

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
CAROL-ANN JOLY

RÉGULATION DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION PAX8 DANS LES
CELLULES ENDOMÉTRIALES STROMALES LORS DE LA DÉCIDUALISATION

OCTOBRE 2018

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 : Nancy et Sylvain

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement l'incroyable support de ma directrice de recherche, Céline Van Themsche. Sa patience, son écoute et la transmission de ses connaissances ont fait de ma maîtrise un moment de plaisir et de grand apprentissage.

Je tiens également à remercier Valérie Leblanc pour son aide grandiose lors de mon apprentissage en début de maîtrise mais également pour sa présence si agréable.

Merci à Roch Tremblay, Stéphanie Bujold et Jessica Dion pour leur aide et leur amitié tout au long de ma maîtrise.

Merci à Jovane Hamelin-Morrissette, Valérie Boulanger et Julie Girouard du laboratoire du Dr Carlos Reyes-Moreno pour nos échanges et le plaisir de les côtoyer tous les jours.

En dernier lieu, j'aimerais remercier ma mère, mon père, ainsi que mon conjoint pour leur patience, leur enthousiasme et leur dévouement qui ont rendu le tout possible. Je n'y serais jamais arrivée sans leur support durant toutes ces années.

RÉSUMÉ

L'infertilité féminine est un problème récurrent dans le monde entier. Des difficultés peuvent ainsi être rencontrées au cours de plusieurs étapes essentielles à la reproduction, dont l'ovulation, la fertilisation, le transport de l'embryon dans l'oviducte, l'implantation, la décidualisation, le développement embryonnaire et la parturition. Malgré la présence de plusieurs techniques de procréation assistées de nos jours, certaines femmes demeurent incapables de concevoir. Un grand nombre de ces femmes sont diagnostiquées avec une mauvaise fonction de l'utérus et malheureusement à ce jour, le manque de connaissances sur les multiples processus utérins associés à la grossesse a freiné le développement d'options thérapeutiques.

Il a néanmoins été démontré qu'une étape cruciale à une bonne implantation et un bon maintien de la grossesse est la décidualisation de l'endomètre. Il s'agit d'un processus complexe qui est encore mal défini au niveau moléculaire. Le processus de décidualisation est sous la loupe des chercheurs en reproduction depuis près de 20 ans. Un défaut dans son achèvement peut entraîner divers types de problèmes de fertilité tels que des dysfonctions utéroplacentaires, des avortements spontanés récurrents, des naissances prématurées, une défaillance de l'implantation, une endométriose, une endométrite, ou encore une hypertrophie, hypotrophie, hyperplasie ou hypoplasie utérine. C'est donc pourquoi il est primordial d'étudier la cascade signalétique induisant la différenciation des cellules endométriales en cellules déciduées.

Pendant la première année de ma maîtrise, j'ai participé activement à la complétion d'un projet de recherche qui était déjà en cours de réalisation par un autre étudiant de l'équipe du Dr Van Themsche, portant sur la régulation de p53 dans les cellules en décidualisation en réponse à un phytoestrogène alimentaire. Ce projet terminé, je me suis concentrée sur mon propre projet de maîtrise, portant sur le lien entre le facteur de transcription PAX8 et la décidualisation des cellules de l'endomètre utérin. Mon premier objectif spécifique était de caractériser la synthèse, l'expression protéique ainsi que l'activité de la protéine PAX8 dans les cellules endométriales stromales lors de la décidualisation; mon second objectif spécifique était d'étudier la relation entre les facteurs de transcription PAX8 et p53 dans les cellules endométriales stromales en décidualisation. Nous avons observé qu'il y a une augmentation de la quantité de protéine PAX8 dans les cellules endométriales stromales lors de leur décidualisation, suggérant que PAX8 pourrait jouer un rôle insoupçonné dans la décidualisation. À l'opposé, la quantité de l'ARNm de PAX8 était diminuée très tôt dans ce processus, révélant une régulation très fine du processus au cours des premiers jours de la décidualisation *in vitro*. Un déplacement de la protéine PAX8 du cytosol vers le noyau suite à l'induction de la décidualisation a également été observé, suggérant que la protéine puisse être active sur ses gènes cibles dès le début du processus. Mes travaux préliminaires m'ont permis de mettre au point des procédures expérimentales pour l'analyse de la régulation post-traductionnelle de PAX8 et pour l'étude d'une interaction possible entre les protéines PAX8 et p53 dans les cellules endométriales stromales dans le contexte de la décidualisation; pour l'instant, ils n'ont pas permis de déterminer avec

certitude quelles sont ces modifications post-traductionnelles et si cette interaction a effectivement lieu. Par contre, j'ai pu mettre en lumière une augmentation sélective de l'expression du gène Wnt4, un gène cible potentiel de PAX8, suite à l'induction de la décidualsection. Des travaux subséquents, basés sur l'interférence à l'ARN, permettront de confirmer si Wnt4 constitue effectivement un gène cible pour PAX8 dans les cellules en décidualsection. Collectivement, mes travaux de recherche des deux dernières années représentent un pas de plus vers une compréhension approfondie de la régulation et du rôle de p53 et PAX8 dans les cellules endométriales stromales au cours de la décidualsection.

Mots-clés : Décidualsection, PAX8, p53, utérus, prolifération cellulaire, cellules endométriales stromales humaines, Wnt.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	iii
RÉSUMÉ.....	iv
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	ix
LISTE DES SYMBOLES.....	xi
CHAPITRE I	
INTRODUCTION.....	1
1.1 L'infertilité féminine	1
1.1.1 Description.....	1
1.1.2 Incidence et facteurs de risque.....	1
1.1.3 La gestion clinique actuelle de l'infertilité féminine	2
1.2 L'utérus et la préparation à la grossesse	3
1.2.1 L'utérus.....	3
1.2.2 L'endomètre utérin	4
1.2.3 La décidualisation	5
1.3 Des nouveaux joueurs potentiels dans la décidualisation.....	9
1.3.1 p53 et la décidualisation	9
1.3.2 PAX8 et la décidualisation	12
1.4 Problématique, objectifs et hypothèses	14
1.4.1 Problématique examinée par le projet de recherche	14
1.4.2 Hypothèse de travail et objectifs de recherche	15
1.5 Modèle expérimental privilégié	16
CHAPITRE II	
MATÉRIEL ET MÉTHODES	18
2.1 Culture cellulaire et mise en plaque.....	18
2.2 Transfection de petits ARN interférants à tête d'épingle (shRNA).....	18
2.3 Traitement de décidualisation.....	19
2.4 Récolte	19

2.5	Fractionnement cytosolique-nucléaire.....	20
2.6	Western Blot	20
2.7	qPCR.....	20
2.8	Immunoprécipitation.....	21
2.9	Analyse statistique.....	22
CHAPITRE III		
RÉSULTATS.....		23
CHAPITRE IV		
DISCUSSION		31
3.1	PAX8 dans la décidualisation.....	36
3.2	PAX8 et p53 dans le stroma utérin	41
CHAPITRE V		
CONCLUSION.....		43
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		45

