

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

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

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE

PAR
JESSICA DION

ANALYSE DE LA RÉGULATION DE P53 DANS LES CELLULES
ENDOMÉTRIALES STROMALES DURANT LA DÉCIDUALISATION

JANVIER 2016

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.

À mes parents : Chantal et André

REMERCIEMENTS

Dans un premier temps, je veux remercier Michel A. Fortier pour le don du modèle de cellules endométriales stromales humaines immortalisées utilisées tout au long de mon projet. De plus, je veux remercier ma directrice de recherche, Céline Van Themsche pour son grand soutien durant mon parcours de maîtrise au sein de son laboratoire. Ensuite, je veux remercier notre assistante de recherche, Valérie Leblanc, pour son aide précieuse ainsi que ses connaissances approfondies en laboratoire, ce qui m'a permis de réaliser des expérimentations adéquates dans le but d'atteindre mes objectifs. Je tiens aussi à remercier mes collègues, Roch Tremblay et Mélanie St-Cyr, pour la collecte de résultats préalables à la poursuite du projet que j'ai entrepris.

Enfin, je veux spécialement remercier le Réseau Québécois en reproduction pour leur soutien financier grâce à leur bourse RQR-FONCER échelonnée sur une année de mon parcours.

RÉSUMÉ

Le cycle menstruel de la femme implique une série de changements morphologiques et hormonaux dans le but de préparer l'utérus à la réception d'un ovule fécondé. La fécondation, l'implantation et le développement de l'embryon dépendent de plusieurs mécanismes, dont la décidualisation, qui est un processus de remodelage de l'endomètre utérin crucial à la préparation ainsi qu'au maintien de la grossesse. Durant ce processus, les cellules stromales de l'endomètre (CES) subissent des changements au cours desquels elles se différencient en cellules déciduales, capables d'interagir adéquatement avec un éventuel embryon qui s'implante : les facteurs cellulaires et les mécanismes moléculaires sous-jacents à la décidualisation sont encore à l'étude. L'infertilité féminine peut être causée par plusieurs facteurs, dont une décidualisation inadéquate. Récemment, il a été démontré que le facteur de transcription p53 joue un rôle important dans certains aspects de la fonction reproductrice féminine et nous avons observé qu'il s'accumule dans les CES humaines au fil de la décidualisation. Toutefois la régulation, à la fois de son expression et de son activité, ainsi que son rôle dans ce contexte, demeurent à investiguer. L'objectif du projet de recherche était d'analyser la régulation de l'expression et de l'activité de p53 dans les CES en décidualisation. Notre hypothèse de travail était que p53 doit s'accumuler suite à des modifications post-traductionnelles et être inactivé dans les CES pendant la décidualisation, pour favoriser la survie des cellules en profonde modification. En effet, la prolifération et la survie cellulaire pourraient être dictées par l'activité de la protéine p53 dans les CES en décidualisation, tel que documenté dans d'autres contextes. Dans un modèle de décidualisation *in vitro* de CES humaines immortalisées, nous avons obtenu des résultats préliminaires qui suggèrent que l'expression génique de p53 est rapidement modulée dans les CES en décidualisation. Les modifications post-traductionnelles que nous avons étudiées, activatrices et stabilisatrices, sont présentes en quantité proportionnelle à la quantité totale de la protéine p53, qui varie pendant la décidualisation et donc, sont peu susceptibles d'être responsables de cette accumulation. Également, nos résultats montrent que l'accumulation de la protéine p53 est indépendante de la voie de la progestérone. Nous investiguons présentement l'implication possible de la voie activée par la PKA dans ce phénomène, puisque la décidualisation *in vitro* se produit sous l'influence de l'AMPc. À la suite de nos travaux, des expérimentations complémentaires permettront de fournir une compréhension plus profonde des mécanismes moléculaires clés du remodelage de l'endomètre normal et de la fonction reproductrice féminine sous l'action de la protéine p53.

Mots-clés : décidualisation, p53, cellules endométriales stromales, utérus, fertilité, modifications post-traductionnelles, localisation intracellulaire, facteur de transcription, protéine

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	iii
RÉSUMÉ.....	iv
LISTE DES FIGURES ET TABLEAU.....	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	x
CHAPITRE I	
P53 DANS LA FONCTION REPRODUCTRICE FÉMININE.....	1
1.1 Troubles de la santé reproductive chez la femme.....	1
1.2 L'utérus.....	2
1.2.1 Structure.....	2
1.2.2 Changements morphologiques.....	2
1.3 Décidualisation	4
1.3.1 Régulation hormonale.....	4
1.3.2 Facteurs cellulaires et marqueurs de la décidualisation.....	5
1.3.3 Les processus intracellulaires nécessaires à la décidualisation	7
1.4 p53	7
1.4.1 Structure protéique.....	8
1.4.2 Rôles au sein de la cellule.....	9
1.4.2.1 Rôle dans la régulation du cycle cellulaire	9
1.4.2.2 Rôle dans l'apoptose.....	10
1.4.2.3 Rôle dans la différenciation cellulaire	10
1.4.2.4 Rôle dans la reproduction	10
1.4.3 Régulation de la protéine p53 par des modifications post-traductionnelles.....	11
1.4.4 Gènes cibles de p53 dans l'utérus.....	12
1.5 Problématique de recherche : rôles potentiel de p53 dans la décidualisation.....	13
CHAPITRE II	
OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES	14

CHAPITRE III	
APPROCHE EXPÉRIMENTALE PRIVILÉGIÉE ET MÉTHODOLOGIE	16
3.1 Choix du modèle cellulaire	16
3.2 Induction de la décidualisation <i>in vitro</i>	17
3.3 Mesure de la prolactine sécrétée	18
3.4 Analyses de l'expression de protéines par RT-PCR.....	18
3.5 Analyses de protéines par immunobuvardage de type Western	19
3.6 Inhibition de la voie de la progestérone avec le Mifépristone (RU486).....	19
3.7 Interférence à l'ARN de p53.....	19
3.8 Analyses statistiques.....	20
CHAPITRE IV	
RÉSULTATS.....	21
4.1 Validation du modèle.....	21
4.1.1 Suivi des changements morphologiques.....	21
4.1.2 Analyse des marqueurs biochimiques.....	22
4.2 La protéine p53 durant la décidualisation.....	25
4.2.1 Régulation de l'expression de p53 pendant la décidualisation	25
4.2.2 La localisation intracellulaire de p53 pendant la décidualisation	27
4.2.3 L'activité de p53 pendant la décidualisation : régulation de ses gènes cibles	28
4.2.3.1 Le cas de p21	28
4.2.3.2 Le cas de Cycline B1	29
4.2.3.3 Le cas de MDM2	30
4.2.4 Les modifications post-traductionnelles de la protéine p53 pendant la décidualisation	31
4.3 Contribution de la voie du récepteur à la progestérone dans la régulation de p53 pendant la décidualisation.....	36
4.3.1 Validation de l'efficacité de l'inhibition pharmacologique	37
4.3.2 Mesure de l'impact du traitement avec le RU486 sur p53	38
4.4 Interférence à l'ARN de p53.....	38
CHAPITRE V	
DISCUSSION	40
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	49

ANNEXE A	
RÉGULATION DE LA PROTÉINE P53 DANS LE MODÈLE IMMORTALISÉ HUMAIN.....	56
ANNEXE B	
RÉGULATION DE P21 DANS LES CELLULES ENDOMÉTRIALES STROMALES.....	57

LISTE DES FIGURES ET TABLEAU

Figure		Page
1.1	L'utérus et le cycle hormonal. Schéma utérin (haut). Changements morphologiques utérins durant le cycle menstruel (bas)	3
1.2	Schéma de l'endomètre utérin humain pendant les phases d'implantation et de décidualisation (Cha, Sun, & Dey, 2012).....	4
1.3	Schématisation des transformations cellulaires suite à l'action des différents acteurs de la décidualisation (Okada, Nie, & Salamonsen, 2005).	6
1.4	Structure schématique de la protéine p53 (A. J. Levine, Tomasini, McKeon, Mak, & Melino, 2011)	9
4.1	Changements morphologiques des HIESC aux jours 1, 3 et 6 de la décidualisation <i>in vitro</i> , tels qu'observés par microscopie de contraste de phase	22
4.2	Analyse de la prolactine sécrétée dans le surnageant des cellules HIESC soumises à la décidualisation <i>in vitro</i> pendant 1, 3 et 6 jours, par EIA (Cayman).....	23
4.3	Analyse des niveaux protéiques de FoxO1 dans les cellules HIESC aux jours 1, 3 et 6 de la décidualisation <i>in vitro</i> , par immunobuvardage de type western	24
4.4	Analyse de la prolifération des HIESC aux jours 1, 3 et 6 suite au traitement <i>in vitro</i> de décidualisation, par le test MTT.....	25
4.5	Analyse des niveaux protéiques de p53 par immunobuvardage de type western dans les HIESCs aux jours 1, 3 et 6 suite au traitement <i>in vitro</i> de décidualisation	26
4.6	Analyse des niveaux expressionnels de p53 par RT-PCR dans les HIESC aux jours 1, 3 et 6 suite au traitement <i>in vitro</i> de décidualisation.....	27
4.7	Analyse de la distribution intracellulaire de p53 au 6 ^e jour de la décidualisation des HIESC, par fractionnement cytoplasmique nucléaire	28
4.8	Analyse des niveaux transcriptionnels et protéiques de p21 aux jours 1, 3 et 6 suite au traitement <i>in vitro</i> de décidualisation	29
4.9	Analyse des niveaux transcriptionnels et protéiques de Cycline B1 aux jours 1, 3 et 6 suite au traitement <i>in vitro</i> de décidualisation	30

4.10	Analyse des niveaux transcriptionnels et protéiques de MDM2 aux jours 1, 3 et 6 suite au traitement <i>in vitro</i> de décidualisation	31
4.11	Analyse des niveaux protéiques de p53 phosphorylée sur la Sérine 15 par immunobuvardage de type western, aux jours 1, 3 et 6 suite au traitement <i>in vitro</i> de décidualisation	32
4.12	Analyse des ratios de p53 phosphorylée sur la Sérine 15 sur les niveaux de protéine totale, aux jours 1, 3 et 6 suite au traitement <i>in vitro</i> de décidualisation, par immunobuvardage de type Western	33
4.13	Analyse du ratio de la quantité de p53 acétylée sur la Lysine 382 sur les niveaux de protéine totale, aux jours 1, 3 et 6 suite au traitement <i>in vitro</i> de décidualisation.....	34
4.14	Analyse des niveaux protéiques de p53 acétylée sur la Lysine 382 aux jours 1, 3 et 6 suite au traitement <i>in vitro</i> de décidualisation	35
4.15	Analyse des niveaux protéiques de p53 ubiquitinée au jour 6 suite au traitement <i>in vitro</i> de décidualisation.....	36
4.16	Analyse des niveaux protéiques de FoxO1 au jour 6 suite au traitement <i>in vitro</i> de décidualisation (CTL) et en combinaison avec la Mifepristone (RU486)	37
4.17	Analyse des niveaux protéiques de p53 au jour 6 suite au traitement <i>in vitro</i> de décidualisation (CTL) et en combinaison avec la Mifepristone (RU486)	38
4.18	Analyse des niveaux protéiques de p53 au jour 6 suite au traitement <i>in vitro</i> de décidualisation, après traitement des cellules avec un petit ARN contrôle (siRNA CTL) ou un petit ARN spécifique à p53 (siRNA p53)	39
A.1	Mécanisme de régulation de p53 dans les cellules humaines immortalisées au SV40 chez la souris et l'humain.....	56
B.1	Analyse des niveaux transcriptionnels (A) et protéiques (B) de p21 dans les cellules endométriales stromales suite au traitement avec de la génistéine	57

Tableau**Page**

3.1	Liste des amorces pour l'analyse par RT-PCR.....	18
-----	--	----

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
CES	Cellules endométriales stromales
IGFBP-1	Insulin-like Growth factor-Binding protein 1
GnRH	Hormone de libération des gonadotrophines
FSH	Hormone folliculostimulante
LH	Hormone lutéinisante
hCG	Gonadotrophine chorionique humaine
MPA	Médroxyprogestérone Acétate
ITS	Infection transmise sexuellement
PR-A/B	Progestérone receptor-A/B
ER- α/β	Estrogen receptor
GPER	G protein-coupled estrogen receptor
PKA	Protein kinase A
FoxO1	Forkhead
K382	Lysine 382
S15	Sérine 15
ADN	Acide désoxyribonucléique
SV40	Simian Virus 40
pRB	Protéine du Rétinoblastome
ARN	Acide ribonucléique
EIA	Enzyme immuno-assay
HIESC	Human Immortals Endometrial Stromal Cells

CHAPITRE I

P53 DANS LA FONCTION REPRODUCTRICE FÉMININE

1.1 Troubles de la santé reproductive chez la femme

L'infertilité est généralement définie comme étant l'absence de conception suite à des relations sexuelles sans contraception, pendant une période minimale d'un an (pour les femmes de moins de 35 ans). L'infertilité touche près de 10 % des femmes en Amérique du Nord et près de 16 % des couples canadiens font face à cette problématique (Bushnik, Cook, Yuzpe, Tough, & Collins, 2012).

Les facteurs d'infertilité féminine les plus couramment cités sont : l'âge (la fertilité diminue après l'âge de 35 ans); les problèmes liés à la production d'ovules (qui se manifestent par l'irrégularité ou l'absence de cycles menstruels); des problèmes liés aux trompes de Fallope, comme une trompe manquante ou une occlusion (causée par une infection transmissible sexuellement (ITS) telle que la chlamydia); des problèmes utérins, comme la présence de fibromes ou de polypes; l'endométriose, qui se caractérise par une prolifération de tissu endométrial autour des organes reproducteurs; un déséquilibre hormonal ou une ménopause précoce (avant l'âge de 40 ans) (Abrao, Muzii & Marana, 2013; Luciano, Lanzone, & Goverde, 2013).

L'infertilité causée par l'âge augmente avec les années. Elle serait causée par une qualité et un nombre décroissant d'ovules. La production d'ovule nécessite une régulation adéquate des différents acteurs hormonaux afin d'obtenir des ovules sains pour la fécondation. Les trompes de Fallope sont la voie de transport et le lieu de fécondation des ovules. Lors d'une anomalie de cette structure, l'ovule ne peut donc pas se rendre dans l'endomètre ou il doit s'implanter. La présence de fibromes ou de polypes entraîne différentes lésions au niveau de l'ensemble de l'organe reproducteur de la femme. Cela met en place une réaction inflammatoire qui affecte la fertilité.

Tous ces facteurs influencent les étapes de la conception et/ou du maintien de la grossesse. Plusieurs d'entre eux impliquent une intégrité structurelle et fonctionnelle de l'utérus et c'est sur cette thématique générale qu'a porté mon travail de recherche de maîtrise.

1.2 L'utérus

1.2.1 Structure

L'utérus, qui accueille l'œuf fécondé et permet le développement de l'embryon puis du fœtus durant la grossesse, se divise en trois grandes parties : le fundus, le corps et le col. Il est composé d'une couche musculaire épaisse (le myomètre) et d'une couche spongieuse, l'endomètre. Ce dernier est composé de tissu épithélial, faisant face à la lumière de l'utérus, ainsi que de tissus stromaux basaux, qui sont confrontés à des changements durant le cycle menstruel (Figure 1.1).

1.2.2 Changements morphologiques

Diverses hormones reproductrices engendrent des changements morphologiques de l'utérus, à différentes étapes du cycle menstruel ainsi que pendant les phases initiales de la grossesse.

Le cycle menstruel se déroule sur une moyenne de 28 jours et est divisé en trois grandes parties : la phase menstruelle, la phase de prolifération folliculaire et la phase lutéale (Figure 1.1). Durant ce cycle, l'endomètre subit des changements importants. L'arrêt des saignements de la phase menstruelle, associés à la desquamation de l'endomètre suite à la nécrose des cellules endométriales, marque le début du cycle (même si souvent représenté comme une étape terminale du cycle, tel que représenté dans la Figure 1.1). Ensuite, la phase de prolifération, facilitée par la FSH (hormone folliculo-stimulante), permet à l'endomètre de s'épaissir favorisant ainsi le renouvellement des glandes, des tissus de connexion et du réseau vasculaire (Kluwer,

2009). Enfin, la phase lutéale se produit suite à la relâche de progestérone et de LH (hormone lutéinisante) permettant l'épaississement continu de l'endomètre, l'expansion et la torsion des glandes et l'accumulation caractéristique de marqueurs hormonaux (Brosens, Hayashi, & White, 1999) (Vasquez *et al.*, 2015).

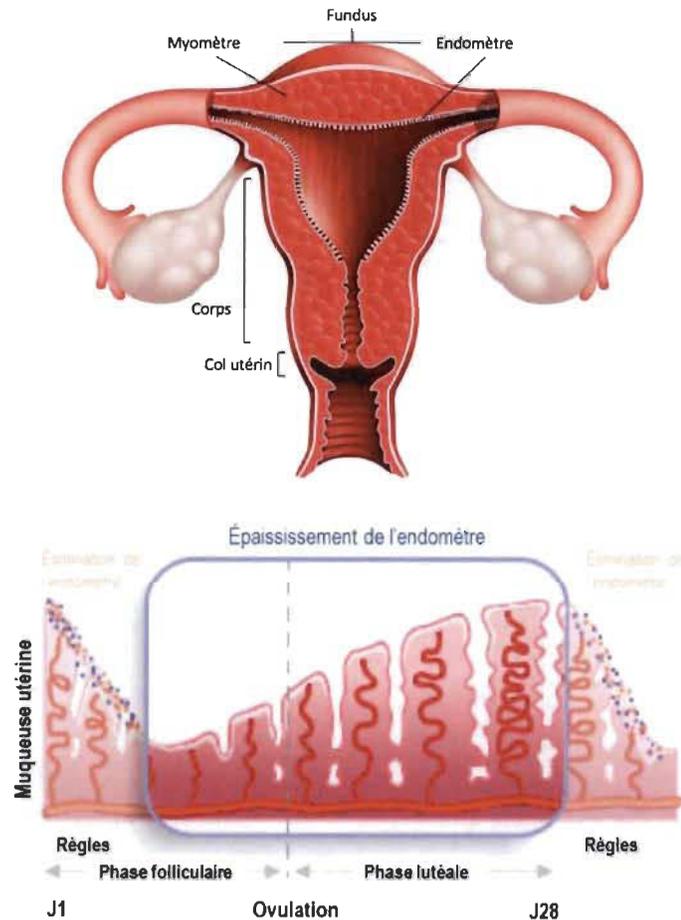


Figure 1.1 L'utérus et le cycle hormonal. Schéma utérin (haut). Changements morphologiques utérins durant le cycle menstruel (bas).

