptose**

Le processus apoptotique a plusieurs rôles. Premièrement, lors de l'implantation embryonnaire; lorsque l'embryon s'accroche à la paroi utérine, les cellules épithéliales de la paroi utérine entrent en apoptose pour laisser la place au corps embryonnaire; il en va de même pour les cellules stromales qui, ayant subi le processus de décidualisation et se retrouvant un peu plus en profondeur dans la paroi de l'utérus, entrent en apoptose pour que l'embryon toujours grandissant continue de se développer (Pampfer et al. 1999; Joswig et al. 2003; Abrahamson et al. 1993). Deuxièmement, au cours du développement: le développement normal d'un organe s'effectue non par modelage, mais par sculpture. Les cellules sont produites en excès puis certaines meurent en fonction des critères requis. Chez l'embryon, l'apoptose permet d'éliminer les cellules excédentaires, notamment lors de la formation des doigts, telles les cellules des membranes interdigitales qui subsistent sous forme de palmes chez les oiseaux aquatiques (Lodish et al. 2000). L'apoptose permet aussi l'élimination de cellules du système immunitaire reconnaissant le soi, comme certains lymphocytes T; cette reconnaissance se fait très tôt dans le développement d'un individu et permet ainsi d'empêcher l'apparition de maladies auto-immunes; ce processus se nomme sélection négative et permet ainsi l'autotolérance aux cellules du soi (Marieb 1999). Un autre exemple : les neurones sont générés en excès, puis près de la moitié ou plus sont éliminés par apoptose afin de créer un équilibre entre ceux-ci et les cibles qu'ils innervent (Yuan et al. 2000). Dernièrement, au cours du processus de cancérisation; des cellules devenues néfastes ou qui pourraient endommager les tissus et ainsi devenir dangereuses pour l'organisme sont acculées au suicide. Par exemple, l'induction de l'apoptose est pour la

protéine p53 un moyen de protéger l'organisme contre des cellules contenant de l'ADN endommagé et éviter une prolifération anarchique. La protéine humaine p53 est dite suppressive de tumeur puisqu'elle possède un rôle essentiel dans le contrôle du cycle cellulaire. En effet, les cellules possédant de l'ADN endommagé ne peuvent se diviser. Le problème dans la majorité des cancers est que la protéine p53 (au même titre que beaucoup d'autres protéines aux fonctions similaires) est mutée et ne peut plus empêcher la division de cellules endommagées.

## **1.6 Le Transforming Growth Factor- $\beta$**

Les premiers membres de la superfamille TGF- $\beta$  furent identifiés sur la base de leur habileté à induire une transformation phénotypique de certaines cellules en culture (Lutz et al. 2002). TGF- $\beta$  est un polypeptide multifonctionnel jouant un rôle dans la régulation de la croissance, la différenciation, l'adhésion, la motilité cellulaire, les interactions extracellulaires, certaines fonctions du système immunitaire (Kerhl et al. 1986) de même que dans le phénomène de l'apoptose et de l'angiogénèse (Rich et al. 2001; Attisano et al. 1994; Perriman et al. 2001; Roberts et al. 1986). Le choix de cette voie de signalisation dans notre étude repose essentiellement sur la capacité du TGF- $\beta$  à induire l'apoptose dans les cellules utérines au cours de la gestation. Toutefois, le rôle de TGF- $\beta$  dans les processus d'oncogénèse a été dans la mire de bien des recherches. Des études récentes en biologie moléculaire (Bast et al. 2000) révèlent que le développement de n'importe quel cancer nécessite une accumulation de certaines caractéristiques cellulaires. Ces caractéristiques sont les suivantes : une habileté de croissance indépendante de tous facteurs exogènes de croissance, une division indéfinie, la création de nouveaux vaisseaux sanguins et l'invasion cellulaire. La voie de signalisation de TGF- $\beta$  contrôle beaucoup de ces processus cellulaires et les cancers peuvent exploiter certaines altérations dans la cascade des signaux de cette voie pour développer des tumeurs. La complexité des signaux de la voie de transduction à partir desquels la cellule répond au TGF- $\beta$  reflète l'habileté du ligand à moduler spécifiquement une variété de fonctions cellulaires.

Il y a cinq isoformes de TGF- $\beta$  (Massagué 1990) mais seulement trois de ces isoformes sont exprimées chez les mammifères (TGF- $\beta$ 1,  $\beta$ 2 et  $\beta$ 3). Les gènes des trois isoformes sont localisés sur différents chromosomes (No 19, 1 et 14 pour l'humain et No 7, 1 et 2 pour la souris; Massagué 1990) et leur poids moléculaires sont aussi légèrement différents : 15, 12.5 et 12 kDa pour TGF- $\beta$ 1,  $\beta$ 2 et  $\beta$ 3 respectivement chez l'humain, le rat et la souris. Les trois isoformes partagent entre 64 et 82% d'homologie au niveau de leur séquence d'ADN (Perry et al. 1997; Rich et al. 2001) et sont produits sous forme latente qui, lorsque activés, forme un peptide mature de 112 acides aminés (Massagué 1990). Les différentes formes de même que les séquences conservées de chaque forme suggèrent qu'il y a un rôle important et spécifique propre à chaque isoforme. Il a été démontré que les trois isoformes de TGF- $\beta$  sont exprimées de façon différente dans les cellules prostatiques humaines normales et malignes (Perry et al. 1997), dans certains carcinomes humains (Guellal et al. 2000) et dans l'utérus de souris (Das et al. 1992). Chez la souris, les isoformes  $\beta$ 2 et  $\beta$ 3 ont été détectées durant la phase préimplantatoire mais sont exprimées différemment. En effet, on a observé la présence de l'isoforme  $\beta$ 2 dans les cellules épithéliales, stromales et myométriales tandis que  $\beta$ 3, à l'instar des données recueillies dans notre laboratoire, n'est pas exprimée dans les cellules épithéliales et stromales en début de gestation (Das et al. 1992). Ces résultats suggèrent donc que les trois isoformes jouent différents rôles fonctionnels au cours de la gestation.

### **1.6.1 Activation du TGF- $\beta$ et liaison à son récepteur**

Pour induire un effet biologique, le TGF- $\beta$  ligand doit être activé après sa sécrétion initiale. Au départ, TGF- $\beta$  forme un précurseur composé d'un domaine N-terminal, d'un pro-domaine de 50-375 aa et d'un domaine C-terminal de 110-140 aa appelé peptide de latence (Lodish et al. 2000). Le précurseur est modifié dans la cellule par le clivage du groupement carboxyle (Rich et al. 2001; Lodish et al. 2000). Après le clivage, le peptide de latence se lie avec le domaine N-terminal pour former un monomère. Deux monomères se lient par des ponts disulfures pour former un hétérodimère. Pour que TGF- $\beta$  devienne actif, l'hétérodimère doit subir un changement conformationnel pour pouvoir se lier à son récepteur (Rich et al. 2001). Une fois le ligand activé, il se lie à une famille de récepteurs



transmembranaires sérine/thréonine kinase pour initier une cascade de signaux de transduction. Ces kinases se divisent en deux sous-familles : les récepteurs de type I et de type II, qui se distinguent par leur poids moléculaires (Attisano et al. 1993).

La cascade de transduction des signaux est initiée par la liaison du TGF- $\beta$  avec le récepteur de type II (figure 1.6). Subséquemment, le récepteur de type I est recruté et se lie au TGF- $\beta$  à l'intérieur d'un complexe de récepteurs. Ce complexe de récepteurs est nécessaire puisque chaque récepteur possède un domaine extracellulaire permettant la liaison d'un des monomères du ligand. Le récepteur de type II est actif de façon constitutive et est autophosphorylé sur des résidus sérine/thréonine lors de la liaison avec TGF- $\beta$ ; il phosphoryle des résidus dans la région GS (région riche en sérines et thréonines) du récepteur de type I (le récepteur de type I ne peut pas s'autophosphoryler), ce qui active l'activité kinase du récepteur de type I requise pour déclencher la cascade de signaux intracellulaires par les protéines Smads (Lodish et al. 2000; Schuster et al. 2002; Lutz et al. 2002).

### **1.6.2 Transduction du signal induit par TGF- $\beta$ : les protéines Smads**

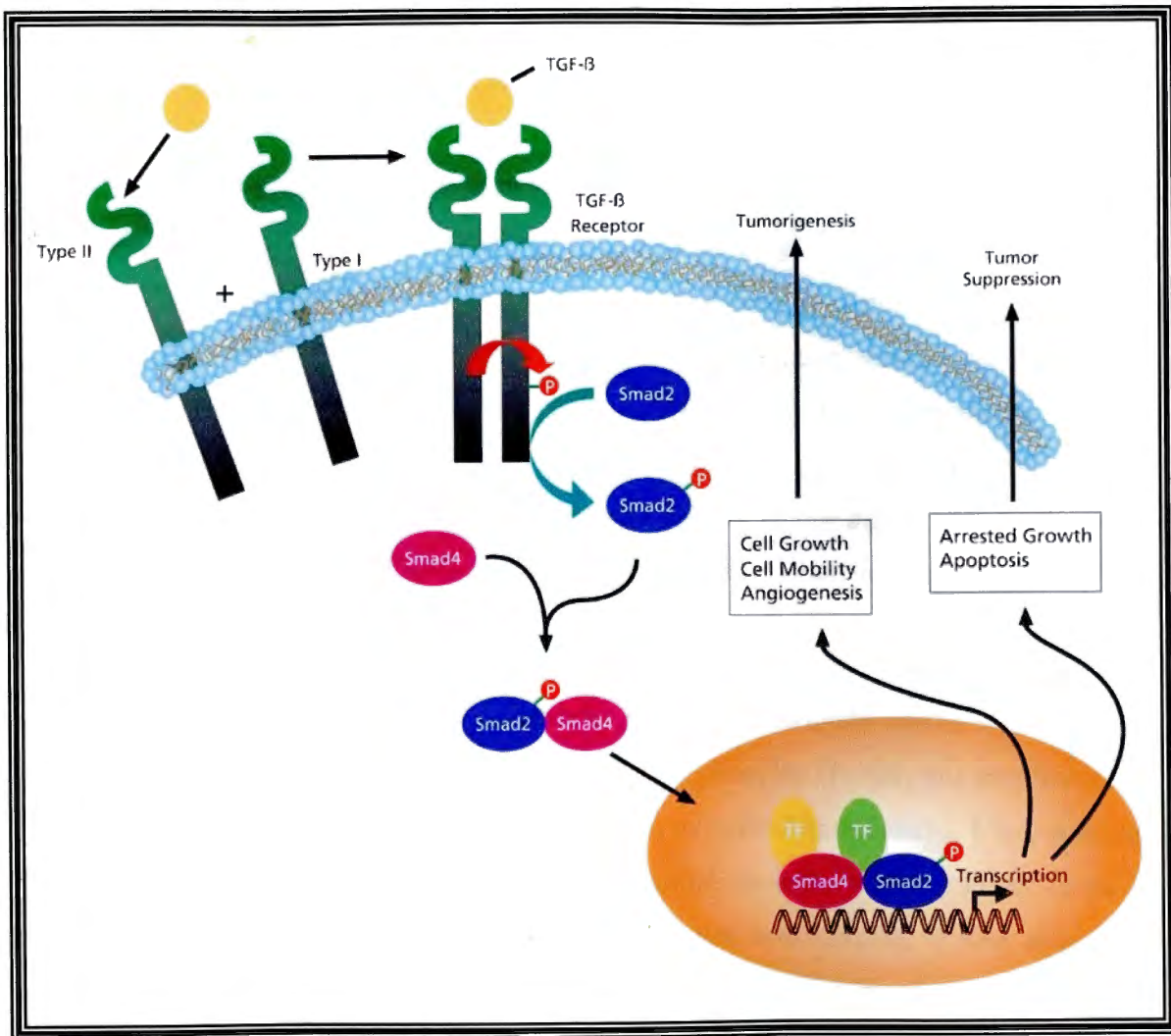
La transduction du signal de TGF- $\beta$  du cytoplasme jusqu'au noyau implique une famille de protéines messagères appelées Smads. Ces protéines Smads sont divisées en trois sous-familles : la première regroupe les R-Smads (receptor-activated Smads) soit Smad2 et Smad3, qui sont caractérisées par deux domaines hautement conservés au cours de l'évolution, les domaines d'homologie à MAD (MH); MH1 se retrouve dans la région aminoterminal et MH2 dans la région carboxyterminale et les deux domaines sont reliés par une région intermédiaire riche en proline (Chong et al. 2004). Deuxièmement, les Co-Smads (common mediator Smads), qui sont représentées par Smad4. Smad4 est importée dans le noyau uniquement lorsqu'elle est associée aux R-Smads, alors que Smad2 et Smad3 peuvent être importées dans le noyau indépendamment de Smad4; toutefois, en l'absence de Smad4, Smad2 et Smad3 ne sont pas en mesure d'activer la transcription. Troisièmement les I-Smads (inhibitory Smads), qui sont représentées par Smad 6 et Smad7 (Schuster et al. 2002). Les I-Smads s'associent au récepteur TGF- $\beta$  de type I activé empêchant ainsi la phosphorylation de Smad2 et Smad3.

Le récepteur TGF- $\beta$  de type I cause la phosphorylation des R-Smads; les R-Smads sont localisées à la membrane plasmique par les microtubules où une protéine nommée SARA (Smad-anchor for Receptor Activation) les présente au récepteur TGF- $\beta$ . Cette phosphorylation se fait au niveau du motif SSXS C-terminal, motif qui est conservé pour toutes les R-Smads et qui cause la dissociation avec le récepteur pour former un complexe hétérodimérique avec Smad4 (Rich et al. 2001; Godkin et al. 1998). Par la suite, ce complexe subit une translocation jusqu'au noyau cellulaire et s'associe avec un co-facteur lié à l'ADN et de ce fait active la transcription de gènes cibles (voir figure 1.6). Pour activer la transcription, le complexe Smad4/Smad2,3 doit s'associer à des protéines nucléaires se liant à l'ADN de la famille Fast (Nagarajan et al. 1999). Le choix des gènes cibles est déterminé par la composition du complexe transcriptionnel (Godkin et al. 1998).

La principale caractéristique qui sera mise en lumière dans cette recherche est la prédisposition du TGF- $\beta$  d'induire la mort cellulaire; plusieurs travaux antécédents démontrent clairement la capacité du TGF- $\beta$  à induire l'apoptose chez le rat (Herrera et al. 2002) de même que la régulation de ce processus par les caspases (Inman et al. 2000; Moulton 1994). Ce projet de maîtrise démontre l'action de TGF- $\beta$  dans les tissus du rat lors de la gestation et ces résultats sont supportés par d'autres études menées chez l'humain par d'autres laboratoires : on y rapporte l'expression de TGF- $\beta$ 1 durant le début de gestation (Ingman et al. 2002) et principalement durant l'implantation; d'autres études démontrent qu'un excès de TGF- $\beta$ 1 est en mesure d'inhiber l'invasion du trophoblaste chez l'humain (Graham et al. 1991). Il a aussi été démontré que TGF- $\beta$ 1 et  $\beta$ 2 pourraient provoquer l'apoptose au moment de l'implantation et de la décidualisation *in vitro* (Moulton 1994).

### **1.7 Voie de survie phosphatidylinositol 3-kinase/Akt (PI3-K/Akt)**

La protéine Akt, une sérine/thréonine kinase de 60 kDa, est une protéine du cytosol inactive recrutée au niveau de la membrane plasmique et activée par phosphorylation au niveau des acides aminés thréonine 308 et sérine 473 en réponse à des facteurs de croissance ou des cytokines (Songyang et al. 1997; Crowder et al. 1998; Dery et al. 2003).

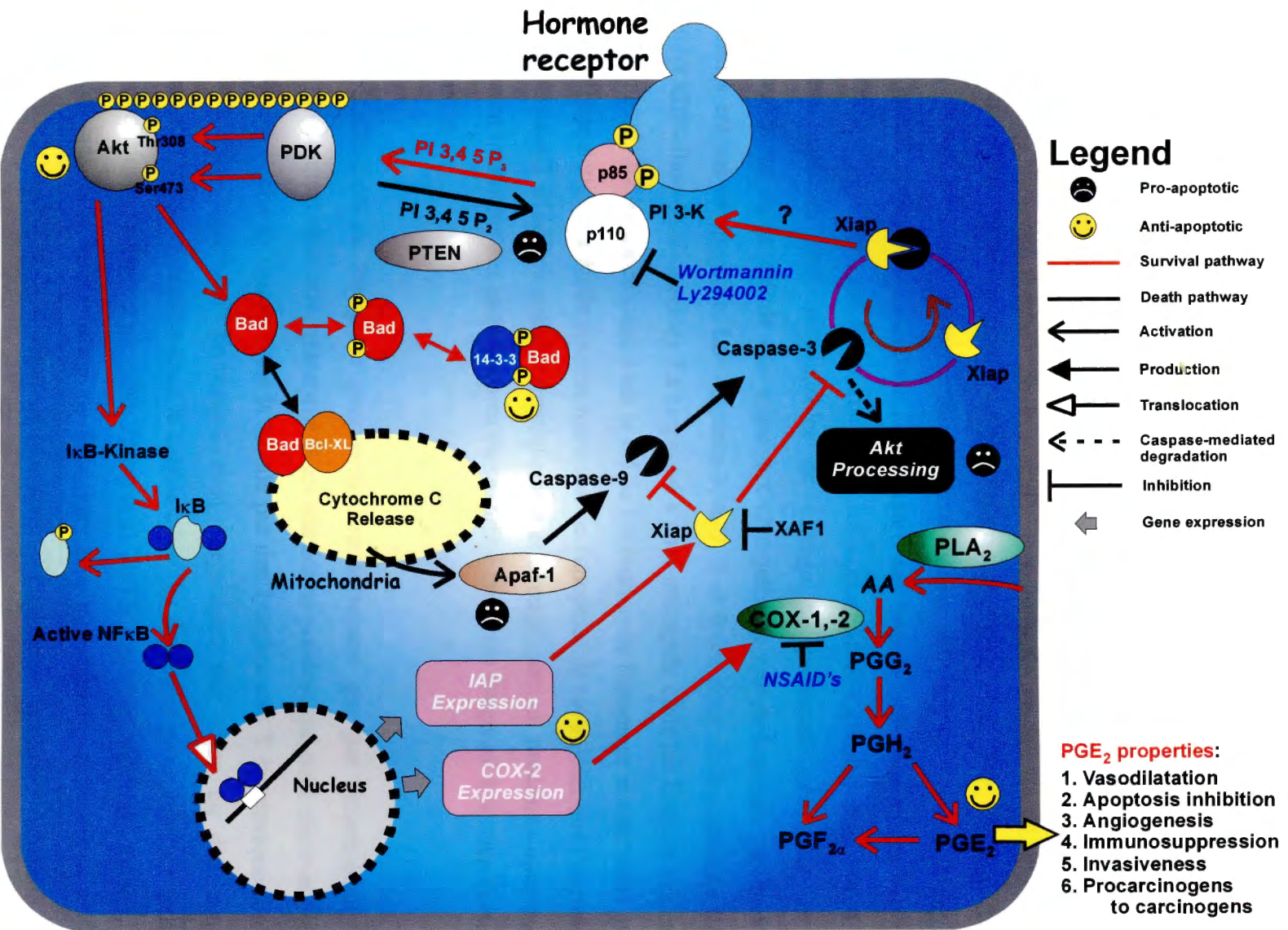


**Figure 1.6 : Schéma général de la voie de signalisation de TGF- $\beta$  (schéma obtenu par la compagnie Cell Signaling Technology).**

Le rôle de survie cellulaire de Akt a été démontré dans plusieurs types de lignée cellulaire (Yang et al. 2004; Latronico et al. 2004). La molécule responsable du recrutement de Akt vers la membrane cellulaire de même que son activation est la phosphatidylinositol-3 kinase (Asselin et al. 2001). Après activation (par un facteur de croissance), la phosphatidylinositol-3 kinase induit la phosphorylation de Akt qui en retour phosphoryle BAD bloquant ainsi son action par l'intermédiaire d'une protéine de la famille 14-3-3 (Rosenquist 2003), une protéine pro-apoptotique membre de la famille Bcl-2. Cette action empêche BAD (emprisonnée dans le cytosol) d'activer Bcl-2 et Bcl-XL et la cascade qui mène à la mort cellulaire. Dans le cas contraire, BAD non-phosphorylé provoque une perturbation de la membrane mitochondriale en inhibant l'action des protéines Bcl-2 et Bcl-XL amenant ainsi la sortie du cytochrome *c* de l'espace intermembranaire de la mitochondrie. Une fois que le cytochrome *c* et des ions ( $Mg^{2+}$ ) sont relâchés (Eskes et al. 1998), le cytochrome *c* se lie à la protéine Apaf-1, ce qui amène le recrutement et l'activation de la caspase-9 qui à son tour active la caspase-3, une protéine clé du processus apoptotique qui est responsable du clivage protéolytique de plusieurs protéines de survie cellulaire (voir figure 1.7) dont PARP (poly (ADP-ribose) polymérase). PARP est une enzyme nucléaire responsable de la réparation de l'ADN et qui agit à titre de facteur de transcription (Di Meglio et al. 2004 ;D'Amours et al. 1999 ;Cohen et al. 1997; Beneke et al. 2000).

Il a été démontré dans notre laboratoire que durant le cycle oestral chez le rat, on retrouve une forte concentration de protéine Akt phosphorylée (P-Akt, une protéine clé de la voie de survie phosphatidylinositol-3 kinase/Akt) excepté durant l'estrus. L'estrus est une période du cycle où l'on retrouve une grande quantité de cellules en apoptose et où les concentrations de Akt phosphorylée diminuent de façon considérable. Il s'est aussi avéré que sous l'effet des estrogènes, hormones connues pour induire une augmentation de la prolifération cellulaire, P-Akt se retrouve fortement exprimée (Dery et al. 2003). La protéine PTEN, une protéine qui régule négativement la voie phosphatidylinositol-3 kinase/Akt, s'est avérée, lors de la même étude, exprimée en grande quantité durant l'estrus (Dery et al. 2003). Ces données suggèrent une importance capitale de la voie phosphatidylinositol-3 kinase/Akt lors de la survie cellulaire dans l'endomètre chez le rat.





**Figure 1.7** Schéma général de la voie de signalisation de PI3-K/Akt

### 1.7.1 Les caspases

Les caspases font partie d'une famille de protéines qui représentent les principaux effecteurs de l'apoptose. Les caspases sont un groupe de cystéines protéases se retrouvant à l'intérieur de la cellule sous forme inactive (pro-protéine); ces pro-protéines peuvent être clivées et ainsi former des enzymes actives suite à l'induction d'un signal pro-apoptotique (Chandra et al. 2003). L'induction de l'apoptose à partir de récepteurs de mort amène l'activation d'une caspase initiateur telle que caspase-8 (Inman et al. 2000; Blanchard et al. 1999). À son tour, la caspase initiateur active d'autres caspases sous forme de cascade; cette cascade amène éventuellement l'activation d'une caspase effectrice soit la caspase-3 (Blanchard et al. 1999), qui à son tour active les caspases-6 et 7 (Inman et al. 2000). Ces dernières caspases sont responsables du clivage de protéines clés dans le bon fonctionnement de la cellule qui mène aux changements morphologiques typiques des cellules entrant en apoptose. Les caspases-3, 6, 7, 8 et 9 ont pour cible commune PARP (poly(ADP-ribose) polymérase). La caspase-6 a pour principale cible les lamines nucléaires (Inman et al. 2000). La caspase-3 est la clé de l'exécution de l'apoptose et c'est celle-ci qui sera utilisée dans cette étude comme marqueur de l'apoptose. Il est à noter que l'expression de la caspase-3 n'indique pas systématiquement et aveuglément un processus apoptotique puisque un inhibiteur des caspases peut être exprimé en même temps tel que Xiap (Leblanc et al. 2003).