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	Anatomie de l'utérus.....	4
1.2	L'endomètre, composé de l'épithélium et du stroma utérin	5
1.3	Schéma de l'endomètre utérin humain pendant les phases d'implantation et de décidualisation.....	6
1.4	Le rôle des hormones sexuelles durant le cycle menstruel	8
1.5	p53 initie une cascade de signalisation intracellulaire menant à l'apoptose ..	10
1.6	Modifications post-traductionnelles dont p53 peut faire l'objet.....	11
1.7	Caractérisation des membres de la famille des PAX	13
3.1	Le marqueur de décidualisation FOXO1 est régulé à la hausse lors de l'induction de la décidualisation <i>in vitro</i> des HIESC.....	23
3.2	La protéine PAX8 est régulée à la hausse pendant la décidualisation des HIESC, au palier post-transcriptionnel	24
3.3	La protéine PAX8 serait régulée à la hausse pendant la décidualisation des T-HESC également	25
3.4	Localisation intracellulaire de la protéine PAX8 dans les CES humaines est modifiée suite à un traitement de décidualisation de 1, 3 et 6 jours	26
3.5	La protéine PAX8 et p53 ne semblent pas interagir dans les HIESC	28
3.6	La phosphorylation sur sérine de la protéine PAX8 est inchangée dans les HIESC en décidualisation	29
3.7	La quantité d'ARNm de Wnt4 est sélectivement augmentée dans les HIESC lors de la décidualisation	30
3.8	Réduction efficace de la quantité de la protéine PAX8 après interférence à l'ARN de PAX8.....	35

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
CES	Cellules endométriales stromales
CO ₂	Dioxyde de carbone
C-terminal	Carboxy-terminal
DCC	Dextran-coated-charcoal-treated
DMSO	Diméthylsulfoxyde
ER- α	Récepteur de l'estrogène α
ER- β	Récepteur de l'estrogène β
FBS	Sérum fœtal bovin
FoxO1	Forkhead box 01
FSH	Hormone folliculostimulante
HIESC	Cellules endométriales stromales humaines
HRP	Peroxidase du raifort
LH	Hormone lutéinisante
MPA	Médroxyprogesterone acétate
N-terminal	Amino-terminal
P	Phosphorylé
PAX	Paired box protein
PBS	Phosphate buffered saline
RT-PCR	Reverse-transcriptase polimerase chain reaction
qPCR	Quantitative polimerase chain reaction
Rb	Rétinoblastome
RIPA	Radio-immunoprecipitation assay

RPMI Milieu de culture de l'institut Roswell Park
SV40 Virus simien 40

LISTE DES SYMBOLES

β	Bêta
g	Gramme
kDa	Kilo Dalton
L	Litre
mL	Millilitre
M	Molaire
n	Nano
μ	Micro

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 L'infertilité féminine

1.1.1 Description

Les troubles de la santé reproductive constituent une problématique d'ordre mondial, à laquelle l'OMS (Organisation mondiale de la santé) consacre un programme entier (Torgovnik, Jonathan 2018, OMS). Plusieurs de ces troubles ont pour conséquence l'infertilité féminine. Cette dernière sévit dans toutes les populations, même chez les Nord-Américaines qui bénéficient pourtant d'un des meilleurs statuts socio-économiques au monde.

Une femme est considérée comme étant infertile lorsqu'elle présente une incapacité à concevoir après 12 mois de relations sexuelles non protégées, ou une incapacité à mener une grossesse à terme. Les femmes touchées par l'infertilité, qu'elles se tournent vers l'aide à la procréation ou non, peuvent faire face à de grandes difficultés : tristesse, anxiété, dépression, dégradation de la qualité de la relation avec leur conjoint et dégradation de la qualité de vie en général.

1.1.2 Incidence et facteurs de risque

De nos jours, 15 % des femmes nord-américaines âgées de 15 à 44 ans sont reconnues comme étant complètement infertiles, s'ajoutant ensuite les femmes dont la fécondité est diminuée, par exemple ayant une difficulté à porter un fœtus à terme ou une difficulté physique à tomber enceinte, représentant 12 % de la même population (Chandra, Copen et al. 2013).

Un problème de fertilité peut être occasionné par de multiples facteurs, dont : l'âge, l'aménorrhée, l'endométriose, l'obésité, l'exposition à des produits chimiques, la cigarette, l'alimentation, des troubles génétiques et certaines ITS (infection transmise sexuellement) et d'autres maladies (cancer) (Cederroth, Zimmermann et al. 2012, Aitken 2014). Ces différents facteurs de risques vont entraver le bon déroulement d'un ou plusieurs des processus physiologiques à la base de la reproduction féminine: l'ovulation, la fertilisation, le transport de l'embryon dans l'oviducte, l'implantation, la déciduialisation, le développement embryonnaire et l'accouchement (Hirota, Daikoku et al. 2010, Cha, Sun et al. 2012).

1.1.3 La gestion clinique actuelle de l'infertilité féminine

De nos jours, nous retrouvons de nombreux traitements visant à améliorer les chances de procréation chez la femme. Si le problème se situe au niveau hormonal et ovarien, la prise d'inducteurs d'ovulation (par exemple le citrate de clomiphène) peut être d'une grande aide. Si le problème se situe au niveau d'une ou des deux trompes de Fallope, qui peuvent être obstruées pour différentes raisons incluant certaines infections virales et bactériennes, une chirurgie avec injection progressive de liquide peut permettre de les débloquer au moins partiellement et pour un certain temps. Finalement, celles qui en ont les moyens peuvent se tourner vers une clinique offrant un service de procréation médicalement assistée. Ces techniques, qui impliquent une intervention médicale, sont l'insémination intra-utérine ainsi que la fécondation *in vitro* qui requiert la manipulation de l'ovule et du sperme à l'extérieur du corps. D'autre part, si une grossesse est désirée suite à une maladie ou à un âge particulièrement élevé, il est également possible de recourir à la décongélation d'ovule, de sperme et d'embryon si une congélation avait été faite de manière préventive (Zhang, Zhu et al. 2015).

1.2 L'utérus et la préparation à la grossesse

1.2.1 L'utérus

L'utérus est un organe en forme de poire renversée, jouant un rôle primordial dans la reproduction féminine soit celui d'accueillir l'embryon lors de son développement. Il est situé au-dessus du vagin, entre le rectum et la vessie. L'utérus est composé de trois parties distinctes : le col, le fond ainsi que le corps (Figure 1.1). Le col de l'utérus est sa partie la plus étroite. Il est situé dans la partie inférieure de l'utérus, adjacente et communicante avec le vagin. Dans la partie supérieure de l'utérus, nous retrouvons le fond. C'est dans cette section que sont connectées les trompes de Fallope, reliant l'utérus aux ovaires. Le rôle des trompes de Fallope est de recueillir l'ovocyte et de transporter l'ovule fécondé jusqu'au corps de l'utérus. Ce dernier forme la partie principale de l'utérus et en son centre se trouve la cavité utérine. C'est dans le corps utérin que s'implante l'ovule fécondé.

Le corps de l'utérus est divisé en trois parties (Figure 1.1). La plus externe est le périmétrium. Il est formé du péritoine (membrane couvrant la majorité des organes de la cavité pelvienne) et d'une couche séreuse sous-jacente. La partie centrale du corps de l'utérus est formée par le myomètre, composé de cellules musculaires lisses. Il s'agit de la couche la plus épaisse. L'endomètre forme la paroi interne de l'utérus et fait lumière à la cavité utérine. C'est au niveau de l'endomètre que l'implantation de l'embryon peut avoir lieu.