Toujours au cours de la phase lutéale, la couche épithéliale de l'endomètre se remplit de produits sécrétoires dont la prolactine (abordée dans la sous-section 1.3.2); les artères s'enroulent et les fibroblastes du stroma se différencient en prévision d'une interaction avec un embryon. Il s'agit de la décidualisation. Toutefois, en absence de fécondation, les niveaux de LH et de progestérone seront diminués et la décidualisation sera stoppée au moment de l'entrée en phase menstruelle (Kluwer, 2009).

1.3 Décidualisation

Tel que mentionné dans la section 1.2, la phase lutéale est caractérisée par de nombreux changements utérins : l'un d'eux est la décidualisation, un processus de différenciation cellulaire du stroma qui est dépendant de la progestérone et de l'estrogène. Le succès de la décidualisation est essentiel à la réussite de l'implantation embryonnaire ainsi qu'au maintien de la grossesse, en permettant un contact déterminant entre l'embryon et l'utérus (Figure 1.2). La décidualisation, qui a donc lieu chaque cycle pendant la deuxième phase du cycle menstruel, débute juste avant la période (fenêtre) d'implantation (Figure 1.2). Lorsqu'un embryon s'implante avec succès dans l'endomètre, la structure et la fonction déciduale persistent jusqu'à la fin de la grossesse (du moins, chez l'humain; chez les rongeurs, la troisième et dernière phase de la gestation est accompagnée d'une régression de la décidue, impliquant la mort cellulaire par apoptose (Y. Gu *et al.*, 1994).

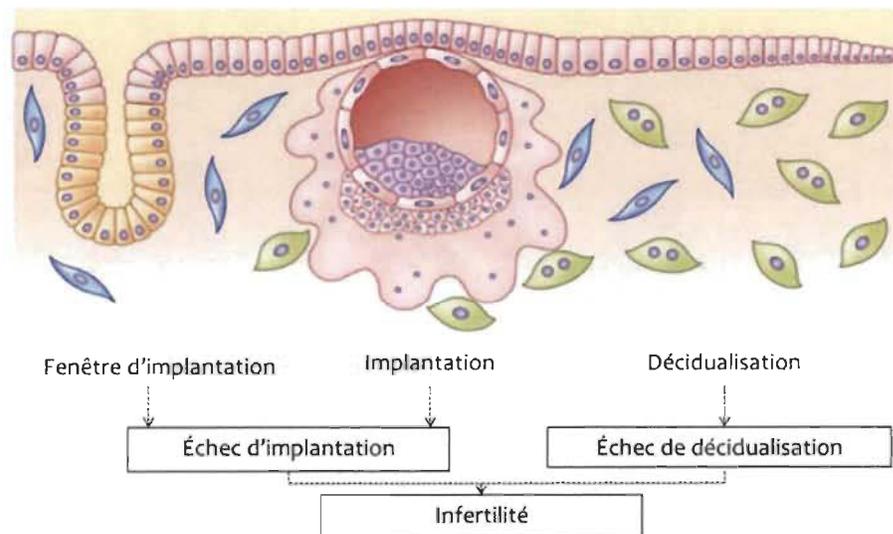


Figure 1.2 Schéma de l'endomètre utérin humain pendant les phases d'implantation et de décidualisation (Cha, Sun, & Dey, 2012).

1.3.1 Régulation hormonale

Les récepteurs de la progestérone (PR-A et PR-B) et de l'estrogène (ER- α , ER- β et GPER) sont tous exprimés dans l'utérus (Lydon *et al.*, 1995), (Yuguchi *et al.*, 2013).

Ces deux hormones stéroïdiennes jouent des rôles distincts dans l'endomètre, mais certains de leurs effets dans les cellules endométriales stromales (CES) sont convergents. La progestérone est sécrétée par le corps jaune, une formation temporaire qui se produit au site de relâche de l'ovule. Dans les cellules endométriales, la liaison de la progestérone à son récepteur entraîne la dimérisation de ce dernier, puis une cascade de signalisation intracellulaire qui aboutit à la transcription de certains gènes. Une étude a montré que les souris avec une déficience au niveau des récepteurs de la progestérone (PR^{-/-}) utérins sont infertiles et plus spécifiquement, un défaut d'implantation embryonnaire a été rapporté (Lydon *et al.*, 1995).

L'estrogène est sécrété par l'ovaire et l'utérus pour favoriser la mise en place de la fenêtre d'implantation et la réceptivité de l'embryon (Ma, Song, Das, Paria, & Dey, 2003). Dans l'utérus, l'estrogène peut lier ses trois récepteurs, ER α , ER β et GPER. La liaison de cette dernière à un récepteur couplé à une protéine G (GPER) active l'adénylate cyclase avec pour résultat une hausse des niveaux d'AMPc dans les cellules. Cette augmentation sensibilise les cellules en décidualisation à la progestérone (Telgmann, Maronde, Tasken, & Gellersen, 1997). La décidualisation requiert l'augmentation des niveaux d'AMPc pour permettre l'activation de la PKA (Protéine Kinase A), puis la phosphorylation de différentes protéines telles que CREB, un facteur de transcription (Brar, Frank, Kessler, Cedars, & Handwerger, 1997).

1.3.2 Facteurs cellulaires et marqueurs de la décidualisation

Plusieurs facteurs cellulaires sont nécessaires au processus de décidualisation (Figure 1.3), dont la protéine Forkhead Box protein O1 (FoxO1) (Kajihara, Brosens, & Ishihara, 2013) et la prolactine déciduale (Horseman *et al.*, 1997; Ormandy *et al.*, 1997), depuis longtemps établies comme deux marqueurs protéiques de la décidualisation. La protéine FoxO1 est augmentée de manière progestérone-dépendante dans les cellules stromales (Labied *et al.*, 2006); elle y joue un rôle dans la prolifération et la différenciation cellulaire (Takano *et al.*, 2007) ainsi qu'au niveau de la transcription de gènes (Buzio, Lu, Miller, Unterman, & Kim, 2006) suite à une augmentation de

l'AMPc. L'augmentation transcriptionnelle du gène *FoxO1* est suivie d'une augmentation de la synthèse de la protéine FoxO1. Sa localisation intracellulaire au noyau favorise, entre autres l'activation du promoteur de la prolactine déciduale (Christian *et al.*, 2002). L'expression de la prolactine déciduale est sous le contrôle d'un promoteur tissu-spécifique et survient uniquement au cours de la décidualisation (Christian *et al.*, 2002), suite à la collaboration des deux hormones stéroïdiennes activant la voie de l'AMPc (Brar *et al.*, 1997). La prolactine synthétisée est ensuite sécrétée par les cellules stromales et agit de manière paracrine sur les cellules de la couche épithéliale (Review Yu-Lee, 1997). La liaison de la prolactine à son récepteur engendre la dimérisation de ce dernier, permettant d'activer la cascade de signalisation des protéines kinases associées à la mitogénèse (MAPK) (Das & Vonderhaar, 1995) et initiant l'activation de facteurs de transcription nécessaires à la progression du cycle cellulaire dont p53, p21 et c-Myc (Seth, Gonzalez, Gupta, Raden, & Davis, 1992) (Jabbour, Critchley, Yu-Lee, & Boddy, 1999). L'expression du récepteur de la prolactine dans l'endomètre est régulée durant chaque cycle menstruel. Il est plus fortement exprimé dès la moitié de la phase lutéale tout en demeurant détectable dans la phase proliférative (Jabbour *et al.*, 1999), (Jones, Critchley, Brooks, Jabbour, & McNeilly, 1998).

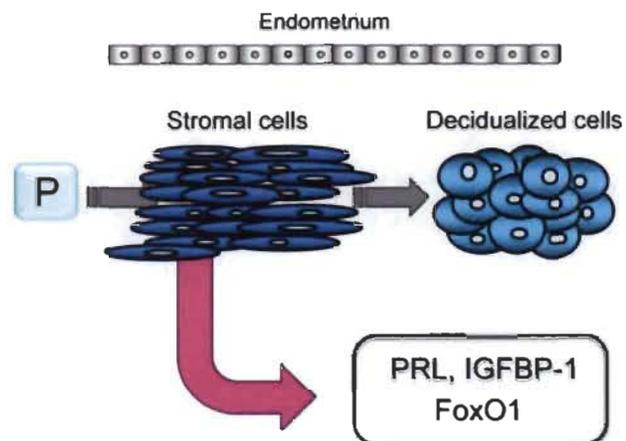


Figure 1.3 Schématisation des transformations cellulaires suite à l'action des différents acteurs de la décidualisation (Okada, Nie, & Salamonsen, 2005).

1.3.3 Les processus intracellulaires nécessaires à la décidualisation

En aval de FoxO1 et de la prolactine, plusieurs autres facteurs intracellulaires sont importants pour le bon déroulement de la décidualisation, notamment ceux qui régulent la division, l'apoptose et la différenciation cellulaire. En effet, la complétion de la décidualisation nécessite un arrêt du cycle cellulaire, une augmentation de la résistance des cellules à la mort cellulaire et une différenciation des cellules endométriales stromales (Ramathal, Bagchi, Taylor, & Bagchi, 2010). L'arrêt du cycle cellulaire et la différenciation se produisent suite à l'action de la progestérone dans l'endomètre. Les acteurs qui régulent cette étape sont p53, p21 et les différentes cyclines (Logan, Steiner, Ponnampalam, & Mitchell, 2012). La différenciation est caractérisée par une perte de l'aspect fibroblastique des cellules pour laisser place à un aspect épithélial (Figure 1.3), caractérisé par des formes plus arrondies avec des modifications structurales spécifiques (Okada *et al.*, 2005). Les mécanismes sous-jacents la différenciation se produisent de façon paracrine et autocrine par la régulation d'une grande quantité de gènes, acteurs de la différenciation cellulaire (Brar, Handwerker, Kessler, & Aronow, 2001). En même temps, les cellules de l'endomètre acquièrent une résistance face au stress oxydatif très présent pendant la décidualisation, notamment via l'augmentation, FoxO1-dépendante, de l'expression de la superoxyde dismutase, une enzyme qui piège les radicaux libres (Kajihara *et al.*, 2006).

Le facteur de transcription p53 est un acteur important de toutes ces étapes et ses gènes cibles sont impliqués dans les trois processus mentionnés ci-haut. La section qui suit est consacrée à la protéine p53 et son rôle potentiel dans la décidualisation.

1.4 p53

Sa découverte fût faite en 1979, par quatre différentes équipes de recherche. L'équipe de L. Crawford, A. Levine et P. May s'intéressait à son rôle dans le processus d'oncogénèse (Kress, May, Cassingena, & May, 1979; Lane & Crawford, 1979; Linzer & Levine, 1979), tandis que l'équipe de L. Old s'intéressait à la recherche de nouveaux

antigènes tumoraux (DeLeo *et al.*, 1979). C'est en 1983 que la protéine a reçu son nom définitif par L. Crawford (Crawford, 1983). Suite à plusieurs années de recherche, la protéine p53 fût classée dans le groupe des suppresseurs de tumeurs. Aujourd'hui, son rôle dans le contexte de la tumorigénèse est largement caractérisé; à l'inverse, son rôle dans un contexte physiologique tel que celui de la décidualisation et de la fonction utérine est encore bien mal compris.

L'ARN de p53 est encodé à partir d'un gène situé sur le chromosome 17. L'expression de p53 est ubiquitaire et constitutive, mais dans les cellules saines, la quantité et l'activité de p53 sont maintenues à des niveaux faibles grâce à différents mécanismes post-traductionnels.

1.4.1 Structure protéique

La protéine de 53 kDa avec 393 acides aminés (Saha, Kar, & Sa, 2015), contient plusieurs domaines de régulation (Figure 1.4). Le domaine N-terminal (N) aussi appelé domaine de transactivation permet la liaison avec d'autres protéines pour la régulation de l'expression de gènes cibles. Le domaine de liaison à l'ADN (DBD) permet une liaison stable de p53 avec l'ADN au niveau des promoteurs de ses gènes cibles. Le domaine de localisation nucléaire (NLS) permet son import au noyau, afin qu'elle puisse atteindre l'ADN et exercer son rôle de facteur de transcription. Finalement le domaine C-terminal (C) permet la régulation de l'activité et la stabilité de la protéine (Saha *et al.*, 2015). De plus, il contient un domaine de tétramérisation, nécessaire à l'action de la protéine sur ses cibles (Lang *et al.*, 2014).

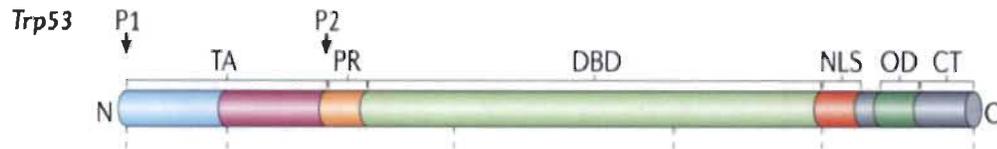


Figure 1.4 Structure schématique de la protéine p53 (A. J. Levine, Tomasini, McKeon, Mak, & Melino, 2011).

TA : Tansactivation, PR : Pro domain, DBD : DNA-Binding Domain, NLS : Nuclear localization signal, OD : oligomerization, CT : carboxy-terminal domain.

1.4.2 Rôles au sein de la cellule

p53 est l'un des suppresseurs de tumeurs les mieux connus (Soussi & Wiman, 2015), mais son rôle dans la physiopathologie du cancer ne sera pas détaillé ici, n'étant pas lié à mes objectifs de recherche. Les rôles biologiques de la protéine p53 dans les cellules saines sont néanmoins observés suite à différentes formes de stress dont les dommages à l'ADN, le raccourcissement des télomères en condition de stress oxydatif et l'hypoxie (ou diminution de la concentration disponible en oxygène telle qu'observée au centre des tumeurs). La régulation du cycle cellulaire, l'apoptose, la sénescence, la réparation de l'ADN, la régulation du métabolisme cellulaire et l'autophagie sont tous des mécanismes cellulaires qui impliquent la protéine p53 (Arnold J. Levine, 1997).

1.4.2.1 Rôle dans la régulation du cycle cellulaire

Suite à différents stress cellulaires, la protéine p53 permet la transition de la phase G1, une phase proliférative, vers la phase S où l'ADN est répliqué. Elle confine les cellules à ce point du cycle jusqu'à ce que les dommages à l'ADN, engendrés par différentes sources, soient réparés. Durant cette étape, la protéine p53 active la transcription du gène p21, un inhibiteur des cyclines (revu par (Arnold J. Levine, 1997)). Si les dommages sont trop importants, la protéine p53 activera, au bout d'un certain délai, des mécanismes de mort cellulaire tels que l'apoptose, afin de détruire ces cellules.

1.4.2.2 Rôle dans l'apoptose

L'apoptose activée par la protéine p53 est engendrée par une variété de signaux suite à différents stress cellulaires, via l'une ou l'autre des voies intrinsèque et extrinsèque dans la cellule (Lowe, Cepero, & Evan, 2004). La voie intrinsèque, en particulier activée en cas de problème interne tel qu'un dommage à l'ADN, engendre la transcription de gènes pré-apoptotiques tels que BAX, Noxa et PUMA de manière p53-dépendante (Chipuk & Green, 2006).

1.4.2.3 Rôle dans la différenciation cellulaire

La régulation de la différenciation cellulaire par la protéine p53 est un processus complexe. La protéine p53 permet une régulation positive autant que négative de la différenciation cellulaire, en fonction de plusieurs paramètres, dont le stade de différenciation et le type cellulaire (revu par (Molchadsky *et al.*, 2008)).

1.4.2.4 Rôle dans la reproduction

Plusieurs aspects de la protéine p53 sont déjà connus dans le contexte de la reproduction, autant chez le mâle que la femelle, chez la souris d'abord et de plus en plus chez l'homme. Chez la souris femelle, le facteur d'inhibition de la leucémie (LIF) est hautement régulé par p53 dans les cellules en décidualisation (Wenwei Hu, Feng, Teresky, & Levine, 2007). Les souris p53-déficientes présentent des défauts d'implantation, qui sont renversés par l'ajout de LIF dans les cellules utérines. Ceci montre que l'implantation et les niveaux de la protéine LIF sont bel et bien régulés par p53 chez ce rongeur (W. Hu, Feng, Atwal, & Levine, 2008). Chez l'humain, le gène encodant p53 est associé à plusieurs polymorphismes nucléotidiques uniques (SNP), dont certains sont associés à une variation de la quantité de LIF dans les cellules (Kang *et al.*, 2009). Mentionnons également que les autres protéines de la famille de p53, p63 et p73, auraient aussi un rôle important à jouer dans la fertilité, par exemple dans le processus de maturation des ovocytes (Feng *et al.*, 2011; W. Hu, Zheng, & Wang, 2011).

1.4.3 Régulation de la protéine p53 par des modifications post-traductionnelles

La régulation de la fonction de la protéine p53 passe par trois mécanismes regroupant la stabilisation de la protéine, sa liaison à l'ADN et l'induction de son activité de transactivation génique (W. Gu & Roeder, 1997; Meek, 1999; Rodriguez, Desterro, Lain, Lane, & Hay, 2000). Sa régulation implique différentes modifications post-traductionnelles. De manière large, ces dernières sont des changements covalents effectués sur une protéine par des protéines régulatrices telles que les kinases, les acétylases et les ubiquitines ligases.

La phosphorylation de la sérine 15 (S15) notamment, située dans la région N-terminale de la protéine, est bien connue comme étant activatrice et nécessaire à l'acétylation de la région C-terminale (Kruse & Gu, 2009). Il est à noter que la région C-terminale de p53 peut aussi être phosphorylée, mais la plus grande partie des sites de phosphorylation sur la protéine p53 demeurent dans la région N-terminale (Ashcroft, Kubbutat, & Vousden, 1999). L'acétylation de la région C-terminale de p53 augmente la stabilité de la protéine en plus de son activité, en favorisant la phosphorylation dans la région N-terminale (Tang, Zhao, Chen, Zhao, & Gu, 2008). L'acétylation de la lysine 382 (K382) en particulier, située dans la région C-terminale, est connue pour favoriser la stabilité ainsi que l'activation de la protéine puisqu'elle est nécessaire à la phosphorylation de S15 (Kruse & Gu, 2009).