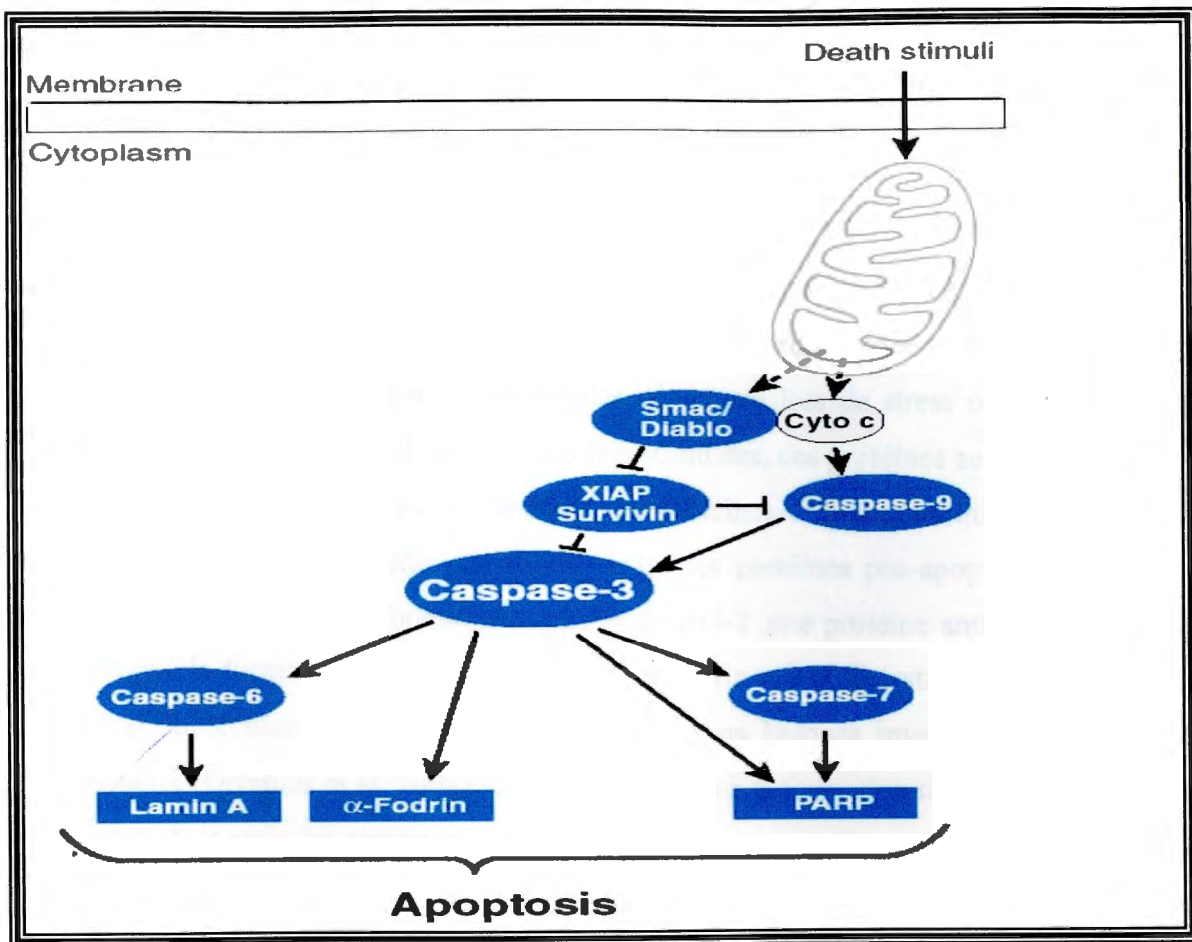
L'induction de l'apoptose peut avoir lieu autrement que par l'intermédiaire de récepteurs de mort cellulaire; granzyme B est une sérine protéase qui peut cliver et activer les caspases et être introduite dans la cellule par des lymphocytes T cytotoxiques ou des cellules tueuses naturelles, protégeant ainsi l'organisme des virus ou des tumeurs potentielles. L'enzyme pénètre dans la cellule cible par des pores membranaires formées par les perforines (Zappata et al. 1998; Zhang et al. 2000). Les mitochondries sont aussi des structures clés dans la régulation de l'apoptose : la libération du cytochrome *c* de la mitochondrie conduit à l'activation de la caspase-9 puis de la caspase-3 (Chandra et al. 2003; Granville 1999). Cette action résulte en la formation d'un apoptosome (un complexe

multi-protéique constitué du cytochrome *c*, de la protéine Apaf-1, de la protéine procaspase- 9 et d'ATP; Nguyen et al. 2003).

### **1.7.2 X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein**

Les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAPs : Inhibitor of apoptosis protein) constituent une famille de protéines anti-apoptotiques intracellulaires qui ont été pour la première fois identifiées comme étant des analogues de gènes retrouvés dans les baculovirus (Birnbaum et al. 1994; Crook et al. 1993). Elles sont caractérisées par des régions répétées IAP caractéristiques des baculovirus que l'on appelle des domaines BIR responsables de leur action anti-apoptotique (Nachmias et al. 2004; Huang et al. 2000). Un seul domaine BIR est requis pour l'inhibition des caspases (Takahashi et al. 1998). Le domaine BIR2 est requis pour l'inhibition des caspases-3 et 7 tandis que le domaine BIR3 inhibe la caspase 9 (Takahashi et al. 1998; Deveraux et al. 1999). Les IAPs comprennent le X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein (XIAP), le human IAP-1 (HIAP-1), le human IAP-2 (HIAP-2), le neuronal apoptosis inhibitory protein (NAIP) et la survivine (Liston et al. 1997). À l'exception de NAIP et de la survivine, les protéines inhibitrices de l'apoptose comprennent toutes un anneau de zinc dans la région C-terminale qui croit-on serait impliqué dans certaines interactions protéines-protéines et protéines-acides nucléiques (Verhagen et al. 2001).

XIAP a été démontrée comme étant un inhibiteur direct des caspase-3 et 7 et interférant directement avec la voie pro-apoptotique Bax/cytochrome *c* en inhibant la caspase-9 (voir figure 1.7 et 1.8) (Leblanc et al. 2003; Arnt et al. 2002; Asselin et al. 2001). Il a été démontré récemment que les caspases pouvaient aussi cliver XIAP et que cette dernière pouvait être inhibée par des protéines comme Smac/DIABLO (Leblanc et al. 2003; Verhagen et al. 2001) et Calpain (Kobayashi et al. 2002). Une fois clivée, XIAP est encore en mesure d'inhiber son substrat puisque la fragmentation de la protéine résulte en deux fragments contenant chacun un domaine BIR spécifique à certaines caspases. Ces fragments possèdent encore leur pouvoir d'inhibition (Deveraux et al. 1999).



**Figure 1.8 : Schéma général de la voie de signalisation de XIAP et de l'action des caspases (schéma obtenu par la compagnie Cell Signaling Technology).**



Des résultats obtenus dans notre laboratoire ont démontré que sous l'effet des estrogènes, l'expression de XIAP augmentait de façon significative au même titre que les caspases 3, 6 et 7 dans les cellules utérines de rat. Ces résultats suggèrent une interaction certaine entre les caspases et XIAP (Leblanc et al. 2003). L'expression de Smac/DIABLO s'est avérée quant à elle diminuée dans les mêmes conditions, ce qui renforcerait l'hypothèse de l'action de XIAP sur les caspases durant les phases apoptotiques (Leblanc et al. 2003).

### **1.7.3 Bcl-2, protéine anti-apoptotique**

Les protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 se retrouvent la plupart du temps dans le cytosol (exception faite de Bcl-2 qui se retrouve exclusivement sur la membrane de la mitochondrie) où elles agissent comme des détecteurs lors de stress ou de dommages causés à la cellule (Smaili et al. 2003). Une fois stimulées, ces protéines se relocalisent à la surface de la mitochondrie où se trouvent les protéines anti-apoptotiques de la même famille (Hsu et al 1997). Cette interaction entre les protéines pro-apoptotiques et anti-apoptotiques déstabilise les fonctions normales de Bcl-2, une protéine anti-apoptotique, et peut mener à la formation de pores dans la mitochondrie et à la libération du cytochrome *c* et d'autres molécules pro-apoptotiques contenues dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie (Orrenius et al. 2004). Cette action mène à la formation d'un apoptosome et à l'activation de la voie des caspases.

D'autres protéines que Bcl-2 appartenant à la même famille sont aussi impliquées dans la régulation de l'apoptose; la famille Bcl-2 est représentée par 16 protéines homologues dont certaines sont pro-apoptotiques tandis que d'autres sont pro-survie cellulaire (Dai et al. 2000; Adams et al. 1998). Celles similaires à Bcl-2 vont promouvoir la survie cellulaire en inhibant certaines adaptations requises pour l'activation de protéases comme les caspases qui sont des protéines clés de l'exécution de l'apoptose. D'un autre côté, la famille Bcl-2 comprend des protéines pro-apoptotiques comme Bax qui déclenche l'apoptose lorsqu'elle est activée par phosphorylation. Les protéines pro-apoptotiques et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 peuvent former des hétérodimères et réguler les

fonctions de l'une comme de l'autre maintenant ainsi la balance homéostatique entre la mort et la survie cellulaire (Hsu et al. 1997).

#### **1.7.4 PTEN, homologue de la phosphatase et de la tensine**

PTEN (Phosphatase and Tensin homologue) est un gène suppresseur de tumeur (Myers et al. 1998) qui, lorsque muté ou non exprimé, se retrouve impliqué dans une très grande variété de cancers humains dont le cancer de la prostate (Trotman et al. 2003), de l'endomètre (Ali 2000) et du sein (Petrocelli et al. 2001). Cette phosphatase est responsable de la régulation de la survie cellulaire, de la croissance (Li et al. 2002) et de la migration (Saga et al. 2003; Sugatani et al. 2003). Après transcription et traduction, la protéine obtenue possède des caractéristiques pro-apoptotiques et son action amène une régulation négative sur la voie de survie cellulaire phosphatidylinositol-3 kinase/Akt en déphosphorylant  $PIP_3$  en  $PIP_2$  et de ce fait empêche la phosphorylation de Akt par PDK laissant ainsi la cellule entrer en apoptose (Hlobilkova et al. 2003).

Il a été démontré que les lignées cellulaires endométriales cancéreuses possédant la protéine PTEN mutée montrent une augmentation prononcée au niveau de l'expression de la forme phosphorylée de la protéine Akt (P-Akt) qui mène à l'activation de  $I\kappa B$ , une protéine inhibitrice de  $NF\kappa B$ , ce qui empêche la translocation de  $NF\kappa B$  jusqu'au noyau cellulaire.  $NF\kappa B$  est un facteur de transcription multifonctionnel impliqué dans la survie cellulaire, la transformation et l'oncogénèse. Cette translocation permet l'induction de la transcription de gènes impliqués dans la survie cellulaire (St-Germain et al. 2004). Ces résultats démontrent l'importance de la régulation de PTEN sur la voie de survie cellulaire phosphatidylinositol-3 kinase/Akt.

#### **1.7.5 CDC47/MCM7, protéine régulatrice du cycle cellulaire**

CDC47/MCM7 est une protéine membre de la famille de maintenance chromosomique (minichromosome maintenance (MCM)) constituée de polypeptides, qui possède un rôle important lors des premières étapes de la réplication de l'ADN

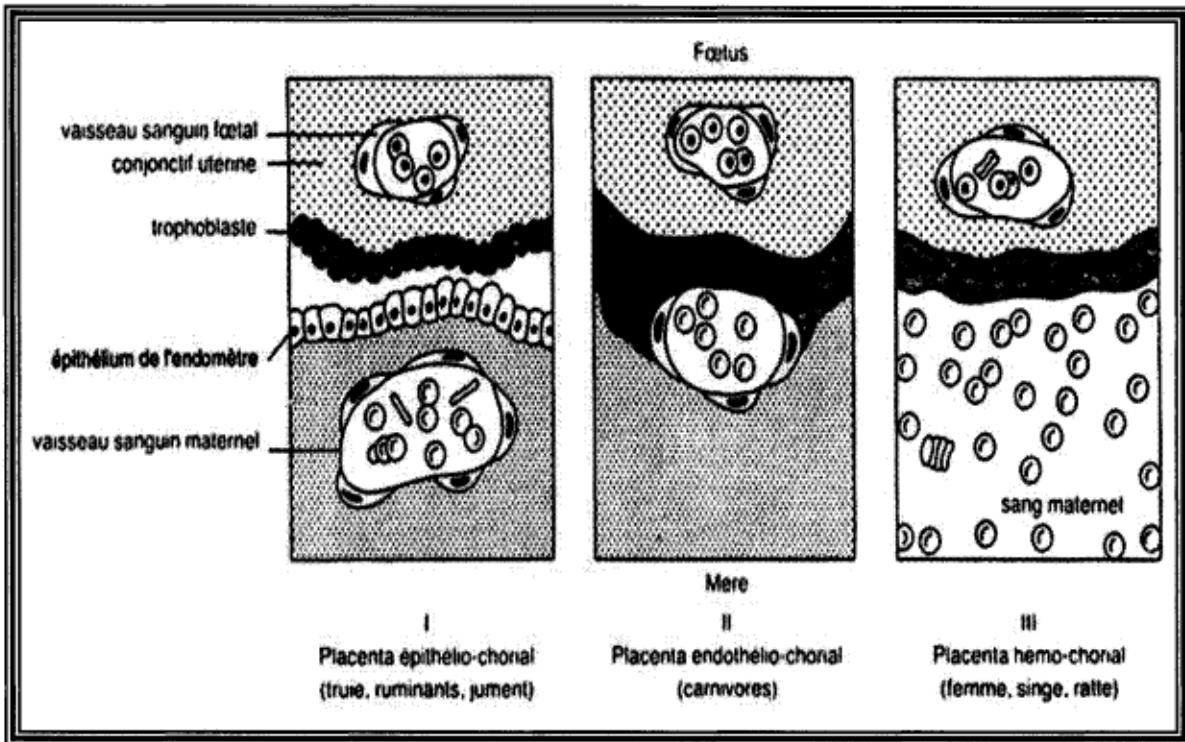
chromosomique et qui est impliquée dans la régulation métabolique permettant à l'ADN de se répliquer durant la phase S (Dalton et al. 1997). CDC47/MCM7 est donc utilisée comme marqueur de la prolifération cellulaire à une étape et un temps donnés.

## **1.8 Le modèle animal**

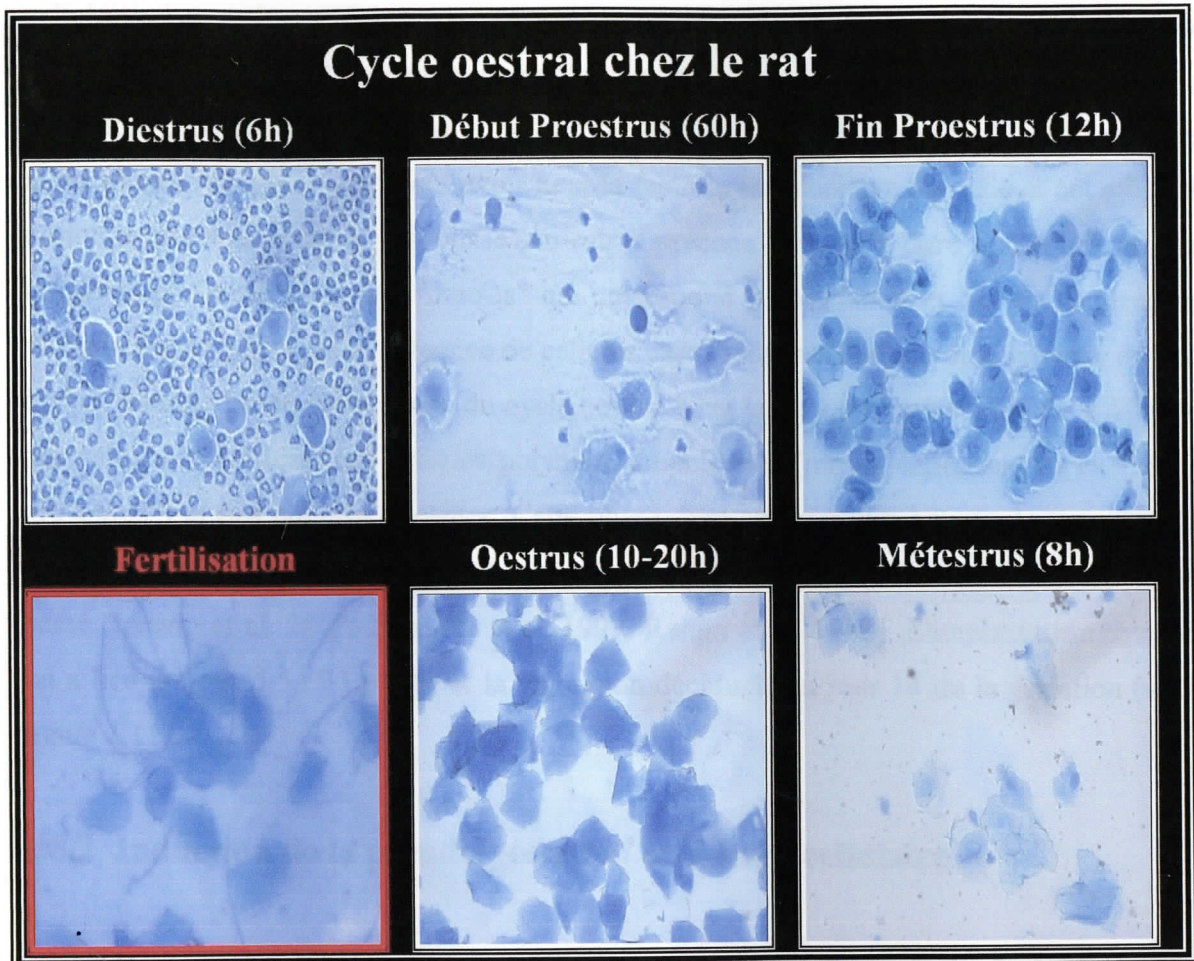
Des rats Sprague-Dawley ont été utilisés pour cette étude; trois facteurs ont contribué au choix de ce modèle animal. Premièrement, le type de placentation est hémochorial : le chorion est très invasif; l'endomètre, le mésenchyme et, par endroits, l'endothélium vasculaire maternels sont lysés. Les cellules trophoblastiques de l'embryon sont en contact direct avec le sang maternel. Les nutriments, déchets et échanges gazeux n'ont que trois couches à traverser pour passer de la circulation maternelle à la circulation foetale. Ce type de placentation est notamment observé chez les rongeurs, les primates et chez l'humain (voir figure 1.9) (Thibeault et al. 2001). Deuxièmement, le temps de gestation est relativement court soit de 21 à 23 jours ce qui facilite l'obtention des tissus (Thibeault et al. 2001 ; Waynforth et al. 1992). Dernièrement, l'animal possède une taille qui facilite les manipulations (spécialement lors des ovariectomies) et permet de récupérer une plus grande quantité de tissu que chez la souris étant donné la longueur et le diamètre de l'utérus. Le prélèvement de cellules lors des frottis vaginaux permettant de déterminer les étapes de l'accouplement s'en trouve aussi facilité.

### **1.8.1 Détermination du cycle oestral en vue de l'accouplement**

Afin de déterminer la période de temps de réceptivité de la femelle (vers la fin pro-oestrus), il faut déterminer les périodes du cycle oestral par frottis vaginaux. Le cycle est divisé en quatre stades principaux : Diestrus, Pro-estrus, Estrus et Métestrus (Waynforth et al. 1992). La fécondation est confirmée par frottis avec l'observation de spermatozoïdes ou la présence d'un bouchon muqueux dans le vagin (le bouchon constitue un amas de sperme qui obstrue complètement l'orifice vaginal (voir figure 1.10) (Waynforth et al. 1992).



**Figure 1.9 : Les différents types de placentation (Tirée de "La reproduction chez les mammifères et l'homme" Thibault 2001).**



**Figure 1.10 : Les étapes du cycle oestral chez le rat; l'accouplement est possible en fin de période proestrus et très tôt en début d'estrus (les photos ont été obtenus à partir de tissus prélevés dans le laboratoire du Dr Éric Asselin).**

La phase diestrus est caractérisée par une très grande majorité de cellules polymorphonucléaires et dure environ six heures. La phase pro-estrus dure soixante-douze heures et se divise en deux parties; la première partie se nomme "early pro-estrus" (pro-estrus précoce) et dure soixante heures : elle se caractérise par une grande quantité de cellules polymorphonucléaires, des cellules nucléées et de quelques cellules cornifiées ou kératinisées (ces cellules prennent une coloration bleue pâle très distincte avec le bleu de méthylène). La seconde partie se nomme "late pro-estrus" (pro-estrus tardif) et c'est à ce moment que l'accouplement peut avoir lieu; la femelle est réceptive au mâle et cet effet se prolonge en début d'estrus. La phase pro-estrus précoce et tardive dure douze heures. La troisième phase du cycle est "l'estrus" qui correspond à l'ovulation et qui est facilement reconnaissable par l'unique présence de cellules cornifiées; cette phase dure environ de dix à vingt heures. La dernière phase du cycle oestral chez le rat est le métestrus; on y détecte des cellules cornifiées, des cellules polymorphonucléaires (moins cependant qu'en "early pro-estrus") et des cellules nucléées. Cette phase dure environ huit heures. Les processus apoptotiques durant l'implantation et la décidualisation chez le rat ont été démontrés par le passé (Joswig et al. 2003; Pampfer et al. 1999; Rango et al, 1998). L'implantation chez le rat a lieu au jour 5.5 (5.5 à 6.5) et la régression déciduale au jour 14 de la gestation (voir figure 1.11).

### **1.8.2 Induction de la pseudo-gestation et culture cellulaire**

La culture cellulaire est une technique que nous avons utilisé afin de contrôler l'environnement dans lequel se multiplient les cellules stromales déciduales de l'utérus chez le rat. Ce contrôle de l'environnement s'avère nécessaire afin de voir les effets d'un traitement précis (les effets d'une molécule particulière) sur ces mêmes cellules. Le processus s'avère très complexe *in vivo* étant donné la très grande variabilité de facteurs et de signaux (parfois inconnus) qui entrent en jeu dans le métabolisme cellulaire. Pour reproduire les effets de cette transformation des cellules stromales utérine *in vitro*, il a fallu induire la pseudo-gestation chez les rats femelles. Chez le rat, la décidualisation des cellules stromales de l'utérus s'effectue en réponse à des stimulations du blastocyste et à des hormones sexuelles. La pseudo-gestation est obtenue en suivant un protocole rigoureux

d'injections successives d'hormones sexuelles qui miment les conditions *in vivo* provoquant ainsi une décidualisation sans véritable fécondation (chap. 1.4 p.22). Nous obtenons par la suite des rats pseudo-gestants (qui ne portent pas d'embryons) et nous prélevons ces cellules transformées. Avec la culture cellulaire, nous sommes en mesure d'analyser les interactions de la voie de survie PI3-K/Akt et de celle de TGF- $\beta$  dans les cellules de l'utérus sans qu'il n'y ait d'interférence causée par la présence d'un embryon (il est connu que les embryons secrètent des cytokines et interagissent avec les cellules de la paroi utérine (chap. 1.4 p. 22).

## 1.9 Hypothèse et objectifs

Notre hypothèse est que le TGF- $\beta$  interfère directement dans la signalisation de XIAP et de la voie de survie Phosphatidylinositol-3-kinase/Akt lors des processus apoptotiques dans l'utérus du rat lors de la gestation. Les principaux objectifs de cette étude sont : 1) de caractériser la voie de survie phosphatidylinositol-3 kinase/Akt et XIAP dans l'utérus de rat lors de la gestation pendant les phases apoptotiques, 2) de caractériser l'expression des trois isoformes de TGF- $\beta$  et de ses seconds messagers (Smad2,3 et P-Smad) dans l'utérus de rat au cours de la gestation et de démontrer l'interaction de la voie de survie phosphatidylinositol-3 kinase/Akt et du TGF- $\beta$  *in vivo* et *in vitro*.



**Figure 1.11 : Grille chronologique du temps de gestation chez le rat; l'implantation a lieu au jour 5.5 et la régression déciduale au jour 14.**



## **Chapitre II**

### **TGF- $\beta$ expression during rat pregnancy and activity on decidual cell survival**

## **Préface**

Les auteurs du chapitre II (article présentement en soumission dans la revue *Endocrinology*) sont Carl Shooner (fait les expériences en relation avec les jours de gestation, écriture de l'article, matériel et méthodes, ovariectomies), Valérie Leblanc (contribution importante au niveau de la récolte des tissus, de la culture cellulaire, de l'immunofluorescence et des figures), Marie-Claude Déry (récolte des tissus et expériences préliminaires), Pierre-Luc Caron (récolte des tissus) et Éric Asselin, direction, encadrement et supervision de la recherche.

## Résumé de l'article

Durant la première étape de la gestation, les cellules trophoblastiques de l'embryon entrent en contact avec l'endomètre utérin; les cellules épithéliales de la paroi utérine entrent en apoptose laissant ainsi à l'embryon un espace suffisant pour l'implantation. À la fin de la gestation, un phénomène apoptotique semblable mais plus important est observé durant la régression déciduale, soit du jour 14 au jour 20. Nous détenons peu d'information en ce qui concerne les mécanismes moléculaires et intracellulaires impliqués dans la régulation du processus apoptotique dans l'utérus au cours de la gestation. L'objectif de cette étude consiste à caractériser l'expression et la régulation des isoformes de TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$  étant un facteur de différenciation bien connu) dans l'endomètre de rat tout au long de la gestation et les effets *in vitro* de TGF- $\beta$ 1 sur des cultures de cellules déciduales. Les rats ont été euthanasiés à différents jours de la gestation (jours 2 à 20) et les utérus ont été prélevés afin de recueillir les cellules requises pour l'analyse protéique et les tissus nécessaires aux techniques d'immunohistochimie et de détection de l'apoptose (TUNEL: TdT-mediated dUTP nick end labeling). Une forte augmentation de l'apoptose a été observée durant la régression déciduale aux jours 14, 16 et 18. La protéine caspase-3 a été clairement détectée durant la régression déciduale par les techniques d'immunobuvardage de type western et d'immunofluorescence. Les analyses de type western démontrent aussi que TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 et TGF- $\beta$ 3 sont fortement exprimés au moment de la régression déciduale. Durant la première étape de la gestation, l'expression de TGF- $\beta$ 1 et TGF- $\beta$ 2 augmente considérablement aux jours 5.5 à 6.5. La protéine TGF- $\beta$ 3 n'a pas été détectée durant cette période de la gestation. Les analyses immunohistochimique révèlent que TGF- $\beta$ 1 et TGF- $\beta$ 2 se retrouvent dans les cellules épithéliales et glandulaires de même que dans les cellules stromales et que TGF- $\beta$ 3 se retrouve principalement au niveau des cellules épithéliales de l'endomètre. La phosphorylation de Smad2 est augmentée durant la régression déciduale. Les études *in vitro* sur les cellules déciduales démontrent que TGF- $\beta$ 1 est un inducteur de l'apoptose via la voie de signalisation des protéines Smads. De plus, TGF- $\beta$ 1 réduit la phosphorylation de Akt, un facteur de survie bien connu, et l'expression de la protéine XIAP dans les cellules déciduales *in vitro*. Ces résultats suggèrent que les

isoformes de TGF- $\beta$  sont régulées de façon différente au long de la gestation et peuvent jouer un rôle important dans le contrôle de l'apoptose et de la survie cellulaire à différentes étapes de la gestation.