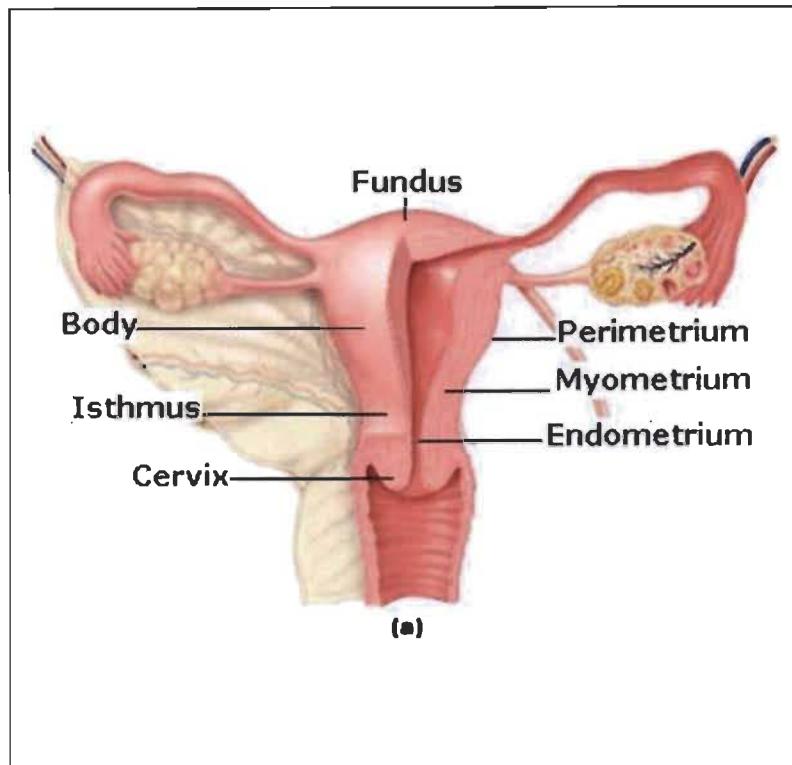


Figure 1.1 Anatomie de l'utérus (<http://www.tabletsmanual.com>).

1.2.2 L'endomètre utérin

L'endomètre utérin est formé de deux couches tissulaires : l'épithélium et le stroma utérin (Figure 1.2). En surface nous retrouvons ainsi une couche de cellules épithéliales et en profondeur, une couche de cellules endométriales stromales (CES). Lors de la phase sécrétoire (après l'ovulation), les CES se transforment au niveau structurel mais aussi au niveau fonctionnel afin de permettre une interaction adéquate avec un éventuel embryon. Cette différenciation des cellules endométriales stromales, pour former une structure appelée décidue, est la décidualisation. Il s'agit d'un processus complexe qui est encore mal défini au niveau moléculaire.

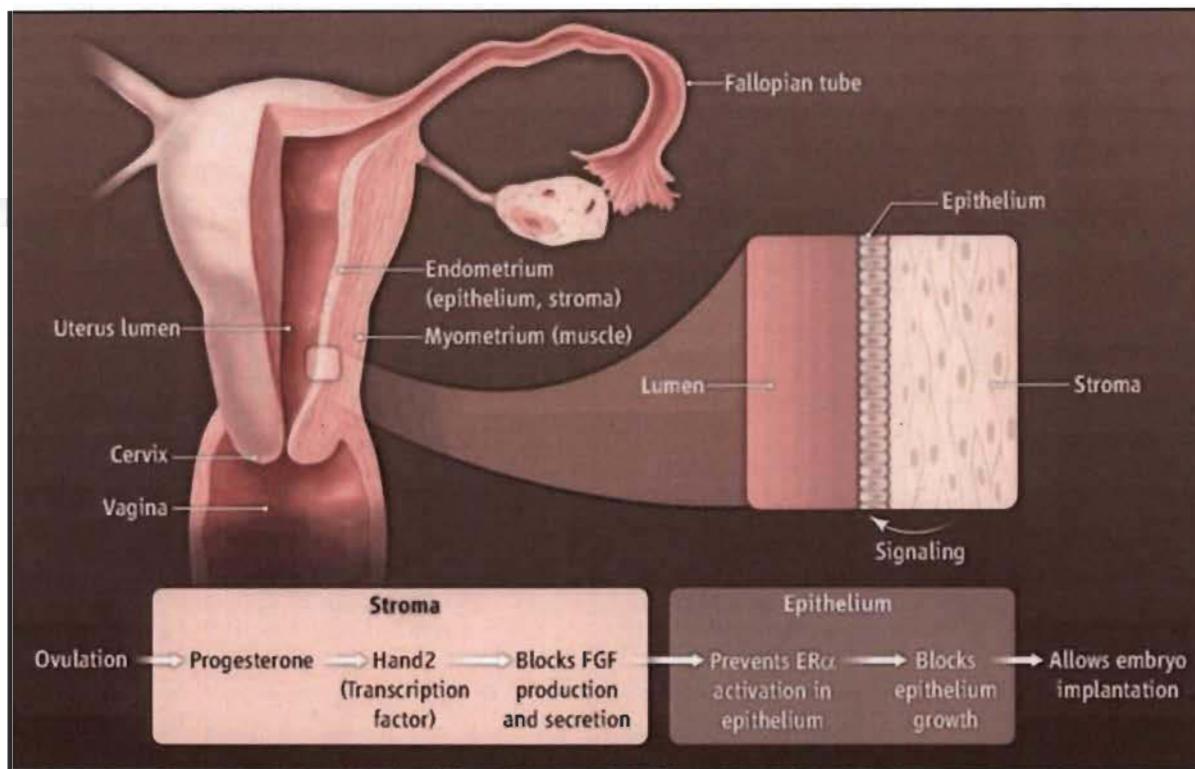


Figure 1.2 L'endomètre, composé de l'épithélium et du stroma utérin (www.sciencemag.org).

1.2.3 La décidualisation

Le processus de décidualisation est sous la loupe des chercheurs en reproduction depuis près de 20 ans. Ce remodelage tissulaire et cellulaire est crucial pour l'établissement (Cha, Sun et al. 2012) et le maintien (Kajihara, Brosens, & Ishihara, 2013) de la grossesse. Un défaut dans son achèvement peut entraîner divers types de problèmes de fertilité tels que des dysfonctions utéroplacentaires, des avortements spontanés récurrents, des naissances prématurées, une défaillance de l'implantation, une endométriose, une endométrite, ou encore une hypertrophie, hypotrophie, hyperplasie ou hypoplasie utérine (Zhang, Zhu et al. 2015). La décidualisation a lieu à chaque cycle menstruel, que la fécondation ait été fructueuse ou non. Si cette fécondation a lieu, les signaux hormonaux induisant la couche déciduale se poursuivront, ce qui permettra la poursuite de la décidualisation et le maintien de la grossesse (Figure 1.3). Toutefois, s'il n'y a pas de grossesse, cette couche de l'endomètre se nécrosera, se détachant ainsi de l'endomètre et sera évacuée par voie génitale dans les menstruations (Cha et al., 2012;

Wira, Rodriguez-Garcia, & Patel, 2015). La décidualisation nécessite un arrêt du cycle de division cellulaire, une inhibition des signaux de mort cellulaire et une diminution de la réponse immune locale (Cha et al., 2012). Elle est également connue pour être plus résistante au stress oxydatif ainsi qu'être un élément essentiel au maintien de la grossesse (Kajihara, Brosens, & Ishihara, 2013).

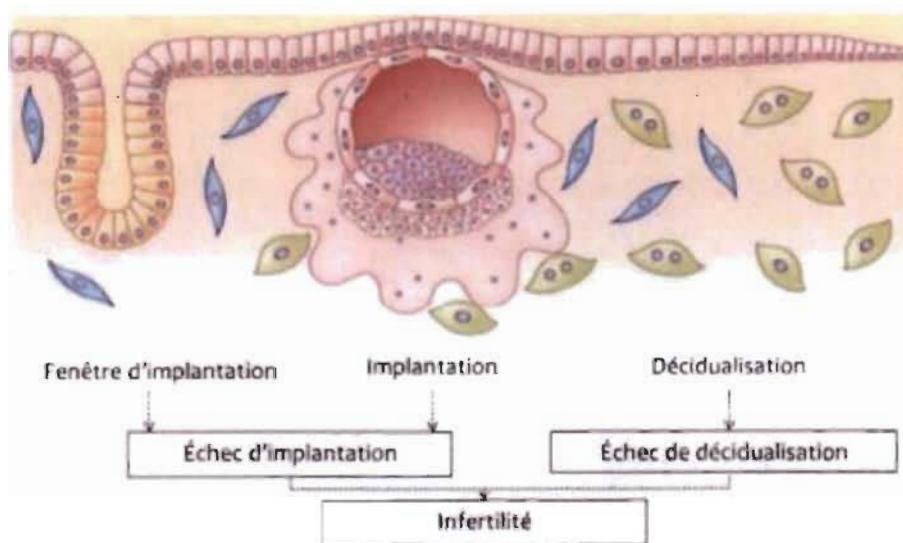


Figure 1.3 Schéma de l'endomètre utérin humain pendant les phases d'implantation et de décidualisation (Cha, Sun, & Dey, 2012).