La protéine p53 fait également l'objet d'ubiquitination, mais cette dernière compétitionne avec l'acétylation, parce que les acides aminés ainsi modifiés sur la protéine sont les mêmes. Elle se produit sous deux formes : la monoubiquitination et la polyubiquitination. La monoubiquitination permet la relocalisation intracellulaire de la protéine en favorisant son export nucléaire, une forme d'inhibition sachant que p53 joue une grande partie de son rôle au niveau de l'ADN nucléaire. La polyubiquitination, pour sa part, engendre la dégradation de la protéine dans le noyau de la cellule suite à son accumulation (C. L. Brooks & Gu, 2006). Dotée d'une activité ubiquitine ligase E3, MDM2 (Mouse Double Minute 2) est capable de mono- et polyubiquitiner p53. De cette façon, MDM2 est un régulateur clé de l'exportation de la protéine p53 hors du

noyau cellulaire ou encore, de sa dégradation dans le protéasome, respectivement (Honda, Tanaka, & Yasuda, 1997).

Ces principales modifications, ainsi que d'autres qui sont moins directement reliées à mon projet de recherche telles que la neddylation, un processus de modifications post-traductionnel très semblable à l'ubiquitination, par la protéine ligase NEDD8 (Hollstein & Hainaut, 2010), exercent collectivement une régulation très fine de la stabilité, de la localisation et de la localisation de la protéine p53. Pour notre étude, nous avons étudié des modifications post-traductionnelles précises, soit la phosphorylation de la Sérine 15, l'acétylation de la Lysine 382 et l'ubiquitination totale, choisies en fonction de leur lien conceptuel avec nos objectifs de recherche et des tests biochimiques à notre portée.

1.4.4 Gènes cibles de p53 dans l'utérus

L'identification et l'étude de l'expression des gènes cibles de p53 permettent de mesurer l'activité du facteur de transcription et circonscrire son rôle dans un processus donné. La protéine p21 est le gène cible de p53 le plus connu et aussi le plus documenté. En tant qu'inhibiteur de kinase cycline-dépendante, p21 permet de contrôler la progression du cycle cellulaire en G1 et en G2, en inhibant CDK1 et CDK2; de plus, il joue un rôle général dans la différenciation cellulaire (revu par (Arnold J. Levine, 1997)). Dans l'utérus, la protéine p21 permet le maintien de l'arrêt du cycle cellulaire dans les cellules différenciées (Burton & Wells, 1998). Toutefois, son expression peut être régulée de manière p53-indépendante, via d'autres facteurs de transcription (revu par (Taylor & Stark, 2001)). La Cycline B1, sans être une cible directe de p53, demeure un marqueur de son activité parce qu'elle est régulée par p21 (Taylor & Stark, 2001). Elle joue un rôle au niveau de la transition entre les phases G2 et M du cycle cellulaire. Enfin, MDM2 est un gène cible de p53 (Honda *et al.*, 1997) et tel que décrit plus haut la protéine est capable d'ubiquitiner p53. Cette boucle de rétroaction entre p53 et MDM2 permet de maintenir les niveaux protéiques de p53 idéaux dans différents contextes.

1.5 Problématique de recherche : rôles potentiels de p53 dans la décidualisation

Des études antérieures ont été faites avec des souris génétiquement modifiées pour tenter d'évaluer le rôle de p53 dans l'utérus des mammifères. Dans un premier temps, des souris portant une délétion constitutive de p53 ont été générées. Ces souris ont eu des portées plus petites, un faible taux d'implantation ainsi qu'une diminution de LIF (Wenwei Hu *et al.*, 2007), un gène cible de p53 qui s'est avéré essentiel à l'implantation chez cette espèce, par comparaison avec les souris contrôle (Wenwei Hu *et al.*, 2007). Ceci suggérait que p53 était essentiel à l'implantation, via LIF. Suite à ces résultats, des souris avec une délétion spécifique de p53 au niveau de l'utérus ont été produites. En contradiction avec les souris où la délétion était ubiquitaire, ces souris n'ont montré aucun défaut d'implantation; par contre, elles ont été associées à des naissances prématurées (Hirota *et al.*, 2010). De plus, un épaissement réduit de la zone déciduale suite à l'implantation a été mesuré chez ces souris par comparaison avec les souris contrôles, ce qui suggère un rôle pour p53 dans le processus de décidualisation. Chez l'humain, certains polymorphismes sont associés à des défauts d'implantation (W. Hu *et al.*, 2008). Collectivement, ces données suggèrent que p53 pourrait être important dans l'utérus pour la bonne fonction reproductive et plus spécifiquement, pour la complétion de la décidualisation. Toutefois, des études du rôle de p53 dans un modèle de cellules humaines n'ont pas encore été réalisées, même s'il a déjà été rapporté que la protéine p53 s'accumule dans les cellules endométriales humaines au moment de la décidualisation, dans certains modèles de décidualisation *in vitro* (Pohnke *et al.*, 2004), (Chapdelaine *et al.*, 2006), suggérant que p53 fasse l'objet d'une régulation pendant ce processus crucial à la reproduction féminine. La régulation fine de l'expression et de l'activité de p53 dans les cellules endométriales humaines tout au long de la décidualisation n'a pas encore été investiguée et c'est sur cette question centrale que nous nous sommes penchés dans le cadre de ma maîtrise.

CHAPITRE II

OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES

L'objectif général de mon projet de recherche était de déterminer de quelle façon l'expression et l'activité de p53 sont régulées dans les cellules endométriales stromales humaines au fil de la décidualisation. Plusieurs objectifs spécifiques ont ainsi été définis dans le cadre de ce projet de recherche en reproduction. Ils sont les suivants :

- 1) *Déterminer quelle est la régulation de l'expression du gène et de la protéine p53 dès le début de la décidualisation (in vitro).*

Des résultats antérieurs montraient que la protéine p53 s'accumule dans les cellules endométriales stromales humaines au jour 6 de la décidualisation *in vitro*, sans que ses niveaux aient été mesurés plus précocement dans ce processus (Pohnke *et al.*, 2004). Notre hypothèse de travail était que l'accumulation de la protéine p53 dans les cellules endométriales stromales pourrait débiter plus tôt qu'au 6^e jour de la décidualisation et qu'elle pourrait être la conséquence d'une régulation à la hausse de l'expression génique.

- 2) *Déterminer si l'accumulation de la protéine p53 lors de la décidualisation (in vitro) des CES serait accompagnée par des modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation et l'acétylation.*

Nous avons posé l'hypothèse selon laquelle certaines modifications post-traductionnelles, telles que la phosphorylation sur sérine-15 et l'acétylation sur lysine-382, peuvent stabiliser la protéine p53 pour ainsi favoriser son accumulation, tel qu'observé dans d'autres modèles de décidualisation des CES (Kruse & Gu, 2009).

- 3) *Déterminer la localisation intracellulaire de la protéine p53 dans les CES durant la décidualisation.*

Il a préalablement été montré que la protéine p53 s'accumulait au niveau du noyau des CES *in vitro* (Pohnke *et al.*, 2004). Puisque la monoubiquitination peut contrôler la localisation intracellulaire de p53 et que sa polyubiquitination entraîne sa dégradation, et qu'en réponse à l'activation de la PKA par l'AMPc, p53 s'accumule dans le noyau des CES (Christopher L. Brooks & Gu, 2003), notre hypothèse de travail est que p53 pourrait faire l'objet d'une plus grande monoubiquitination et de moins de polyubiquitination pendant la décidualisation pour ainsi s'accumuler au niveau du noyau cellulaire.

- 4) *Déterminer si l'activation de la voie de la progestérone caractéristique de la décidualisation est responsable d'un changement de l'expression ou de l'activité de p53 dans les CES.*

L'activation de la voie de la PKA induit l'accumulation de protéine p53 dans les CES (Pohnke *et al.*, 2004). Puisqu'il a été montré que la voie de la progestérone sensibilise à l'activité de la voie de PKA dans ces cellules (Telgmann *et al.*, 1997), notre hypothèse est que l'accumulation complète de la protéine p53 pendant la décidualisation serait dépendante de la progestérone.

- 5) *Déterminer le rôle de p53 dans les cellules stromales endométriales durant la décidualisation.*

Notre hypothèse de travail est que la protéine p53 jouerait un rôle important dans les CES pour permettre la décidualisation, entre autres parce que les souris ayant une délétion utérine de la protéine p53 montrent une incapacité de la décidue à s'épaissir et atteindre la taille normale pendant la grossesse (Hirota *et al.*, 2010).

CHAPITRE III

APPROCHE EXPÉRIMENTALE PRIVILÉGIÉE ET MÉTHODOLOGIE

3.1 Choix du modèle cellulaire

Les cellules endométriales stromales humaines immortalisées nous ont été généreusement offertes par le Dr Michel A. Fortier (Centre Hospitalier Universitaire de Laval (CHUL), Québec, QC, Canada). Elles ont été obtenues à la suite de biopsies effectuées chez des femmes ayant des cycles menstruels normaux, ne présentant pas de néoplasme et pas d'endométriose. Elles ont ensuite été immortalisées avec l'antigène Large T du virus simien 40 (SV40) (Chapdelaine *et al.*, 2006). Les cellules ont été maintenues dans le milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute) avec rouge de Phénol (PR+) contenant 50 µg/ml de gentamycine, supplémentées avec 10 % de sérum bovin fœtal (FBS) et maintenues à 37 °C dans une atmosphère humide contenant 5 % de CO₂. Chapdelaine *et al.* (2006) ont déjà démontré qu'en réponse à un stimulus de décidualisation décrit ci-après, cette lignée de cellules immortalisées montre les principaux changements morphologiques et biochimiques associés à la décidualisation (Chapdelaine *et al.*, 2006).

Le vecteur rétroviral SSR69 contenant le SV40 large TAG (Chapdelaine *et al.*, 2006) a été utilisé pour immortaliser les cellules. L'antigène Large T a plusieurs effets, mais l'augmentation de la durée de vie des cellules se produit suite à la formation d'un complexe entre l'antigène T et pRB-1 et/ou p53. Une fois lié avec pRB-1, le facteur de transcription E2F-1 est activé et les sous-unités des complexes cyclines kinases sont réarrangées, facilitant la division cellulaire (Hubbard & Ozer, 1999).

Dans certaines cellules humaines, l'antigène T et la protéine p53 forment un complexe qui est incapable de se lier à l'ADN. Toutefois, la protéine peut adopter une conformation active et lier l'ADN, même lorsqu'elle est liée à l'antigène T (Sheppard,

Corneillie, Espiritu, Gatti, & Liu, 1999) (voir Annexe A). De plus, il a été démontré que dans certains types cellulaires, le complexe formé entre l'antigène T et la protéine p53 suite à l'immortalisation n'inhibe pas p53, mais au contraire, l'active (Bocchetta *et al.*, 2008). Dans la lignée HIESC que nous avons utilisée pour modèle cellulaire, l'ajout de certaines molécules augmente l'expression de gènes cibles de p53. Des expérimentations conduites dans notre laboratoire montrent qu'il est possible d'augmenter la quantité de la protéine p53 ainsi que celle de son gène cible p21 dans notre lignée modèle, ce qui suggère fortement que la protéine p53 n'est pas inactivée et que son expression demeure réglable suite à l'immortalisation (voir Annexe B). Enfin, mes propres résultats montrent que la protéine p53 subit des modifications post-traductionnelles activatrices dans les HIESC pendant la décidualisation, ce qui renforce encore davantage la conclusion que même si la lignée de cellules HIESC que nous utilisons pour modèle a été immortalisée avec l'antigène T, la protéine p53 n'est pas inactivée et cette lignée peut être utilisée pour modèle.

3.2 Induction de la décidualisation *in vitro*

Selon un modèle déjà validé par Chapdeleine *et al.* (2006), les cellules HIESCensemencées dans des plaques 6 puits ont été incubées dans du milieu RPMI-1640 sans rouge de phénol (PR-) contenant 50 ug/ml de gentamycine et 10 % de sérum bovin foetal, pendant 24 h. La décidualisation a été induite *in vitro* en traitant les cellules avec 0,5 mM de 8-bromo adénosine monophosphate cyclique (AMPC) (Enzo Life Sciences Inc., Farmingdale, NY) et 1 µM de 17-acétate de médroxyprogestérone (MPA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), dans du milieu RPMI sans rouge de phénol contenant 2 % de FBS dextran-coated charcoal-treated (DCC) et 50 µg/ml de gentamycine. Les cellules contrôles ont été traitées avec le véhicule (DMSO). Le milieu a été changé tous les deux jours et les cellules ont été collectées aux jours 1, 3 et 6 de la décidualisation.

3.3 Mesure de la prolactine sécrétée

Les milieux conditionnés (CM) de HIESC ont été recueillis afin de mesurer le taux de prolactine sécrétée, aux jours 1, 3 et 6 de la décidualisation. Avant les essais, la culture cellulaire a été centrifugée à 13 000 rpm pendant 1 min; les surnageants exempts de cellules ont été récupérés. La mesure de la prolactine (PRL) a été faite par dosage dans ces surnageants par la technique de l'EIA, à l'aide d'une trousse commerciale (Cayman, Ann Arbor, MI). À la fin de la procédure, la densité optique a été lue à 450 nm avec un spectrophotomètre Fluostar OPTIMA BMG (BMG Labtech Inc., Durham, NC). Les résultats sont exprimés en ng/ml.

3.4 Analyses de l'expression de protéines par RT-PCR

Les cellules traitées ont été récoltées avec du Trizol pour ensuite extraire l'ARN à l'aide du kit Direct-zol™ RNA Miniprep (ZYMO RESEARCH, CA, USA). L'obtention de l'ADNc a été effectuée à l'aide de la qScript™ cDNA SuperMix (Quanta Biosciences, MD, USA). Les PCRs obtenues à partir de l'ADNc ont été effectuées à l'aide de la OneTaq® DNA Polymerase (NEB, Whitby, Ontario, Canada). Les PCRs ont été mises sur gel d'agarose 1 % à 120V durant 45 minutes. Les bandes obtenues ont ensuite été quantifiées par densitométrie. Les résultats obtenus ont été normalisés avec la GAPDH dans les mêmes conditions.

Tableau 3.1

Liste des amorces pour l'analyse par RT-PCR

Nom	Nb cycles	T°	Séquence sens	Séquence anti-sens	Compagnie
Prolactine	35	61	AAA GGA TCG CCA TGG AAA G	GCA CAG GAG CAG GTT TGA	IDT
IGFBP1	35	61	CCC ATT CCA AGG GTA GAC GC	TTT TAC CTG CCA AAC TGC AAC A	IDT
β-actine	25	60	CCT CCC TGG AGA AGA GCT A	ACG TCA CAC TTC ATG ATG GA	Sigma
p53	35	61	TGA CAC GCT TCC CTG GAT TG	GAA CCA TTG TTC AAT ATC GTC CG	Sigma
mdm2	35	61	GTG ATC TTG GCT CAC TGC AA	ACG AGG TCA GGA GAT CGA GA	IDT
p21	35	61	CCT CAT CCC GTG TTC TCC TTT	GTA CCA CCC AGC GGA CAA GT	IDT
Cycline	35	61	ACG AAG GTC TGC GCG TGT T	CCG CTG GCC ATG AAC TAC CT	IDT
GAPDH	35	61	GTC AGT GGT GGA CCT GAC CT	TGA GCT TGA CAA AGT GGT CG	Sigma

3.5 Analyses de protéines par immunobuvardage de type Western

Les cellules traitées ont été lysées dans une solution froide de RIPA contenant des inhibiteurs de protéases et de phosphorylases (Complete™ from Roche, Laval, Quebec, Canada). Une quantité égale de lysats cellulaires a été séparée sur un gel de polyacrylamide 11 % et transférée sur une membrane de nitrocellulose (Bio-Rad). Les membranes ont été incubées avec différents anticorps primaires toute la nuit à 4 °C. Les anticorps p53, Acetyl-p53, Phospho-p53, p21, FoxO1 et PARP ont été achetés chez Cell Signaling (Beverly, MA), Cyclin B1 chez Santa Cruz Technologie (Santa Cruz, CA) et MDM2 et GAPDH chez Abcam (Toronto, ON). Les membranes ont ensuite été incubées avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase chevaline pour 1 heure (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON). La détection a été faite en utilisant du SuperSignal WestFemto (Pierce, Arlington Heights, IL, USA), tel que décrit par le manufacturier.

3.6 Inhibition de la voie de la progestérone avec le Mifépristone (RU486)

Les cellules HIESC confluentes dans les plaques 6 puits ont été incubées dans du milieu RPMI avec rouge de phénol contenant 10 % de FBS et 50 µg/ml de gentamycine pendant 24 h. Le traitement avec le RU486 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a été fait en ajoutant 0,1 µM de l'inhibiteur dilué dans le véhicule DMSO, pour une durée de 6 jours. Le milieu a été changé tous les deux jours et les cellules ont été collectées au jour 6 de la décidualisation.

3.7 Interférence à l'ARN de p53

Les HIESC ont étéensemencées dans des plaques de 6 puits à la densité requise pour atteindre environ 80 % de confluence après 24 heures. La séquence nucléotidique pour l'interférence à l'ARN de p53 (5'-GUAAUCUACUGGACGGAATT-3') ou la séquence contrôle négatif ne ciblant aucun gène (5'-GAAAUUUGCGUGUGGAGUATT-3'), ont été ajoutées aux cellules en utilisant un

rapport de 1:2 μL , siRNA: Lipofectamine 2000 (μg : μl / puits). Tous les siRNA sont d'Ambion. Après 24 heures de transfection, le milieu a été remplacé et les cellules ont été incubées dans du milieu RPMI-1640 contenant 50 $\mu\text{g/ml}$ de gentamycine et 10 % de sérum bovin fœtal, pendant de 24 h à 37 °C. Ensuite, les cellules ont été soumises à décidualisation *in vitro* tel que décrit ci-dessus.

3.8 Analyses statistiques

Les résultats ont été soumis au test T bilatéral avec une confiance d'intervalle de 95 % et une valeur de p de moins de 0,05 était considérée comme statistiquement significative (PRISM software version 5.00; GraphPad, San Diego, CA, USA). L'analyse des différents jours de décidualisation s'est faite en les comparant individuellement. En aucun cas, les différents jours, soit 1, 3 et 6, ont été comparés entre eux.