## **TGF- $\beta$ expression during rat pregnancy and activity on decidual cell survival<sup>†</sup>**

Carl Shooner, Valérie Leblanc, Marie-Claude Déry, Pierre-Luc Caron 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:** Role of TGF- $\beta$  during pregnancy.

**Key words:** Phosphatidylinositol 3-kinase, Akt, PTEN, Caspases, apoptosis, XIAP, Smad, 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

<sup>†</sup> 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). Marie-Claude Déry is recipient of a FRSQ studentship.

## ABSTRACT

During the rat early pregnancy, trophoblast of the tiny embryo begins to join with the endometrium and epithelial cells undergo apoptosis, which gives the embryo enough space to embed itself in the uterine cell wall. Reaching the end of pregnancy, regression of 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 regulation of transforming growth factor- $\beta$  isoforms in the rat endometrium throughout pregnancy and its action *in vitro* using cultured decidual cells. Rats were killed at different days of pregnancy (days 2-20) and uteri removed to collect endometrial protein extracts or fixed, embedded and sectioned for immunohistochemistry (IHC) and *in situ* cell death analyses using TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL). A strong increase of apoptosis in the DB on days 14, 16 and 18 was observed. Cleaved caspase-3 was clearly detected during DB regression by Western analysis and immunofluorescence. Western analyses demonstrated that TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3 were highly expressed at the time of DB regression. During early pregnancy, TGF- $\beta$ 1 and - $\beta$ 2 expressions raised at days 5.5 to 6.5. TGF- $\beta$ 3 protein was not detected during early pregnancy. IHC analyses revealed that TGF- $\beta$ 1 and -2 were found surrounding both luminal and glandular epithelium and stroma. TGF- $\beta$ 3 was mainly located surrounding endometrial epithelium. Smad2 phosphorylation was increased at the time of DB regression. *In vitro* studies using decidual cells revealed that TGF- $\beta$ 1 induced apoptosis through Smad pathway. Moreover, TGF- $\beta$ 1 reduced both Akt phosphorylation and XIAP expression in decidual cells *in vitro*. Taken together, these results suggest that TGF- $\beta$  isoforms are differently regulated during pregnancy and may have an important role in the control of apoptosis and cell survival at specific stages during pregnancy.

## INTRODUCTION

Apoptosis, or programmed cell death, is a natural phenomenon occurring when the cells are subjected to stress, DNA damage, death signals or lack of growth factor. Apoptotic stimuli allow intracellular cascade of signals such as the caspases, a family of cysteine proteases implicated in the cleavage of a number of important proteins which result in cell disassembly, cell death and phagocytosis. 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 the deciduas basalis regression in the rat endometrium, since the embryo grows bigger and thus, needs more space for its development (4;5).

The first members of the TGF- $\beta$  superfamily were identified on the basis of their ability to induce a transformed phenotype of certain cells in culture (6). They are now known as multifunctionnal polypeptide involved in regulation of cell proliferation and differentiation, immunoregulation, angiogenesis and regulation of extracellular matrix (7;8). They act via cellular signalling through Smads and Phosphorylated-Smads (P-Smads), the active form of Smads. Those proteins are sent to the nucleus and activate transcription factors that activate caspases and other regulation proteins (9;10). Another characteristic of TGF- $\beta$  is its capacity to induce apoptosis in several cell types (11;12). In fact, transforming growth factor- $\beta$  was shown to have pro-apoptotic function mediated by caspases (13-15). The three isoforms genes are localized on different chromosomes and their molecular weights are slightly different : 15, 12.5 and 12 KDa for TGF- $\beta$ 1,  $\beta$ 2 and  $\beta$ 3 respectively. However they share furthermore 80 % sequence homology and are produced in a latent form which is activated into a 112-amino acids mature peptide (16). The multiplicity of the TGF- $\beta$  forms and the sequence conservation within each form through evolution suggest important specific roles for each isoforms. Moreover, it has been demonstrated that TGF- $\beta$ 1,  $\beta$ 2 and  $\beta$ 3 are differently expressed in normal and malignant human prostate cells (17) and in human breast carcinoma (18) as well as in the mouse uterus (19) and porcine conceptus-maternal interface (20;21).

The uterus is a hormone-dependent organ and it is subjected to a great amount of cellular proliferation and cell death. Studies have shown that apoptosis is increased in the endometrium during the rat implantation period and during decidual basalis regression (1;2;22). The mRNA for TGF- $\beta$ 1 has been shown to be present within the uterus during rat pregnancy and localized to the luminal and glandular epithelial cells during early and late pregnancy (23). TGF- $\beta$ 1 and - $\beta$ 2 mRNAs are also found in the mouse uterus during pregnancy (24-26). Expression of TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3 mRNAs are also shown in the periimplantation uterus (19). A study showed that TGF- $\beta$ 1 and  $\beta$ -2 treatments on cultured endometrial rat stromal cells induced apoptosis (12). These studies suggest that TGF- $\beta$  isoforms might be involved differently in the control of apoptosis in the uterus during pregnancy. However, the mechanisms that control apoptosis in the endometrium during pregnancy are poorly documented. Since, the expression of TGF- $\beta$  isoforms has been suggested more specifically at the mRNA level, a study showing the protein expression of all three TGF- $\beta$  isoforms throughout the pregnancy was mandatory. Thus, the aim of this study was to determine the expression and regulation of TGF- $\beta$ 1,  $\beta$ 2 and  $\beta$ 3 proteins in the rat uterus throughout pregnancy and to further determine *in vitro*, the role of TGF- $\beta$  in the decidual cells fate. We found that the three isoforms of TGF- $\beta$  are expressed and regulated differently in epithelial and stromal endometrial cells during the rat pregnancy and we showed, using primary decidual cell cultures, the involvement of TGF- $\beta$  in the regulation of programmed cell death. Moreover, the present study shows that TGF- $\beta$  signals through Smad2 and acts on XIAP and Akt pathways to induce apoptosis.

## MATERIAL AND METHOD

### Reagents

TGF- $\beta$ 1, - $\beta$ 2 and - $\beta$ 3 polyclonal antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc (Santa cruz, California). CDC47/MCM7 antibody was obtained from Medicorp (Montréal, QC). Phospho-Akt (Ser 473), Akt, XIAP, Cleaved caspase-3, and Phospho-Smad2 (Ser 465 / 467) antibodies were obtained from Cell Signaling Technology



(Beverly, MA). Anti-Smad2/3 antibody was purchased from Calbiochem (San Diego, CA). Vectastain ABC Kit for rabbit IgG was purchased from Vector Laboratories Inc. (Burlingame, CA). In Situ Cell Death detection kit (TUNEL), POD and DAB substrate was obtained from Roche (Laval, QC).

### **Animals**

Sprague-Dawley female rats, 200-225g, were obtained from Charles River Laboratories Canada (St-Constant, Qc). Animals were fed *ad libidum* on standard chow and water in animal facilities illuminated between 6h00 and 20h00. 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 were mated in separate cages and confirmation of pregnancy was determined by vaginal smears and/or the presence of vaginal plug (day 1). Rats were killed on day 2, 4, 5, 5.5, 6, 6.5, 8, 10, 12, 14, 16, 18 and 20 of pregnancy. Uteri were collected and fixed for immuno-histochemical staining (IHC) and apoptotic cell death detection by [TdT]-mediated deoxyuridinetriphosphate nick end-labeling (TUNEL). Endometrial protein extracts were collected for Western analysis.

### **Rat pretreatments and decidual cell culture**

A total of 10 animals 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 $\beta$ -diol, Sigma-Aldrich (St-Louis, USA) and progesterone (Laboratoire Mat, PQ) to induce decidualization according to the following protocol (27): 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  $\mu$ 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  $\mu$ g) and progesterone (4 mg) for three days (day 3, 4 and 5 of pseudopregnancy); 5) Another injection of estradiol (0.1  $\mu$ g) in the afternoon of day 7 (day 4 of pseudopregnancy); 6) Animals were killed on day 8 (day 5 of pseudopregnancy).

Uteri were removed and horns taken and immersed in HBSS solution containing HEPES (20mM), penicillin (100 units/ml), streptomycin (100 µg/ml) and fungizone (1,25 µl/ml) (Invitrogen, ON). Further manipulations were performed in a sterile environment. The horns were transferred in a sterile petri containing HBSS, slit longitudinally, immersed in trypsin type I solution (0.3%) (Roche Diagnostics Canada, PQ) in HBSS and agitated for 60 minutes at room temperature. Horns were vortexed at maximum during 5 sec and supernatant containing epithelial cells was transferred in a sterile falcon containing 150 µl of FBS D.C. (Dextran-Charcoal extracted). Horns were washed three times with 2.5ml of HBSS and the washing solution were mixed with epithelial cells. Those were kept at 4°C during stromal cells preparation. Next, horns were 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. Horns were then vortexed at maximum during 5 sec. The supernatant containing stromal cells was transferred in a sterile falcon containing 150 µl of FBS D.C. Horns were washed two times with 2.5ml of HBSS and the supernatants were mixed with stromal cells. Horns were discarded and the stromal cells were centrifuged at 1,000 rpm for 5 minutes. Cells were washed two times with HBSS. The supernatant were discarded and the cells were resuspended with DMEM-F12 (Ph 7.1) (Invitrogen, ON) containing 2.438g NaHCO<sub>3</sub>, 10% FBS D.C. and gentamycine 50 µg/ml. Cells were incubated at 37°C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. The medium was changed after two hours in order to eliminate epithelial cell contamination from stromal cell cultures. Proteins from treated cell cultures were extracted with TRIZOL (Invitrogen, ON). For Western blot analyses, 15 µg of total proteins were 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 washed with PBS, the sections were incubated with 0.3 % hydrogen peroxide in methanol for 30 min to quench endogenous peroxidase activity. After washing with PBS, the sections were incubated with blocking serum (Vectastain ABC Kit) at room temperature for 1 h. A primary antibody (TGF-β1, β2 or β3; 1:50 dilution or

CDC47/MCM7; 1:100 dilution) was then added to the sections; incubation was carried out at 4°C overnight in a humidified chamber. After a 5 min wash in PBS, the tissue sections were incubated for 30 min with 3µg/ml biotinylated antibody (anti-rabbit or anti-mouse). Subsequently, slides were washed with PBS and incubated with avidin-biotin complex reagent containing horseradish peroxidase for 30 min. The 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 without the primary antibody.

### **Immunofluorescence**

Tissues were prepared as described in the immunohistochemical section. Cleaved caspase-3 antibody was diluted 1:100 and incubated at 4°C overnight in the presence of tissues. After two 5 min washes 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, the slides were washed with PBS, mounting medium was applied and coverslip added. Negative controls were performed using the same protocol without the presence of the primary antibody. The sections were examined using an Olympus BX60 microscope equipped with a Coolsnap-pro CF digital camera (Carsen Group, Ont).

### **TdT-mediated deoxyuridinetriphosphate nick end-labeling (TUNEL)**

Tissue sections were deparaffinized, rehydrated and rinsed with PBS. They were incubated with proteinase K (20µg/ml) for 30 min at room temperature. Slides were washed two times with PBS, the endogenous peroxidase was inactivated with 0.3 % hydrogen peroxide in methanol for 30 min. 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 reagents (In Situ Cell Death Detection, POD) for 30 min at 37 °C in a 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 atmosphere. The slides were washed for 5 min in PBS. Colour development was achieved using DAB substrate and counterstaining with haematoxylin. Negative control was performed using the same protocol without the

TdT enzyme.

### **Protein extraction and Western analysis**

Protein homogenates from pregnant endometrium were isolated according to a protocol previously described (28). 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 are at an early stage of differentiation and cannot 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. 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. The DB begins to regress on Day 14 and becomes too thin to be reliably dissected after Day 17. Other details have also been described previously by Ogle and George (29).

Endometrial cells were homogenized using a pipet 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 (50µg) were heated at 94°C for 3 min, resolved by 10% SDS-PAGE and electrotransferred to nitrocellulose membranes using a semidry transfer (Bio-Rad, Mississauga, ON). The membranes were blocked for 2h at room temperature with PBS containing 5 % milk powder, and then incubated with anti TGF-β1-2-3 (1:1000); P-Smad2 (Ser 465 / 467) (1:1000) and Smad 2/3 (1:1000) subsequently with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse secondary antibody (1:3000; room temperature for 45 min). All membranes were reprobbed 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), according to the manufacturer's instructions. Signal was visualized using the Biochemi Imaging System

(UVP, CA). Densitometrical analyses were performed (protein of interest and  $\beta$ -actin) using the GelDoc 2000 and the Quantity One software (Bio-Rad, Mississauga, ON). Results are expressed as the ratio protein of interest/ $\beta$ -actin to correct for loading for each endometrial sample.

### **Hoechst and trypan blue exclusion staining**

Following 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 min. Hoechst nuclear staining was viewed and photographed using a Olympus BX60 fluorescence microscope and a Coolsnap-Pro CF digital Camera (Carsen Group, ON). Cells with typical apoptotic nuclear morphology (nuclear shrinkage, condensation and fragmentation) were identified and counted on randomly selected fields of numbered photographic slides. 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 carried out on 6 to 8 different extracts. Endometrial extracts from each rat was assessed individually. Western analyses of cultured decidual cells were repeated 5 times for each TGF- $\beta$  doses. The results subjected to statistical analyses were expressed as the 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 regulation during pregnancy**

In order to confirm the presence of apoptosis in DB, TUNEL measurement was performed on uterine sections obtained at day 14 of gestation. The presence of the activated form of

caspase-3 was also measured by Western analysis and immunofluorescence using a day 14 pregnant uterine section. Figure 1 clearly demonstrates that apoptosis is present in the DB at day 14 and that the cleaved caspase-3 fragment was significantly and gradually increased from day 8 and maximal at day 14 as demonstrated by Western analysis. Cleaved caspase-3 fragment was observed in the cytoplasm of apoptotic cells in the DB (Fig. 1B). Caspase-3 antibody do not recognize full length caspase-3; it is specific to 17 and 19 Kda active fragments of the protein. Only 19 Kda fragments were analysed during early pregnancy and 17 Kda fragments during late pregnancy.

### **Expression of TGF- $\beta$ 1, $\beta$ 2 and $\beta$ 3 in the rat uterus during pregnancy**

To document the presence and expression of TGF- $\beta$  proteins in the uterus throughout pregnancy, IHC and Western analyses were performed on uterine sections and lysates of pregnant rats respectively. It was important to document the presence of TGF- $\beta$  proteins since the information found in the literature shows mRNA expression of different TGF- $\beta$  isoforms and in specific period of pregnancy rather than the whole gestation. Western blot analyses shown in figure 2 demonstrated that TGF- $\beta$ 1 and  $\beta$ 2 were both expressed in a similar pattern. Their expression was increased following implantation (days 5.5 to 6.5) and was maximal during decidua basalis (DB) regression (day 14). However, the localization of those two isoforms during pregnancy was slightly different (Fig. 3): immunohistochemicals analysis confirms that during early pregnancy, the signal was found in both epithelial and stromal cells but during late pregnancy, TGF- $\beta$ 1 was expressed mainly in stromal cells while TGF- $\beta$ 2 was located in epithelial cells. It's interesting to see that both TGF- $\beta$ 1 and  $\beta$ 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. On the opposite, TGF- $\beta$ 3 has not been found during early pregnancy (Fig. 2 and 3). However, TGF- $\beta$ 3 was increased and present at the time of DB regression (days 12 to 16) suggesting that its action might be limited to decidual regression during pregnancy.

### **Involvement of Smad2 in TGF- $\beta$ signaling during pregnancy**

TGF- $\beta$  signal transduction was 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 was the type I receptor-dependent sequential phosphorylation of the two C-terminal serine residues (30). Therefore, phosphorylation of the C-terminus of receptor-activated Smads, particularly Smad2, is crucial for the initiation of TGF- $\beta$  signaling. Western blot analyses of Smad2 and phospho-Smad2 on endometrial cell lysate from pregnant rats was carried out to confirm that TGF- $\beta$  isoforms present in the endometrium during pregnancy have an activity on those cells. The results demonstrated that Smad2 expression was regulated throughout pregnancy (Figure 4). Its expression was high from day 5 to 10 and was dramatically reduced from day 12 to the end of pregnancy. However the levels of phospho-Smad2, the activated form, were high on days 12 and 14 and were gradually reduced to the end of pregnancy. The presence of high levels of phospho-Smad2 correlated with the high expression of the three TGF- $\beta$  isoforms and the presence of apoptosis.

### **TGF- $\beta$ action *in vitro* on decidual cells**

As demonstrated previously by Moulton in 1994 (12), TGF- $\beta$ 1 induces DNA cleavage in rat decidual cells. To confirm that TGF- $\beta$ 1 is responsible for the induction of apoptosis, three different techniques were used to measure apoptosis and cell proliferation (Fig. 5). Hoechst nuclear staining (Fig. 5A) and TUNEL analysis (Fig. 5C) clearly demonstrated that TGF- $\beta$ 1 induced apoptosis in a dose-dependent manner. Apoptosis was increased to 20% at 1 ng/ml of TGF- $\beta$ 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- $\beta$ 1 on cell survival and viability. A dose-dependent increase of cell death was observed in response to TGF- $\beta$ 1 treatment (Fig. 5B).

### **Effect of TGF- $\beta$ on Akt, P-Akt, CDC-47 and XIAP expression *in vitro***

To further determine how TGF- $\beta$  might act at the intra-cellular level to induce apoptosis in decidual cells, experiments were carried out to analyse the possible interaction of TGF- $\beta$

with the PI3K/Akt survival pathway. Recent studies have suggested and demonstrated that TGF- $\beta$  directly acts with Smad3 to regulate the sensitivity to TGF- $\beta$  induced apoptosis (31;32) and another study showed that TGF- $\beta$  exerts a largely inhibitory effect on basal meningioma proliferation possibly through Smad 2/3 (33). Since Smad3 is directly involved in TGF- $\beta$  signaling, a similar mechanism might be involved in the control of decidual cell fate. Another study showed that Akt activity might in turn be affected by the presence or absence of inhibitor of apoptosis proteins such as XIAP (34;35) and cIAP-1 (36). Figure 6 shows that Phospho-Smad2, the activated form, was increased in response to TGF- $\beta$ 1. There was no significant difference observed in term of Smad2 protein expression in response to TGF- $\beta$ 1. As demonstrated in Figure 6, the proliferation marker CDC-47 was significantly decreased in response to TGF- $\beta$ 1 treatment. Figure 7 demonstrates that Phospho-Akt, the active form of Akt, was highly expressed in control cells, indicating that this pathway was active and important in cell proliferation and cell survival. However, in the presence of TGF- $\beta$ 1, Phospho-Akt was significantly decreased suggesting an interaction of TGF- $\beta$  and the PI3K/Akt survival pathway. Total Akt protein expression was not influenced by TGF- $\beta$ 1 treatment. Moreover, XIAP protein expression, a well known inhibitor of apoptosis protein, was significantly reduced in response to increasing doses of TGF- $\beta$ .

## DISCUSSION

Transforming growth factor- $\beta$  isoforms have been known to be expressed and regulated differently in several types of tissues such as ovine uterus (37), human colon carcinoma (38), porcine conceptus-maternal interface (39). They are also recognized as pro-apoptotic factor in many cell type including fetal rat hepatocytes (13) and human leiomyoma smooth muscle cells (40). However, little is known about the role of TGF- $\beta$  isoforms in the rat uterus during pregnancy. The aim of the present study was to investigate the pro-apoptotic functions of TGF- $\beta$  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- $\beta$  isoforms ( $\beta$ 1,  $\beta$ 2 and  $\beta$ 3) are differently expressed and regulated in rat uterus throughout pregnancy.

It is already known that apoptosis is induced during embryo implantation and decidualization in rodents (1;2;12). Our results confirm that apoptosis is induced in the pregnant rat uterus especially during regression of the decidua basalis which was accompanied by a decrease of CDC-47, a known proliferation marker of the MCM7 family (41). Caspases are known to induce cell death and are executioners of apoptosis (14;42). 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 suggest that this pathway is important to induce cleavage of critical survival proteins and to further stimulate apoptosis during DB regression. Caspase-3 activation was weakly observed at the time of implantation and this might be explained by the fact that only few epithelial cells undergo apoptosis in the presence of an embryo at the implantation site. Western blot and IHC analyses might not be enough sensitive techniques to detect the presence of small levels of cleaved caspase-3.

The logical pursuit of this study was to determine the expression of TGF- $\beta$  isoforms during those critical stages of pregnancy. According to previous work published in regards to TGF- $\beta$  isoforms in other systems and in mouse uterus (17;19;23), we found that expression and regulation is indeed different for each isoforms. TGF- $\beta$ 1 was already known to induce apoptosis in human (43) and rat (12) endometrial stromal cells. In the present study, TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 2 were found throughout pregnancy and very concentrate during apoptotic phases such as DB regression. On the other hand, using both IHC and Western analyses, TGF- $\beta$ 3 protein was undetectable in the early stages of gestation, suggesting that TGF- $\beta$ 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. (19) showing that TGF- $\beta$ 3 mRNA was absent during early pregnancy. Nevertheless, the three mammalian forms of TGF- $\beta$  are strongly expressed during DB regression 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 differently expressed in different cells of the same tissues; similarities have been observed in human normal and malignant prostate epithelial cells (17) as TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3 are more expressed in epithelial cells than in stromal cells during late pregnancy. The strong expression of TGF- $\beta$ 1 during early pregnancy (day 5.5 to 6.5) may be explained by the fact that this isoform is necessary for trophoblast invasion during human embryo implantation (44). A similar process might be involved and necessary for embryo implantation in the rat.

The logical step of the present study was to determine if the TGF- $\beta$  isoforms present during pregnancy were active. A lot of information can be found in many physiological systems regarding TGF- $\beta$  and its cellular receptors (6;8) and Smad proteins responsible for its intracellular signal transduction (45-47). Since it is known that TGF- $\beta$  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 expression was stronger at the time of embryo implantation. Smad2 phosphorylation was gradually increased during DB regression which correlates the presence of TGF- $\beta$  isoforms. These results suggest that TGF- $\beta$  isoforms present during these two critical stages of pregnancy might act through Smads proteins to induce apoptosis. Smad2 protein is relatively low during DB regression 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 (48). However, Smad2 phosphorylation is not as much increased during early pregnancy as compare 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- $\beta$  might only be observed in a little number of cells which was below the level of detection with the techniques used.

To better understand the effect of TGF- $\beta$  at the cellular level, decidual cell cultures were used to further investigate the interaction of TGF- $\beta$  and the PI 3-K/Akt survival pathway. It

has been demonstrated recently that Akt phosphorylation is directly induced by 17 $\beta$ -estradiol in the ovariectomized rat uterus indicating that sex steroids have an important influence on endometrial cell fate (49). Very recent studies have showed that TGF- $\beta$  might directly block Akt activity through Smad activation (50). Thus, stromal decidual cells were treated with different doses of TGF- $\beta$ 1 to determine if Smad activation might in turn block Akt survival pathway to induce cell death. TGF- $\beta$ 1 induced Smad2 phosphorylation in decidual cells *in vitro* and triggered apoptosis which was accompanied by a reduction of cells proliferation confirming TGF- $\beta$  as an apoptotic factor in rat decidual cells. In response to TGF- $\beta$ 1, Akt phosphorylation was significantly decreased indicating that Akt activity inhibition might be an important mechanism for TGF- $\beta$ -induced apoptosis in this model. The results support the hypothesis that TGF- $\beta$  action via Smads not only acts at the transcriptional level to induce production of apoptotic factors in decidual cells but also at the proteins 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 (34;35). The present results show a direct interaction between TGF- $\beta$ 1 and XIAP protein expression. TGF- $\beta$ 1 reduced XIAP expression *in vitro* in a dose dependant manner. Recent studies have demonstrated that XIAP can act as a cofactor in the regulation of gene expression induced by TGF- $\beta$  and is independent of Smad4 (13;51). Because TGF- $\beta$ 1 reduced Akt phosphorylation and that XIAP was shown to induce Akt phosphorylation (35), it is possible that TGF- $\beta$  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 better understand the interactions between TGF- $\beta$  and the 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 $\beta$ -estradiol in the rat during estrous cycle (52), might also be a putative candidate for regulation of TGF- $\beta$  activity in decidual cells.