Dans les CES, les structures et voies biochimiques impliquées dans la décidualisation sont multiples et interconnectées, et de nombreuses questions demeurent sans réponse. L'état actuel des connaissances à ce sujet est bien documenté dans cet article de revue : (Zhu, Hou et al. 2014). Les cellules en décidualisation acquièrent une plus grande résistance au stress oxydatif (Kajihara, Brosens, & Ishihara, 2013). La décidualisation est également caractérisée entre autres par un changement au niveau morphologique des CES, qui passent de la forme fibroblastique à une forme ovoïde. Ceci est notamment une conséquence de l'accumulation intracellulaire de glycogène, une réserve d'énergie (Spornitz Adv Anat Embryol Cell Biol. 1992;124:1-99).

À l'échelle moléculaire, certains événements sont centraux pour une bonne décidualisation et méritent d'être rappelés dans le cadre du présent mémoire. Ainsi, l'induction de la décidualisation est marquée par une nette augmentation de la

sécrétion de la prolactine déciduale ainsi que par l'augmentation des niveaux intracellulaires de la protéine Forkhead Box O1 (FoxO1) (Kajihara, Brosens et al. 2013). En réponse à l'augmentation de la progestérone à la suite de l'ovulation, la protéine FoxO1 s'accumulera et collaborera dans l'inhibition de la prolifération cellulaire, favorisant ainsi la différenciation cellulaire nécessaire au processus de décidualisation (Gellersen and Brosens 2003, Cloke, Huhtinen et al. 2008, Mazur, Vasquez et al. 2015). L'un des gènes cibles du facteur de transcription FoxO1 dans les CES en décidualisation est justement celui de la prolactine (Vasquez, Mazur et al. 2015). Pour ce faire, FoxO1 doit s'associer au récepteur de la progestérone. Sous l'action de l'estriadiol et la progestérone simultanément, la prolactine déciduale sera exprimée, et ce, seulement dans les cellules en décidualisation puisque le gène qui l'encode contient un promoteur tissu-spécifique. Suite à sa synthèse, la prolactine sera sécrétée et ira agir sur les cellules épithéliales de l'endomètre afin d'activer la cascade de signalisation des protéines kinases associées à la mitogénèse permettant également le processus de différenciation cellulaire (Yu-Lee 1997, Jabbour and Critchley 2001, Larsen and Grattan 2010). Une autre importante cible du facteur de transcription FoxO1 dans les CES en décidualisation est la signalisation par les Wnt. Il a été montré que la progestérone module l'activité de la voie de Wnt au moment d'induire la décidualisation, de manière FOXO1-dépendante (Wang Y et al, Clin Cancer Res. 2009 Sep 15;15(18):5784-93).

Une autre hormone sexuelle jouant un rôle primordial dans la décidualisation est l'estriadiol. Cette dernière est responsable de la prolifération cellulaire du stroma utérin et, par le fait même, de l'épaississement de l'endomètre dans la phase proliférative du cycle menstruel. L'estriadiol joue également un rôle dans la phase sécrétoire du cycle menstruel. En fait, il prépare les cellules du stroma utérin à l'action de la progestérone et enclenche l'arrêt du cycle cellulaire via l'augmentation du sous-type ER- β de l'estriadiol qui favorise l'inhibition du cycle cellulaire (Figure 1.4) (Logan, Steiner et al. 2012). Puisque la différenciation cellulaire nécessaire à l'accomplissement de la décidualisation requiert une grande quantité d'énergie, le cycle cellulaire doit être inhibé, rendant la concentration locale d'estrogène décisive dans ce processus. Lors de la phase sécrétoire, les récepteurs ER α sont activés et induisent l'accumulation de la protéine adénosine monophosphate

cyclique (AMPc), un facteur primordial dans l'initiation de la décidualisation, dans les CES {Christian, 2002 #32; Liverman, 2009 #32}.

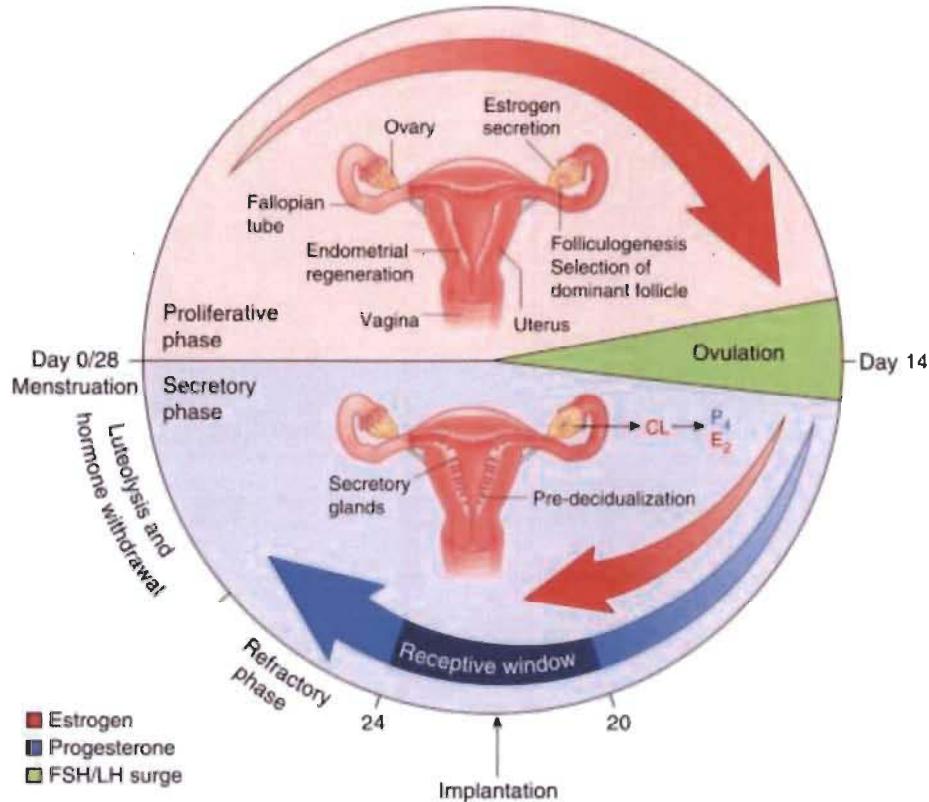


Figure 1.4 Le rôle des hormones sexuelles durant le cycle menstruel (Cha et Dey, 2012).