CHAPITRE IV

RÉSULTATS

4.1 Validation du modèle

4.1.1 Suivi des changements morphologiques

La validation du modèle cellulaire suite au traitement de décidualisation *in vitro* des HIESC a débuté par l'observation des changements morphologiques caractéristiques de la décidualisation. Ces derniers consistent en une transformation de l'allure fibroblastique (aspect fusiforme, avec de très longs et minces prolongements, et formant de rares contacts focaux) vers le phénotype épithélial (de forme cubique ou prismatique, donc moins longues et plus larges que les cellules fibroblastiques, et formant de très nombreux contacts focaux à l'état de confluence). Les résultats illustrés à la figure 4.1 montrent qu'il est possible de voir ces changements caractéristiques dès le jour 1 du traitement, mais qu'ils sont plus prononcés et fréquents à partir du jour 3 de la décidualisation.

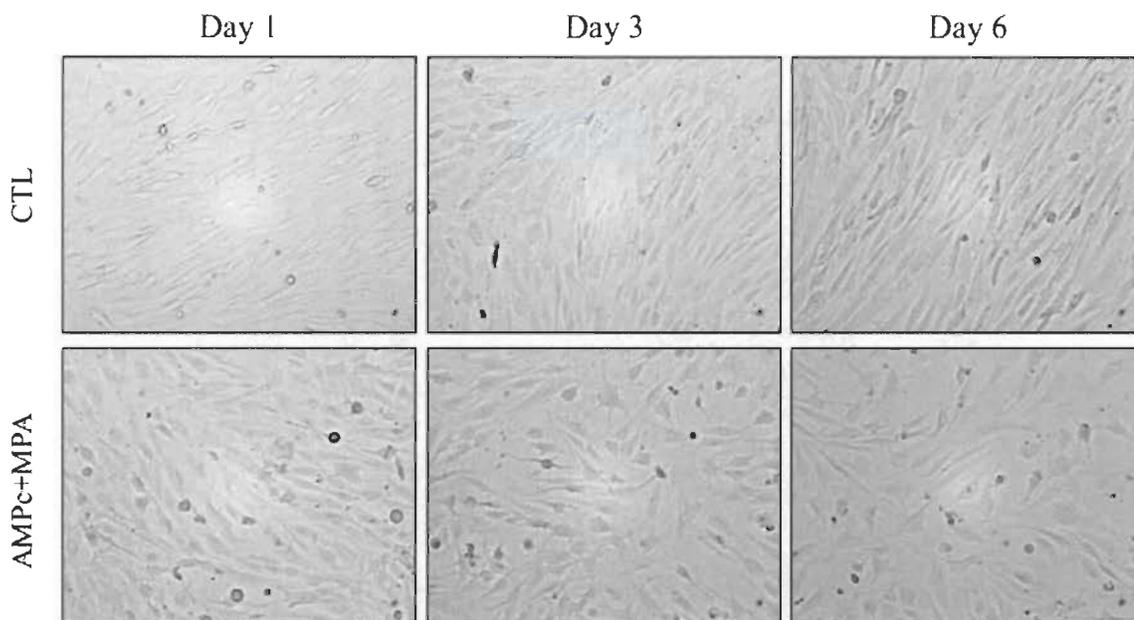


Figure 4.1 Changements morphologiques des HIESC aux jours 1, 3 et 6 de la décidalisation *in vitro*, tels qu'observés par microscopie de contraste de phase. Grossissement : 400X.

4.1.2 Analyse des marqueurs biochimiques

Les quantités de prolactine déciduale sécrétée et de protéine FoxO1, deux marqueurs très bien connus de la décidalisation (voir sous-section 1.3.2), ont été mesurées suite au traitement de décidalisation. À l'aide d'un test EIA, nous avons pu observer une augmentation des niveaux de prolactine sécrétée dans les surnageants des cellules déciduales et ce, dès le jour 3 de la décidalisation (Figure 4.2).

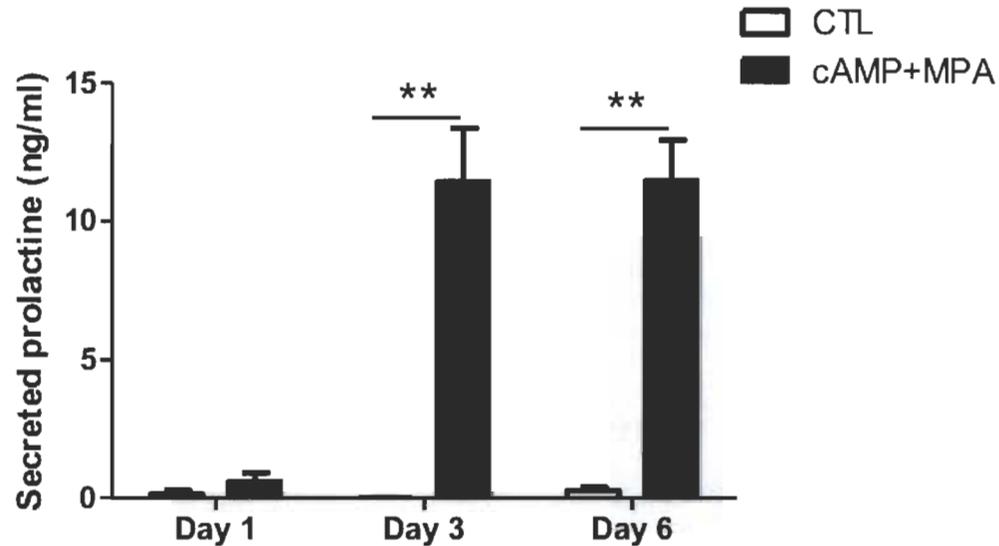


Figure 4.2 Analyse de la prolactine sécrétée dans le surnageant des cellules HIESC soumises à la décidualisation *in vitro* pendant 1, 3 et 6 jours, par EIA (Cayman).
Les résultats sont une moyenne +/- écart type de trois expériences indépendantes, réalisées en duplicatas.

De même, des immunobuvardages de type western ont révélé une augmentation significative des niveaux protéiques de FoxO1, dès le jour 3 de la décidualisation (Figure 4.3). L'augmentation de ces deux marqueurs nous a permis de conclure que la décidualisation *in vitro* de nos cellules HIECS était réalisée avec succès dans nos conditions expérimentales. Pour la majorité des traitements de décidualisation qui ont suivi, nous avons continué de vérifier si l'augmentation de la quantité de protéine FOXO1 était significative afin de s'assurer de la validité et de la reproductibilité de notre modèle au fil de l'étude. Nous avons choisi pour alléger la présente section du mémoire, de ne pas montrer systématiquement les résultats de ces tests contrôle.

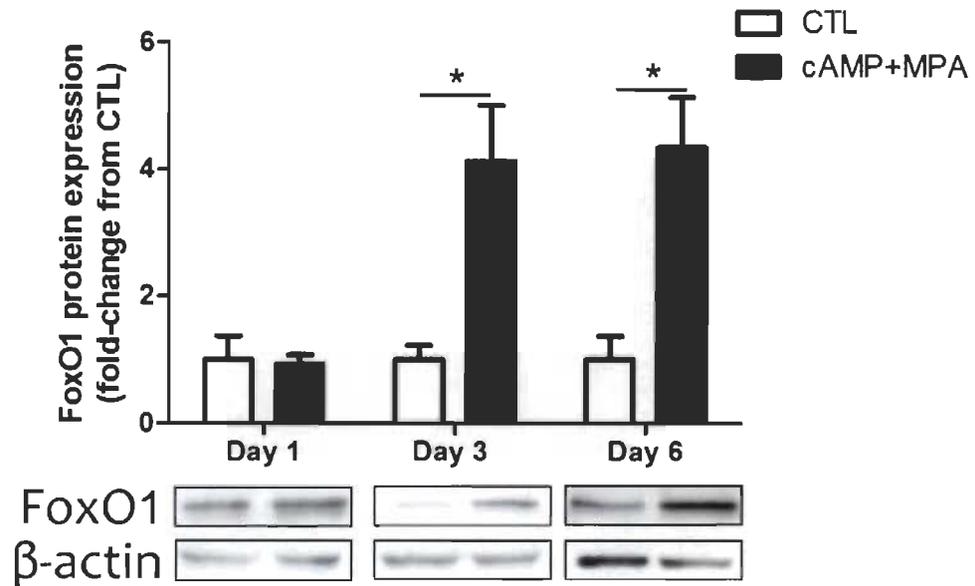


Figure 4.3 Analyse des niveaux protéiques de FoxO1 dans les cellules HIESC aux jours 1, 3 et 6 de la décidualisation *in vitro*, par immunobuvardage de type western.

Les résultats sont une moyenne +/- écart type de trois expériences indépendantes et les blots montrés sont représentatifs de chaque condition expérimentale.

La prolifération des HIESCs en décidualisation, dès le début du processus, a été évaluée par le test MTT. Tel qu'attendu (Pohnke *et al.*, 2004), nous avons observé une diminution significative de la prolifération cellulaire pendant la décidualisation (Figure 4.4).

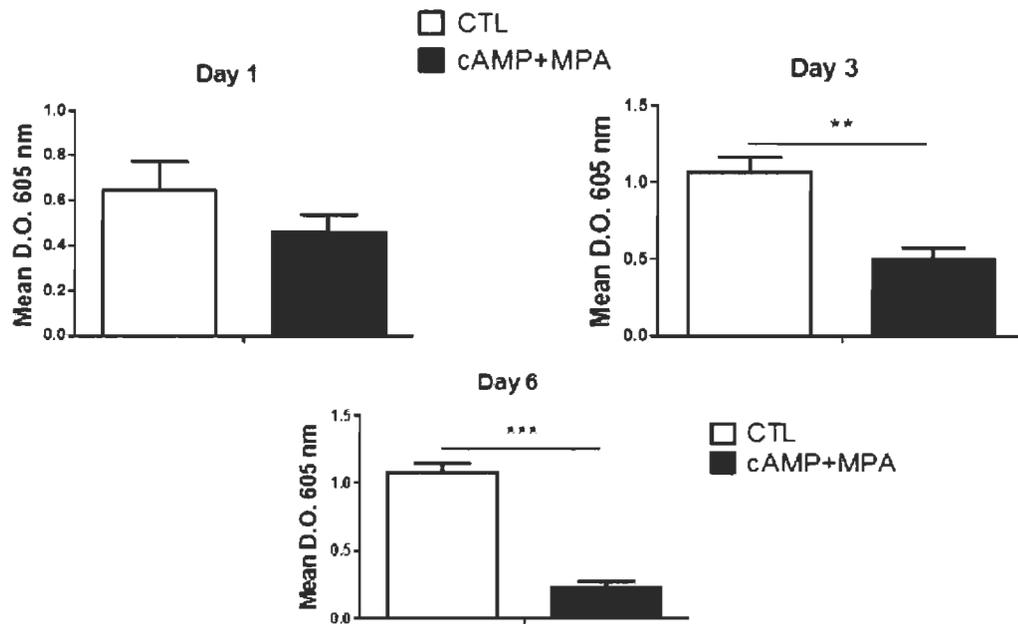


Figure 4.4 Analyse de la prolifération des HIESC aux jours 1, 3 et 6 suite au traitement *in vitro* de décidualisation, par le test MTT. Les résultats sont une moyenne de quadruplicata +/- écart type de quatre expériences indépendantes.

Collectivement, les résultats présentés dans les figures 4.1 à 4.4 montrent que dans nos conditions expérimentales, les cellules endométriales HIESC décidualisent correctement et représentent un bon modèle pour l'étude de p53 pendant la décidualisation.

4.2 La protéine p53 durant la décidualisation

4.2.1 Régulation de l'expression de p53 pendant la décidualisation

Nous avons d'abord observé une augmentation de la quantité totale de protéine p53 dans les HIESC au fil de la décidualisation, tel que déjà rapporté antérieurement (Pohnke *et al.*, 2004); toutefois, pour la première fois nous montrons que cette accumulation survient dès le 3^e jour de la décidualisation (Figure 4.5).

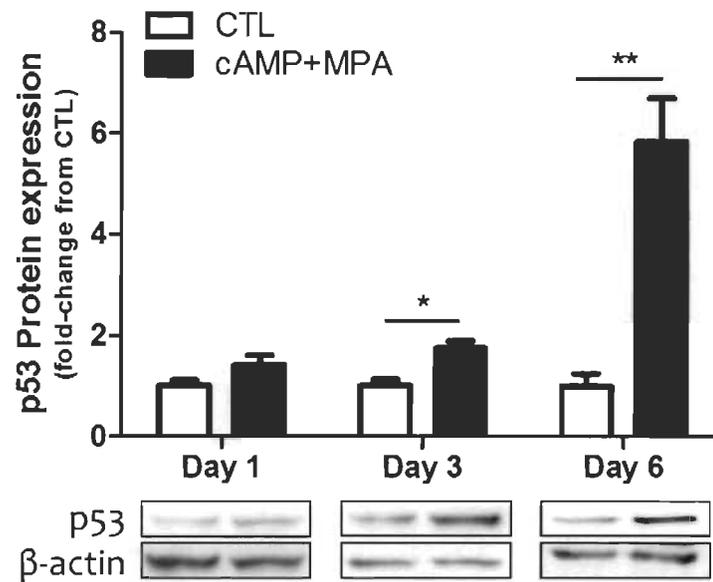


Figure 4.5 Analyse des niveaux protéiques de p53 par immunobuvardage de type western dans les HI ESCs aux jours 1, 3 et 6 suite au traitement *in vitro* de décidalisation.

Les résultats sont une moyenne +/- écart type de six expériences indépendantes et les blots montrés sont représentatifs de chaque condition expérimentale.

L'accumulation de la protéine p53 au 3^e jour de la décidalisation ne serait pas la conséquence d'une régulation au niveau transcriptionnel, parce qu'elle n'est pas précédée ni accompagnée, mais bien suivie par une augmentation significative de la quantité d'ARN de p53 (qui n'est mesurable qu'au jour 6 de la décidalisation) (Figure 4.6). Ce sont donc des mécanismes post-transcriptionnels qui peuvent être responsables de l'accumulation de la protéine p53 dans les HI ESC dès le 3^e jour de la décidalisation *in vitro*. Par contre, il apparaît qu'un mode de régulation transcriptionnelle est également présent, après une plus longue période de décidalisation.

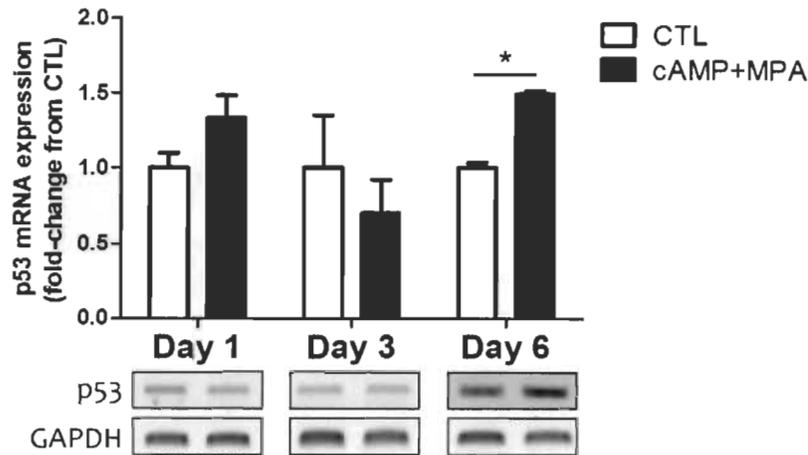


Figure 4.6 Analyse des niveaux expressionnels de p53 par RT-PCR dans les HIESC aux jours 1, 3 et 6 suite au traitement *in vitro* de décidualisation.

Les résultats sont une moyenne +/- écart type de quatre expériences indépendantes.

4.2.2 La localisation intracellulaire de p53 pendant la décidualisation

Nous avons analysé la localisation intracellulaire de la protéine p53 dans les HIESCs pendant la décidualisation, par un test biochimique de fractionnement cytoplasmique-nucléaire. Nous avons porté notre intérêt sur le 6^e jour de la décidualisation, qui était celui où se produisait l'augmentation la plus grande de la quantité de protéine de p53 dans notre modèle. Nous avons ainsi pu observer qu'il y avait une augmentation significative des niveaux protéiques de p53 dans la fraction cytosolique et dans la fraction nucléaire (Figure 4.7). Ceci est cohérent avec l'augmentation significative de la quantité totale de la protéine p53 observée dans les HIESCs après cette même période de 6 jours de décidualisation (Figure 4.5).

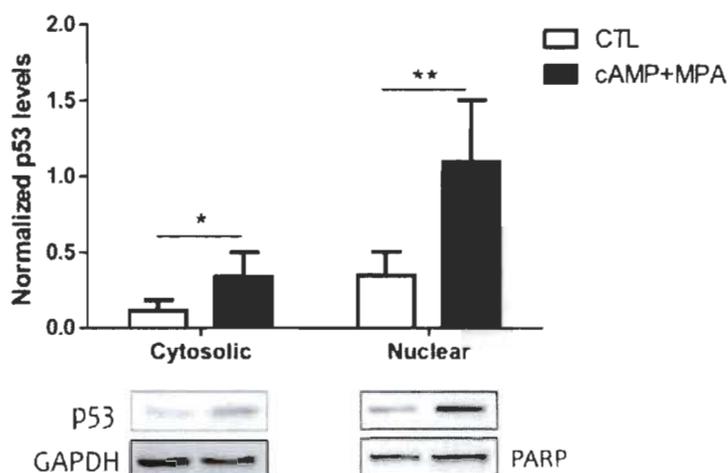


Figure 4.7 Analyse de la distribution intracellulaire de p53 au 6^e jour de la décidualisation des H1ESC, par fractionnement cytoplasmique nucléaire.

Un immunobuvardage de type Western a permis de mesurer la quantité de la protéine p53 dans chacune des fractions; les protéines GAPDH et PARP ont été mesurées pour fin d'analyse de pureté des fractions cytoplasmique et nucléaire respectivement (obtenues via une trousse commerciale de la compagnie Pierce), ainsi que pour la normalisation. Les résultats sont une moyenne \pm écart type de cinq expériences indépendantes et les blots montrés sont représentatifs de chaque condition expérimentale.

4.2.3 L'activité de p53 pendant la décidualisation : régulation de ses gènes cibles

Nous avons examiné la régulation de l'expression des principaux gènes cibles de p53, directs et indirects, soit p21, cycline B1 et MDM2, pendant le processus de décidualisation *in vitro* des H1ESC.