In conclusion, this study demonstrates that the three isoforms of TGF- $\beta$  are differently localized and regulated in endometrial cells of pregnant rat, particularly at the time of implantation and DB regression. Furthermore, the present study showed that TGF- $\beta$  plays an important role in the control of cell survival and cell death and that it directly interacts 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 others Smads and/or co-Smads proteins during TGF- $\beta$ -induced apoptosis. Other investigations will also be required to better understand the specific roles of TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3 at the intracellular and molecular level *in vitro*, as well as quantitative RT-PCR to determine how these isoforms control gene expression through Smad signal transducers.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Mrs Rollande Caron who brought a lot technical expertise with animals and gave plenty of her precious time for these studies. We thank also Mrs Sophie Parent for reviewing the manuscript.

## REFERENCES

1. Abrahamsohn PA, Zorn TM 1993 Implantation and decidualization in rodents. *J Exp Zool* 266:603-628
2. Pampfer S, Donnay I 1999 Apoptosis at the time of embryo implantation in mouse and rat. *Cell Death Differ* 6:533-545
3. Parr EL, Tung HN, Parr MB 1987 Apoptosis as the mode of uterine epithelial cell death during embryo implantation in mice and rats. *Biol Reprod* 36:211-225
4. Welsh AO, Enders AC 1993 Chorioallantoic placenta formation in the rat. III. Granulated cells invade the uterine luminal epithelium at the time of epithelial cell death. *Biol Reprod* 49:38-57
5. Welsh AO 1993 Uterine cell death during implantation and early placentation. *Microsc Res Tech* 25:223-245
6. Lutz M, Knaus P 2002 Integration of the TGF-beta pathway into the cellular signalling network. *Cell Signal* 14:977-988
7. Rich J, Borton A, Wang X 2001 Transforming growth factor-beta signaling in cancer. *Microsc Res Tech* 52:363-373
8. Attisano L, Wrana JL, Lopez-Casillas F, Massague J 1994 TGF-beta receptors and actions. *Biochim Biophys Acta* 1222:71-80
9. Kretschmar M, Doody J, Massague J 1997 Opposing BMP and EGF signalling pathways converge on the TGF-beta family mediator Smad1. *Nature* 389:618-622
10. 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
11. Perlman R, Schiemann WP, Brooks MW, Lodish HF, Weinberg RA 2001 TGF-beta-induced apoptosis is mediated by the adapter protein Daxx that facilitates JNK activation. *Nat Cell Biol* 3:708-714
12. Moulton BC 1994 Transforming growth factor-beta stimulates endometrial stromal apoptosis in vitro. *Endocrinology* 134:1055-1060
13. 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

14. Inman GJ, Allday MJ 2000 Apoptosis induced by TGF-beta 1 in Burkitt's lymphoma cells is caspase 8 dependent but is death receptor independent. *J Immunol* 165:2500-2510
15. Boone DL, Tsang BK 1998 Caspase-3 in the rat ovary: localization and possible role in follicular atresia and luteal regression. *Biol Reprod* 58:1533-1539
16. Massague J 1990 The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol* 6:597-641
17. Perry KT, Anthony CT, Steiner MS 1997 Immunohistochemical localization of TGF beta 1, TGF beta 2, and TGF beta 3 in normal and malignant human prostate. *Prostate* 33:133-140
18. Ghellal A, Li C, Hayes M, Byrne G, Bundred N, Kumar S 2000 Prognostic significance of TGF beta 1 and TGF beta 3 in human breast carcinoma. *Anticancer Res* 20:4413-4418
19. Das SK, Flanders KC, Andrews GK, Dey SK 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
20. Gupta A, Dekaney CM, Bazer FW, Madrigal MM, Jaeger LA 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
21. Gupta A, Ing NH, Bazer FW, Bustamante LS, Jaeger LA 1998 Beta transforming growth factors (TGFss) at the porcine conceptus-maternal interface. Part I: expression of TGFbeta1, TGFbeta2, and TGFbeta3 messenger ribonucleic acids. *Biol Reprod* 59:905-910
22. Gu Y, Jow GM, Moulton BC, Lee C, Sensibar JA, Park-Sarge OK, Chen TJ, Gibori G 1994 Apoptosis in decidual tissue regression and reorganization. *Endocrinology* 135:1272-1279
23. Chen HL, Yelavarthi KK, Hunt JS 1993 Identification of transforming growth factor-beta 1 mRNA in virgin and pregnant rat uteri by in situ hybridization. *J Reprod Immunol* 25:221-233
24. Lea RG, Flanders KC, Harley CB, Manuel J, Banwatt D, Clark DA 1992 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* 148:778-787

25. Manova K, Paynton BV, Bachvarova RF 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
26. Tamada H, McMaster MT, Flanders KC, Andrews GK, Dey SK 1990 Cell type-specific expression of transforming growth factor-beta 1 in the mouse uterus during the periimplantation period. *Mol Endocrinol* 4:965-972
27. Kennedy TG, Ross HE 1993 Effect of prostaglandin E2 on rate of decidualization in rats. *Prostaglandins* 46:243-250
28. Dai D, Ogle TF 1999 Progesterone regulation of epidermal growth factor receptor in rat decidua basalis during pregnancy. *Biol Reprod* 61:326-332
29. Ogle TF, George P 1995 Regulation of the estrogen receptor in the decidua basalis of the pregnant rat. *Biol Reprod* 53:65-77
30. Macias-Silva M, Abdollah S, Hoodless PA, Pirone R, Attisano L, Wrana JL 1996 MADR2 is a substrate of the TGFbeta receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling. *Cell* 87:1215-1224
31. Conery AR, Cao Y, Thompson EA, Townsend CM, Jr., Ko TC, Luo K 2004 Akt interacts directly with Smad3 to regulate the sensitivity to TGF-beta induced apoptosis. *Nat Cell Biol* 6:366-372
32. Remy I, Montmarquette A, Michnick SW 2004 PKB/Akt modulates TGF-beta signalling through a direct interaction with Smad3. *Nat Cell Biol* 6:358-365
33. Johnson MD, Okediji E, Woodard A 2004 Transforming growth factor-beta effects on meningioma cell proliferation and signal transduction pathways. *J Neurooncol* 66:9-16
34. Asselin E, Wang Y, Tsang BK 2001 X-linked inhibitor of apoptosis protein activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in rat granulosa cells during follicular development. *Endocrinology* 142:2451-2457
35. Asselin E, Mills GB, Tsang BK 2001 XIAP regulates Akt activity and caspase-3-dependent cleavage during cisplatin-induced apoptosis in human ovarian epithelial cancer cells. *Cancer Res* 61:1862-1868
36. Gagnon V, St Germain ME, Parent S, Asselin E 2003 Akt activity in endometrial cancer cells: regulation of cell survival through cIAP-1. *Int J Oncol* 23:803-810
37. Dore JJ, Jr., Wilkinson JE, Godkin JD 1996 Ovine endometrial expression of transforming growth factor beta isoforms during the peri-implantation period. *Biol Reprod* 54:1080-1087

38. 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 2001 Differential expression of transforming growth factors-beta1, -beta2 and -beta3 in human colon carcinoma. *Eur J Cancer* 37:224-233
39. Gupta A, Dekaney CM, Bazer FW, Madrigal MM, Jaeger LA 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
40. Arici A, Sozen I 2000 Transforming growth factor-beta3 is expressed at high levels in leiomyoma where it stimulates fibronectin expression and cell proliferation. *Fertil Steril* 73:1006-1011
41. You Z, Ishimi Y, Masai H, Hanaoka F 2002 Roles of Mcm7 and Mcm4 subunits in the DNA helicase activity of the mouse Mcm4/6/7 complex. *J Biol Chem* 277:42471-42479
42. Cohen GM 1997 Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326:1-16
43. Chatzaki E, Kouimtzoglou E, Margioris AN, 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
44. Slater M, Murphy CR 2000 Transforming growth factors alpha and beta-1 are co-expressed in the uterine epithelium during early pregnancy. *Cell Tissue Res* 300:315-320
45. Ingman WV, Robertson SA 2002 Defining the actions of transforming growth factor beta in reproduction. *Bioessays* 24:904-914
46. Javelaud D, Mauviel A 2004 Mammalian transforming growth factor-betas: Smad signaling and physio-pathological roles. *Int J Biochem Cell Biol* 36:1161-1165
47. Akhurst RJ, Derynck R 2001 TGF-beta signaling in cancer--a double-edged sword. *Trends Cell Biol* 11:S44-S51
48. Lin HY, Wang HM, Li QL, Liu DL, Zhang X, Liu GY, 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
49. Dery MC, Leblanc V, Shooner C, Asselin E 2003 Regulation of Akt expression and phosphorylation by 17beta-estradiol in the rat uterus during estrous cycle. *Reprod Biol Endocrinol* 1:47



50. Conery AR, Cao Y, Thompson EA, Townsend CM, Jr., Ko TC, Luo K 2004 Akt interacts directly with Smad3 to regulate the sensitivity to TGF-beta induced apoptosis. *Nat Cell Biol* 6:366-372
51. Birkey RS, Wurthner JU, Parks WT, Roberts AB, Duckett CS 2001 X-linked inhibitor of apoptosis protein functions as a cofactor in transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem* 276:26542-26549
52. Leblanc V, Dery MC, Shooner C, Asselin E 2003 Opposite regulation of XIAP and Smac/DIABLO in the rat endometrium in response to 17beta-estradiol at estrus. *Reprod Biol Endocrinol* 1:59

## FIGURE LEGEND

Figure 1 : Detection of apoptosis in pregnant endometrial tissues demonstrated by Western and TUNEL analyses. A) Apoptosis as determined by Western analysis of cleaved caspase-3 (one blot presented out of 6).  $\beta$ -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. B) Cleaved caspase-3 immunofluorescence at day 14 of pregnancy. C) TUNEL analysis at day 14 of pregnancy. B) and C) One representative section is presented out of 6 experiments. C-: negative control.

Figure 2 : TGF- $\beta$ 1, - $\beta$ 2 and - $\beta$ 3 expression in rat endometrium during rat pregnancy. Total endometrial proteins were collected at different days of pregnancy.  $\beta$ -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.

Figure 3 : Immunohistochemistry of TGF- $\beta$ 1, - $\beta$ 2 and - $\beta$ 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 day pregnancy. Representative days of pregnancy are presented. Negative control (C-): primary antibody absent.

Figure 4 : Smad2 and phospho-Smad2 (P-Smad2) expression in rat endometrium during rat pregnancy. Total endometrial proteins were collected at different days of pregnancy.  $\beta$ -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 5 : Measurement of apoptosis in rat decidual cells as demonstrated by Hoechst staining, TUNEL and trypan blue exclusion analyses in response to TGF- $\beta$ 1. A) Apoptosis as determined by Hoechst nuclear staining. Data represent the mean  $\pm$  SEM of six independent experiments. B) Cell viability as determined by trypan blue exclusion assay. Data represent the mean  $\pm$  SEM of six independent experiments. C) Apoptosis as determined by TUNEL assay. Representative section is presented out of 6 experiments.

Figure 6: Expression of Smad2, P-Smad2 and CDC47 in rat decidual cells *in vitro* as demonstrated by Western blot analyses.  $\beta$ -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 7: Expression of Akt, P-Akt and XIAP in rat decidual cells *in vitro* as demonstrated by Western blot analyses.  $\beta$ -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 ( $p < 0.05$ ).