Certains membres de la famille des protéines Wingless (Wnt), comme Wnt4, Wnt5a et Wnt6, sont des éléments importants pour une bonne complémentation du processus de décidualisation. Wnt4 peut être exprimée par les cellules endométriales stromales elles-mêmes (HESS et al. Biol Reprod. 2007 Jan;76(1):102-17): en liant ses récepteurs Frizzled (Fzd) et LRP5/6 (MacDonald et al. Dev Cell. 2009 Jul; 17(1):9-26) à la surface des CES, elle induit l'expression du facteur de transcription FoxO1 dans les CES (Li et al. Endocrinology. 2013 Jan; 154(1): 446-457). La protéine Wnt5a, produite par les CES, a une fonction autocrine et en liant ses récepteurs non-canoniques dont ROR (Green et al. Trends Cell Biol. 2008 Nov; 18(11):536-44) à la surface des CES elle médie les effets de la progestérone (Matsuoka Endocrinol Metab 2010; 95:E291-E299) et permet d'assurer un nombre et une taille adéquats de sites d'implantation, ainsi que le maintien du

phénotype décidual (Cha et al. Volume 8, Issue 2, p382-392, 24 July 2014). Dans les CES en décidualisation, Wnt5a verra son expression varier selon le niveau de Wnt4 présent dans les cellules. S'il y a une diminution de Wnt4 observée dans les CES, la protéine Wnt5a sera surexprimée afin de compenser la perte de Wnt4 (Wang, Zhang et al. 2016). En dernier lieu, tout comme l'estrogène, Wnt6 est essentielle à la régulation du cycle cellulaire pendant la décidualisation des CES (Wang, Lu et al. 2013). Elle est produite par les CES elles-mêmes (Wang et al. 2013) et y joue donc un rôle autocrine pendant la décidualisation, en liant les mêmes récepteurs que les autres ligands Wnt canonique incluant Wnt 4 (MacDonald et al. Dev Cell. 2009 Jul; 17(1):9-26).

1.3 Des nouveaux joueurs potentiels dans la décidualisation

1.3.1 p53 et la décidualisation

La protéine p53 est souvent appelée le gardien du génome. Ce nom lui est accordé puisqu'elle a comme rôle principal d'induire l'arrêt du cycle cellulaire lorsqu'il y a des dommages à l'ADN pour en permettre la réparation (Kruse and Gu 2009, Akdemir, Jain et al. 2014). Si ces dommages sont irréparables, la protéine p53 enclenchera la cascade d'évènements signalétique entraînant l'apoptose des cellules (Figure 1.5).

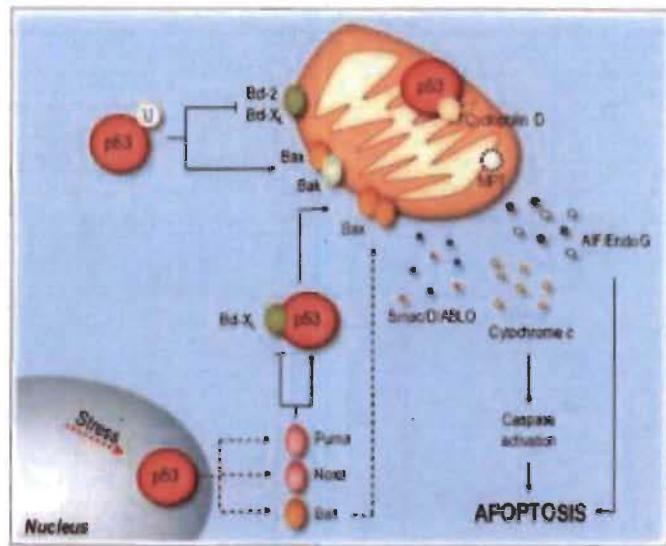


Figure 1.5 p53 initie une cascade de signalisation intracellulaire menant à l'apoptose (Amaral, Xavier, Steer, & Rodrigues, 2010).

La protéine p53 est codée à partir du gène TP53, situé sur le petit bras du chromosome 17 chez l'humain. Elle est exprimée de manière ubiquitaire et constructive en conditions physiologiques. Elle compte 393 acides aminés. Cette protéine comporte cinq domaines fonctionnels dont chacun d'entre eux a une fonction bien précise (Figure 1.6) (Kruse and Gu 2009). Premièrement, le domaine de transactivation de la protéine p53 se situe dans l'extrémité N-terminale. Par la suite, nous retrouvons un domaine riche en proline qui permet la conformation isoélectrique de la protéine. Ensuite, le domaine nécessaire au rôle de facteur de transcription de p53, donc nécessaire à la reconnaissance et à la liaison à l'ADN de ses gènes cibles. Contigu au domaine de liaison à l'ADN, se trouve le domaine de tétramérisation. La formation d'un tétramère permet une activité optimale de la protéine. Finalement, à l'extrémité C-terminale, nous retrouvons le domaine appelé C-terminal qui fait l'objet de modifications post-traductionnelles clés pour son activation ainsi que sa localisation intracellulaire.

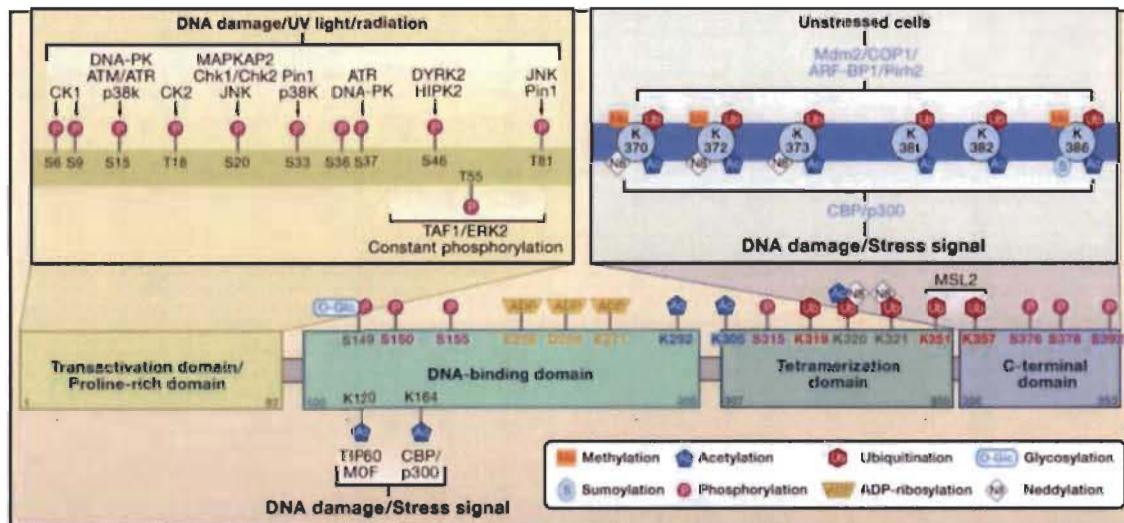


Figure 1.6 Modifications post-traductionnelles dont p53 peut faire l'objet (tirée de Kruse et Gu, 2009).

La régulation et le rôle de la protéine p53 sont surtout connus dans le contexte du cancer : il s'agit d'un des suppresseurs de tumeurs les mieux décrits. Puisque son rôle principal dans la physiologie normale est d'assurer une bonne prolifération sans dommage, une mutation au niveau du gène même de p53, pouvant résulter d'une multitude de facteurs environnementaux notamment, engendre une prolifération abondante des cellules mutées. Il a été démontré que ces mutants jouent un rôle primordial dans la première apparition de cellules cancéreuses, mais qu'ils sont également importants dans la promotion, l'agressivité ainsi que la métastasie de ces cellules cancéreuses, comme il a été observé dans le colon, le poumon, l'œsophage, l'estomac, le sein et même de la vessie (Rivlin, Brosh et al. 2011).