4.2.3.1 Le cas de p21

Nous avons découvert que les niveaux totaux de l'ARN messager de p21 dans les H1ESC, suite au traitement *in vitro* de décidualisation pendant 1, 3 et 6 jours, ne sont pas modulés significativement (Figure 4.8, portion de gauche); il en va de même pour les niveaux de la protéine p21 (Figure 4.8, portion de droite). Ce gène cible de p53 ne serait

donc pas induit par p53 dans les HIESC pendant la décidualisation, même si p53 semble maintenue dans des conditions actives pendant ce processus (Figures 4.11 à 4.14).

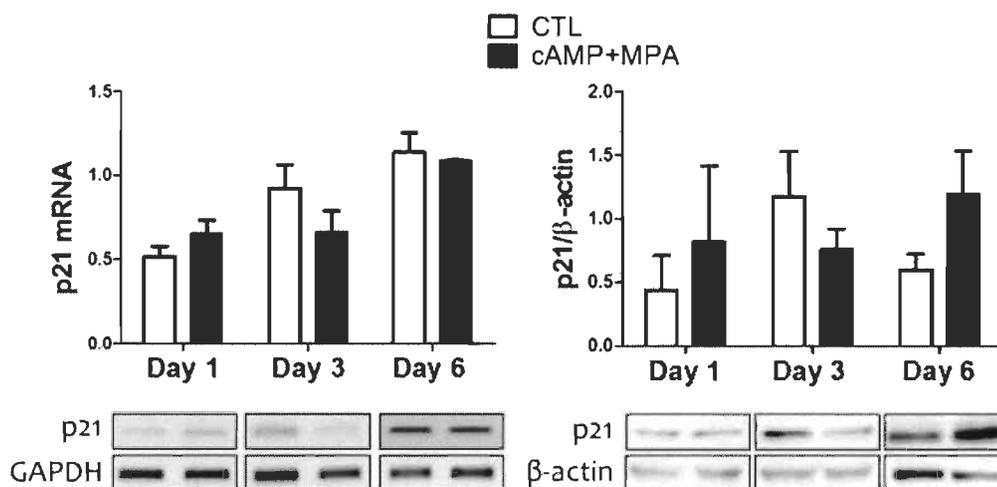


Figure 4.8 Analyse des niveaux transcriptionnels et protéiques de p21 aux jours 1, 3 et 6 suite au traitement *in vitro* de décidualisation.

Portion de gauche : analyse par RT-PCR. Portion de droite : analyse par immunobuvardage de type Western. Les résultats sont une moyenne \pm écart type de trois expériences indépendantes pour l'analyse des mRNA et six expériences indépendantes pour l'analyse protéique. Les blots montrés sont représentatifs de chaque condition expérimentale.

4.2.3.2 Le cas de Cycline B1

De la même façon que pour p21, les niveaux totaux de l'ARN messager de Cycline B1 dans les HIESC, suite au traitement *in vitro* de décidualisation pendant 1, 3 et 6 jours, ne sont pas modulés significativement (Figure 4.9, portion de gauche); il va de même pour les niveaux de la protéine (Figure 4.9, portion de droite). Ce gène cible de p53 ne serait donc pas réprimé par p53 dans les HIESC pendant la décidualisation, même si p53 semble maintenue dans des conditions actives pendant ce processus (Figures 4.11 à 4.14).

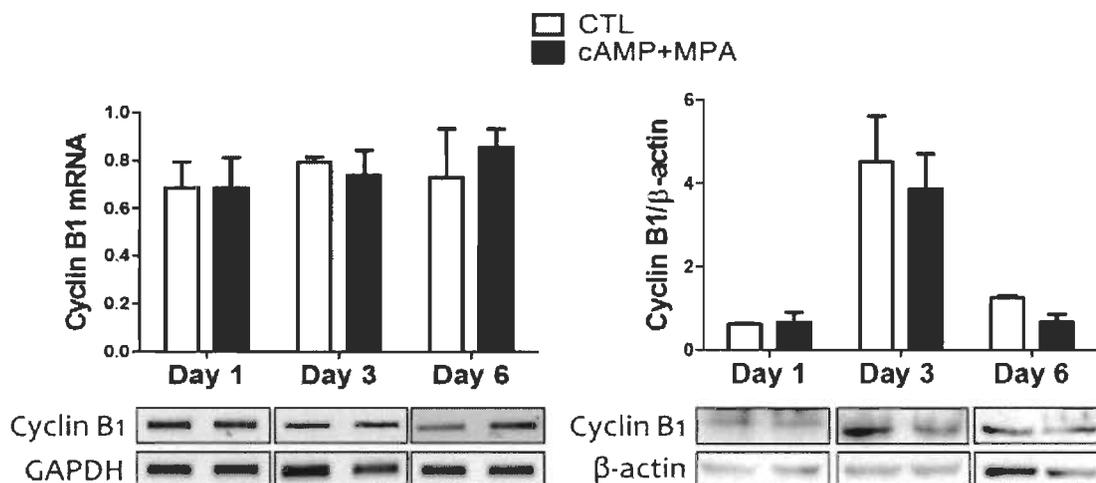


Figure 4.9 Analyse des niveaux transcriptionnels et protéiques de Cycline B1 aux jours 1, 3 et 6 suite au traitement *in vitro* de décidualisation. Portion de gauche : analyse par RT-PCR. Portion de droite : analyse par immunobuvardage de type Western. Les résultats sont une moyenne \pm écart type de trois expériences indépendantes et les blots montrés sont représentatifs de chaque condition expérimentale.

4.2.3.3 Le cas de MDM2

Nous avons détecté une variation significative de la quantité d'ARN messager de MDM2 dans les HIESC, au 3^e jour après le début de la décidualisation; au 6^e jour, cette augmentation n'était plus détectable (Figure 4.10, portion de gauche). Il est important de noter que cette diminution est contraire à l'action de p53, qui est un régulateur positif de l'expression de MDM2. De plus, les niveaux protéiques de MDM2 suite au traitement de *décidualisation in vitro* ne varient pas significativement (Figure 4.10, portion de droite); ensemble, les résultats de la figure 4.10 suggèrent que p53 n'active pas davantage l'expression de MDM2 pendant la décidualisation.

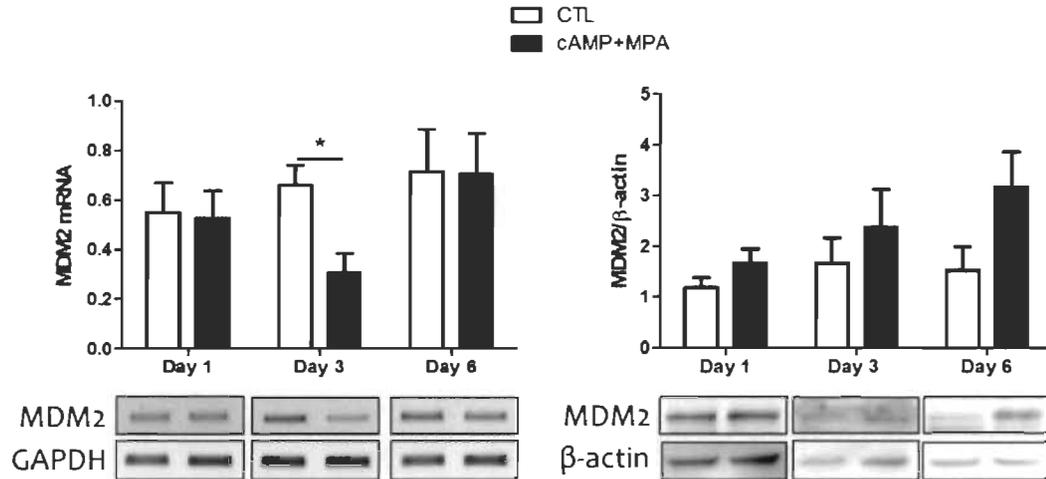


Figure 4.10 Analyse des niveaux transcriptionnels et protéiques de MDM2 aux jours 1, 3 et 6 suite au traitement *in vitro* de décidualisation.

Portion de gauche : analyse par RT-PCR. Portion de droite : analyse par immunobuvardage de type Western. Les résultats sont une moyenne \pm écart type de trois expériences indépendantes et les blots montrés sont représentatifs de chaque condition expérimentale.

Collectivement, tous ces résultats montrent que p53 ne serait pas active au niveau de ses gènes cibles p21 (Figure 4.8), cycline B1 (Figure 4.9) et MDM2 (Figure 4.10) pendant la décidualisation, bien qu'elle soit présente en plus grande quantité dans les cellules.

4.2.4 Les modifications post-traductionnelles de la protéine p53 pendant la décidualisation

Après avoir déterminé que p53 étaient régulée à la hausse dans les HIESC pendant la décidualisation, avec une accumulation préférentielle au niveau du noyau des cellules, nous avons investigué la présence de certaines modifications post-traductionnelles de la protéine p53, susceptibles d'expliquer ces observations parce qu'elles sont connues pour augmenter la stabilité ou encore, d'influencer la localisation intracellulaire et/ou l'état d'activation de p53. La phosphorylation de la protéine p53 sur sa sérine 15 est activatrice et il est possible de voir une augmentation significative des niveaux de

protéines p53 phosphorylée sur sérine 15 dès le 3^e jour de la décidualisation, qui est également maintenue au 6^e jour (Figure 4.11).

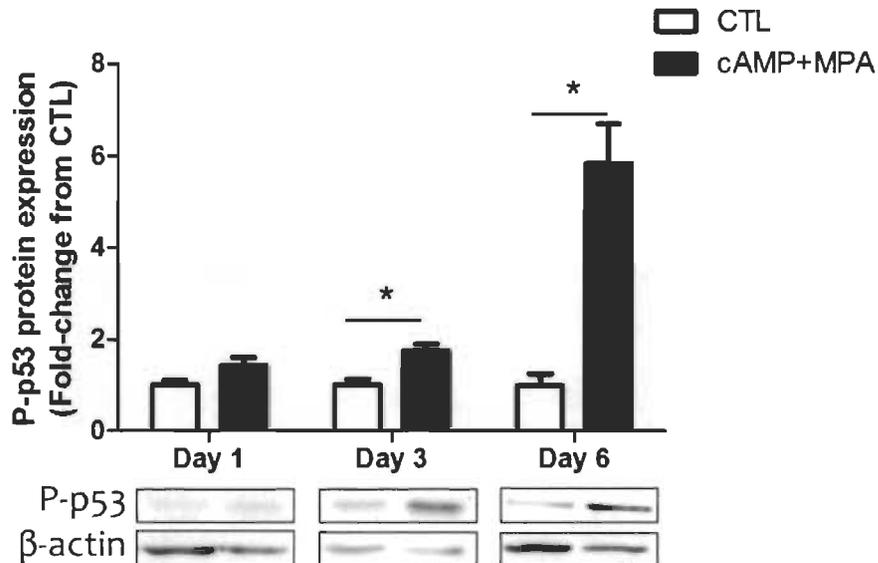


Figure 4.11 Analyse des niveaux protéiques de p53 phosphorylée sur la Sérine 15 par immunobuvardage de type western, aux jours 1, 3 et 6 suite au traitement *in vitro* de décidualisation.

Les résultats sont une moyenne \pm écart type de six expériences indépendantes et les blots montrés sont représentatifs de chaque condition expérimentale

Rapporter la quantité de protéine phosphorylée sur la quantité totale de protéine p53 nous permet d'observer qu'il n'y a pas de variation significative de la modulation du niveau de phosphorylation sur la sérine 15 pendant la décidualisation (Figure 4.12).

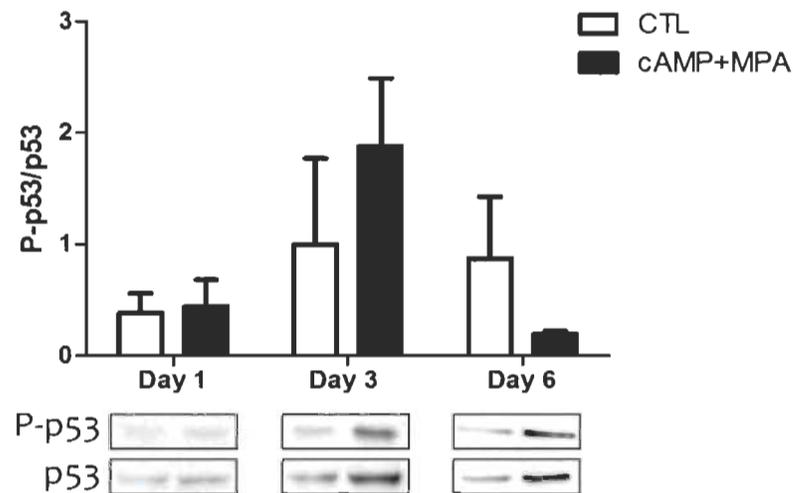


Figure 4.12 Analyse des ratios de p53 phosphorylée sur la Sérine 15 sur les niveaux de protéine totale, aux jours 1, 3 et 6 suite au traitement *in vitro* de décidualisation, par immunobuvardage de type Western. Les résultats sont une moyenne \pm écart type de six expériences indépendantes et les blots montrés sont représentatifs de chaque condition expérimentale.

L'acétylation de la lysine 382 de p53 augmente le potentiel d'activité de la protéine en plus de la stabiliser (Kruse & Gu, 2009). Il est possible de voir une augmentation significative des niveaux totaux de protéine p53 acétylée sur lysine-382 pendant la décidualisation. Ceci suggère que la stabilité et l'activité de p53 pourraient augmenter au cours de ce processus. Il est à noter que cette acétylation n'est significative qu'au jour 6 de la décidualisation (Figure 4.13).

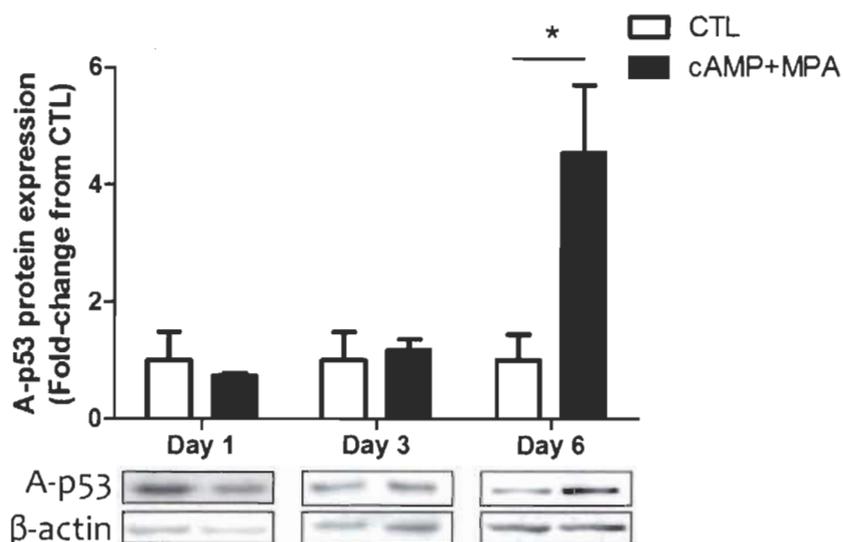


Figure 4.13 Analyse du ratio de la quantité de p53 acétylée sur la Lysine 382 sur les niveaux de protéine totale, aux jours 1, 3 et 6 suite au traitement *in vitro* de décidualisation.

Les résultats sont une moyenne \pm écart type de six expériences indépendantes et les blots montrés sont représentatifs de chaque condition expérimentale.

Rapporter la quantité de protéine acétylée sur la quantité totale de protéine p53 nous permet d'observer qu'il n'y a pas de variation significative de la modulation du niveau d'acétylation de p53 pendant la décidualisation (Figure 4.14) : il ne semble pas y avoir de facteur limitant et la quantité de protéine acétylée est donc proportionnelle à la quantité totale de p53 présente.

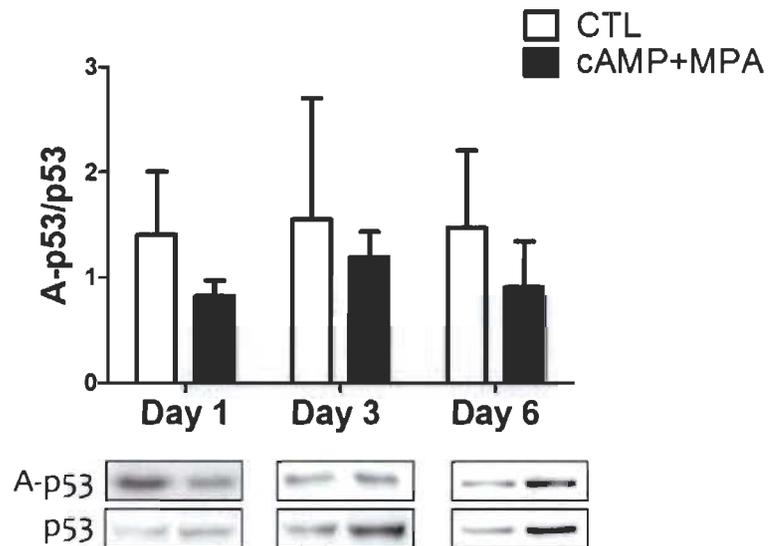


Figure 4.14 Analyse des niveaux protéiques de p53 acétylée sur la Lysine 382 aux jours 1, 3 et 6 suite au traitement *in vitro* de décidualisation. Les résultats sont une moyenne \pm écart type de six expériences indépendantes et les blots montrés sont représentatifs de chaque condition expérimentale.

Finalement, après avoir immunoprécipité la protéine p53 totale à partir des HIESC soumises à la décidualisation pendant 6 jours, des immunobuvardages de type western n'ont permis de détecter aucune forme ubiquitinée de p53 (Figure 4.15, portion de droite). En effet, les formes mono- et poly-ubiquitinées de p53 ont une taille supérieure à celle de la protéine totale non-ubiquitinée; ceci est dû à la taille de la molécule ubiquitine (8 kDa par monomère ajouté; pour un exemple, voir Kashuba *et al.*, 2011). Bien entendu, nous nous sommes assurés au cours de ces expérimentations d'avoir bien immunoprécipité la protéine p53, et ce, dans chaque condition expérimentale (Figure 4.15, portion de gauche). Ces résultats suggèrent que la protéine p53 n'est pas ubiquitinée dans les HIESC en réponse au stimulus de décidualisation.