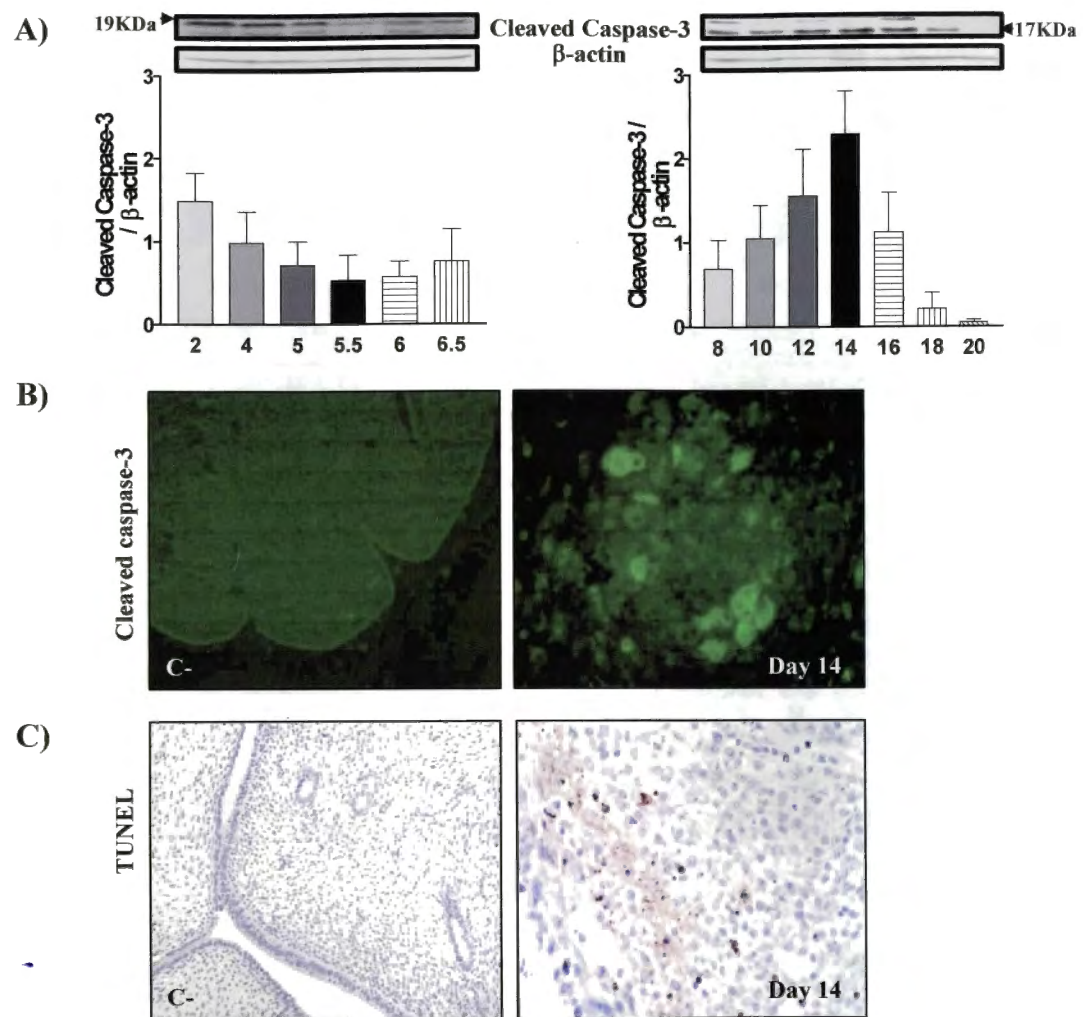


Figure 1

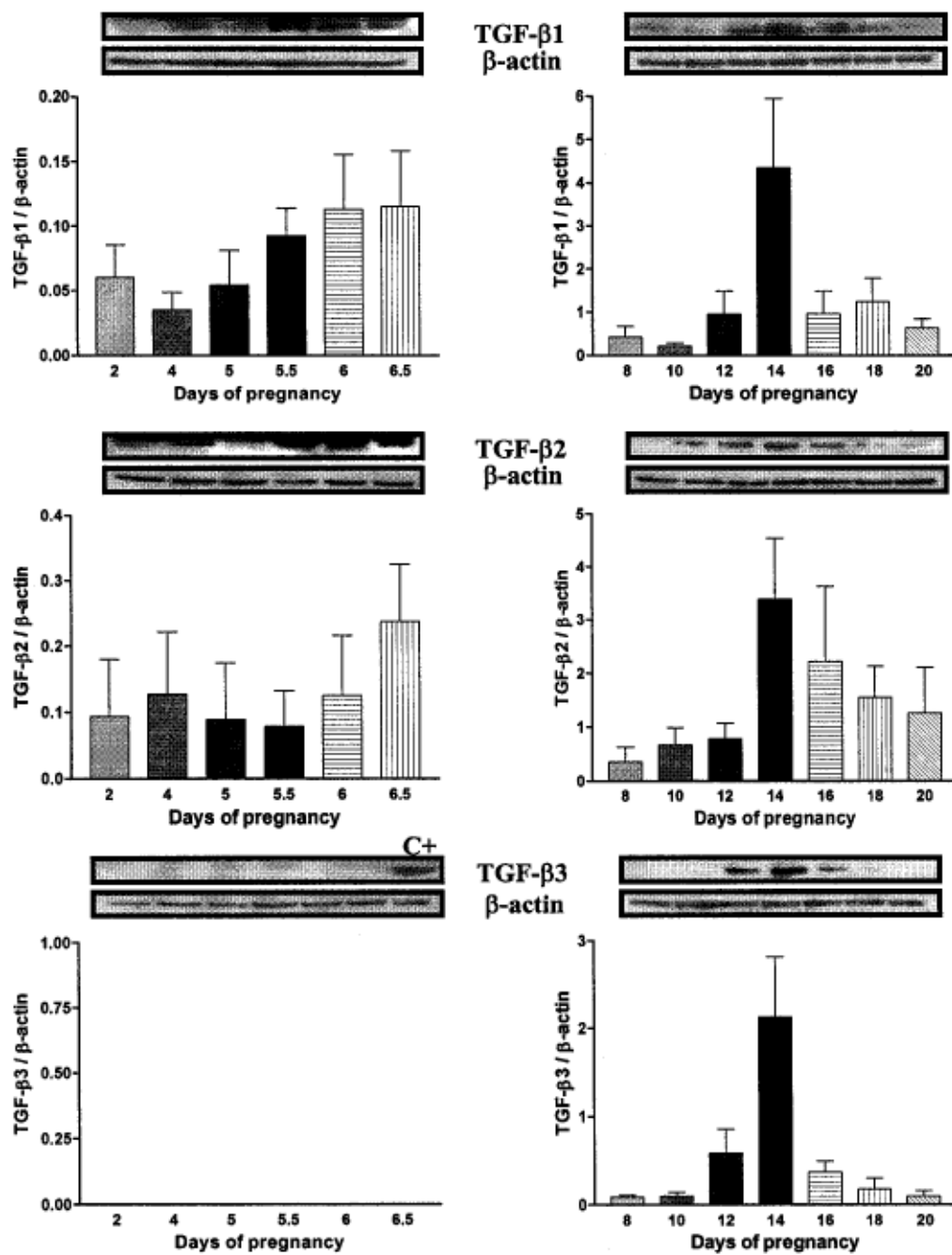


Figure 2

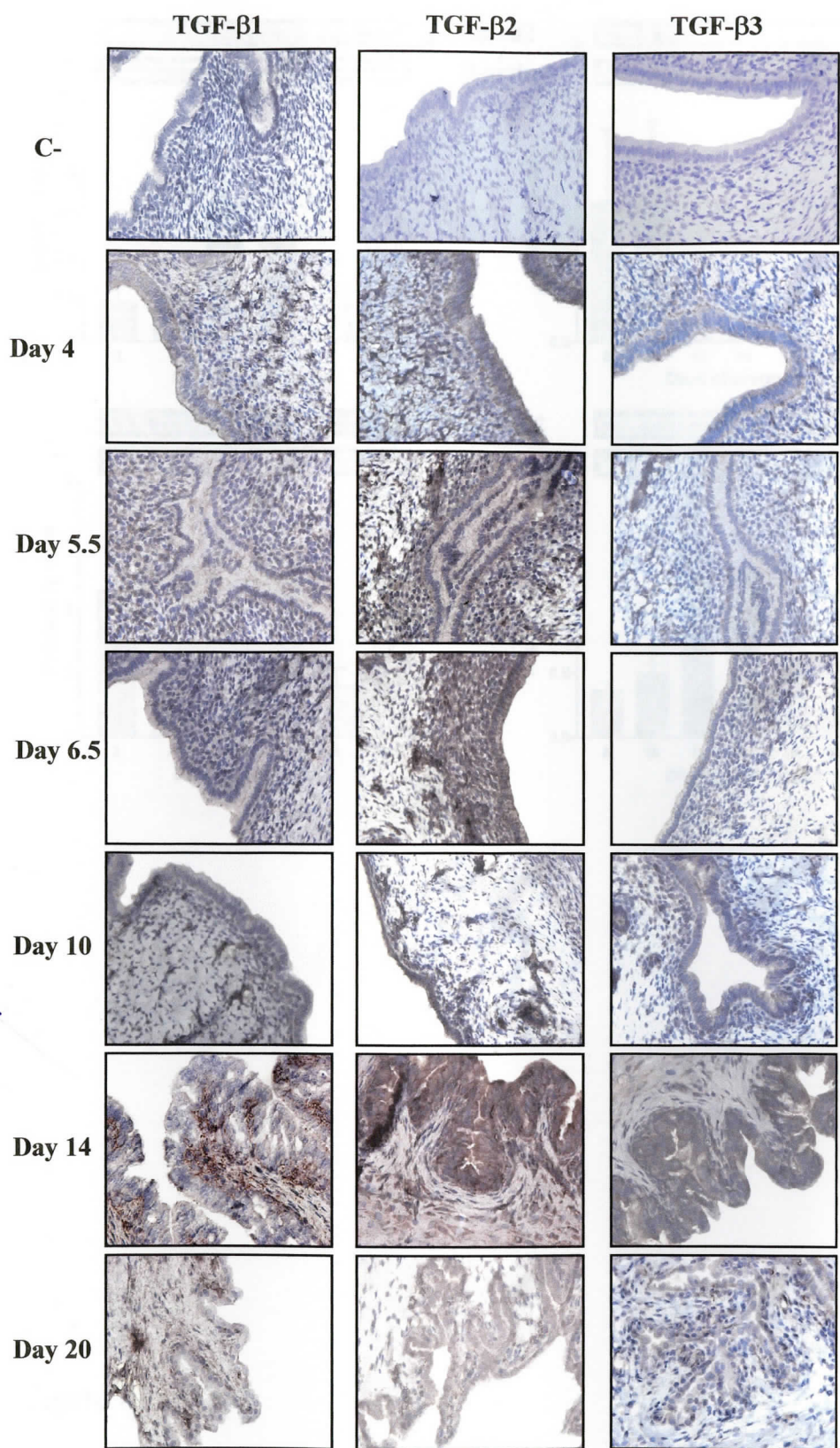


Figure 3

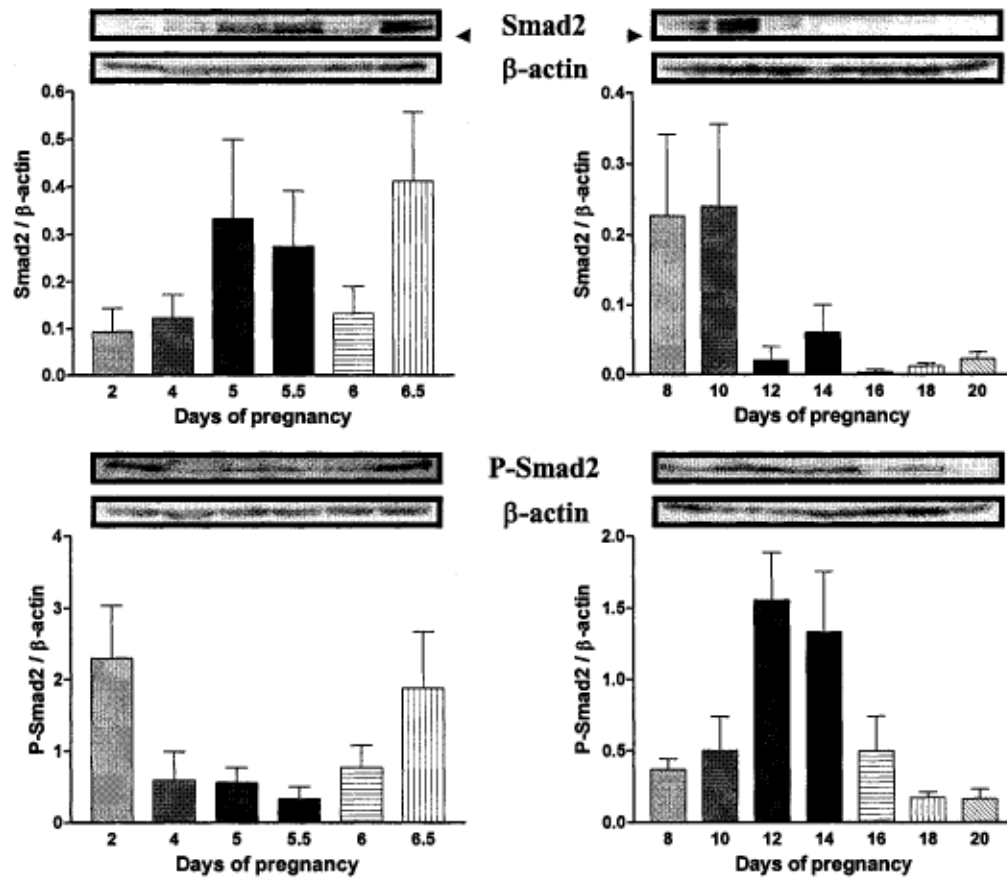


Figure 4



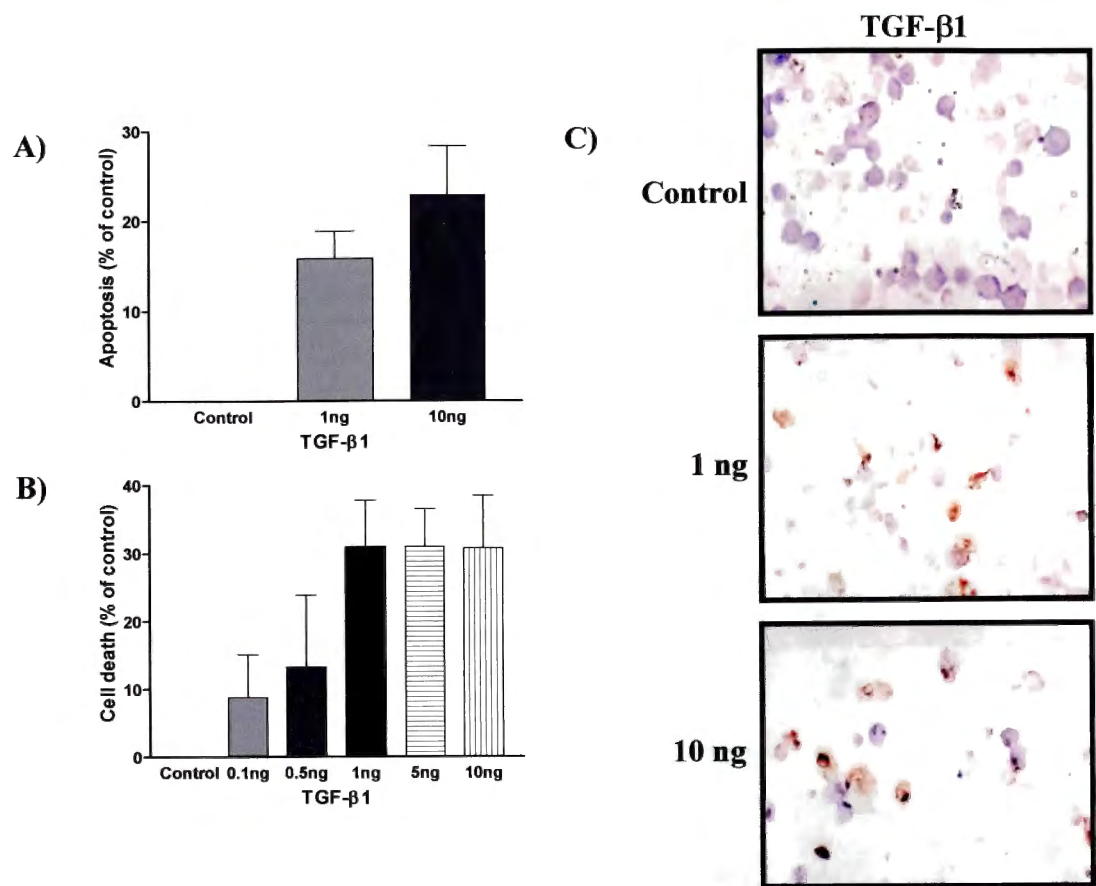


Figure 5



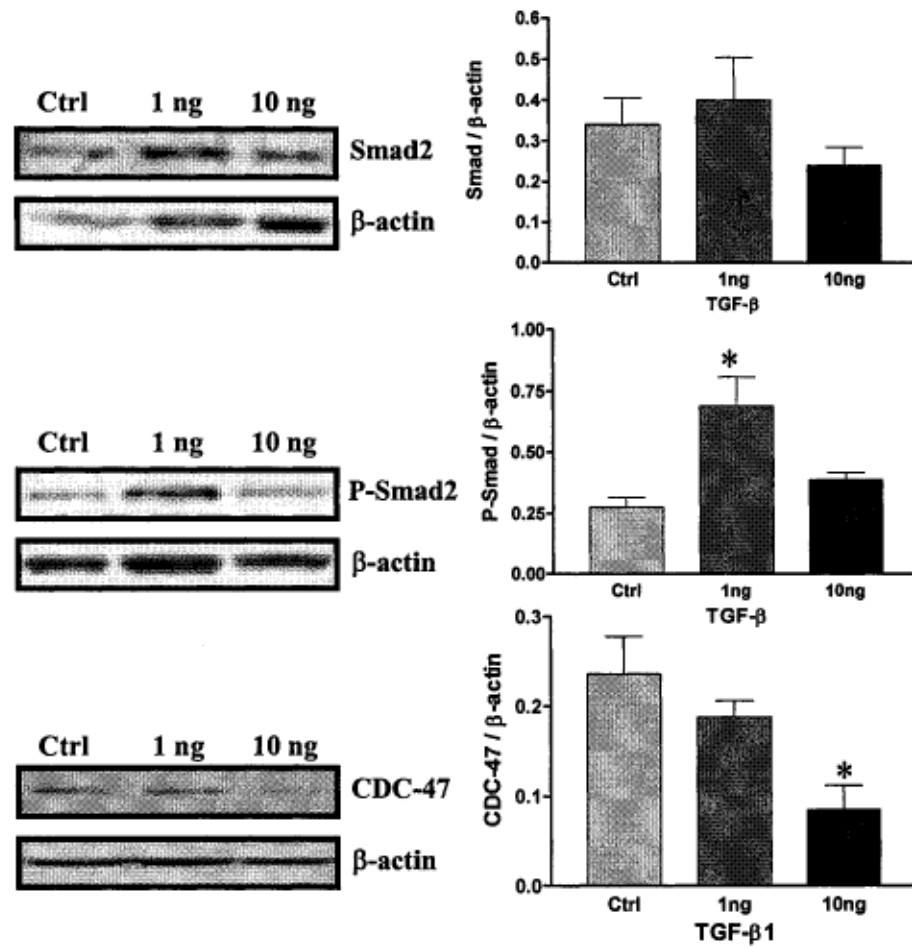


Figure 6

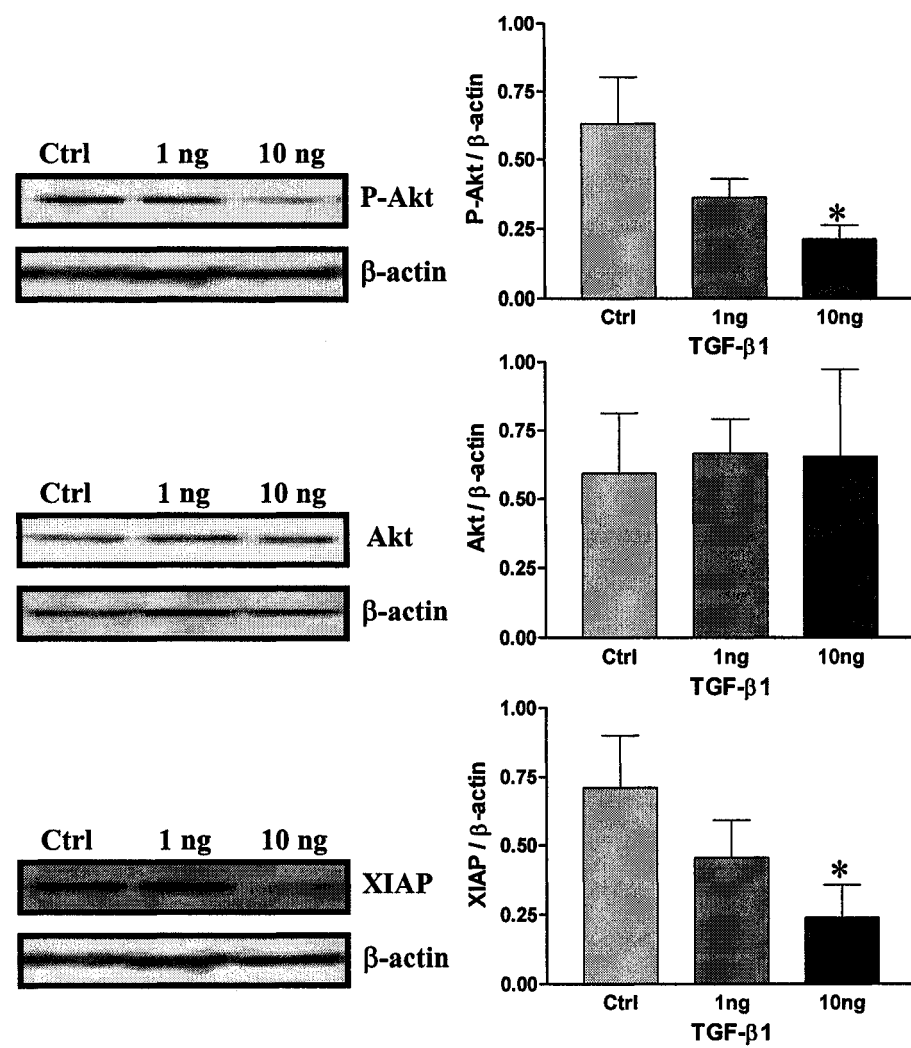


Figure 7

### **Chapitre III**

**Regulation of XIAP expression and Akt activity are important mechanisms to control apoptosis and cell survival in the endometrium during rat pregnancy**

## **Préface**

Les auteurs du chapitre III (article présentement en attente de soumission) sont Carl Shooner (fait les expériences en relation avec les jours de gestation, écriture de l'article, matériel et méthodes, ovariectomies), Valérie Leblanc (contribution importante au niveau de la récolte des tissus, de la culture cellulaire et des figures), Marie-Claude Déry (récolte des tissus et expériences préliminaires) et Éric Asselin, directeur de recherche direction, encadrement et supervision de la recherche.

## Résumé de l'article

Durant la première étape de la gestation, les cellules trophoblastiques de l'embryon entrent en contact avec l'endomètre utérin; les cellules épithéliales de la paroi utérine entrent en apoptose laissant ainsi à l'embryon un espace suffisant pour l'implantation. À la fin de la gestation, un phénomène apoptotique semblable mais plus important est observé durant la régression déciduale, soit du jour 14 au jour 20. Nous détenons peu d'information en ce qui concerne les mécanismes moléculaires et intracellulaires impliqués dans la régulation du processus apoptotique dans l'utérus au cours de la gestation. L'objectif de cette étude est de caractériser l'expression et la régulation du X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) et de la voie de survie phosphatidylinositol 3-kinase(PI3-K)/Akt dans l'utérus de rat au cours de la gestation. Les rats ont été euthanasiés à différents jours de la gestation (jours 2 à 20) et les utérus ont été prélevés afin de recueillir les cellules requises pour l'analyse protéique et les tissus nécessaires aux techniques d'immunohistochimie. Une forte augmentation de l'apoptose est observée durant la réaction déciduale (jour 14,16 et 18). La prolifération cellulaire, quand à elle, a été déterminée par l'expression du facteur de prolifération CDC47/MCM7 qui s'est avéré faiblement exprimé au moment de l'implantation et de la régression déciduale. Une forte expression de la forme active de Akt (Akt phosphorylée) a été observée tout au long de la gestation; cette expression s'est avérée réduite durant la régression déciduale et faible durant l'implantation embryonnaire. L'expression de XIAP démontre une régulation et une expression similaire à P-Akt durant la régression déciduale. LY294002 (un inhibiteur de la voie de survie cellulaire PI3-K/Akt) bloque la phosphorylation de Akt, réduit l'expression de XIAP et induit l'apoptose dans les cellules déciduales *in vitro* de façon dose-dépendante. Ces résultats démontrent que XIAP et les protéines de la voie de survie cellulaire PI3-K/Akt sont d'importantes molécules régulatrices de l'apoptose dans l'utérus de rat pendant la gestation. Cette étude démontre pour la première fois l'expression et la régulation de XIAP et PI3-K/Akt dans l'utérus de rat gestante.

**Regulation of XIAP expression and Akt activity are important mechanisms to control apoptosis and cell survival in the endometrium during rat pregnancy<sup>†</sup>**

Carl Shooner, 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

Short title: Role of XIAP and Akt during pregnancy.

Key words: Phosphatidylinositol 3-kinase, Akt, PTEN, Caspases, apoptosis, XIAP, Bcl-2, 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

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

## ABSTRACT

During the rat pregnancy, trophoblast of the tiny embryo begins to join with the endometrium and epithelial cells undergo apoptosis, which gives the embryo enough space to embed itself in the uterine cell wall. Reaching the end of pregnancy, regression of 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 regulation of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) and phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-K)/Akt survival pathway in the rat endometrium during pregnancy. Rats were killed at different days of pregnancy (days 2-18) and uteri were removed to collect endometrial proteins extracts or fixed, embedded and sectioned for immunohistochemistry (IHC). A strong increase of apoptosis in the DB at days 14, 16 and 18 was observed. On the opposite, cell proliferation determined by the expression of the proliferation factor CDC47/MCM7 was low during implantation and DB regression. The active form of Akt (phospho-Akt) was strongly present throughout pregnancy but was low at the time of implantation and reduced during DB regression. XIAP expression showed a similar pattern of regulation than the one observed with phospho-Akt around day 14 of pregnancy. PI 3-K inhibitor LY294002 blocked Akt phosphorylation, reduced XIAP expression and induced apoptosis of decidual cells *in vitro* in a dose-dependent manner. These results demonstrate that XIAP and the PI 3-K/Akt survival pathway may be important signaling molecules by which apoptosis is regulated in the rat endometrium throughout pregnancy. This study is the first to report expression and regulation of XIAP and PI 3-K/Akt in uterus of pregnant rat.

## INTRODUCTION

During embryo implantation in rodents, the trophoblast possesses invasive properties to deeply infiltrate the uterine endometrium [1,2]. Under the effect of estrogen and progesterone, endometrial stromal cells begin a process called decidualization. This process is crucial since endometrial cells need to be receptive to the growing embryo [3,4]. During implantation, epithelial cells of the endometrium will undergo apoptosis at the time when trophoblast join with the uterus cell wall. A second wave of apoptosis occur around day 14 of pregnancy at the time of deciduas basalis (DB) regression [5,6]. Although some studies have demonstrated that TGF- $\beta$  might be involved in triggering apoptosis during DB regression [7,8], the specific intracellular mechanisms controlling apoptosis in rat decidual endometrial cells are poorly understood and documented.

Akt, a serine/threonine protein kinase of 60 kDa, is an inactive cytosolic protein recruited to the plasma membrane and is activated by phosphorylation at threonine 308 and serine 473 in response to growth factors or cytokines [9-11]. The cell survival role of Akt has been demonstrated in multiple cell lineage [12,13]. The molecule responsible for recruitment of Akt to the cellular membrane as well as activation is the lipid kinase PI 3-K. Upon activation (by a growth factor), PI 3-K induces Akt phosphorylation which in turn phosphorylates and blocks the action of Bad, a pro-apoptotic member of the Bcl-2 family which result in preventing the perturbation of the mitochondrial membrane. Without appropriate stimulation by a growth factor, BAD inhibit the action of Bcl-2 and Bcl-XL which lead to the perturbation of the mitochondrial membrane and the release of cytochrome *c* from the intermitochondrial membrane space[14,15]. Once it has been released, cytochrome *c* binds to Apaf-1, resulting in the recruitment and activation of caspase-9 which in turn regulates and activates caspase-3, one of the key executioners of apoptosis. Caspase-3 cleaves many key cellular proteins, such has PARP (poly(ADP-ribose)polymerase), a nuclear enzyme responsible for DNA repair and act as a transcription factors [16-18]. Phosphatase and Tensin homologue (PTEN) is a tumor suppressor gene implicated in a wide variety of human cancers [19]. This pro-apoptotic protein is a negative



regulator of the PI3-K pathway by dephosphorylating PIP<sub>3</sub> into PIP<sub>2</sub> and preventing the phosphorylation of Akt.

Inhibitors of Apoptosis Protein (IAPs) constitute a family of intracellular anti-apoptotic proteins, which were first identified as analogs of genes present in the baculovirus. They are characterized by one or more baculovirus IAP repeats, called BIR domains that are responsible for their anti-apoptotic activity [20]. It includes X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein (XIAP), human IAP-1 (HIAP-1), human IAP-2 (HIAP-2) neuronal apoptosis inhibitory protein (NAIP) and survivin[21]. With the exception of NAIP and survivin, they include a C-terminal RING-Zinc finger domain believed to be involved in proteins-proteins and proteins-nucleic acid interactions. XIAP has been shown to be a direct inhibitor of caspase-3 and caspase-7 and to interfere with the Bax/cytochrome C pathway by inhibiting caspase-9 [22-24]. It has been shown recently that XIAP might also be involved in cell survival through regulation of Akt phosphorylation in different systems [25-28].

Bcl-2 and related cytoplasmic proteins are also regulators of apoptosis. The Bcl-2 family of proteins are represented by 16 homologues having pro-apoptotic or pro-survival properties [29,30]. Bcl-2 protein promotes cell survival by inhibiting adapters needed for activations of proteases like caspases which are key executioners of cell death. On the other hand, pro-apoptotic proteins like Bax promote apoptosis when activated by phosphorylation. Pro-apoptotic and anti-apoptotic proteins of the Bcl-2 family can heterodimerize and regulate one another function which is required to maintain a homeostatic balance between cell survival and cell death. Another protein involved in cell survival and proliferation is CDC-47/MCM7, a member of the minichromosome maintenance (MCM) family of polypeptides. CDC-47/MCM7 has role in the early stages of chromosomal DNA replication and has been implicated in the regulatory machinery allowing DNA to replicate during S phase which is used as a proliferation marker[31].

The aim of the present study was to characterize the regulation of the PI 3-K/Akt survival pathway in rat uterus during pregnancy and the possible interaction of XIAP during these

important processes of pregnancy. Regulation of PI 3-K/Akt survival pathway and XIAP expression were investigated using Western blotting, IHC and *in vitro* decidual cell cultures.

## **MATERIAL AND METHOD**

### **Reagents**

CDC47/MCM7 and Bcl-2 antibodies were obtained from Mediacorp (Montréal, QC). Phospho-Akt (Ser 473), Akt, PTEN and XIAP antibodies were obtained from Cell Signaling Technology (Beverly, Massachusetts). Vectastain ABC Kit for rabbit IgG was purchased from Vector Laboratories Inc. (Burlingame, CA).

### **Animals**

Sprague-Dawley female rats, 200-225g, were obtained from Charles River Laboratories Canada (St-Constant, Qc). Animals were maintained on standard chow and water, which were available *ad libitum*, in animal facilities illuminated between 6h00 and 20h00. 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 were mated in separate cages and confirmation of pregnancy was determined by vaginal smears and/or the presence of vaginal plug (day 1). Rats were killed on day 2, 4, 5, 5.5, 6, 6.5, 8, 10, 12, 14, 16, 18 and 20 of pregnancy. Uteri were collected and fixed for immunohistochemical staining (IHC) or endometrial protein extracts collected for Western analysis.

### **Rat pretreatments and decidual 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 $\beta$ -diol, Sigma-aldrich) and progesterone (Laboratoire Mat, PQ) to induce decidualization as described previously [32]: 1) 0.2  $\mu$ g 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  $\mu$ 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 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).

Uteri were removed and horns taken and immersed in HBSS solution containing HEPES (20mM), penicillin (100 units/ml), streptomycin (100 µg/ml) and fungizone (1,25 ul/ml) (Invitrogen, ON). Further manipulations were performed in a sterile environment. The horns were transferred into a sterile petri containing HBSS, slit longitudinally and immersed in trypsin type I solution (0.3%) (Roche Diagnostics Canada, PQ) in HBSS and agitated for 60 minutes at room temperature. Horns were vortexed at maximum during 5 sec and supernatant containing epithelial cells was transferred into a sterile falcon containing 150 µl of FBS D.C. (Dextran-Charcoal extracted). Horns were washed three times with 2.5ml of HBSS and wash solution mixed with epithelial cells. Those were kept at 4°C during stromal cells preparation. Next, horns were 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. Horns were then vortexed at maximum during 5 sec. The supernatant containing stromal cells was transferred into a sterile falcon containing 150 µl of FBS D.C. Horns were washed two times with 2.5ml of HBSS and supernatant mixed with stromal cells. Horns were discarded and stromal cells were centrifuged at 1,000 rpm for 5 minutes. Cells were washed two times with HBSS and centrifuged. Supernatant was discarded and cells diluted with DMEM-F12 (Ph 7.1) (Invitrogen, ON) containing 2.438g NaHCO<sub>3</sub>, 10% FBS D.C. and gentamycine 50 µg/ml. Cells were incubated at 37°C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. The medium was changed two hours after the first incubation in order to eliminate epithelial cell contamination from stromal cell cultures. Total proteins from treated cell cultures were extracted using TRIZOL (Invitrogen, ON). 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 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 3µg/ml biotinylated antibody (anti-rabbit or anti-mouse). Subsequently, slides were washed with PBS and incubated with avidin-biotin complex reagent containing horseradish peroxidase for 30 min. 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 without primary antibody.

### **Protein extraction and Western analysis**

Proteins homogenates from pregnant endometrium were isolated according to a protocol previously described [33]. 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. 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. Other details have also been described previously by Ogle and George [34].

Endometrial cells 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 (50µg) were heated at 94°C for 3 min, resolved by 10% SDS-PAGE and electrotransferred to nitrocellulose membranes using a semidry transfer (Bio-Rad, Mississauga, ON). The membranes were then blocked 2 h at room temperature with PBS containing 5 % milk powder, then incubated with anti TGF-β1-2-3 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 reprobbed 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), according to the manufacturer's instructions. Signal was visualized using the Biochemi Imaging System (UVP, CA). Densitometrical analyses were performed (protein of interest and β-actin) using the GelDoc 2000 and the Quantity One software (Bio-Rad, Mississauga, ON). Results are expressed as a ratio (proteins of interest/β-actin) to correct for loading for each endometrial sample.

### **Statistical analysis**

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

## RESULTS

In order to determine apoptotic phenomenon involved during implantation and regression of the decidua basalis in rat uterus during pregnancy, our previous study using TUNEL, immunofluorescence and western analyses of cleaved PARP and cleaved caspase-3 revealed that apoptosis was present during the implantation period (days 5.5 to 6.5) and during DB regression (day 14) [8]. In the current study, complementary experiences were performed to confirm those stages of apoptosis during rat pregnancy. Immunohistochemical CDC47/MCM7 staining, a well known proliferation marker, was carried out on uterine tissues section from pregnant rats (day 2 to 20 of pregnancy).

Figure 1 shows that CDC47/MCM7 positive cells were abundant in the stromal endometrial compartment (where decidual cells were present) throughout pregnancy. However, positive cells were significantly reduced at the time of DB regression (days 12, 14 and 16) in stromal cells. On the opposite, epithelial proliferation was low during early pregnancy, gradually increased from day 6.5 to day 14 and reduced at day 16, 18 and 20. Since we have demonstrated recently the importance of Akt activity inhibition in the action of TGF- $\beta$  induced-apoptosis in rat decidual cells *in vitro*, we sought to determine its expression and activity during rat pregnancy.

Figure 2 shows Akt expression and Akt activity (phospho-Akt) in the endometrium of pregnant rat. Results shows that Akt was present during early pregnancy and reduced on day 5.5. During late pregnancy, Akt expression is high on days 8-12 and gradually reduced from day 14 to 20. Phospho-Akt shows the same pattern of expression during late pregnancy: phosphorylation was high on days 8-12 and gradually reduced from day 14 to 20. During early pregnancy, P-Akt was low on day 2 and 4 and significantly increased on day 5 to 6.5. These results support the fact that activity of this survival pathway during pregnancy was less active when apoptotic processes are triggered. To further investigate expression other proteins known to be involved in the regulation of the PI 3-K/Akt pathway activity, Bcl-2 and PTEN expression were studied (figure 3). Bcl-2, a pro-survival member of the Bcl-2 family, was constitutively and strongly expressed throughout gestation and its

expression was not influenced by pregnancy. PTEN, on the other hand, a pro-apoptotic phosphatase directly and negatively involved in Akt phosphorylation was highly expressed during early pregnancy (days 2-8). However, PTEN expression was still high on day 10 and 12 prior decidua basalis regression and was reduced on days 14 to 20. Many studies have shown the possible link between XIAP expression and Akt activity [25,26] and we sought to determine its expression in pregnant rat endometrium. XIAP expression was high on days 2 and 4 of pregnancy, was reduced from day 5 to 6.5 and gradually increased from day 8 to 14 where XIAP expression reached its maximum (figure 4).

XIAP expression was then reduced from day 16 to the end of pregnancy. Overall, as determined by CDC47/MCM7 expression, proliferation showed a similar pattern of activity than the one observed with XIAP expression supporting the anti-apoptotic properties of this inhibitor of caspase activity. Since the results obtained *in vivo* showed that Akt activity might be important in the control of cell fate during pregnancy, decidual cell cultures were used to determine, at the cellular level, the consequence of Akt activity on cell survival. LY294002, a well known and characterized phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor[35], was used to block Akt phosphorylation in decidual cells (figure 5). As hypothesized, the results showed that LY294002 prevent Akt phosphorylation which resulted in the induction of apoptosis. LY294002 had no effect on Akt expression but significantly reduced XIAP expression suggesting a possible interaction of Akt and XIAP as observed in other systems.