Depuis quelques années, la communauté scientifique porte un intérêt grandissant envers un rôle possible de p53 dans la fonction reproductive chez la femelle (et la femme chez l'humain). Certaines études ont en effet suggéré que p53 pourrait jouer un rôle dans la différenciation cellulaire ayant cours dans les cellules du stroma utérin lors de la déciduialisation chez le rongeur (Menendez, Camus et al. 2010, Purvis, Karhohs et al. 2012, Akdemir, Jain et al. 2014). Ainsi, dans une première étude, avait été rapporté chez les souris p53-déficientes (knock-out constitutif), une diminution de la fertilité tel que démontré par une diminution de la taille et de la fréquence des portées (Niklaus, Aubuchon

et al. 2007). Dans une étude subséquente, où la suppression de l'expression de p53 était plutôt restreinte à l'utérus des souris, un épaississement incomplet du tissu décidual, sa sénescence accélérée ainsi que des naissances prématuées étaient notées (Hirota, Daikoku et al. 2010, Cha, Sun et al. 2012). Ces études suggèrent fortement que la présence de p53 dans l'endomètre utérin est essentielle à la complétion de la décidualisation ainsi qu'à son maintien jusqu'à terme. Ceci soulève la question centrale de la régulation de l'expression et de l'activité de p53, ainsi que ses rôles biologiques, dans les cellules endométriales stromales dans le contexte de la décidualisation.

1.3.2 PAX8 et la décidualisation

La protéine PAX8 est un facteur de transcription membre de la famille des paired box proteins (PAX), composé de 310 acides aminés et codés par le gène *PAX8* situé sur le bras long du chromosome 2. Les protéines PAX sont principalement connues pour leurs rôles dans la différentiation terminale cellulaire et tissulaire s'effectuant lors du développement embryonnaire et ont également été démontrées comme étant essentielles pour le développement des organes reproducteurs (Di Palma, Filippone et al. 2013). Cette famille de protéine est divisée en quatre groupes distincts, se distinguant par l'assemblage varié de divers domaines protéiques (Fabian, Kozmikova et al. 2015). PAX8 fait partie du groupe II, étant composé d'une homéoboîte partielle et ne possédant pas d'homéodomaine en position C-terminale (Figure 1.7) (Paixao-Cortes, Salzano et al. 2013). Son rôle principal et très bien connu est d'assurer un bon développement embryonnaire de la glande thyroïde (Di Palma, Filippone et al. 2013). Cette protéine a toutefois été détectée dans ce même organe chez l'adulte proposant ainsi qu'elle y jouerait un rôle même dans un contexte post-différenciation (Marotta, Amendola et al. 2014, Ma, Latif et al. 2015). De plus, PAX8 a été détectée dans des tumeurs de la glande thyroïde (Ma, Latif et al. 2015). Puisque la présence et l'activité de PAX8 favorisent la prolifération et la survie cellulaire (Di Palma, Filippone et al. 2013), il est possible qu'une mutation dans ce facteur de transcription puisse contribuer à l'apparition de tumeurs.

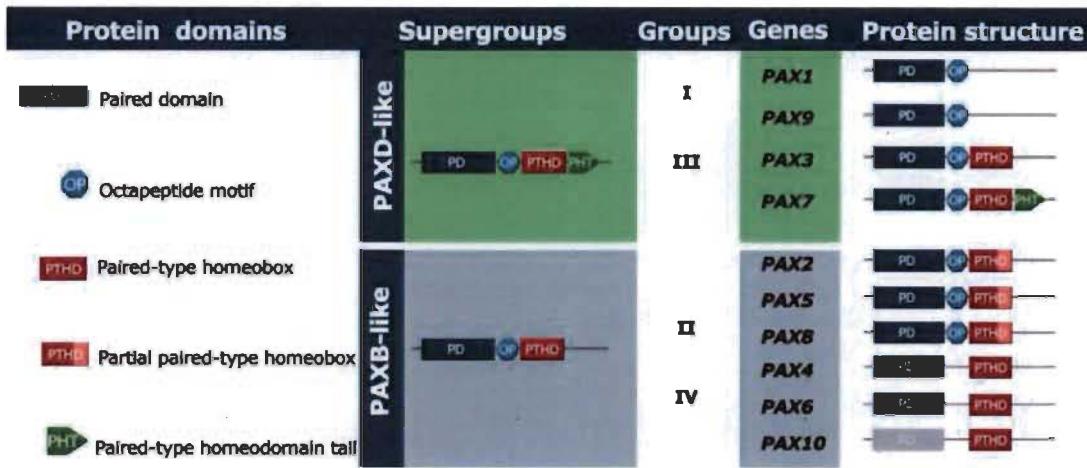


Figure 1.7 Caractérisation des membres de la famille des PAX (Paixão-Côrtes VR et al. Seminars in Cell & Developmental Biology, Volume 44, 2015, 64-74).

Chez les souris PAX8-déficientes, le développement du tractus reproducteur femelle est compromis et l'utérus n'est présent que sous une forme vestigiale (Mittag et al. 2007 Endocrinology 148(2):719–72). Chez les souris de phénotype sauvage, à l'âge adulte, la protéine PAX8 est détectable dans le compartiment du stroma utérin; chez l'humain l'ARNm de PAX8 a été détecté, grâce à l'hybridation *in situ*, au niveau du stroma dans l'utérus en phase sécrétoire (Mittag et al. 2007 Endocrinology 148(2):719-72). Ceci suggère que PAX8 pourrait jouer un rôle dans le stroma endométrial et possiblement, pendant la déciduallisation.

En tant que facteur de transcription, PAX8 a la possibilité de réguler l'expression de plusieurs gènes. Comme mentionné dans la section 1.2.3 la famille des Wnt sont des facteurs importants dans le processus de déciduallisation mais sont également des gènes cibles de la protéine PAX8 dans certains types cellulaires comme le tissu épithéial de la glande thyroïde (Filippone, Di Palma et al. 2014). La protéine p53, de son côté est également un gène cible de PAX8. En fait, p53 contient un site de liaison pour les facteurs de transcription de la famille PAX dans son premier exon non traduit et il a été démontré que les protéines PAX2 et PAX8 ont la capacité d'inhiber la transactivation de p53 (Stuart, Haffner et al. 1995); notamment, PAX8 peut réguler l'expression de la protéine p53 dans les astrocytes humains (Stuart, Haffner et al. 1995). Un autre gène que nous avions

identifié au départ comme un gène cible potentiel pour PAX8 est E2F1. Il a été démontré que la protéine PAX8 régule directement l'expression de E2F1 dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses (Li, Nyman et al. 2011). Il est important de souligner que la protéine E2F1 joue un rôle important dans le processus de décidualisation en se liant à la protéine RB, favorisant ainsi l'arrêt du cycle cellulaire requis à la différenciation cellulaire de la décidualisation (Lei, Feng et al. 2012, Mayank, Sharma et al. 2014).

Toutes les études mentionnées précédemment suggèrent que la présence des protéines p53 et PAX8 pourrait jouer un rôle central dans le processus de décidualisation, et qu'un lien fonctionnel existe entre ces deux facteurs de transcription, par exemple que PAX8 régule l'expression de p53. Il est donc crucial de comprendre les mécanismes cellulaires ainsi que moléculaires qui régulent l'expression et l'activité de ces protéines dans les cellules endométriales stromales dans le contexte de la décidualisation.