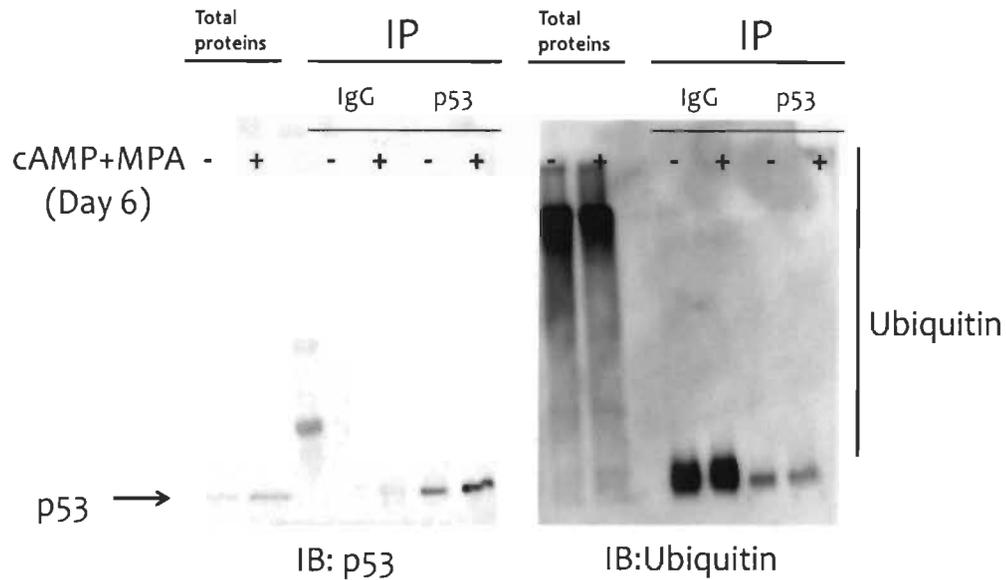


Figure 4.15 Analyse des niveaux protéiques de p53 ubiquitinée au jour 6 suite au traitement *in vitro* de décidalisation.

Dans la portion de gauche de la figure, un anticorps anti-p53 a été utilisé pour la détection (immunoblot, IB) et dans la portion de droite, un anti-ubiquitine a été utilisé. Total proteins : Lyse cellulaire totale; IgG et p53 : contrôle isotypique ou anti-p53 utilisés pour l'immunoprécipitation.

4.3 Contribution de la voie du récepteur à la progestérone dans la régulation de p53 pendant la décidalisation

Une étude antérieure (Pohnke *et al.*, 2004) avait déjà suggéré que l'augmentation de la quantité totale de p53 dans les cellules endométriales stromales pendant la décidalisation pouvait être médiée par la voie de la PKA (qui dans l'utérus normal est activée en réponse à l'augmentation de la quantité d'AMPc par l'estradiol). Mais puisque l'exposition à la progestérone sensibilise les cellules endométriales à l'action de l'estrogène médiée par la PKA (Telgmann *et al.*, 1997), nous avons examiné si l'accumulation de p53 dans les HIESC pendant la décidalisation était également dépendante de la progestérone. À cette fin, nous avons traité les cellules avec un inhibiteur pharmacologique du récepteur à la progestérone, le RU486, avant d'initier la décidalisation *in vitro* des cellules pendant 6 jours.

4.3.1 Validation de l'efficacité de l'inhibition pharmacologique

Nous avons mesuré les niveaux protéiques de FoxO1, étant donné que ce dernier est un marqueur de décidualisation et que son expression est progestérone-dépendante (Labied *et al.*, 2006) (Figure 4.16). Nous pouvons toujours observer une augmentation significative de la protéine FoxO1 suite au traitement de décidualisation, tel qu'attendu, lorsque les cellules recevaient en co-traitement une solution contrôle (CTL; diluant du RU486). Par contre, lorsque les cellules étaient co-traitées avec le RU486, les niveaux de la protéine FoxO1 n'étaient pas augmentés significativement par la décidualisation : ceci confirme que le traitement avec cet inhibiteur a efficacement inhibé l'induction progestérone-dépendante de la décidualisation.

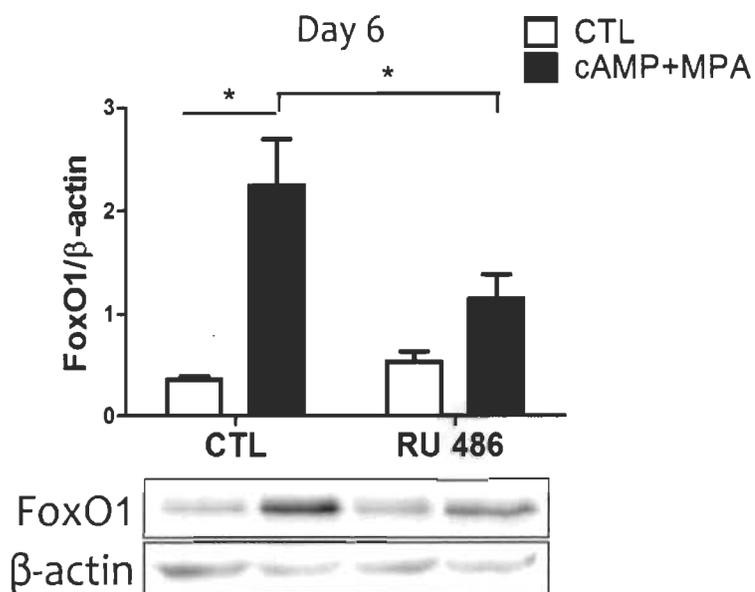


Figure 4.16 Analyse des niveaux protéiques de FoxO1 au jour 6 suite au traitement *in vitro* de décidualisation (CTL) et en combinaison avec la Mifepristone (RU486).

Les résultats sont des moyennes \pm écart type de cinq expériences indépendantes, les blots montrés sont représentatifs de chaque condition expérimentale.

4.3.2 Mesure de l'impact du traitement avec le RU486 sur p53

Nous avons découvert que bloquer la voie de la progestérone à l'aide du RU486 n'a aucun impact significatif sur la quantité totale de protéine p53 dans les HIESC pendant 6 jours de décidualisation (Figure 4.17); ceci indique clairement que l'accumulation de p53 observée est indépendante de la voie de la progestérone.

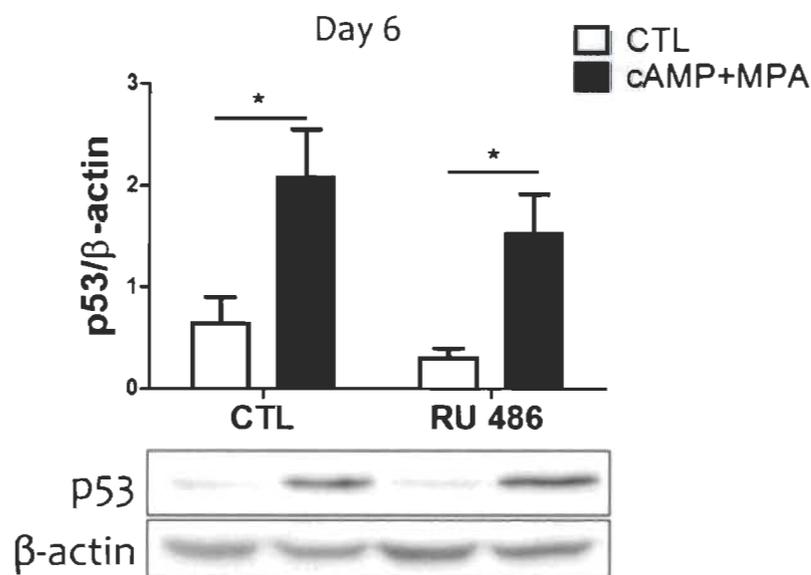


Figure 4.17 Analyse des niveaux protéiques de p53 au jour 6 suite au traitement *in vitro* de décidualisation (CTL) et en combinaison avec la Mifepristone (RU486).

Les résultats sont des moyennes \pm écart type de cinq expériences indépendantes, les blots montrés sont représentatifs de chaque condition expérimentale.

4.4 Interférence à l'ARN de p53

Enfin, dans le but d'évaluer le rôle de l'accumulation de la protéine p53 dans les HIESC pendant la décidualisation, nous avons débuté des expériences d'interférence à l'ARN de p53. Pour l'instant, nous en sommes à l'optimisation de cette approche et lorsque ce sera complété et que la répression de l'expression de p53 dans les HIESC sera satisfaisante, nous soumettrons les cellules pré-traitées avec le siRNA de p53 à la

décidualisation in vitro et mesurerons l'impact sur divers processus biologiques impliqués, dont la prolifération, la survie ainsi que la différenciation cellulaire.

La figure 4.18 montre que tel qu'attendu, les niveaux de protéiques de p53 sont augmentés après 6 jours de décidualisation lorsque les cellules ont d'abord été pré-traitées avec un ARN d'interférence non-spécifique (siRNA CTL). Il est aussi observable que les niveaux protéiques de p53 détectables dans les cellules après 6 jours de décidualisation sont significativement inférieurs lorsque les cellules sont soumises à l'interférence à l'ARN de p53. Cependant, dans nos conditions expérimentales actuelles le stimulus de décidualisation réussit à augmenter significativement la quantité totale de p53 dans les HIESC, même après interférence à l'ARN de p53. Nous souhaitons optimiser notre procédure d'interférence à l'ARN avant de poursuivre cette série d'expériences.

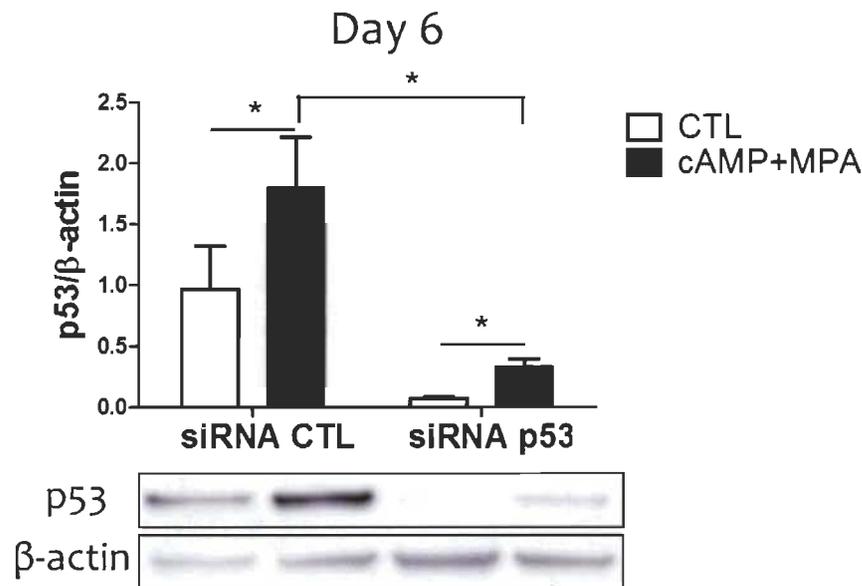


Figure 4.18 Analyse des niveaux protéiques de p53 au jour 6 suite au traitement *in vitro* de décidualisation, après traitement des cellules avec un petit ARN contrôle (siRNA CTL) ou un petit ARN spécifique à p53 (siRNA p53).

Les résultats sont des moyennes \pm écart type de quatre expériences indépendantes et les blots montrés sont représentatifs de chaque condition expérimentale.

CHAPITRE V

DISCUSSION

L'infertilité féminine est un problème récurrent dans la société actuelle, qui touche près de 10 % des femmes (Bushnik, Cook, Yuzpe, Tough, & Collins, 2012). L'absence de conception, échelonnée sur une année, dépend de plusieurs facteurs tels que décrits dans le premier chapitre de ce mémoire. De plus, des polymorphismes nucléotidiques répertoriés dans le gène encodant p53 sont impliqués dans une proportion des cas d'infertilité chez la femme. Ils ont un impact sur la fonction de la protéine p53 qui a un rôle important dans la reproduction féminine (Kang *et al.*, 2009).

Dans le maintien de la fertilité, le processus de la décidualisation est important étant donné son rôle chevauchant et excédant la période de l'implantation de l'embryon dans l'endomètre. Durant la décidualisation, plusieurs voies de signalisation intracellulaires sont activées et parmi les facteurs intracellulaires susceptibles de jouer un rôle essentiel à la complétion avec succès de la décidualisation se trouve la protéine p53. En effet, cette dernière assurerait l'achèvement de la décidualisation et permettrait la poursuite à terme de la grossesse, tel que décrit par Hu *et al.* (2007). Cette protéine a déjà fait l'objet de nombreuses investigations dans le contexte des pathologies féminines (cancer du sein et de l'ovaire, endométriose); par contre, sa régulation et son rôle dans le stroma endométrial, aux diverses étapes de la préparation et de la grossesse ne sont pas bien comprises pour l'instant.

Certaines études, quoique peu nombreuses, se sont penchées sur le sujet de la protéine p53. Toutefois, ces dernières ont seulement considéré les événements tardifs de la décidualisation et ne se sont que peu penchées sur les rôles précis de la protéine p53 dans ce contexte. Les expérimentations effectuées au cours de ma maîtrise avaient pour but d'investiguer la régulation et le rôle de la protéine p53, plus précisément, dans les cellules endométriales stromales, dans le contexte de la décidualisation. Ainsi, l'analyse

semi-quantitative de l'expression des protéines p53 en conjonction avec ses gènes cibles, en parallèle avec la caractérisation de modifications post-traductionnelles clés de la protéine p53, ont permis d'évaluer la régulation de son expression, son degré de stabilité et d'activation et son activité de facteur de transcription. Enfin, nous avons évalué le rôle de messagers chimiques impliqués dans la décidualisation en tant que régulateurs potentiels de la protéine p53.

Nous avons dans un premier temps validé notre modèle cellulaire. Nous avons ainsi pu observer chez les HIESC soumises au stimulus de décidualisation *in vitro*, les changements morphologiques caractéristiques attendus. Les cellules acquéraient en effet un aspect de plus en plus épithélial, suite au traitement *in vitro* de décidualisation, tel que décrit par Chapdelaine *et al.* (2006). Par la suite, nous avons observé que les niveaux de prolactine déciduale sécrétée durant le processus étaient augmentés, en accord avec la littérature (Devi & Halperin, 2014); en parallèle, les niveaux d'expression de la protéine FoxO1 étaient également augmentés, tel que décrit par Buzzio *et al.* (2006). Finalement, les résultats montrent que les cellules en décidualisation subissent une diminution de la prolifération cellulaire, tel que déjà rapporté dans un modèle similaire (Pohnke *et al.*, 2004). En effet, la différenciation des cellules est généralement associée avec un arrêt prolifératif (revu par (Cha *et al.*, 2012)). Il est important de noter que nous sommes les premiers à pouvoir préciser que l'augmentation de la quantité des marqueurs FoxO1 et prolactine sécrétée, ainsi que la diminution de la prolifération cellulaire, surviennent dès le 3^e jour de la décidualisation *in vitro*.

Globalement, les données morphologiques, expressionnelles des marqueurs et biologiques que nous avons accumulées nous permettaient de conclure que nous réalisons avec succès la décidualisation des HIESC *in vitro*. Ce modèle a donc pu être utilisé pour l'étude de p53 dans le contexte de la décidualisation.

Nous avons observé que la quantité de la protéine p53 était augmentée au fil du processus de la décidualisation. L'analyse statistique montre que cette augmentation est maximale au jour 6 de la décidualisation, tout en étant significative dès le jour 3.

Une autre équipe, qui utilisait un modèle de décidualisation similaire au nôtre (cellules endométriales stromales humaines primaires, traitées avec une combinaison d'AMPc et de progestérone), a déjà montré que la protéine p53 s'accumulait dans les cellules endométriales stromales, et ce, à partir du jour 6 de la décidualisation (Pohnke *et al.*, 2004); toutefois, cette étude n'a investigué la régulation de p53 qu'au niveau du noyau des cellules. De plus, le protocole de décidualisation utilisé était quelque peu différent du nôtre, parce qu'au lieu d'utiliser le MPA ils utilisaient de la progestérone. Enfin, cette équipe n'a pas investigué si la décidualisation *in vitro* avait un impact sur p53 dans les jours qui précèdent le 6^e jour (même s'ils ont analysé l'influence d'un traitement avec de l'AMPc seul, pendant de plus courts et plus longs temps d'exposition). Nous sommes donc les premiers à démontrer que l'accumulation de p53 en réponse au traitement complet d'AMPc et progestérone débute dès le 3^e jour des traitements.

Dans l'étude citée plus haut (Pohnke *et al.*, 2004), l'analyse de la régulation transcriptionnelle de p53 dans les cellules endométriales stromales avait été limitée à l'étude de l'exposition à l'AMPc, pendant 6 jours ou plus. Nous avons investigué plus en détail la cinétique de l'expression génique de p53 en réponse au stimulus complet de décidualisation (AMPc + progestérone) et ce, dès le 1^{er} jour des traitements. Nos résultats montrent, pour la première fois, que la quantité de l'ARN messenger de p53 est augmentée significativement par le traitement combiné de décidualisation, ce qui confirme une régulation transcriptionnelle de p53 dans ce modèle. Il est important de noter que cette augmentation n'est pas significative aux jours 1 et 3 du traitement, mais seulement au sixième jour. Considérant que la protéine p53 s'accumule après trois jours dans ces conditions expérimentales, ceci indique que l'accumulation de la protéine p53 dans les cellules endométriales stromales durant la décidualisation n'est d'abord pas transcriptionnelle. Toutefois, la régulation à la hausse par voie transcriptionnelle qui survient plus tardivement pourrait être importante pour renforcer l'accumulation de p53 dans les HIESC.