## DISCUSSION

Numerous studies are found in the literature to describe implantation, and decidualization processes in rat and mouse [36] (see [37,38] for reviews) and the involvement of apoptosis during those critical stages of embryo development [39,40]. During early pregnancy, the uterine endometrium responds to an implanting blastocyst with extensive growth and differentiation of the decidua. The aim of the present study was to characterize the regulation of the PI3-K/Akt survival pathway and XIAP expression during apoptosis activation in the rat uterus throughout gestation, more precisely at the time of implantation

and DB regression. Previous work carried out in our laboratory confirmed the presence of apoptosis during implantation and DB regression as well as the demonstration that TGF- $\beta$ 1, - $\beta$ 2 and - $\beta$ 3 isoforms might be important regulators of cell fate during these processes [8].

The present results shows that the active form of Akt (phospho-Akt) is an important protein involved in cell survival occurring in the endometrium during rat pregnancy and confirm our hypothesis in this regard. At the time of implantation and DB regression Akt phosphorylation is reduced and apoptosis is increased as demonstrated by the presence of the cleaved caspase-3 fragment [8]. We have demonstrated recently that increased Akt expression and activity in response to 17 $\beta$ -estradiol in the cycling rat uterus might be important mechanism to protect endometrial cells from apoptotic triggering and to induce endometrial cell proliferation, whereas inhibition of Akt activity might lead to caspase-3 activation and apoptosis in endometrial cells [27]. A similar process might be involved in the pregnant rat uterus. However, the presence of active cleaved caspase-3 does not necessarily indicate that apoptosis will be triggered since many caspase inhibitors can be present in the cytoplasm to block their activities. One example of such inhibitor is X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP). Surprisingly, our results showed that XIAP expression was increased during DB regression which is contrary to our hypothesis. Since XIAP is an anti-apoptotic factor, logically its expression should be reduced at the time of apoptosis induction. In the uterus of cycling rats, a similar situation was observed: apoptosis was strong at estrus while XIAP expression was maximal [28]. Moreover, the latter study (in ovariectomized rats) showed that XIAP expression was increased by 17 $\beta$ -estradiol which is consistent with the mitogenic activity and apoptosis inhibitory activity of 17 $\beta$ -estradiol, but it is not clear why XIAP expression does not increase during proestrus (when 17 $\beta$ -estradiol levels are maximal). In contrast, Smac/DIABLO, an inhibitor of XIAP activity, was decreased at estrus and 17 $\beta$ -estradiol treatment in ovariectomized rats reduced its expression [28]. Smac/DIABLO down-regulation supports the fact that active caspase-3 might be present but elimination of Smac/DIABLO inhibitor is important to trigger apoptosis through the caspase pathway. The results also suggest that this pro-apoptotic factor might have a key function in triggering apoptosis at particular time during rat pregnancy. A recent study showed that XIAP is not cleaved by caspases during apoptosis induced by TGF- $\beta$ 1 in



fetal rat hepatocytes [41] and it is known that TGF- $\beta$ 1 levels are high during implantation and DB regression [8]. However, Akt is known to be a direct target of caspase-3 [26] and Akt cleavage might be more important in relation to the caspase pathway. The fact that the simple inhibition of PI 3-K with LY294002 in decidual cells results in the induction of apoptosis confirm the importance to block Akt pathway activity to induced apoptosis in decidual cells. Moreover, inhibition of Akt phosphorylation and down-regulation of XIAP expression in the presence of LY294002 support the hypothesis that Akt activity might be involved in the regulation of XIAP expression possibly through NF- $\kappa$ B pathway [42,43].

The finding of bcl-2 in some tissues responsive to steroid hormones, such as endometrium and myometrium, suggested that *bcl-2* gene expression may be related to hormone-dependent apoptosis [44]. In a study using ovariectomized rats primed with 17 $\beta$ -estradiol and treated with progestin and 17 $\beta$ -estradiol before an intrauterine stimulus to initiate decidualization, expression of bcl-2 decreased after hormone treatment and decidualization [45]. However, the present results showed that bcl-2 expression was not influenced by pregnancy and did not support the hypothesis that bcl-2 is a sex steroid regulated anti-apoptotic protein. Bcl-2 protein might be important to control cell survival but its elimination or down-regulation might not be important in the control of apoptosis in the rat uterus during pregnancy.

The expression of PTEN, a well known tumor suppressor, is especially high during implantation and low during DB regression, suggesting that its role may be more important in controlling epithelial cell fate during implantation. Recently, we have showed that Akt phosphorylation was reduced at estrus in rat endometrium but IHC revealed a specific pattern of phospho-Akt expression in luminal epithelial cells and was distributed mainly at the membrane level facing the uterine lumen [27]. Translocation at the plasma membrane of phospho-Akt from the nucleus and/or cytoplasm suggests that its presence at the membrane level may not allow phospho-Akt to be active in term of survival signaling. A recent study demonstrated that transient membrane association is required for the physiological activation of Akt indicating that correct subcellular localization is crucial for the activation of the kinase, and it may also allow its appropriate inactivation by phosphatases [46]. PTEN,

a phosphatase found and active at the plasma membrane [47,48] which directly dephosphorylates the phospholipid PIP<sub>3</sub> which is essential for Akt phosphorylation [49], might be the important phosphatase involved in the present system. The current results clearly show that PTEN protein was present in the endometrium and was not influenced by hormonal changes observed during pregnancy. Indeed, recruitment of Akt at the membrane level may be a mechanism by which PTEN and other phosphatase acts on Akt to inactivate its function. Since PTEN protein expression was constant during early pregnancy PTEN is proposed to be a constitutively expressed protein. In the human endometrium, PTEN has been shown to be regulated by progesterone [50]. However, PTEN is increased prior to DB regression. This suggests that PTEN might be an important protein involved in initiating DB regression rather than a role during embryo implantation.

In conclusion, Akt activity and XIAP expression might be important points of control in endometrial cell fate during pregnancy. Further analysis will be necessary to determine the interaction between Akt and XIAP during pregnancy. Immunohistochemical staining will be needed in order to determine the localization of Akt, phospho-Akt and XIAP in endometrial compartments during pregnancy. Since three isoforms of Akt have been described and might possess different properties, the role of these specific Akt isoforms will require deeper investigations in the reproductive system of pregnant rats.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

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 for reviewing the manuscript.

## REFERENCES

1. Tabibzadeh S, Babaknia A. The signals and molecular pathways involved in implantation, a symbiotic interaction between blastocyst and endometrium involving adhesion and tissue invasion. *Hum Reprod* 1995; 10:1579-1602.
2. Barkai U, Kraicer PF. Intrauterine signaling and embryonic implantation. *Biol Signals* 1996; 5:111-121.
3. 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; 109:129-136.
4. Ogle TF. Progesterone-action in the decidual mesometrium of pregnancy. *Steroids* 2002; 67:1-14.
5. Pampfer S, Donnay I. Apoptosis at the time of embryo implantation in mouse and rat. *Cell Death Differ* 1999; 6:533-545.
6. 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.
7. Moulton BC. Transforming growth factor-beta stimulates endometrial stromal apoptosis in vitro. *Endocrinology* 1994; 134:1055-1060.
8. Shooner C, Leblanc V, Dery MC, Caron PL, Asselin E. TGF- $\beta$  expression during rat pregnancy and activity on decidual cell survival. *Endocrinology* , Submitted. 2004.
9. Songyang Z, Baltimore D, Cantley LC, Kaplan DR, Franke TF. Interleukin 3-dependent survival by the Akt protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:11345-11350.
10. Crowder RJ, Freeman RS. Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt protein kinase are necessary and sufficient for the survival of nerve growth factor-dependent sympathetic neurons. *J Neurosci* 1998; 18:2933-2943.
11. Dery MC, Leblanc V, Shooner C, Asselin E. Regulation of Akt expression and phosphorylation by 17 $\beta$ -estradiol in the rat uterus during estrous cycle. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1:47.
12. Yang L, Dan HC, Sun M, Liu Q, Sun XM, Feldman RI, Hamilton AD, Polokoff M, Nicosia SV, Herlyn M, Sefti SM, Cheng JQ. Akt/protein kinase B signaling inhibitor-2, a selective small molecule inhibitor of Akt signaling with antitumor activity in cancer cells overexpressing Akt. *Cancer Res* 2004; 64:4394-4399.

13. Latronico MV, Costinean S, Lavitrano ML, Peschle C, Condorelli G. Regulation of Cell Size and Contractile Function by AKT in Cardiomyocytes. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1015:250-260.
14. Orrenius S. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. *Toxicol Lett* 2004; 149:19-23.
15. 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.
16. Di Meglio S, Tramontano F, Cimmino G, Jones R, Quesada P. Dual role for poly(ADP-ribose)polymerase-1 and -2 and poly(ADP-ribose)glycohydrolase as DNA-repair and pro-apoptotic factors in rat germinal cells exposed to nitric oxide donors. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1692:35-44.
17. D'Amours D, Desnoyers S, D'Silva I, Poirier GG. Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem J* 1999; 342:249-268.
18. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997; 326:1-16.
19. Myers MP, Pass I, Batty IH, Van dK, Stolarov JP, Hemmings BA, Wigler MH, Downes CP, Tonks NK. The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor supressor function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:13513-13518.
20. Nachmias B, Ashhab Y, Ben Yehuda D. The inhibitor of apoptosis protein family (IAPs): an emerging therapeutic target in cancer. *Semin Cancer Biol* 2004; 14:231-243.
21. Liston P, Young SS, Mackenzie AE, Korneluk RG. Life and death decisions: the role of the IAPs in modulating programmed cell death. *Apoptosis* 1997; 2:423-441.
22. 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.
23. Arnt CR, Chiorean MV, Heldebrant MP, Gores GJ, Kaufmann SH. Synthetic Smac/DIABLO peptides enhance the effects of chemotherapeutic agents by binding XIAP and cIAP1 in situ. *J Biol Chem* 2002; 277:44236-44243.
24. 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.
25. 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.

26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. Dai D, Moulton BC, Ogle TF. Regression of the decidualized mesometrium and decidual cell apoptosis are associated with a shift in expression of Bcl2 family members. *Biol Reprod* 2000; 63:188-195.
30. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998; 281:1322-1326.
31. Dalton S, Hopwood B. Characterization of Cdc47p-minichromosome maintenance complexes in *Saccharomyces cerevisiae*: identification of Cdc45p as a subunit. *Mol Cell Biol* 1997; 17:5867-5875.
32. Kennedy TG, Ross HE. Effect of prostaglandin E2 on rate of decidualization in rats. *Prostaglandins* 1993; 46:243-250.
33. Dai D, Ogle TF. Progesterone regulation of epidermal growth factor receptor in rat decidua basalis during pregnancy. *Biol Reprod* 1999; 61:326-332.
34. Ogle TF, George P. Regulation of the estrogen receptor in the decidua basalis of the pregnant rat. *Biol Reprod* 1995; 53:65-77.
35. Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem* 1994; 269:5241-5248.
36. Abrahamsohn PA, Zorn TM. Implantation and decidualization in rodents. *J Exp Zool* 1993; 266:603-628.
37. Kennedy TG. Embryonic signals and the initiation of blastocyst implantation. *Aust J Biol Sci* 1983; 36:531-543.
38. Fazleabas AT, Strakova Z. Endometrial function: cell specific changes in the uterine environment. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 186:143-147.
39. Joswig A, Gabriel HD, Kibschull M, Winterhager E. Apoptosis in uterine epithelium and decidua in response to implantation: evidence for two different pathways. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1:44.

40. Pampfer S, Donnay I. Apoptosis at the time of embryo implantation in mouse and rat. *Cell Death Differ* 1999; 6:533-545.
41. 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.
42. St Germain ME, Gagnon V, Parent S, Asselin E. Regulation of COX-2 protein expression by Akt in endometrial cancer cells is mediated through NF-kappaB/IkappaB pathway. *Mol Cancer* 2004; 3:7.
43. 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.
44. Lu QL, Poulson R, Wong L, Hanby AM. Bcl-2 expression in adult and embryonic non-haematopoietic tissues. *J Pathol* 1993; 169:431-437.
45. Akcali KC, Khan SA, Moulton BC. Effect of decidualization on the expression of bax and bcl-2 in the rat uterine endometrium. *Endocrinology* 1996; 137:3123-3131.
46. Andjelkovic M, Alessi DR, Meier R, Fernandez A, Lamb NJ, Frech M, Cron P, Cohen P, Lucocq JM, Hemmings BA. Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J Biol Chem* 1997; 272:31515-31524.
47. Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, Ruland J, Penninger JM, Siderovski DP, Mak TW. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* 1998; 95:29-39.
48. Iijima M, Devreotes P. Tumor suppressor PTEN mediates sensing of chemoattractant gradients. *Cell* 2002; 109:599-610.
49. Maehama T, Dixon JE. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* 1998; 273:13375-13378.
50. Mutter GL, Lin MC, Fitzgerald JT, Kum JB, Eng C. Changes in endometrial PTEN expression throughout the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:2334-2338.

## FIGURE LEGEND

Figure 1 : Immunohistochemistry of CDC47/MCM7 proliferation marker in rat endometrium during pregnancy. Graphics represent epithelial and stromal CDC47/MCM7 positive cells throughout pregnancy. Data represent the mean  $\pm$  SEM of six independent experiments.

Figure 2 : Akt and phospho-Akt expression in rat endometrium during rat pregnancy. Total endometrial proteins were collected at different days of pregnancy.  $\beta$ -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.

Figure 3 : Bcl-2 and PTEN expression in rat endometrium during rat pregnancy. Total endometrial proteins were collected at different days of pregnancy.  $\beta$ -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.

Figure 4 : XIAP and CDC47/MCM7 expression in rat endometrium during rat pregnancy. Total endometrial proteins were collected at different days of pregnancy.  $\beta$ -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.

Figure 5: Effect of PI 3-K inhibitor (LY294002) on Akt, phospho-Akt and XIAP expression in rat decidual cells.  $\beta$ -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 ( $p < 0.05$ ).