1.4 Problématique, objectifs et hypothèses

1.4.1 Problématique examinée par le projet de recherche

La décidualisation est un processus biologique essentiel à la fertilité féminine, au cœur de la préparation de l'endomètre à l'implantation d'un embryon ainsi qu'à l'interaction subséquente avec ce dernier (Telgmann and Gellersen 1998, Chapdelaine, Kang et al. 2006, Brosens, Wilson et al. 2009). Les connaissances actuelles permettent déjà d'apprécier à quel point tout le processus de décidualisation des cellules endométriales est finement régulé, tant au niveau endocrine que paracrine et autocrine (Carbillon, Uzan et al. 2000, Guzeloglu-Kayisli, Kayisli et al. 2009, Wetendorf and DeMayo 2012). À l'intérieur des cellules en décidualisation, plusieurs cascades de signalisation sont activées, mais jusqu'ici les travaux de la communauté scientifique n'ont pas terminé de mettre en lumière les divers mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués (Large and DeMayo 2012, Okada, Tsuzuki et al. 2014). Réaliser une analyse détaillée et intégrée de ces mécanismes permettrait d'atteindre un niveau supérieur de compréhension de la physiologie de la reproduction féminine et fournirait du même

souffle des clés pour l'étude des nombreux problèmes endométriaux associés à une réduction de la fertilité.

Plusieurs indications directes et indirectes, obtenues antérieurement par l'équipe de recherche du Dr Van Themsche ainsi que par d'autres équipes, suggèrent que les facteurs de transcription p53 et PAX8 pourraient jouer un rôle clé dès l'initiation de la décidualisation. L'équipe du Dr Hirota a démontré que l'absence de la protéine p53 au niveau de l'utérus au cours de la décidualisation est reliée à une hyperdifférenciation cellulaire résultant en une sénescence précoce de la décidue, des naissances prématuées ainsi que des avortements spontanés chez la souris (Hirota, Daikoku et al. 2010). Il a également été démontré que certains membres de la famille des Wnt, des gènes cibles de PAX8 dans certains types cellulaires, sont des facteurs importants dans l'induction de la décidualisation dans les CES humaines et murines (Sonderegger, Pollheimer et al. 2010, Filippone, Di Palma et al. 2014). Il est primordial de comprendre la régulation de leur expression et de leur activité dans l'endomètre au fil de la décidualisation, ainsi que du lien potentiel qui les unit dans ce contexte.

1.4.2 Hypothèse de travail et objectifs de recherche

L'hypothèse générale de ce projet était que l'expression et l'activité de PAX8 seraient régulées à la hausse à l'initiation de la décidualisation, de manière à réguler à la hausse l'expression de PAX8 et permettre l'accumulation de p53 et la bonne complétion du processus (Stuart, Haffner et al. 1995). Nous avons basé notre premier objectif spécifique sur cette théorie et avons entrepris de caractériser la synthèse, l'expression protéique ainsi que l'activité de la protéine PAX8 dans les cellules endométriales stromales lors de la décidualisation.

Notre second objectif spécifique était d'étudier la relation entre les deux facteurs de transcription PAX8 et p53 dans les cellules endométriales stromales dans le contexte de la décidualisation.

1.5 Modèle expérimental privilégié

Des modèles expérimentaux tant *in vitro* que *in vivo* de la décidualisation ont été établis et sont couramment utilisés par la communauté scientifique. Dans le cadre du présent projet de recherche, nous n'avons pas eu recours à un modèle *in vivo*, mais il en existe pour différentes espèces, permettant d'étudier l'implantation et la décidualisation des rongeurs aux primates, en passant par le cochon, le mouton et les bovidés (Lee, Li et al. 2004). En complément avec ces études, le rôle plus spécifique des facteurs identifiés peut être déterminé dans divers modèles de souris génétiquement modifiées: citons pour exemple les études qui ont été effectuées avec des souris possédant une délétion de gènes tels que Hoxa-10 ou p53 (Hu, Feng et al. 2007, Ramathal, Bagchi et al. 2010).

Les modèles de la décidualisation *in vitro* quant à eux, impliquent la culture de cellules endométriales stromales immortalisées ou primaires de diverses origines, auxquelles on ajoute une seule ou une combinaison de molécules capables d'induire un phénotype décidual (Dunn, Kelly et al. 2003, Chapdelaine, Kang et al. 2006, Jividen, Movassagh et al. 2014). Dans le cadre du présent projet de recherche, nous avons utilisé comme modèle cellulaire les HIESC, des cellules endométriales stromales humaines immortalisées à l'aide de l'antigène large T du virus SV40. Ces cellules nous ont été gracieusement données par le Dr Michel A. Fortier du Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université Laval (CHUL). Dans ces cellules, les changements morphologiques ainsi que fonctionnels associés à la décidualisation peuvent être reproduits *in vitro* en traitant les cellules avec une combinaison d'acétate de médroxyprogesterone (MPA), dérivé de la progesterone, et d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) (Pohnke, Schneider-Merck et al. 2004, Chapdelaine, Kang et al. 2006). Puisque la progesterone est essentielle à l'induction de la décidualisation (Halasz et al. Journal of Reproductive Immunology 97 (2013) 43–50), l'ajout de son dérivé stable MPA à des cellules en culture reproduit son effet pour l'induction *in vitro* de la décidualisation (Gellersen and Brosens 2003). Dans le même ordre d'idée, l'estrogène qui participe aussi à l'induction de la décidualisation *in vivo* provoque l'activation de l'AMPc dans les CES et utiliser l'AMPc dans une culture *in vitro* permet de mimer l'effet de l'estrogène

(Mikihiro Yoshie 2015). Afin de confirmer l’induction efficace de la décidualisation des cellules endométriales stromales *in vitro*, l’analyse de la protéine FoxO1 a été systématiquement effectuée, par immunobuvardage de type Western.

Dans ce modèle de décidualisation *in vitro*, l’analyse du contenu en protéines d’intérêts, soit PAX8 et p53, a pu être effectuée par immunobuvardage de type Western. Les modifications post-traductionnelles de PAX8 ainsi que la liaison protéine-protéine entre PAX8 et p53 ont été évaluées par immunoprécipitation puis par immunobuvardage de type Western. De plus, la localisation intracellulaire de PAX8 au fil de la décidualisation a été évaluée par extraction cytosolique-nucléaire.

Mentionnons en terminant qu’il existe également d’autres méthodes permettant d’induire la décidualisation *in vitro*, soit avec un traitement combinant l’estradiol et la progestérone ou encore un traitement à l’AMPc seulement (Irwin, Kirk et al. 1989, Mizuno, Tanaka et al. 1998, Pohnke, Schneider-Merck et al. 2004, Grinius, Kessler et al. 2006, Feng, Zhang et al. 2011, Leno-Duran, Ruiz-Magana et al. 2014).

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Culture cellulaire et mise en plaque

Les cellules endométriales stromales immortalisées (HIESC) à l'aide de l'antigène large T du virus SV40, fournies généreusement par le Dr Michel A. Fortier (Centre de Recherche du CHUL, QC, Canada), ont été utilisées comme modèle expérimental. Ces cellules sont cultivées dans un milieu RPMI PR+ (Roswell Park Memorial Institute medium) contenant 50 µg/mL de gentamicine et 10 % de FBS (sérum de veau fœtal). Elles sont incubées à 37 °C dans une atmosphère comprenant 5 % de CO₂. Les cellules croissent à l'intérieur de boites de 75 cm² jusqu'à confluence de 70-90 %; elles sont alors récoltées par trypsination puis passées ou encore traitées.

En vue d'un traitement, les cellules sont comptées puis ensemencées à raison de 310 000 ou 450 000 cellules/puits (selon le traitement qui suivra) dans une plaque de 6 puits. Après une première incubation de 24 heures, leur milieu de culture est remplacé par du RPMI sans rouge de phénol (le phénol étant un agoniste du récepteur à l'estradiol et induisant une cascade intracellulaire augmentant notamment leur prolifération; Berthois et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 1986 Apr; 83(8): 2496-2500) comprenant 2 % de FBS DCC (traité au charbon recouvert de dextran pour enlever toute trace de stéroïdes qui pourraient induire la prolifération cellulaire) et 50 µg/mL de l'antibiotique gentamicine. Après 24 h, les cellules atteignent une confluence de 70-90 % et le traitement (décidualisation, transfection) est initié.