Nous avons pu observer que la protéine p53 s'accumule dans le noyau et dans le cytosol des HIESC en réponse à un stimulus complet de décidualisation. Ceci suggère

que p53 pourrait remplir une fonction dans les deux compartiments de la cellule pendant la décidualisation, possiblement dans des processus biologiques différents. En effet, d'une manière générale le rôle de régulateur du cycle cellulaire et de la différenciation cellulaire de p53 s'exerce via son activité de régulation de l'expression génique dans le compartiment nucléaire, alors que le rôle pro-apoptotique de p53 s'exerce dans le cytoplasme et plus précisément, au niveau des mitochondries (Kusio-Kobialka *et al.*, 2012). Nos données ne peuvent être comparées qu'avec les données d'une seule autre étude qui avaient montré que l'exposition à de l'AMPc seul pendant 6 jours augmentait la quantité de la protéine p53 dans des extraits nucléaires de cellules endométriales stromales humaines (Pohnke *et al.*, 2004). Dans cette étude, la variation de p53 dans le cytosol des cellules n'a pas été investiguée. Il est important de souligner que dans notre modèle complet de décidualisation, l'augmentation de la protéine p53 dans le noyau n'est pas différente de celle survenant dans le cytosol. Dans la figure 4.7, il est possible de voir des augmentations significatives dans les deux compartiments cellulaires. Toutefois, lors de l'analyse des rapports au contrôle, il n'y a pas de différence significative entre le cytosol et le noyau. Ceci suggère que la fonction de p53, encore inconnue, pourrait se produire dans l'un ou l'autre des compartiments pendant le processus de décidualisation. Théoriquement, une migration préférentielle de p53 vers le noyau cellulaire, auquel on s'attendait, aurait pu être causée par une diminution de la mono-ubiquitination de p53 par MDM2 (Honda *et al.*, 1997). À cet égard, nous avons justement observé une diminution de l'expression de MDM2 au jour 3 de la décidualisation. Même si cet effet était transitoire, parce que l'expression de MDM2 n'était plus modulée au jour 6 de la décidualisation, une diminution de la quantité de MDM2 au jour 3 pourrait entraîner une diminution de la mono-ubiquitination de p53 et freiner son export vers le cytosol dans les jours qui suivent.

Globalement, le profil de localisation intracellulaire de p53 suggère que pendant la décidualisation des HIESC, p53 pourrait voir son activité transcriptionnelle favorisée, de façon à exercer un contrôle du cycle cellulaire et/ou de la différenciation cellulaire. En ce sens, notre observation générale que la prolifération des HIESC était diminuée dans notre modèle de décidualisation *in vitro* est cohérente avec une augmentation de

l'inhibition du cycle cellulaire par p53. Nous avons donc investigué si certains gènes cibles de p53, réputés pour jouer un rôle dans le contrôle du cycle cellulaire, étaient modulés pendant la décidualisation.

p21 et Cycline B1 sont les principaux gènes liés au cycle cellulaire que nous avons étudiés. Dans les deux cas, l'analyse des niveaux d'ARNm ainsi que des niveaux protéiques a montré une absence de modulation d'expression après 6 jours de décidualisation complète. Ceci est en accord avec une étude préalable montrant que la quantité de protéine p21 était invariable dans le noyau des HIESC traitées avec de l'AMPc seul (Pohnke *et al.*, 2004). L'ensemble de nos résultats suggère que même si p53 s'accumule dans le noyau des HIESC pendant la décidualisation, il n'affecte pas le cycle cellulaire de manière p21- ou cycline B1-dépendante (s'il l'affecte). Et puisque p21 est également connu pour son rôle dans la différenciation cellulaire (Parker *et al.*, 1995), le fait qu'il ne soit pas modulé pendant la décidualisation des HIESC, malgré le changement morphologique évident des cellules vers le phénotype décidual, suggère que p53 n'influence pas la différenciation cellulaire de manière p21-dépendante (s'il l'influence). Le rôle de p53 dans le contrôle du cycle cellulaire et de l'apoptose pendant la décidualisation pourra être également étudié par la stratégie d'interférence à l'ARN de p53, que nous optimisons actuellement tel que décrit plus haut.

Les résultats pré-cités (absence de modulation de deux gènes-cibles de p53, p21 et cycline B1, durant la décidualisation) suggèrent en outre que l'activité de p53 n'est pas modulée pendant ce processus, bien que sa quantité totale augmente. Nous avons vérifié la régulation de l'expression d'un autre gène cible de p53, pour confirmer cette hypothèse : nos résultats ont montré que la quantité du transcrit et de la protéine MDM2 ne variaient pas de façon p53-dépendante pendant la décidualisation, à l'instar de p21 et cycline B1. Si la protéine p53 qui s'accumule aux jours 3 et 6 de la décidualisation était active, il devrait au moins y avoir une augmentation, dans le même sens, de l'expression du gène de MDM2 à un stade ou un autre de la décidualisation (C. L. Brooks & Gu, 2006). Collectivement, nos résultats suggèrent donc fortement que la protéine p53 qui s'accumule dans les HIESC, dans le compartiment nucléaire préférentiellement, ne serait

pas active. L'analyse de la régulation de la protéine LIF, tel que discuté plus haut, est un autre marqueur que nous aurions pu utiliser pour déduire le niveau d'activité de p53 dans notre modèle. Nous avons choisi de ne pas le faire, jugeant que le cumul des autres marqueurs choisis (Prolactine, FoxO1, l'accumulation de p53) était suffisant.

Plusieurs modifications post-traductionnelles ont été recensées sur la protéine p53, dont certaines influencent l'état d'activation et la stabilité de la protéine. Nous avons donc investigué certaines de ces modifications post-traductionnelles, dont la phosphorylation sur sérine-15, l'acétylation sur lysine-382 et la poly-ubiquitination. Nous avons pu démontrer pour la première fois que les niveaux de phosphorylation de la sérine 15 de la protéine p53 sont augmentés significativement dès le jour 3 de la décidualisation. Cette modification est décrite dans la littérature comme étant activatrice (Kruse & Gu, 2009) et donc, une plus grande quantité de p53 phosphorylée sur sérine-15 dans la cellule pourrait être associée à une plus grande activité du facteur de transcription (ceci, si l'on considère cette seule modification; cependant, l'état d'activité d'une protéine est plutôt dicté par la combinaison des différentes modifications post-traductionnelles qu'elle cumule). Lorsque les niveaux de protéine p53 phosphorylée sur sérine-15 sont normalisés sur la quantité totale de protéine p53 toutefois, nous observons qu'il n'y a pas de différence entre le taux de phosphorylation sur sérine-15 de p53 avant et pendant la décidualisation. Ceci indique que la machinerie enzymatique responsable de la phosphorylation sur sérine-15 de p53 dans les HIESC ne subit pas de variation d'activité pendant la décidualisation et que la modulation du niveau de phosphorylation est constant. Il en va de même pour l'acétylation de la protéine p53 sur la lysine 382 : augmentation de la quantité totale de protéine p53 acétylée sur lysine-382 dans les cellules pendant la décidualisation, mais invariabilité du taux d'acétylation de la protéine avant et pendant la décidualisation. Parce que l'acétylation sur lysine-382 favorise la stabilité et l'activité de p53 (Christopher L. Brooks & Gu, 2003), une plus grande quantité totale de p53 acétylée sur lysine-382 pourrait théoriquement être associée à une plus grande activité et une plus grande activité de p53 (ceci, encore une fois, en ne considérant que cette modification post-traductionnelle unique). Enfin, nous n'avons pas été en mesure de détecter des formes ubiquitinées (mono- ou poly-ubiquitinées) de p53

dans les HIESC jusqu'à maintenant. Si ces résultats sont confirmés par des expériences subséquentes, incluant un contrôle positif d'ubiquitination (enrichi en p53 mono- et poly-ubiquitiné), nous pourrions conclure que la décidualisation n'induit pas la présence d'une quantité significative de protéine p53 mono- ou poly-ubiquitiné dans la HIESC. Ceci pourrait expliquer pourquoi p53 s'accumule dans les HIESC en décidualisation, et pourquoi elle le fait préférentiellement dans le compartiment nucléaire.

La progestérone est une hormone très importante pour l'induction de la décidualisation, tel que décrit dans le premier chapitre du présent mémoire. Nous avons évalué l'implication de la voie activée par cette molécule dans l'accumulation de la protéine p53 observée dans les HIESC pendant la décidualisation. L'inhibition pharmacologique du récepteur de la progestérone à l'aide du Mifepristone (RU486) a permis de conclure que l'accumulation de la protéine p53 durant la décidualisation était complètement indépendante de la voie de la progestérone. En même temps, ceci suggère que l'accumulation de p53 serait exclusivement dépendante de l'activation de la voie de la PKA suivie de l'accumulation de l'AMPc. Ceci serait en accord avec deux études précédentes de Pohnke *et al.* (2004) et Samalecos *et al.* (2009) qui ont montré que l'exposition de cellules endométriales stromales à de l'AMPc seul était suffisante pour induire une accumulation de p53, et ce, après 3 ou 4 jours de traitement.

En résumé, j'ai pu déterminer pendant ma maîtrise que : 1) p53 s'accumule plus rapidement que le montraient les études antérieures dans les cellules endométriales stromales en décidualisation; 2) cette accumulation se fait préférentiellement, mais pas exclusivement, dans le compartiment nucléaire des cellules; 3) cette accumulation est indépendante de la voie de la progestérone; 4) certaines modifications post-traductionnelles qui augmentent la stabilité et l'activité de p53 continuent de se produire après l'induction de la décidualisation *in vitro* des cellules endométriales stromales, avec une modulation de niveau invariable; 5) l'accumulation de p53 et ces modifications post-traductionnelles ne sont toutefois pas accompagnées d'une augmentation de l'expression de certains gènes cibles de p53 associés à sa stabilité ou à son rôle dans la différenciation et la prolifération cellulaire. Pour faire avancer encore davantage les

connaissances sur p53 dans le contexte de la décidualisation, plusieurs analyses sont envisagées : 1) Pour déterminer le rôle précis de p53 dans les cellules en décidualisation, la répression de l'expression de la protéine p53 au moyen de la technologie de l'interférence à l'ARN est une stratégie de choix. Nous avons débuté la mise au point de cette répression et nous compléterons l'optimisation du procédé avant d'évaluer de la répression de l'expression de p53 sur la prolifération cellulaire, l'apoptose et la différenciation des cellules endométriales stromales pendant la décidualisation. Si toutefois, la diminution de la protéine ne dépassait pas 75 %, ce qui s'avère être un taux minimal pour considérer les résultats, deux options sont possibles. La transfection de shRNAs, une méthode qui ressemble beaucoup à celle utilisée, mais qui est plus stable et offre un meilleur rendement. La technologie de CRISPR/Cas9 permet de modifier de plusieurs façons l'expression et la fonction de la protéine ciblée. Ainsi, plusieurs aspects de la régulation de la protéine pourraient être étudiés en même temps. 2) L'expression d'autres gènes cibles que p21, cycline B1 et MDM2 pourraient être mesurées pour mieux circonscrire le rôle de p53 dans le stroma endométrial pendant la décidualisation. Pour des analyses quantitatives, il serait approprié de procéder par PCR en temps réel plutôt que par RT-PCR conventionnel. 3) En parallèle, des immunoprécipitations de la chromatine pourraient permettre de confirmer la présence de p53 au niveau des promoteurs des gènes identifiés et leur régulation p53-dépendante. 4) Plusieurs modifications post-traductionnelles autres que celles que nous avons investiguées jusqu'à maintenant méritent d'être caractérisées, parce qu'elles pourraient contribuer à réguler l'état d'activation de p53 dans le cytoplasme et le noyau des cellules endométriales stromales en décidualisation. Par exemple, la protéine pourrait avoir subi certaines modifications post-traductionnelles la rendant inactive (Kruse & Gu, 2009) qui n'ont pas été étudiées dans le projet. 5) Pour vérifier si l'accumulation de p53 dans les cellules endométriales stromales pendant la décidualisation est PKA-dépendante, il serait facile de bloquer pharmacologiquement cette voie (en utilisant le H89 par exemple) et/ou de procéder à l'interférence à l'ARN de la PKA. 6) Pour consolider toutes ces nouvelles données, il serait impératif de déterminer si elles peuvent être reproduites dans une autre lignée de cellules endométriales stromales humaines (biopsies de l'endomètre (Arnold, Kaufman, Seppala, & Lessey, 2001), et/ou dans des cellules

endométrales stromales primaires, telles que les U_{III}, qui seront prélevées à partir d'utérus de rattes (Prigent-Tessier, Barkai, Tessier, Cohen, & Gibori, 2001). De cette façon, les résultats seront confirmés dans un modèle *in vivo*. Tous ces travaux de recherche permettront de mieux comprendre la dynamique au cœur de la décidualisation, plus précisément les événements entourant la protéine p53, d'identifier de nouveaux biomarqueurs (par exemple, certaines formes phosphorylées ou acétylées de la protéine) et enfin, apporter de nouvelles cibles thérapeutiques pour l'infertilité chez la femme.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abrao, M. S., Muzii, L., & Marana, R. (2013). Anatomical causes of female infertility and their management. *Int J Gynaecol Obstet*, *123 Suppl 2*, S18-24. doi:10.1016/j.ijgo.2013.09.008
- Arnold, J. T., Kaufman, D. G., Seppala, M., & Lessey, B. A. (2001). Endometrial stromal cells regulate epithelial cell growth in vitro: a new co-culture model. *Hum Reprod*, *16*(5), 836-845.
- Ashcroft, M., Kubbutat, M. H., & Vousden, K. H. (1999). Regulation of p53 function and stability by phosphorylation. *Mol Cell Biol*, *19*(3), 1751-1758.
- Bocchetta, M., Elias, S., De Marco, M. A., Rudzinski, J., Zhang, L., & Carbone, M. (2008). The SV40 large T antigen-p53 complexes bind and activate the insulin-like growth factor-I promoter stimulating cell growth. *Cancer Res*, *68*(4), 1022-1029. doi:10.1158/0008-5472.can-07-5203
- Brar, A. K., Frank, G. R., Kessler, C. A., Cedars, M. I., & Handwerger, S. (1997). Progesterone-dependent decidualization of the human endometrium is mediated by cAMP. *Endocrine*, *6*(3), 301-307. doi:10.1007/bf02820507
- Brar, A. K., Handwerger, S., Kessler, C. A., & Aronow, B. J. (2001). Gene induction and categorical reprogramming during in vitro human endometrial fibroblast decidualization. *Physiol Genomics*, *7*(2), 135-148. doi:10.1152/physiolgenomics.00061.2001
- Brooks, C. L., & Gu, W. (2003). Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation. *Current Opinion in Cell Biology*, *15*(2), 164-171. doi:10.1016/s0955-0674(03)00003-6
- Brooks, C. L., & Gu, W. (2006). p53 ubiquitination: Mdm2 and beyond. *Mol Cell*, *21*(3), 307-315. doi:10.1016/j.molcel.2006.01.020
- Brosens, J. J., Hayashi, N., & White, J. O. (1999). Progesterone receptor regulates decidual prolactin expression in differentiating human endometrial stromal cells. *Endocrinology*, *140*(10), 4809-4820. doi:10.1210/endo.140.10.7070
- Burton, J. L., & Wells, M. (1998). Recent advances in the histopathology and molecular pathology of carcinoma of the endometrium. *Histopathology*, *33*(4), 297-303.

- Bushnik, T., Cook, J. L., Yuzpe, A. A., Tough, S., & Collins, J. (2012). Estimating the prevalence of infertility in Canada. *Hum Reprod*, 27(3), 738-746. doi:10.1093/humrep/der465
- Buzzio, O. L., Lu, Z., Miller, C. D., Unterman, T. G., & Kim, J. J. (2006). FOXO1A differentially regulates genes of decidualization. *Endocrinology*, 147(8), 3870-3876. doi:10.1210/en.2006-0167
- Cha, J., Sun, X., & Dey, S. K. (2012). Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy. *Nat Med*, 18(12), 1754-1767. doi:10.1038/nm.3012
- Chapdelaine, P., Kang, J., Boucher-Kovalik, S., Caron, N., Tremblay, J. P., & Fortier, M. A. (2006). Decidualization and maintenance of a functional prostaglandin system in human endometrial cell lines following transformation with SV40 large T antigen. *Mol Hum Reprod*, 12(5), 309-319. doi:10.1093/molehr/gal034
- Chipuk, J. E., & Green, D. R. (2006). Dissecting p53-dependent apoptosis. *Cell Death Differ*, 13(6), 994-1002. doi:10.1038/sj.cdd.4401908
- Christian, M., Zhang, X., Schneider-Merck, T., Unterman, T. G., Gellersen, B., White, J. O., & Brosens, J. J. (2002). Cyclic AMP-induced forkhead transcription factor, FKHR, cooperates with CCAAT/enhancer-binding protein beta in differentiating human endometrial stromal cells. *J Biol Chem*, 277(23), 20825-20832. doi:10.1074/jbc.M201018200
- Crawford, L. (1983). The 53,000-dalton cellular protein and its role in transformation. *Int Rev Exp Pathol*, 25, 1-50.
- Das, R., & Vonderhaar, B. K. (1995). Transduction of prolactin's (PRL) growth signal through both long and short forms of the PRL receptor. *Mol Endocrinol*, 9(12), 1750-1759. doi:10.1210/mend.9.12.8614411
- DeLeo, A. B., Jay, G., Appella, E., Dubois, G. C., Law, L. W., & Old, L. J. (1979). Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(5), 2420-2424.
- Devi, Y. S., & Halperin, J. (2014). Reproductive actions of prolactin mediated through short and long receptor isoforms. *Mol Cell Endocrinol*, 382(1), 400-410. doi:10.1016/j.mce.2013.09.016
- Feng, Z., Zhang, C., Kang, H. J., Sun, Y., Wang, H., Naqvi, A., et al. (2011). Regulation of female reproduction by p53 and its family members. *FASEB J*, 25(7), 2245-2255. doi:10.1096/fj.10-180166

- Gu, W., & Roeder, R. G. (1997). Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell*, *90*(4), 595-606.
- Gu, Y., Jow, G. M., Moulton, B. C., Lee, C., Sensibar, J. A., Park-Sarge, O. K., *et al.* (1994). Apoptosis in decidual tissue regression and reorganization. *Endocrinology*, *135*(3), 1272-1279. doi:10.1210/endo.135.3.8070373
- Hirota, Y., Daikoku, T., Tranguch, S., Xie, H., Bradshaw, H. B., & Dey, S. K. (2010). Uterine-specific p53 deficiency confers premature uterine senescence and promotes preterm birth in mice. *J Clin Invest*, *120*(3), 803-815. doi:10.1172/jci40051
- Hollstein, M., & Hainaut, P. (2010). Massively regulated genes: the example of TP53. *J Pathol*, *220*(2), 164-173. doi:10.1002/path.2637
- Honda, R., Tanaka, H., & Yasuda, H. (1997). Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett*, *420*(1), 25-27.
- Horseman, N. D., Zhao, W., Montecino-Rodriguez, E., Tanaka, M., Nakashima, K., Engle, S. J., *et al.* (1997). Defective mammopoiesis, but normal hematopoiesis, in mice with a targeted disruption of the prolactin gene. *Embo j*, *16*(23), 6926-6935. doi:10.1093/emboj/16.23.6926
- Hu, W., Feng, Z., Atwal, G. S., & Levine, A. J. (2008). p53: a new player in reproduction. *Cell Cycle*, *7*(7), 848-852.
- Hu, W., Feng, Z., Teresky, A. K., & Levine, A. J. (2007). p53 regulates maternal reproduction through LIF. *Nature*, *450*(7170), 721-724. Retrieved from <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=mnh&AN=18046411&site=ehost-live>
- Hu, W., Zheng, T., & Wang, J. (2011). Regulation of Fertility by the p53 Family Members. *Genes Cancer*, *2*(4), 420-430. doi:10.1177/1947601911408892
- Hubbard, K., & Ozer, H. L. (1999). Mechanism of immortalization. *Age: The Official Journal of the American Aging Association, the American College of Clinical Gerontology & the International Association of Biomedical Gerontology*, *22*(2), 65-69. doi:10.1007/s11357-999-0008-1
- Jabbour, H. N., Critchley, H. O., Yu-Lee, L. Y., & Boddy, S. C. (1999). Localization of interferon regulatory factor-1 (IRF-1) in nonpregnant human endometrium: expression of IRF-1 is up-regulated by prolactin during the secretory phase of the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*, *84*(11), 4260-4265. doi:10.1210/jcem.84.11.6142