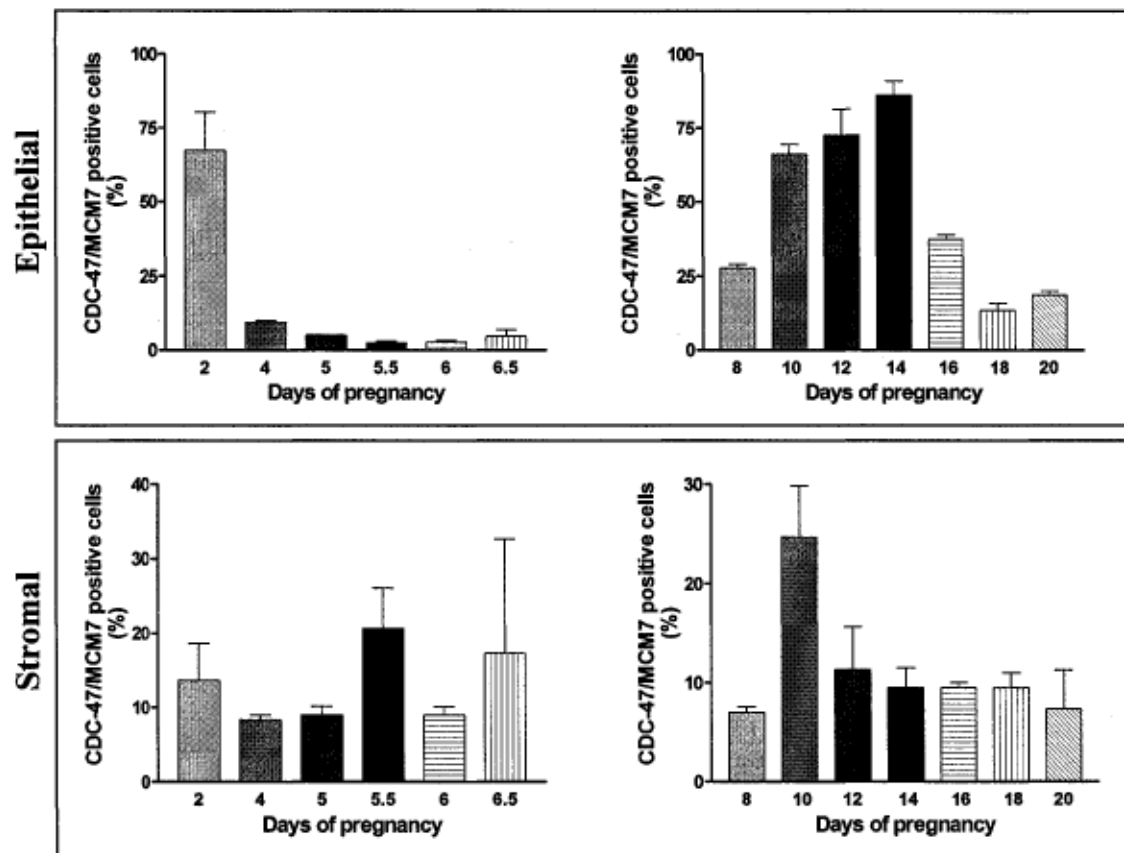


Figure 1

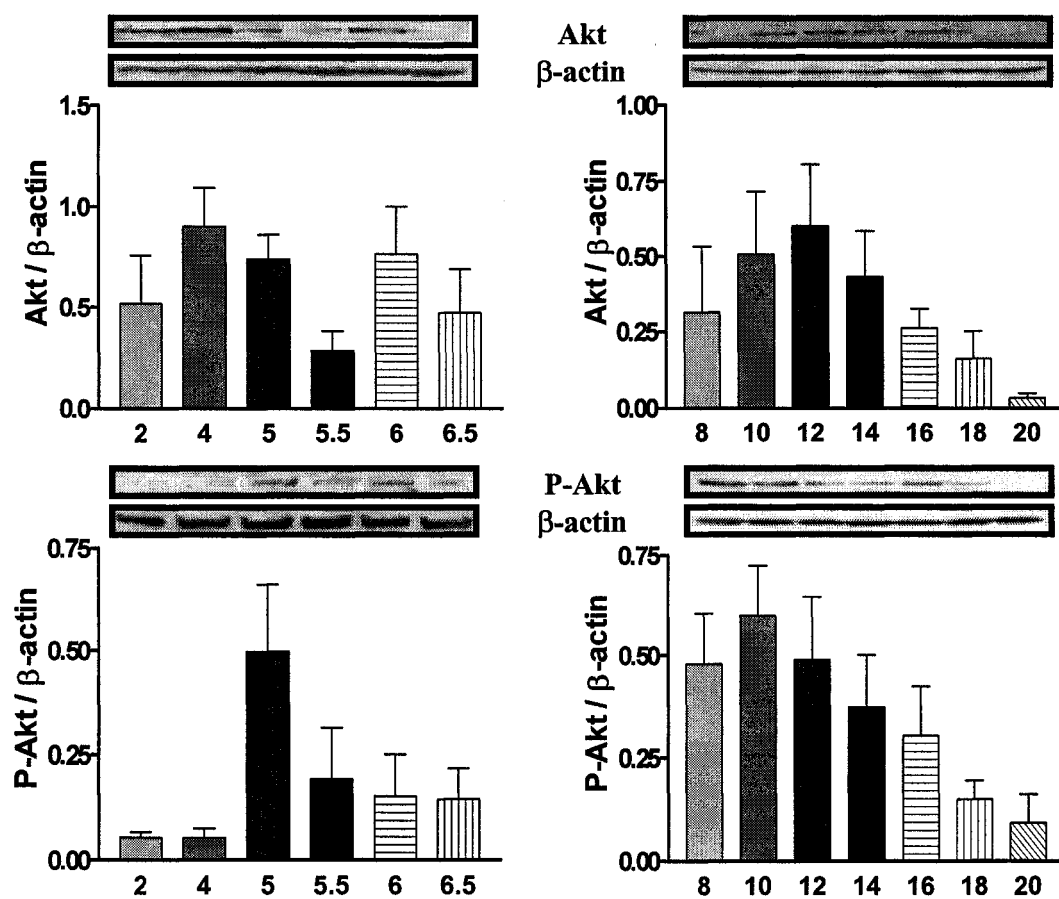


Figure 2

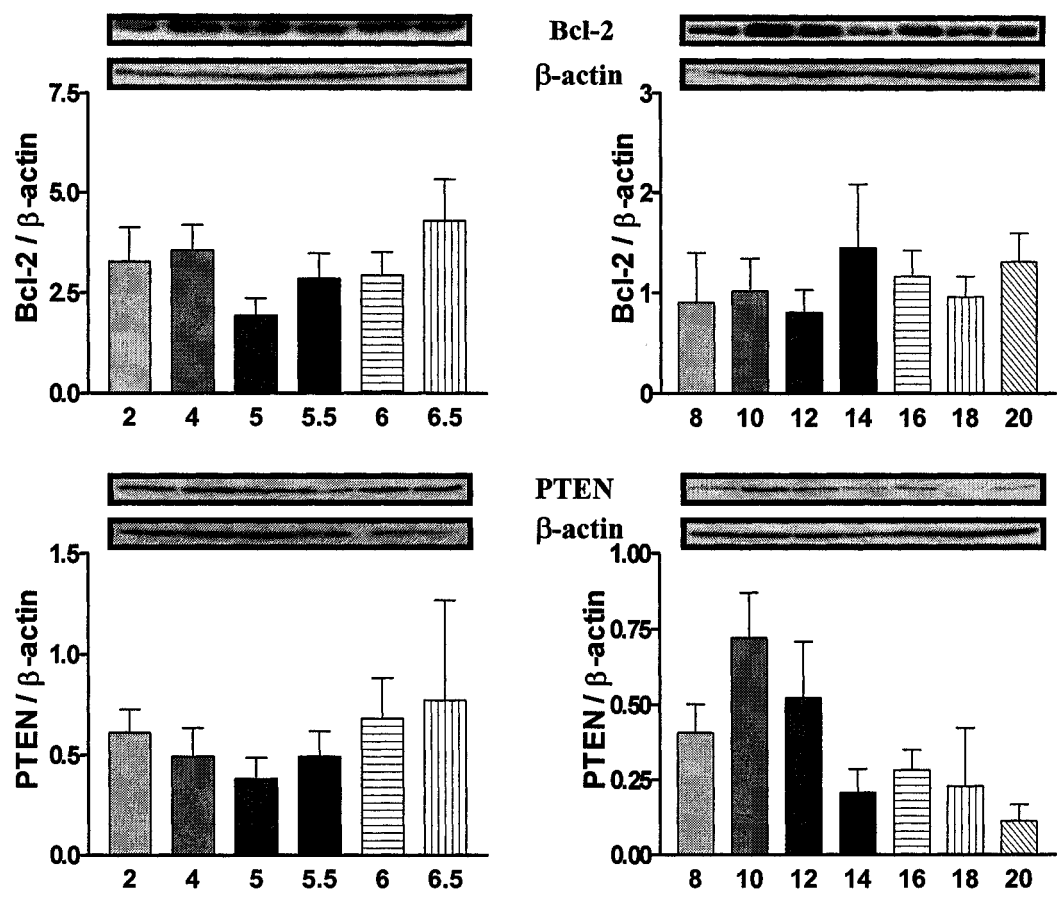


Figure 3

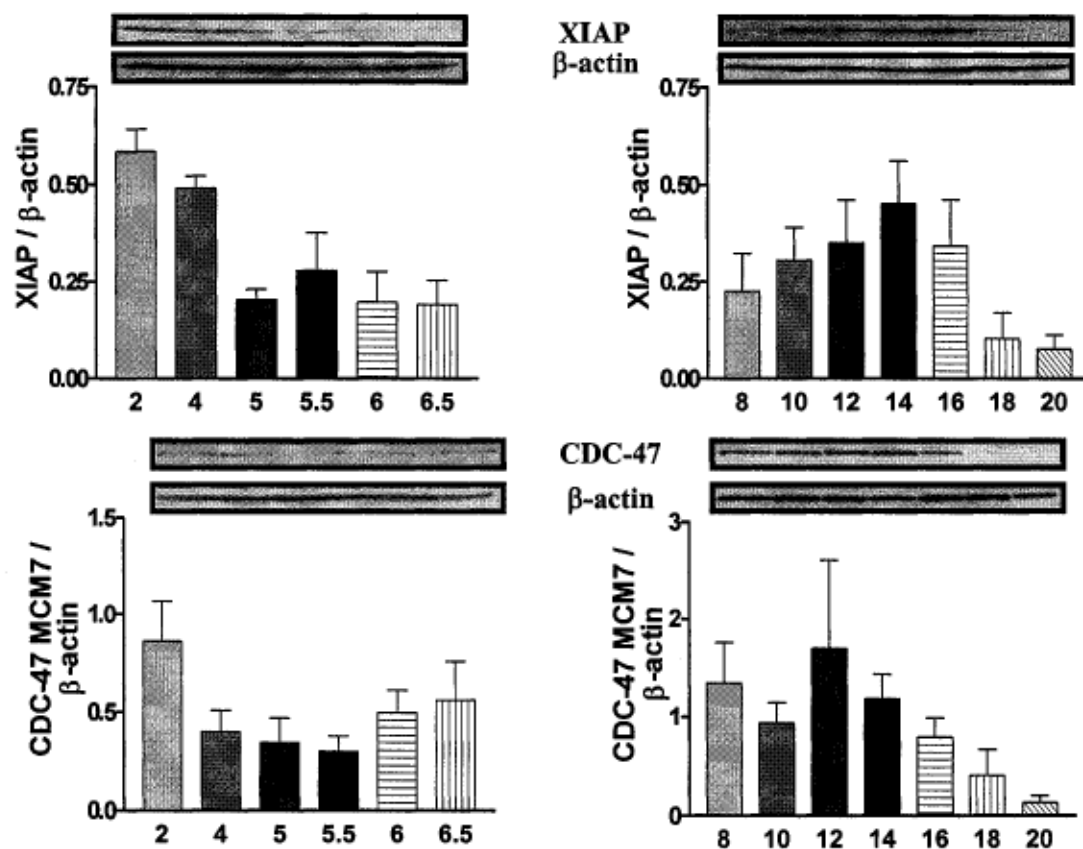


Figure 4

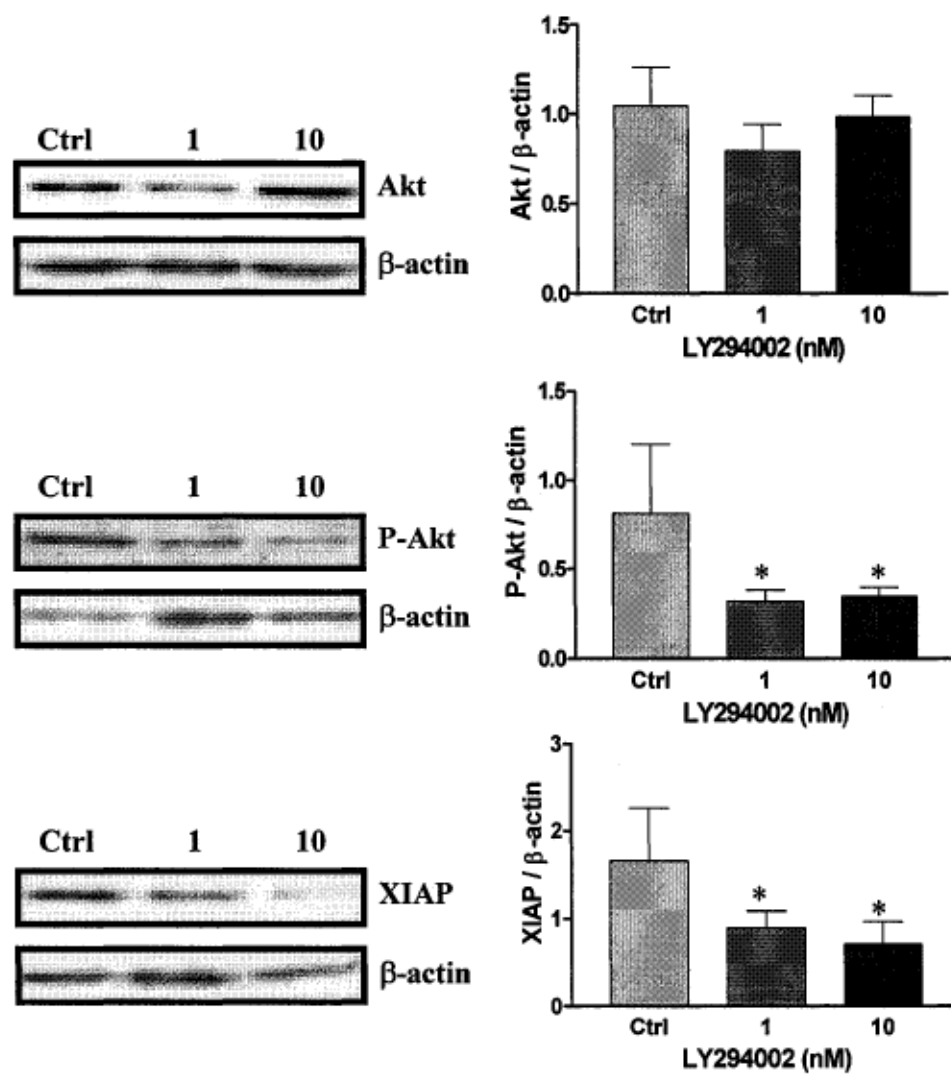


Figure 5

## **Chapitre IV**

### **Discussion et perspectives d'avenir**

## 4.1 Discussion

Les recherches faites au cours de cette étude se divisent en deux grandes étapes qui ont toutes deux comme objectif principal l'étude de l'apoptose dans l'utérus de rat durant la gestation. Premièrement, la caractérisation de la voie de survie phosphatidylinositol-3 kinase/Akt au niveau de l'endomètre et particulièrement durant les phases d'implantation et de régression décidual; en second lieu, la caractérisation de la voie de signalisation du TGF- $\beta$  et de ses isoformes de même que leurs interactions avec la voie de survie phosphatidylinositol-3 kinase/Akt durant ces mêmes phases.

L'objectif de la première partie de la recherche était de caractériser la voie de survie phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pendant les phénomènes apoptotiques durant la gestation chez le rat; beaucoup de travaux ont déjà été faits sur l'implantation et la décidualisation chez le rat et la souris (Abrahamson et al. 1993) de même que sur le phénomène de mort cellulaire programmée pendant ces deux étapes critiques lors du développement de l'embryon (Pampfer et al. 1999; Joswig et al. 2003; Arici et al. 2000; Gupta et al. 1998). Des expérimentations ont aussi été menées dans notre laboratoire pour confirmer les phases apoptotiques durant l'implantation et la régression décidual soit par immunohistochimie, immunofluorescence, immunobuvardage, ainsi que par les techniques de marquage Hoechst et TUNEL, deux techniques de marquage direct des cellules en apoptose. Le marqueur de prolifération CDC47/MCM7 a été utilisé pour la technique d'immunohistochimie et d'immunobuvardage et l'anticorps anti-caspase 3 pour l'immunofluorescence. Ces résultats confirment la mort cellulaire durant l'implantation et la régression décidual durant la gestation.

L'expression du marqueur de prolifération est faible au moment de l'implantation et de la régression décidual à l'inverse de la caspase-3, qui de façon générale confirme la mort cellulaire, fortement exprimée à ces mêmes moments. La présence de la forme active de la caspase-3 est importante pour induire le clivage de plusieurs protéines de survie et pour stimuler l'apoptose durant la régression décidual. Cependant, l'activation de la caspase-3 était un peu plus faible au moment de l'implantation embryonnaire; ce phénomène peut être expliqué puisque peu de cellules entrent en apoptose en la présence

d'un embryon au moment de l'implantation. TUNEL, un marqueur direct de l'apoptose, démontre une coloration très intense lors de la régression déciduale de même qu'avec la technique Hoechst. TUNEL est une technique couramment utilisée pour mesurer l'apoptose : durant le processus apoptotique, le clivage de l'ADN génomique de la cellule produit une multitude de fragments d'ADN (Negoescu et al. 1998); ces fragments peuvent être identifiés à l'aide d'enzymes et d'oligonucléotides marqués. Ce marquage est ensuite révélé à l'aide d'une peroxydase et il en résulte une coloration brune. La coloration au Hoechst est aussi un marqueur de l'ADN que la cellule soit vivante ou non; l'identification par microscopie à fluorescence se fait par l'observation de corps apoptotiques caractéristiques de l'apoptose.

Les résultats obtenus avec la protéine P-Akt nous démontrent que la forme active de Akt est effectivement une protéine clé dans le processus de survie cellulaire dans l'endomètre de rat durant la gestation; les résultats obtenus démontrent que son activité correspond précisément à l'opposé de celle de caspase 3 (durant le jour 2, le jour 4 et aussi durant l'implantation et la régression déciduale). En effet, l'activité de la caspase-3 diminue de façon importante durant l'implantation et la régression jusqu'à la parturition. Des expériences menées dans notre laboratoire montrent que l'augmentation de l'expression et de l'activité de Akt en réponse au  $17\beta$ -estradiol dans le cycle oestral du rat pourrait être un mécanisme de protection contre l'apoptose pour les cellules endométriales et induirait une prolifération cellulaire. D'un autre côté, l'inhibition de l'activité de Akt conduirait à l'activation de la caspase-3 et à la mort cellulaire (Déry et al. 2003). Ce processus pourrait aussi être impliqué dans l'utérus de rat gestant. Des traitements *in vitro*, réalisés au cours de cette étude, avec LY294002, un inhibiteur de la voie de survie phosphatidylinositol-3 kinase/Akt, démontrent clairement son action sur la voie de survie. En effet, une faible dose de LY294002 amène automatiquement une diminution de l'expression de P-Akt et XIAP; ceci confirme que P-Akt et XIAP sont des protéines importantes de cette voie de survie. Il ne faut cependant pas perdre de vue que la présence de caspase-3 active n'indique pas nécessairement un déclenchement de l'apoptose puisque des inhibiteurs de caspases peuvent être présents dans le cytoplasme et bloquer leur activité.



Un exemple de ces inhibiteurs de caspases est la protéine XIAP. Nous avons pu observer que l'expression de XIAP, une protéine faisant partie d'une famille de molécules anti-apoptotiques, était fortement exprimée durant les principales phases de l'apoptose (principalement durant la régression déciduale). Évidemment, sa capacité à inhiber les caspases et son pouvoir anti-apoptotique nous amenaient à penser que son niveau d'expression serait très bas durant le processus de mort cellulaire. Ce phénomène peut être expliqué de la façon suivante : des études démontrent que Smac/DIABLO, un inhibiteur connu de XIAP, est faiblement exprimé durant les phases apoptotiques du cycle oestral chez le rat (Leblanc et al. 2003) et de ce fait ne peut pas inhiber XIAP. Il est possible que le même processus se produise chez le rat gestant durant les phases apoptotiques. D'autre part, si nous nous référons aux travaux menés durant cette étude, nous pouvons observer que l'expression de XIAP est pratiquement la même que caspase-3 et ce tout au long de la période de gestation, ce qui nous amène à penser que la surexpression de XIAP à ces moments précis où le processus apoptotique est à son plus fort est nécessaire pour contrôler la mort cellulaire.

Des études démontrent aussi le fait que XIAP n'est pas clivé par les caspases durant l'apoptose induite par TGF- $\beta$ 1 dans les hépatocytes de rats foetaux (Herrera et al. 2002). Il a été démontré durant ce projet que TGF- $\beta$ 1 est présent en grande concentration au moment de l'implantation et de la régression déciduale. Même si XIAP se retrouvait clivée par les caspases durant les phases de mort cellulaire (Asselin et al. 2001), elle serait en mesure d'inhiber les caspases via les domaines BIR encore actifs sur ses deux fragments restants (Deveraux et al. 1999). Il faut aussi prendre en considération que dans les études *in vivo*, il y a beaucoup de facteurs qui influencent l'expression des protéines dont celui des hormones stéroïdes. Il a été démontré que les estrogènes augmentent considérablement l'expression de XIAP (Leblanc et al. 2003) puisque ces molécules sont en mesure d'augmenter la prolifération cellulaire dans l'endomètre et par le fait même, sont des molécules anti-apoptotiques (Dery et al. 2003). Les niveaux d'estrogènes augmentent tout au long de la gestation chez la plupart des mammifères (Maestriperi et al. 1998); ceci expliquerait peut-être la forte augmentation de XIAP pendant la régression déciduale.

Un autre facteur important à prendre en considération au niveau de l'expression de la protéine XIAP est le facteur de transcription nucléaire NF- $\kappa$ B. Le spectre d'action de cette enzyme est très large et joue un rôle important dont la réponse immunitaire, la réponse inflammatoire, la prolifération cellulaire et l'apoptose (Jono et al. 2004). Cette enzyme se retrouve sous forme inactive dans le cytosol et est associée à la protéine inhibitrice I $\kappa$ B qui, lorsque phosphorylée, perd son potentiel inhibiteur et permet la translocation de NF $\kappa$ B jusqu'au noyau cellulaire permettant ainsi la transcription et l'expression des IAPs, les protéines inhibitrices de l'apoptose. L'étude de la régulation de cette enzyme lors de la gestation chez le rat pourrait fournir de précieuses informations sur la régulation de XIAP durant les périodes cruciales de mort cellulaire qui surviennent durant l'implantation embryonnaire et la régression déciduale.

Des études menées dans notre laboratoire démontrent qu'il y a un effet important de la protéine Akt sur la voie de signalisation de NF $\kappa$ B dans les cellules cancéreuses humaines possédant la protéine PTEN mutée. Nos résultats démontrent qu'une expression constitutive de Akt mène à l'induction de la phosphorylation de I $\kappa$ B et à l'expression des cyclooxygénase-2. La COX-2 est une enzyme possédant des propriétés anti-inflammatoires et étant reconnue pour être fortement exprimée dans les tumeurs endométriales primaires (St-Germain et al. 2004). Ces résultats montrent que Akt pourrait être en mesure de permettre la translocation de NF $\kappa$ B jusque dans le noyau cellulaire et ainsi favoriser l'expression des IAPs dont XIAP. Cet effet aurait pour résultante la promotion de la survie cellulaire et démontre l'interaction des deux voies de signalisation.

La découverte de la présence de Bcl-2 dans certains tissus soumis à l'action des hormones stéroïdes, tel l'endomètre et le myomètre, suggère que l'expression du gène Bcl-2 pourrait être reliée à un processus apoptotique hormone-dépendant (Lu et al. 1993). Une étude utilisant des rats ovariectomisés pseudogestants traités avec du 17 $\beta$ -estradiol et de la progestine démontrent que l'expression de Bcl-2 diminue après les traitements hormonaux (Akcali et al. 1996). Des études suggèrent que TGF- $\beta$ 1 est en mesure d'augmenter la quantité de protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 dans les cellules stromales (Chatzaki et al. 2003). D'autres travaux démontrent que la protéine Bax (une protéine pro-

apoptotique de la famille Bcl-2) peut former des hétérodimères avec Bcl-2 pour favoriser des réponse pro-apoptotiques ou anti-apoptotiques (Adams et al. 1998). Les résultats de cette étude démontrent que l'expression de Bcl-2 n'est pratiquement pas influencée par la gestation et ne supporte pas l'hypothèse que Bcl-2 soit une protéine anti-apoptotique régulée par les hormones stéroïdes. Bcl-2 peut être importante dans le contrôle de la survie cellulaire mais sa régulation négative n'affecte en rien le contrôle de l'apoptose dans l'utérus de rat durant la gestation.

PTEN, un facteur suppresseur de tumeur bien connu, est particulièrement exprimé pendant l'implantation et très peu durant le processus de régression déciduale. Nous croyons que son rôle est plus spécifique dans les cellules épithéliales de l'utérus de rat. Comme l'expression de la protéine PTEN est constante durant la première étape de la gestation, nous proposons que PTEN est exprimée de façon constitutive. Dans l'endomètre humain, la protéine PTEN s'est avérée régulée par la progestérone (Mutter et al. 2000). Toutefois, l'expression de PTEN est augmentée juste avant le régression déciduale, suggérant que cette protéine pourrait être importante au niveau de l'initiation de la régression déciduale.

Les objectifs de la deuxième partie de l'étude étaient premièrement de caractériser la voie de signalisation de TGF- $\beta$  et de ses isoformes ( $\beta$ 1,  $\beta$ 2 et  $\beta$ 3) et ensuite de déterminer ses effets sur la voie de survie phosphatidylinositol-3 kinase/Akt. Les isoformes du Transforming Growth Factor- $\beta$  sont connus comme étant régulés et exprimés de différentes façons et ce, dans plusieurs types de tissus comme l'utérus de bovin (Doré et al. 1996), le carcinome du colon humain (Bellone et al. 2001), la jonction cellulaire embryo-maternelle chez le porc (Gupta et al. 1998). Ils sont aussi reconnus comme facteurs pro-apoptotiques dans divers types de cellules incluant les hépatocytes de rats foetaux (Herrera et al. 2002). Plusieurs études ont démontré les capacités d'induction de l'apoptose par TGF- $\beta$  dans différents types de cellules et différents types de systèmes : digestif, reproducteur et nerveux (Schuster et al. 2002; Moulton 1994).

En accord avec d'autres travaux effectués sur les isoformes de TGF- $\beta$  (Perry et al. 1997; Das et al. 1992; Godkin et al. 1998), nos travaux démontrent que ces trois isoformes sont effectivement exprimées et régulées de différentes façons dans l'utérus de rat gestant. TGF- $\beta$ 1 était déjà reconnu pour induire l'apoptose dans les cellules stromales endométriales humaines (Chatzaki et al. 2003). Dans l'utérus de rat, TGF- $\beta$ 1 et TGF- $\beta$ 2 sont présent tout au long de la gestation et sont fortement exprimés pendant les phases apoptotiques. D'un autre côté, l'expression de TGF- $\beta$ 3 est quand à elle indétectable avec les techniques d'immunobuvardage et d'immunohistochimie utilisées durant les premières étapes de la gestation; Ces résultats suggèrent que TGF- $\beta$ 3 ne serait pas nécessaire durant la phase de l'implantation de l'embryon. Ces résultats supportent une étude menée par un autre laboratoire (Das et al. 1992) démontrant que l'ARNm de TGF- $\beta$ 3 est absent durant la première étape de la gestation. Quoi qu'il en soit, les concentrations des trois isoformes de TGF- $\beta$  sont très importantes durant la régression déciduale (jour 14) et l'implantation (TGF- $\beta$ 1 et TGF- $\beta$ 2, jour 5.5). Ces résultats suggèrent une importante fonction au TGF- $\beta$  durant l'apoptose chez le rat gestant.

Ces trois isoformes sont aussi exprimés de façon différente dans les cellules d'un même tissu; des similarités ont été observées dans les cellule épithéliales prostatiques humaines (Perry et al. 1997); chez le rat, il s'est avéré que les isoformes  $\beta$ 1 et  $\beta$ 2 était plus exprimées dans les cellules épithéliales que dans les cellules stromales durant la dernière phase de la gestation. L'immunobuvardage de même que l'immunohistochimie montrent que l'expression de TGF- $\beta$ 1 est très forte dans les cellules stromales déciduales durant la régression de la décidue; de plus des traitements *in vitro* sur les cellules stromales déciduales avec TGF- $\beta$ 1 induisent l'apoptose de façon dose-dépendante, résultats qui ont été confirmés avec les marqueurs de type TUNEL, Hoechst et Trypan Blue. La forte expression de TGF- $\beta$ 1 durant la première étape de la gestation (jour 5.5 à 6.5) peut être expliquée du fait que cette isoforme est nécessaire pour l'invasion du trophoblaste pendant l'implantation embryonnaire chez l'humain (Slater et al. 2000; Ingman et al. 2002). Un processus similaire pourrait être impliqué dans l'implantation embryonnaire chez le rat. Il faut cependant spécifier qu'une étude démontre le fait que chez l'humain, une surexpression

de TGF- $\beta$ 1 lors de l'implantation peut inhiber l'invasion du trophoblaste et ainsi provoquer des problèmes liés à l'implantation (Graham et al. 1991).

D'un autre côté, il est nécessaire de spécifier que le prélèvement des tissus pour la coupe destinée à l'immunohistochimie (durant la phase précoce de la gestation) comportait du tissu embryonnaire tandis que les cellules prélevées pour l'immunobuvardage n'en contenait pratiquement pas. En effet, les embryons ne peuvent être délogés de l'utérus durant les premiers jours de la gestation sans que celui-ci ne subisse des dommages (on doit donc les utiliser entièrement pour la coupe des tissus et on se retrouve avec du tissu utérin et embryonnaire dans les préparations). Toutefois, les cellules peuvent être prélevées entrent les embryons pour les technique d'immunobuvardage. Comme l'embryon sécrète aussi du TGF- $\beta$ , nous croyons que cela peut expliquer les différences de concentration entre les deux techniques durant la phase précoce de la gestation.

Pour être en mesure de comprendre les mécanismes d'action de TGF- $\beta$ , des expériences ont été faites pour vérifier les mécanismes intracellulaires impliqués dans la voie de signalisation de TGF- $\beta$ . Des travaux ont déjà été publiés par d'autres laboratoires sur les récepteurs cellulaires de TGF- $\beta$  (Lutz et al. 2002; Rich et al. 2001) et sur les protéines Smads responsables de la transduction intracellulaire des signaux (Ingman et al. 2002; Javelaud et al. 2004; Akhurst et al. 2001). Nos résultats démontrent une corrélation entre la concentration de TGF- $\beta$  et celle de P-Smad2. P-Smad2 est responsable (avec co-Smad soit Smad4) de la translocation des signaux jusqu'au noyau pour l'activation de gènes cibles. Comme décrit précédemment, le récepteur de type I de TGF- $\beta$  phosphoryle les R-Smads, soit Smad2 ou Smad3; lorsque phosphorylés, les R-Smads correspondent à P-Smad2(3), c'est-à-dire la forme active des R-Smads qui forment un hétérodimère avec Smad4 pour rejoindre le noyau. La concentration de P-Smad correspond à une activation en réponse à une stimulation par TGF- $\beta$ . Les résultats obtenus démontrent que la concentration de Smad2 (non-phosphorylé) est relativement faible mais progresse en augmentant durant la régression déciduale; la concentration est cependant très forte pendant les premières étapes de la gestation. La concentration de la forme active de Smad2 est très forte durant la régression déciduale et augmente considérablement durant la phase liée à

l'implantation embryonnaire. Ces résultats correspondent aux étapes où l'on retrouve la présence des isoformes de TGF- $\beta$ . Ces résultats suggèrent que les isoformes de TGF- $\beta$  présentes durant ces étapes cruciales de la gestation pourraient agir via la voie de signalisation des protéines Smads pour induire l'apoptose. Des études récentes supportent ces résultats et démontrent que la forte expression de Smad2 en début de gestation serait probablement due à l'invasion du trophoblaste, ce qui entraînerait la formation de la première zone de décidualisation (Lin et al. 2004). On peut toutefois observer que l'augmentation de l'expression de P-Smad2 n'est pas aussi forte durant la première étape de la gestation par rapport à la période tardive de gestation; il est en effet possible que la faible augmentation de l'expression de P-Smad2 induite par TGF- $\beta$  durant cette étape soit due à la petite quantité de cellules qui entrent en apoptose durant l'implantation.

Pour compléter la deuxième partie de ce projet, il fallait mettre en lumière l'interaction des deux voies de signalisation et plus précisément de l'effet du TGF- $\beta$  sur la voie de survie phosphatidylinositol-3 kinase/Akt. Il a récemment été démontré que la phosphorylation de Akt pouvait être directement induite par 17 $\beta$ -estradiol dans des utérus de rats ovariectomisés indiquant ainsi l'importance des stéroïdes sexuels sur les cellules endométriales (Déry et al. 2003). Une étude récente démontre que TGF- $\beta$  pourrait bloquer directement l'activité de la protéine Akt via l'activation des protéines Smads (Conery et al. 2004). Pour prouver cette hypothèse, des cellules stromales déciduales ont été traitées avec différentes doses de TGF- $\beta$ 1 pour déterminer si l'activation des Smads pourrait en retour bloquer la voie de survie Akt et induire l'apoptose. TGF- $\beta$ 1 a induit la phosphorylation de Smad2 dans les cellules déciduales *in vitro* ainsi que l'apoptose d'une manière dose-dépendante accompagnée d'une réduction de la prolifération cellulaire. Ces expériences confirment le rôle de TGF- $\beta$  comme étant un facteur apoptotique dans les cellules déciduales chez le rat. En réponse à TGF- $\beta$ 1, la phosphorylation de Akt a diminué de façon significative indiquant ainsi que l'inhibition de l'activité de Akt pourrait être un mécanisme important quant à la capacité au TGF- $\beta$  d'induire l'apoptose. Ces résultats supportent l'hypothèse selon laquelle le TGF- $\beta$  agit via la voie de signalisation des Smads non seulement au niveau transcriptionnel en induisant la production de facteurs apoptotiques

dans les cellules déciduales mais aussi au niveau protéique en bloquant l'activation de facteurs de survie.

Il a été démontré récemment que la phosphorylation de la protéine Akt serait régulée par XIAP dans les cellules épithéliales ovariennes humaines et dans les cellules de la granulosa chez le rat (Asselin et al. 2001). Nos résultats démontrent un lien direct entre l'expression de TGF- $\beta$  et la protéine XIAP. Premièrement, TGF- $\beta$ 1 inhibe directement XIAP *in vitro* de façon dose-dépendante. Deuxièmement, l'immunobuvardage avec XIAP montre une grande concentration de protéines durant la régression déciduale lorsque le processus apoptotique atteint son plus haut niveau ; on peut observer le même phénomène avec TGF- $\beta$  : des études récentes montrent que dans certains cas, XIAP peut agir à titre de cofacteur dans la voie de signalisation induite par TGF- $\beta$  et de façon indépendante à Smad4 (Birkey et al. 2004; Herrera et al. 2002). TGF- $\beta$  semble aussi inhiber directement P-Akt, la protéine responsable de la cascade cellulaire menant à la survie cellulaire, d'une manière dose-dépendante. En effet, à mesure que la concentration de TGF- $\beta$  lors des traitements des cellules déciduales augmente, le processus apoptotique augmente et la phosphorylation de Akt diminue. On observe des similarités *in vivo* au niveau de l'implantation embryonnaire (jour 5.5 à 6.5) et de la régression déciduale (jour 14). Les techniques d'immunobuvardage démontrent aussi que durant la gestation, l'activité *in vivo* de P-Akt est très faible lorsque la concentration de TGF- $\beta$  atteint un très haut niveau. Ces expériences démontrent l'effet de TGF- $\beta$  sur la voie de survie phosphatidylinositol-3 kinase/Akt et l'importance des deux voies dans le processus apoptotique.