- Jones, R. L., Critchley, H. O., Brooks, J., Jabbour, H. N., & McNeilly, A. S. (1998). Localization and temporal expression of prolactin receptor in human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab*, *83*(1), 258-262. doi:10.1210/jcem.83.1.4506
- Kajihara, T., Brosens, J. J., & Ishihara, O. (2013). The role of FOXO1 in the decidual transformation of the endometrium and early pregnancy. *Med Mol Morphol*, *46*(2), 61-68. doi:10.1007/s00795-013-0018-z
- Kajihara, T., Jones, M., Fusi, L., Takano, M., Feroze-Zaidi, F., Pirianov, G., *et al.* (2006). Differential expression of FOXO1 and FOXO3a confers resistance to oxidative cell death upon endometrial decidualization. *Mol Endocrinol*, *20*(10), 2444-2455. doi:10.1210/me.2006-0118
- Kang, H. J., Feng, Z., Sun, Y., Atwal, G., Murphy, M. E., Rebbeck, T. R., *et al.* (2009). Single-nucleotide polymorphisms in the p53 pathway regulate fertility in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(24), 9761-9766. doi:10.1073/pnas.0904280106
- Kashuba, E., Yurchenko, M., Yenamandra, S. P., Snopok, B., Szekely, L., Bercovich, B., . . . Klein, G. (2011). Epstein-Barr virus-encoded EBNA-5 forms trimolecular protein complexes with MDM2 and p53 and inhibits the transactivating function of p53. *Int J Cancer*, *128*(4), 817-825. doi:10.1002/ijc.25414
- Kluwer, W. (Ed.) (2009). *Color Atlas of Histology* (Fifth ed.). United-states, Maryland: Lippincott Williams and Wilkins.
- Kress, M., May, E., Cassingena, R., & May, P. (1979). Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum. *J Virol*, *31*(2), 472-483.
- Kruse, J. P., & Gu, W. (2009). Modes of p53 regulation. *Cell*, *137*(4), 609-622. doi:10.1016/j.cell.2009.04.050
- Kusio-Kobialka, M., Wolanin, K., Podszywalow-Bartnicka, P., Sikora, E., Skowronek, K., McKenna, S. L., *et al.* (2012). Increased acetylation of lysine 317/320 of p53 caused by BCR-ABL protects from cytoplasmic translocation of p53 and mitochondria-dependent apoptosis in response to DNA damage. *Apoptosis*, *17*(9), 950-963. doi:10.1007/s10495-012-0739-9
- Labied, S., Kajihara, T., Madureira, P. A., Fusi, L., Jones, M. C., Higham, J. M., *et al.* (2006). Progestins regulate the expression and activity of the forkhead transcription factor FOXO1 in differentiating human endometrium. *Mol Endocrinol*, *20*(1), 35-44. doi:10.1210/me.2005-0275

- Lane, D. P., & Crawford, L. V. (1979). T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature*, 278(5701), 261-263.
- Levine, A. J. (1997). p53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division. *Cell*, 88(3), 323-331. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81871-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81871-1)
- Levine, A. J., Tomasini, R., McKeon, F. D., Mak, T. W., & Melino, G. (2011). The p53 family: guardians of maternal reproduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12(4), 259-265. doi:10.1038/nrm3086
- Linzer, D. I., & Levine, A. J. (1979). Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell*, 17(1), 43-52.
- Logan, P. C., Steiner, M., Ponnampalam, A. P., & Mitchell, M. D. (2012). Cell cycle regulation of human endometrial stromal cells during decidualization. *Reprod Sci*, 19(8), 883-894. doi:10.1177/1933719112438447
- Lowe, S. W., Cepero, E., & Evan, G. (2004). Intrinsic tumour suppression. *Nature*, 432(7015), 307-315. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nature03098>
- Luciano, A. A., Lanzone, A., & Goverde, A. J. (2013). Management of female infertility from hormonal causes. *Int J Gynaecol Obstet*, 123 Suppl 2, S9-17. doi:10.1016/j.ijgo.2013.09.007
- Lydon, J. P., DeMayo, F. J., Funk, C. R., Mani, S. K., Hughes, A. R., Montgomery, C. A., Jr., et al. (1995). Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev*, 9(18), 2266-2278.
- Ma, W. G., Song, H., Das, S. K., Paria, B. C., & Dey, S. K. (2003). Estrogen is a critical determinant that specifies the duration of the window of uterine receptivity for implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(5), 2963-2968. doi:10.1073/pnas.0530162100
- Meek, D. W. (1999). Mechanisms of switching on p53: a role for covalent modification? *Oncogene*, 18(53), 7666-7675. doi:10.1038/sj.onc.1202951
- Molchadsky, A., Shats, I., Goldfinger, N., Pevsner-Fischer, M., Olson, M., Rinon, A., et al. (2008). p53 Plays a Role in Mesenchymal Differentiation Programs, in a Cell Fate Dependent Manner. *PLoS One*, 3(11), e3707. doi:10.1371/journal.pone.0003707

- Okada, H., Nie, G., & Salamonsen, L. A. (2005). Requirement for Proprotein Convertase 5/6 during Decidualization of Human Endometrial Stromal Cells *in Vitro*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *90*(2), 1028-1034. doi:doi:10.1210/jc.2004-0904
- Ormandy, C. J., Camus, A., Barra, J., Damotte, D., Lucas, B., Buteau, H., *et al.* (1997). Null mutation of the prolactin receptor gene produces multiple reproductive defects in the mouse. *Genes Dev*, *11*(2), 167-178.
- Parker, S. B., Eichele, G., Zhang, P., Rawls, A., Sands, A. T., Bradley, A., *et al.* (1995). p53-independent expression of p21Cip1 in muscle and other terminally differentiating cells. *Science*, *267*(5200), 1024-1027.
- Pohnke, Y., Schneider-Merck, T., Fahnenstich, J., Kempf, R., Christian, M., Milde-Langosch, K., . . . Gellersen, B. (2004). Wild-type p53 protein is up-regulated upon cyclic adenosine monophosphate-induced differentiation of human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab*, *89*(10), 5233-5244. doi:10.1210/jc.2004-0012
- Prigent-Tessier, A., Barkai, U., Tessier, C., Cohen, H., & Gibori, G. (2001). Characterization of a rat uterine cell line, U(III) cells: prolactin (PRL) expression and endogenous regulation of PRL-dependent genes; estrogen receptor beta, alpha(2)-macroglobulin, and decidual PRL involving the Jak2 and Stat5 pathway. *Endocrinology*, *142*(3), 1242-1250. doi:10.1210/endo.142.3.8004
- Ramathal, C. Y., Bagchi, I. C., Taylor, R. N., & Bagchi, M. K. (2010). Endometrial decidualization: of mice and men. *Semin Reprod Med*, *28*(1), 17-26. doi:10.1055/s-0029-1242989
- Review Yu-Lee, L. Y. (1997). Molecular actions of prolactin in the immune system. *Proc Soc Exp Biol Med*, *215*(1), 35-52.
- Rodriguez, M. S., Desterro, J. M., Lain, S., Lane, D. P., & Hay, R. T. (2000). Multiple C-terminal lysine residues target p53 for ubiquitin-proteasome-mediated degradation. *Mol Cell Biol*, *20*(22), 8458-8467.
- Saha, T., Kar, R. K., & Sa, G. (2015). Structural and sequential context of p53: A review of experimental and theoretical evidence. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*(0). doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2014.12.002>
- Samalecos, A., Reimann, K., Wittmann, S., Schulte, H. M., Brosens, J. J., Bamberger, A. M., & Gellersen, B. (2009). Characterization of a novel telomerase-immortalized human endometrial stromal cell line, St-T1b. *Reprod Biol Endocrinol*, *7*, 76. doi:10.1186/1477-7827-7-76

- Seth, A., Gonzalez, F. A., Gupta, S., Raden, D. L., & Davis, R. J. (1992). Signal transduction within the nucleus by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 267(34), 24796-24804. Retrieved from <http://www.jbc.org/content/267/34/24796.full.pdf>
- Sheppard, H. M., Corneillie, S. I., Espiritu, C., Gatti, A., & Liu, X. (1999). New insights into the mechanism of inhibition of p53 by simian virus 40 large T antigen. *Mol Cell Biol*, 19(4), 2746-2753.
- Soussi, T., & Wiman, K. G. (2015). TP53: an oncogene in disguise. *Cell Death Differ*. doi:10.1038/cdd.2015.53
- Takano, M., Lu, Z., Goto, T., Fusi, L., Higham, J., Francis, J., *et al.* (2007). Transcriptional cross talk between the forkhead transcription factor forkhead box O1A and the progesterone receptor coordinates cell cycle regulation and differentiation in human endometrial stromal cells. *Mol Endocrinol*, 21(10), 2334-2349. doi:10.1210/me.2007-0058
- Tang, Y., Zhao, W., Chen, Y., Zhao, Y., & Gu, W. (2008). Acetylation is indispensable for p53 activation. *Cell*, 133(4), 612-626. doi:10.1016/j.cell.2008.03.025
- Taylor, W. R., & Stark, G. R. (2001). Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene*, 20(15), 1803-1815. doi:10.1038/sj.onc.1204252
- Telgmann, R., Maronde, E., Tasken, K., & Gellersen, B. (1997). Activated protein kinase A is required for differentiation-dependent transcription of the decidual prolactin gene in human endometrial stromal cells. *Endocrinology*, 138(3), 929-937. doi:10.1210/endo.138.3.5004
- Vasquez, Y. M., Mazur, E. C., Li, X., Kommagani, R., Jiang, L., Chen, R., *et al.* (2015). FOXO1 is required for binding of PR on IRF4, novel transcriptional regulator of endometrial stromal decidualization. *Mol Endocrinol*, 29(3), 421-433. doi:10.1210/me.2014-1292
- Yuguchi, H., Tanabe, A., Hayashi, A., Tanaka, Y., Okuda, K., Yamashita, Y., *et al.* (2013). The expression status of G protein-coupled receptor GPR30 is associated with the clinical characteristics of endometriosis. *Endocr Res*, 38(4), 223-231. doi:10.3109/07435800.2013.774011

ANNEXE A

RÉGULATION DE LA PROTÉINE P53 DANS LE MODÈLE IMMORTALISÉ HUMAIN

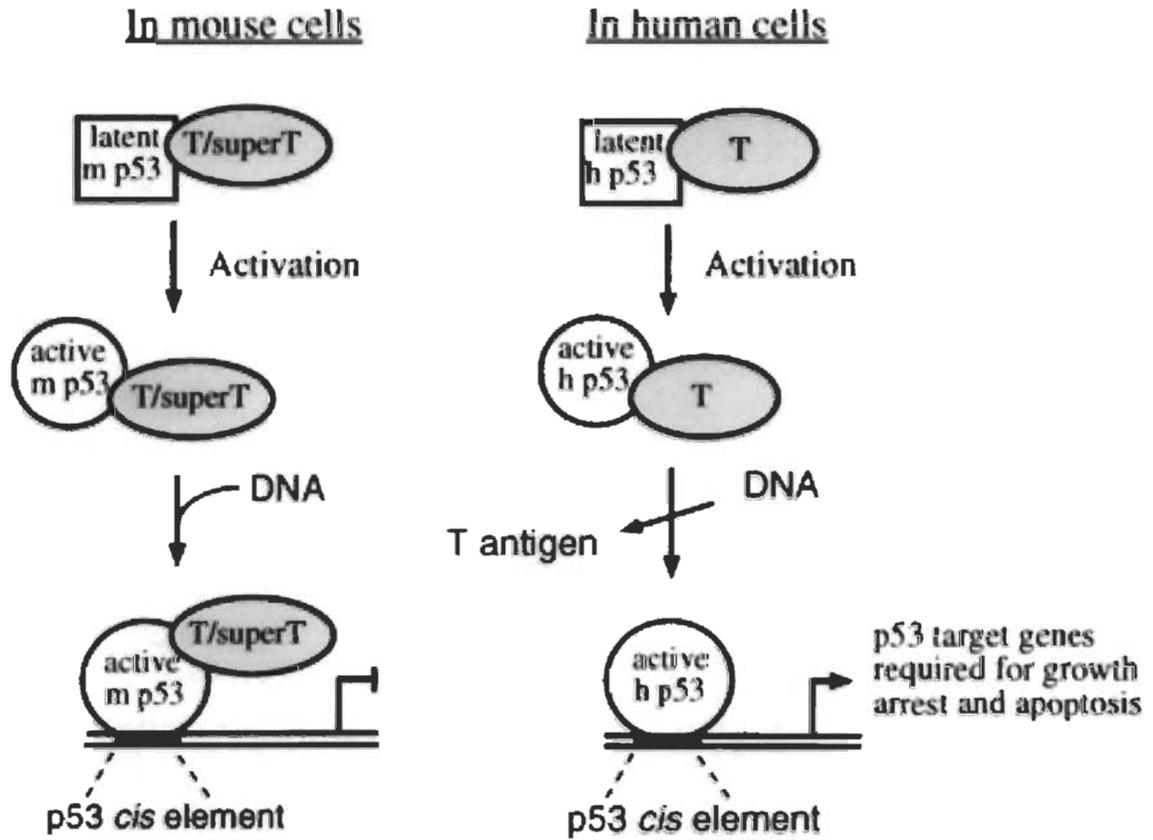


Figure A.1 Mécanisme de régulation de p53 dans les cellules humaines immortalisées au SV40 chez la souris et l'humain.

ANNEXE B

RÉGULATION DE P21 DANS LES CELLULES ENDOMÉTRIALES STROMALES

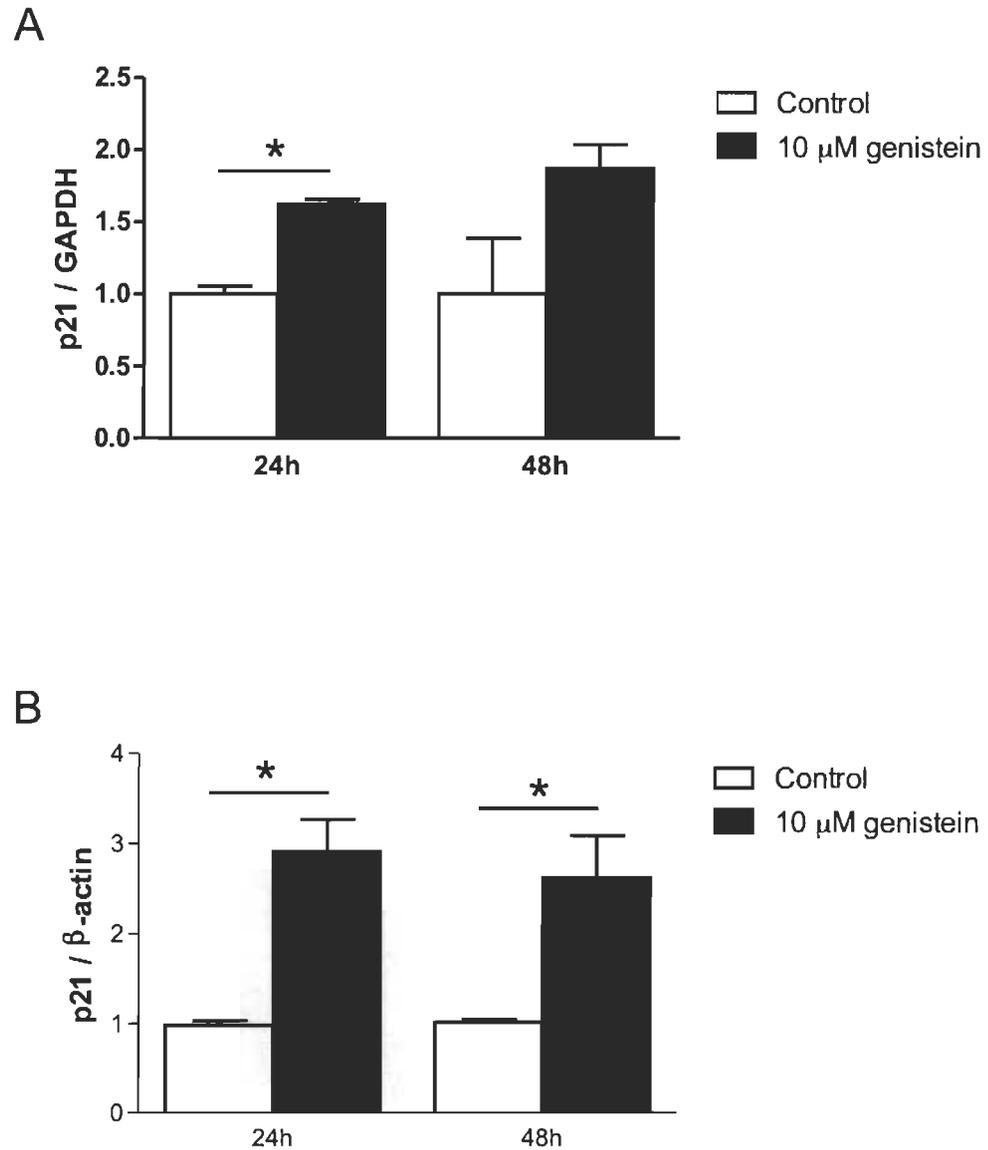


Figure B.1 Analyse des niveaux transcriptionnels (A) et protéiques (B) de p21 dans les cellules endométriales stromales suite au traitement avec de la génistéine.