L'hypothèse de ce projet de recherche a été confirmée soit que le Transforming Growth Factor- $\beta$  interfère directement avec la voie de survie Phosphatidylinositol-3 kinase/Akt. Cette allégation est justifiée par les expérimentations *in vitro* qui démontrent clairement cet effet et ce, de façon sélective, c'est à dire sans tous les facteurs impondérables se retrouvant *in vivo* tels que les hormones stéroïdes et autres voies de signalisation. Les objectifs ont été atteints soient la caractérisation de façon générale (avec certaines protéines cibles) des deux voies de signalisation de même que l'interaction de ces deux voies. Il est à noter que beaucoup de travaux restent à faire étant donné la quantité

phénoménale d'interactions et le nombre de protéines impliquées dans ces deux voies. Nous avons ainsi démontré pour la première fois les effets de TGF- $\beta$ 1 sur la voie de survie phosphatidylinositol-3 kinase/Akt dans les processus apoptotiques lors de la gestation chez le rat.

## 4.2 Perspectives d'avenir

Pour ce qui est de la caractérisation de la voie de survie phosphatidylinositol-3 kinase/Akt, d'autres analyses s'avèreront nécessaires pour déterminer l'interaction de chacune des protéines de la voie de signalisation avec les autres. Par exemple l'effet de la protéine Akt sur NF $\kappa$ B durant la gestation qui en retour détermine une action transcriptionnelle au niveau du noyau nucléaire sur les gènes de la famille IAP. Aussi, l'action de Bcl-2 sur Smac/DIABLO qui agit à titre d'inhibiteur de XIAP, les effets de XIAP sur les caspases et celui des caspases sur Akt. Il sera intéressant de vérifier l'importance des différentes isoformes de Akt telles Akt1, Akt2 et Akt3 car il est connu que les trois isoformes sont régulées et exprimées de façon différentes (Dufour et al. 2004) au même titre que TGF- $\beta$ . Des techniques d'immunohistochimie seront aussi nécessaires pour vérifier la prédominance de l'expression des protéines de la voie de survie phosphatidylinositol-3 kinase/Akt dans les cellules épithéliales ou stromales dans l'utérus du rat au cours de la gestation. Des analyses sont présentement en cours dans notre laboratoire en utilisant des cultures cellulaires de cellules épithéliales et stromales pour étudier ces phénomènes.

Pour ce qui est de la voie de signalisation de TGF- $\beta$ , il est clair qu'elle influence directement la voie de survie cellulaire phosphatidylinositol-3 kinase/Akt. D'autres expériences seront utiles pour mieux comprendre ces interactions. La présente étude démontre clairement les différences au niveau de la régulation et l'expression des trois isoformes de TGF- $\beta$  dans l'utérus du rat gestant de même que son effet direct sur P-Akt et Xiap, deux protéines clés dans le processus de survie cellulaire. Des analyses ultérieures seront requises afin de compléter cette étude en faisant des traitements *in vitro* avec TGF- $\beta$ 2 et TGF- $\beta$ 3 et voir leurs effets sur la voie de survie. De plus, des expériences d'analyses



de l'expression des gènes avec RT-PCR s'avèreront nécessaires afin de mieux comprendre la régulation de ces gènes sur les voies de signalisation PI3K/Akt et TGF- $\beta$ .

Dans un proche avenir, les résultats de ces travaux pourront être mis à projet dans les cas d'infertilité féminine et plus particulièrement au niveau des problèmes liés à l'implantation embryonnaire; peut-être les problèmes de communication entre l'embryon et la paroi utérine sont en partie causés par un dysfonctionnement du processus apoptotique permettant ainsi la nidation du blastocyste. En accord avec les recherches menées durant ce projet, la surexpression d'une protéine pro-apoptotique (en l'occurrence TGF- $\beta$ ) ou l'inhibition d'une protéine de survie importante (P-Akt ou XIAP) déclencherait le processus apoptotique au niveau de l'endomètre utérin au moment de l'implantation embryonnaire permettant ainsi l'invasion du trophoblaste et le développement ultérieur de l'embryon. D'autres recherches devront évidemment avoir lieu afin de déterminer avec exactitude l'importance et la pertinence de chacune des protéines impliquées dans les voies de signalisation et leur interactions respectives; à ce moment seulement serons nous en mesure de mettre au point une approche thérapeutique. De façon générale, la recherche sur les mécanismes intracellulaires de l'apoptose lors de l'implantation chez les espèces à placentation hémochoriale ne peut que nous amener dans la bonne direction vers la résolution d'un problème qui touche un grand nombre de femmes en Amérique du nord de même que dans le monde entier.

## RÉFÉRENCES

- Abrahamsohn P.A. & Zorn T.M. Implantation and decidualization in rodents. *J. Exp. Zool.* 266, 603-628 (1993).
- Adams J.M. & Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281, 1322-1326 (1998).
- Akali KC, Khan SA, Moulton BC. Effect of decidualization on the expression of bax and bcl-2 in the rat uterine endometrium. *Endocrinology* 137, 3123-3131 (1996).
- Akhurst RJ, Derynck R. TGF-beta signaling in cancer--a double-edged sword. *Trends Cell Biol.* 11, 44-51 (2001).
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J.D. Molecular biology of the cell. Garland Publishing Inc. 1294 pp. (1994).
- Ali IU. Gatekeeper for Endometrium: the PTEN Tumor Suppressor Gene. *Journal of the National Cancer Institute* 92, 861-863 (2000).
- 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.* 73, 1006-1011 (2000).
- Arnt C.R., Chiorean M.V., Heldebrant M.P., Gores G.J. & Kaufmann S.H. Synthetic Smac/DIABLO peptides enhance the effects of chemotherapeutic agents by binding XIAP and cIAP1 in situ. *J. Biol. Chem.* 277, 44236-44243 (2002).
- 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* 142, 2451-2457 (2001).
- Asselin E., Mills G.B. & Tsang B.K. XIAP regulates Akt activity and Caspase-3-dependent cleavage during cisplatin-induced apoptosis in human ovarian epithelial cancer cells. *Cancer Res.* 61, 1862-1868 (2001).
- Attisano L, Wrana JL, Lopez-Casillas F, Massague J. TGF-beta receptors and actions. *Biochim Biophys Acta.* 1222, 71-80 (1994).
- Barkai U. & Kraicer P.F. Intrauterine signaling and embryonic implantation. *Biol. Signals.* 5, 111-121 (1996).
- Bast, Kufe, Pollock, Weichselbaum, Holland, Frei. Cancer Edition Fifth Edition (2000).

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*. 37, 224-33 (2001).

Beneke R, Geisen C, Zevnik B, Bauch T, Muller WU, Kupper JH, Moroy T. DNA excision repair and DNA damage-induced apoptosis are linked to Poly(ADP-ribosyl)ation but have different requirements for p53. *Mol Cell Biol*. 20, 6695-703 (2000).

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*. 276, 26542-9 (2001).

Birnbaum MJ, Clem RJ, Miller LK. An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs. *J Virol*. 68, 2521-8 (1994).

Blanchard H, Kodandapani L, Mittl PR, Marco SD, Krebs JF, Wu JC, Tomaselli KJ, Grutter MG. The three-dimensional structure of caspase-8: an initiator enzyme in apoptosis. *Structure Fold Des*. 15, 1125-33 (1999).

Boone DL, Tsang BK. Caspase-3 in the rat ovary: localization and possible role in follicular atresia and luteal regression. *Biol Reprod*. 58, 1533-9 (1998).

Bulletti C, Flamigni C, Giacomucci E. Reproductive failure due to spontaneous abortion and recurrent miscarriage. *Hum Reprod Update* 2, 118-136 (1996).

Chandra D, Tang DG. Mitochondrially localized active caspase-9 and caspase-3 result mostly from translocation from the cytosol and partly from caspase-mediated activation in the organelle. Lack of evidence for Apaf-1-mediated procaspase-9 activation in the mitochondria. *J Biol Chem*. 278, 17408-20 (2003).

Chatzaki E, Kouimtoglou 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*. 9, 91-5 (2003).

Chong PA, Ozdamar B, Wrana JL, Forman-Kay JD. Disorder in a target for the Smad2 mad homology 2 domain and its implications for binding and specificity. *J Biol Chem*. (2004).

Cohen G.M. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J*. 326, 1-16 (1997).

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*. 6, 366-372 (2004).

Crook NE, Clem RJ, Miller LK. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol.* 67, 2168-74 (1993).

Crowder R.J. & Freeman R.S. Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt protein kinase are necessary and sufficient for the survival of nerve growth factor-dependent sympathetic neurons. *J. Neurosci.* 18, 2933-2943 (1998).

Dai D., Moulton B.C. & Ogle, T.F. Regression of the decidualized mesometrium and decidual cell apoptosis are associated with a shift in expression of Bcl2 family members. *Biol. Reprod.* 63, 188-195 (2000).

Dalton S. & Hopwood B. Characterization of Cdc47p-minichromosome maintenance complexes in *Saccharomyces cerevisiae*: identification of Cdc45p as a subunit. *Mol. Cell Biol.* 17, 5867-5875 (1997).

D'Amours D., Desnoyers S., D'Silva I. & Poirier G.G. Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem. J.* 342, 249-268 (1999).

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* 130, 3459-66 (1992).

Deckwerth TL, Johnson EM Jr. Temporal analysis of events associated with programmed cell death (apoptosis) of sympathetic neurons deprived of nerve growth factor. *J Cell Biol.* 123, 1207-22 (1993).

Dery M.C., 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.* 1, 47 (2003).

Deveraux QL, Leo E, Stennicke HR, Welsh K, Salvesen GS, Reed JC. Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *EMBO J.* 18, 5242-51 (1999).

Dey S.K. Implantation. *Reproductive Endocrinology, Surgery and Technology.* pp.422-433

Di Meglio S., Tramontano F., Cimmino G., Jones R. & Quesada P. Dual role for poly(ADP-ribose)polymerase-1 and -2 and poly(ADP-ribose)glycohydrolase as DNA-repair and pro-apoptotic factors in rat germinal cells exposed to nitric oxide donors. *Biochim. Biophys. Acta* 1692, 35-44 (2004).

Domagala A, Kasprzak M, Kurpisz M. Immunological characteristics of cervical mucus in infertile women. *Zentralbl Gynakol.* 119, 616-20 (1997).

Dore JJ Jr, Wilkinson JE, Godkin JD. Ovine endometrial expression of transforming growth factor beta isoforms during the peri-implantation period. *Biol Reprod.* 54, 1080-7 (1996).

Duc-Goiran P, Mignot TM, Bourgeois C, Ferre F. Embryo-maternal interactions at the implantation site: a delicate equilibrium. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 183,85-100.

Dufour G, Demers MJ, Gagne D, Dydensborg AB, Teller IC, Bouchard V, Degongre I, Beaulieu JF, Cheng JQ, Fujita N, Tsuruo T, Vallee K, Vachon PH. Human intestinal epithelial cell survival and anoikis: Differentiation state-distinct regulation and roles of protein kinase B/Akt isoforms. *J Biol Chem.* Aug 6 (2004).

Edwards RG. Physiological and molecular aspects of human implantation. *Hum Reprod.* 10, 1-13 (1995).

Ghellal A, Li C, Hayes M, Byrne G, Bundred N, Kumar S. Prognostic significance of TGF beta 1 and TGF beta 3 in human breast carcinoma. *Anticancer Res.* 20, 4413-8 (2000).

Godkin JD, Dore JJ. Transforming growth factor beta and the endometrium. *Rev Reprod.* 3, 1-6 (1998).

Graham CH, Lala PK. Mechanism of control of trophoblast invasion in situ. *J Cell Physiol.* 148, 228-34 (1991).

Granville DJ, Shaw JR, Leong S, Carthy CM, Margaron P, Hunt DW, McManus BM. Release of cytochrome c, Bax migration, Bid cleavage, and activation of caspases 2, 3, 6, 7, 8, and 9 during endothelial cell apoptosis. *Am J Pathol.* 155, 1021-5 (1999).

Grzanka A, Grzanka D, Orlikowska M. Cytoskeletal reorganization during process of apoptosis induced by cytostatic drugs in K-562 and HL-60 leukemia cell lines. *Biochem Pharmacol.* 66, 1611-7 (2003).

Gu Y. *et al.* Apoptosis in decidual tissue regression and reorganization. *Endocrinology* 135, 1272-1279 (1994).

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.* 59, 911-7 (1998).

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.* 520, 93-96 (2002).

Hietanen S, Lain S, Krausz E, Blattner C, Lane DP. Activation of p53 in cervical carcinoma cells by small molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97, 8501-6 (2000).

Hsu YT, Wolter KG, Youle RJ. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94, 3668-72 (1997).

Huang Q, Deveraux QL, Maeda S, Salvesen GS, Stennicke HR, Hammock BD, Reed JC. Evolutionary conservation of apoptosis mechanisms: lepidopteran and baculoviral inhibitor of apoptosis proteins are inhibitors of mammalian caspase-9. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97,1427-32 (2000).

Imamura T, Takase M, Nishihara A, Oeda E, Hanai J, Kawabata M, Miyazono K. Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily. *Nature*. 389, 622-6 (1997).

Ingman WV, Robertson SA. Defining the actions of transforming growth factor beta in reproduction. *Bioessays*. 24, 904-14 (2002).

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*. 165, 2500-10 (2000).

Hiramine C. [Definition and morphological features of apoptosis] *Rinsho Byori*. 45, 459-69 (1997).

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

Javelaud D, Mauviel A. [Transforming growth factor-betas: smad signaling and roles in physiopathology]. *Pathol Biol (Paris)*. 52, 50-4 (2004).

Jono H, Lim JH, Chen LF, Xu H, Trompouki E, Pan ZK, Mosialos G, Li JD. NF-kB is essential for induction of CYLD, the negative regulator of NF-kB: Evidence for a novel inducible auto-regulatory feedback pathway. *J Biol Chem*. Jun 28 (2004)

Joswig A., Gabriel,H.D., Kibschull,M. & Winterhager,E. Apoptosis in uterine epithelium and decidua in response to implantation: evidence for two different pathways. *Reprod. Biol. Endocrinol*. 1, 44 (2003).

Kehrl JH, Roberts AB, Wakefield LM, Jakowlew S, Sporn MB, Fauci AS. Transforming growth factor beta is an important immunomodulatory protein for human B lymphocytes. *J Immunol*. 137, 3855-60 (1986).

Kennedy T.G. & Ross,H.E. 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 (1997).

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 26, 239-57 (1972).

Kobayashi S, Yamashita K, Takeoka T, Ohtsuki T, Suzuki Y, Takahashi R, Yamamoto K, Kaufmann SH, Uchiyama T, Sasada M, Takahashi A. Calpain-mediated X-linked inhibitor

of apoptosis degradation in neutrophil apoptosis and its impairment in chronic neutrophilic leukemia. *J Biol Chem.* 277, 33968-77 (2002).

Kretzschmar M, Doody J, Massague J. Opposing BMP and EGF signalling pathways converge on the TGF-beta family mediator Smad1. *Nature.* 389, 618-22 (1997).

Latronico,M.V., Costinean,S., Lavitrano,M.L., Peschle,C. & Condorelli,G. Regulation of Cell Size and Contractile Function by AKT in Cardiomyocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1015, 250-260 (2004).

Leblanc,V., Dery,M.C., 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.* 1, 59 (2003).

Lee B.S., Nowak R. H Human leiomyoma Smooth Muscles Show Increased Expression of Transforming Growth Factor-B3 (TGF-B3) and altered responses to the Antiproliferative Effects of TGFβ. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 86, 913-920 (2000).

Li L, Liu F, Salmonsens RA, Turner TK, Litofsky NS, Di Cristofano A, Pandolfi PP, Jones SN, Recht LD, Ross AH. PTEN in neural precursor cells: regulation of migration, apoptosis, and proliferation. *Mol Cell Neurosci.* 20, 21-9 (2002).

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.* 80, 303-16 (2004).

Liston P., Young,S.S., Mackenzie,A.E. & Korneluk,R.G. Life and death decisions: the role of the IAPs in modulating programmed cell death. *Apoptosis.* 2, 423-441 (1997).

Lodish H, Berk A, Zipursky S.L., Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J.E. Molecular cell biology. W.H. Freeman and Company 1084 pp. (2000).

Lu QL, Poulson R, Wong L, Hanby AM. Bcl-2 expression in adult and embryonic non-haematopoietic tissues. *J Pathol.* 169, 431-437 (1993).

Lutz M, Knaus P. Integration of the TGF-beta pathway into the cellular signalling network. *Cell Signal.* 14, 977-88 (2002).

Lyons RA, Djahanbakhch O, Saridogan E, Naftalin AA, Mahmood T, Weekes A, Chenoy R. Peritoneal fluid, endometriosis, and ciliary beat frequency in the human fallopian tube. *Lancet.* 360, 1221-2 (2002).

Maestripieri D, Zehr JL. Maternal responsiveness increases during pregnancy and after estrogen treatment in macaques. *Horm Behav.* 34, 223-30 (1998).

- Marieb E.N. Anatomie et physiologie humaines. Éditions du Renouveau Pédagogique Inc. 1194 pp. (1999).
- Massague J. The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol.* 6, 597-641 (1990).
- Morris EJ, Keramaris E, Rideout HJ, Slack RS, Dyson NJ, Stefanis L, Park DS. Cyclin-dependent kinases and P53 pathways are activated independently and mediate Bax activation in neurons after DNA damage. *J Neurosci.* 15;21, 5017-26 (2001).
- Moulton B.C. Transforming growth factor-beta stimulates endometrial stromal apoptosis in vitro. *Endocrinology.* 134, 1055-60 (1994).
- Mutter GL, Lin MC, Fitzgerald JT, Kum JB, Eng C. Changes in endometrial PTEN expression throughout the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab.* 85, 2334-2338 (2000).
- Myers M.P. *et al.* The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 13513-13518 (1998).
- Nachmias B., Ashhab Y. & Ben Yehuda D. The inhibitor of apoptosis protein family (IAPs): an emerging therapeutic target in cancer. *Semin. Cancer Biol.* 14, 231-243 (2004).
- Nagarajan RP, Liu J, Chen Y. Smad3 inhibits transforming growth factor-beta and activin signaling by competing with Smad4 for FAST-2 binding. *J Biol Chem.* 274, 31229-35 (1999).
- Negoescu A, Guillermet Ch, Lorimier Ph, Robert C, Lantuejoul S, Brambilla E, Labat-Moleur F. TUNEL Apoptotic Cell Detection in Archived Paraffin-embedded Tissues. *Biochemica* 3, 36-41 (1998).
- Nezis IP, Stravopodis DJ, Papassideri I, Robert-Nicoud M, Margaritis LH. Dynamics of apoptosis in the ovarian follicle cells during the late stages of Drosophila oogenesis. *Cell Tissue Res.* 307, 401-9 (2002).
- Nguyen JT, Wells JA.. Direct activation of the apoptosis machinery as a mechanism to target cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 7533-7538 (2003).
- Ogle T.F. Progesterone-action in the decidual mesometrium of pregnancy. *Steroids* 67, 1-14 (2002).
- Orrenius S. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. *Toxicol. Lett.* 149, 19-23 (2004).
- Pampfer S. & Donnay I. Apoptosis at the time of embryo implantation in mouse and rat. *Cell Death. Differ.* 6, 533-545 (1999).



Peter ME, Heufelder AE, Hengartner MO. Advances in apoptosis research. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94, 12736-7 (1997).

Poppe K, Velkeniers B. Thyroid and infertility. *Verh K Acad Geneesk Belg*. 64, 389-99 (2002).

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*. 3, 708-14 (2001).

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*. 33, 133-40 (1997).

Petrocelli T, Slingerland JM. PTEN deficiency: a role in mammary carcinogenesis. *Breast Cancer Res*. 3, 356-360 (2001).

Ragusa A, de Carolis C, dal Lago A, Miriello D, Ruggiero G, Brucato A, Pisoni MP, Muscara M, Merati R, Maccario L, Nobili M. Progesterone supplement in pregnancy: an immunologic therapy? *Lupus* 13,639-642 (2004).

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

Rich J, Borton A, Wang X. Transforming growth factor-beta signaling in cancer. *Microsc Res Tech*. 52, 363-73 (2001).

Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, Heine UI, Liotta LA, Falanga V, Kehrl JH, et al. Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 83, 4167-71 (1986).

Robert Eskes, Bruno Antonsson, Astrid Osen-Sand, Sylvie Montessuit, Christoph Richter, Rémy Sadoul, Gonzalo Mazzei, Anthony Nichols and Jean-Claude Martinou. Bax-induced Cytochrome C Release from Mitochondria Is Independent of the Permeability Transition Pore but Highly Dependent on  $Mg^{2+}$  Ions. *J. Cell Biol*. 143, 217-224 (1998).

Romashkova J.A. & Makarov S.S. NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature* 401, 86-90 (1999).

Rosenquist M. 14-3-3 proteins in apoptosis. *Braz J Med Biol Res*. 36, 403-8 (2003).

Saga Y, Mizukami H, Takei Y, Ozawa K, Suzuki M. Suppression of cell migration in ovarian cancer cells mediated by PTEN overexpression. *Int J Oncol*. 23, 1109-13 (2003).

Schuster N, Kriegelstein K. Mechanisms of TGF-beta-mediated apoptosis. *Cell Tissue Res*. 307, 1-14 (2002).

Sharma M, Sethi S, Daftari S, Malhotra S. Evidence of chlamydial infection in infertile women with fallopian tube obstruction. *Indian J Pathol Microbiol.* 46, 680-3 (2003).

Sherwood Lauralee. Human physiology : from cells to systems. Wadsworth Publishing Company 753pp (1997).

Slater M, Murphy CR. Transforming growth factors alpha and beta-1 are co-expressed in the uterine epithelium during early pregnancy. *Cell Tissue Res.* 300, 315-20 (2000).

Smaili SS, Hsu YT, Carvalho AC, Rosenstock TR, Sharpe JC, Youle RJ. Mitochondria, calcium and pro-apoptotic proteins as mediators in cell death signaling. *Braz J Med Biol Res.* 36, 183-90 (2003).

Songyang Z., Baltimore,D., Cantley,L.C., Kaplan,D.R. & Franke,T.F. Interleukin 3-dependent survival by the Akt protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 11345-11350 (1997).

St-Germain ME, Gagnon V, Parent S, Asselin E. Regulation of COX-2 protein expression by Akt in endometrial cancer cells is mediated through NF-kappaB/IkappaB pathway. *Mol Cancer.* 11,3-7 (2004).

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

Tabibzadeh,S. & Babaknia,A. The signals and molecular pathways involved in implantation, a symbiotic interaction between blastocyst and endometrium involving adhesion and tissue invasion. *Hum. Reprod.* 10, 1579-1602 (1995).

Takahashi R, Deveraux Q, Tamm I, Welsh K, Assa-Munt N, Salvesen GS, Reed JC. A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases. *J Biol Chem.* 273, 7787-90 (1998).

Thellin O, Coumans B, Zorzi W, Igout A, Heinen E. Tolerance to the foeto-placental "graft": ten ways to support a child for nine month. *Current Opinion in Immunology* 12,731-737 (2000).

Tewari M, Dixit VM. Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is inhibited by the poxvirus crmA gene product. *J Biol Chem.* 270, 3255-60 (1995).

Thibeault C, Levasseur MC. La reproduction chez les mammifères et l'homme. Ellipses Édition Marketing S.A. 928 pp. (2001)

Trotman LC, Niki M, Dotan ZA, Koutcher JA, Cristofano AD, Xiao A, Khoo AS, Roy-Burman P, Greenberg NM, Dyke TV, Cordon-Cardo C, Pandolfi P. Pten dose dictates cancer progression in the prostate. *PLoS Biol.* Dec (2003).

Verhagen AM, Coulson EJ, Vaux DL. Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs. *Genome Biol.* 2 (2001).

Vlahos C.J., Matter, W.F., Hui, K.Y. & Brown, R.F. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J. Biol. Chem.* 269, 5241-5248 (1994).

Waynforth H.B., Flecknell P.A. Experimental and surgical technique in the rat. Academic Press Limited 382pp. (1992).

Webb P.D., Glasser S.R. Human in Vitro Fertilization and Embryo Transfer. Plenum Press p.341 (1984).

Yang L. *et al.* Akt/protein kinase B signaling inhibitor-2, a selective small molecule inhibitor of Akt signaling with antitumor activity in cancer cells overexpressing Akt. *Cancer Res.* 64, 4394-4399 (2004).

You Z, Ishimi Y, Masai H, Hanaoka F. Roles of Mcm7 and Mcm4 subunits in the DNA helicase activity of the mouse Mcm4/6/7 complex. *J Biol Chem.* 277, 42471-9 (2002).

Yuan J, Yankner BA. Apoptosis in the nervous system. *Nature* 407, 802-9 (2000).

Zapata JM, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. Granzyme release and caspase activation in activated human T-lymphocytes. *J Biol Chem.* 273, 6916-20 (1998).

Zhang D, Beresford PJ, Greenberg AH, Lieberman J. Granzymes A and B directly cleave lamins and disrupt the nuclear lamina during granule-mediated cytolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98, 5746-51 (2001).