2.2 Transfection de petits ARN interférants à tête d'épingle (shRNA)

Les cellules croissent jusqu'à une confluence d'environ 70 % à partir d'une mise en plaque de 310 000 cellules/puits. Afin d'effectuer la transfection, les puits ciblés reçoivent

un traitement avec 0,5 μ g d'ARN interférant combiné avec l'agent de transfection Lipofectamine 2000, dans un rapport volumique de 1:3. Une incubation de 20 minutes à température pièce s'en suit. Après 24 h d'incubation, le milieu de culture est changé pour du RPMI sans rouge de phénol comprenant 2 % FBS avec gentamicine pour une incubation d'une durée de 24 heures, puis les cellules sont récoltées par trypsination.

2.3 Traitement de décidualisation

À partir d'une mise en plaque de 450 000 cellules/puits ayant atteint une confluence d'environ 70 %, les cellules reçoivent 0,5 mM de 8-bromo-AMPc (dérivé de l'AMPc, qui active certaines voies intracellulaires normalement activées par l'estradiol) et 1 μ m de MPA (anologue de la progestérone) dilués dans du RPMI sans rouge de phénol contenant 2 % FBS DCC. Les cellules contrôles reçoivent du RPMI sans rouge de phénol contenant 2 % FBS DCC, ainsi que du DMSO (diluant du MPA). Un changement de milieu avec rafraîchissement du traitement sera effectué aux 48 heures. Après un temps de traitement de six heures, 24 heures, 48 heures, trois jours, quatre jours ou six jours, les cellules sont récoltées et analysées.

2.4 Récolte

À la suite du temps de traitement déterminé, les cellules sont récoltées par trypsination puis séparées en deux échantillons qui sont centrifugés afin d'éliminer le liquide et conserver le culot sec de cellules. Les cellules de l'un des deux culots sont lysées dans environ 350 μ L de Trizol et la suspension est congelée à -80 °C pour analyse subséquente des ARN par RT-qPCR. Les cellules de l'autre culot sont lysées dans environ 40 μ L de tampon de lyse RIPA auquel a été ajouté un cocktail d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases, pour analyse subséquente des protéines par immunobuvardage de type western; ces lyses sont homogénéisées par congélation-décongélation puis conservées à -20 °C. Alternativement, les cellules sont lysées dans le réactif de lyse de la trousse. NE-PER de fractionnement cytosolique-nucléaire (NE-PER, Pierce).

2.5 Fractionnement cytosolique-nucléaire

Les directives de la compagnie commercialisant la trousse NE-PER (Pierce) ont été suivies. Suite à la récolte, les cellules sont centrifugées et le surnageant y est retiré. Le réactif CER I est par la suite ajouté au culot selon la quantité indiquée par la compagnie. Cette quantité est variable selon le volume du culot résultant de la centrifugation. Tout le reste du protocole est réalisé en conformité avec les directives du fabricant. Les fractions nucléaires et cytosoliques obtenues pour chaque échantillon de cellules de départ sont conservées à -80 °C pour analyse subséquente par immunobuvardage de type western. GAPDH, une enzyme mitochondriale, est utilisé comme marqueur de pureté et de quantité de protéines du cytosol tandis que PARP, une protéine nucléaire, est utilisée comme marqueur de pureté et de quantité de protéines du noyau.

2.6 Western Blot

Le contenu en protéines totales de chaque lyse protéique obtenue dans le tampon RIPA est dosé à l'aide de la trousse DC protein assay (Bio-Rad) et des quantités égales de protéines totales sont chargées dans des puits de gels SDS-PAGE de 12 % acrylamide. Après migration, transfert sur membrane de nitrocellulose, blocage avec des protéines du lait et hybridation avec les anticorps primaires et secondaires, la révélation est faite à l'aide du réactif West Femto Super Signal (Pierce) et le signal chimioluminescent est capté par l'appareil à imagerie Biospectrum 1500 (UVP).

Les anticorps primaires utilisés (p53, FoxO1 et PARP) sont achetés de la compagnie Cell Signaling, GAPDH et β -tubuline sont de la compagnie Abcam, PAX8 est de la compagnie Santa Cruz et β -actine est de la compagnie Sigma.

2.7 qPCR

Les ARN totaux sont extraits et purifiés à l'aide des réactifs Trizol et Direct-zol RNA MiniPrep (ZYMO RESEARCH). L'ADNc est fabriqué à partir de 0,4 μ g d'ARN

par la transcriptase inverse Qscript de la compagnie Quanta Bioscience. L'ADNc obtenu est ensuite amplifié par qPCR en utilisant des amorces spécifiques. Le TBP humain a été utilisé comme témoin de normalisation pour l'analyse quantitative. L'analyse a été effectuée grâce au programme Stratagene Mx 3000P (Agilent Technologies) en utilisant un mélange composé de PerfeCTa SYBR Green SuperMix Low Rox (Quanta BioSciences) à la dilution recommandée, 600 nm d'amorces sens et anti-sens et une dilution optimisée de l'ADNc composant un volume total de 20 µl. Les conditions de PCR étaient : 95 °C pendant 10 secondes, 62 °C pendant 30 secondes puis 72 °C pendant 30 secondes, pour un total de 40 cycles.

2.8 Immunoprecipitation

Les cellules HIESC ont été cultivées jusqu'à confluence de 80 % puis lavées trois fois avec du PBS froid. Ensuite, les cellules ont été immédiatement homogénéisées dans un tampon d'homogénéisation (50 mMol de Tris-HCl (pH 7,5), 150 mmol de NaCl, 5 mmol d'EDTA, 10 % de SDS, 0,5 % de déoxycholate de sédium, 1 % de NP40, 10 g /ml de leupeptine, 10 g/ml d'aprotinine et 1 mmol de PMSF) puis une centrifugation est effectuée à 12 000 RPM pendant 10 min à 4 °C afin de recueillir le surnageant. L'immunoprecipitation a été réalisée en incubant 0,5 mg de lysats cellulaires totaux avec un anticorps primaire anti- PAX8 (Santa Cruz Biotechnology) ou -p53 (Cell Signaling) à 4 °C en présence de protéines G-Sépharose (Sigma) pendant 4 heures sous agitation. Les précipités ont été lavés quatre fois avec du PBS glacé, remis en suspension dans du tampon d'échantillon de SDS, résolus par SDS-PAGE et transférés dans des membranes de nitrocellulose. Ils ont ensuite été incubés avec un anticorps primaire PAX8 ou p53 à 4 °C pendant la nuit. Finalement, les membranes ont été incubées avec des anticorps secondaires pendant 2 h et visualisées en utilisant un système de chimioluminescence amélioré tel que décrit dans la section Western-Blot.

2.9 Analyse statistique

Toutes les statistiques ont été effectuées avec le logiciel GraphPadPrism version 5,03. Le test utilisé est le test T de Student bilatéral pour valeurs appariées avec un intervalle de confiance de 95 %. Les différences significatives ont été acceptées pour les valeurs de $p < 0,05$.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

Plusieurs changements morphologiques et biochimiques caractéristiques peuvent être mesurés pour valider l'efficacité de la décidualisation *in vitro* de cellules HIESC (Chapdeleine et al, Mol Hum Reprod. 2006 May;12(5):309-19). Dans le cadre de mon projet de recherche, je vérifiais lors de chaque expérience de décidualisation que la quantité du marqueur Foxo1 était significativement augmentée dans les cellules HIESC au fil des jours de traitement avec le mélange AMPc + MPA. La figure 3.1 montre un résultat représentatif. Suite à cette confirmation de la réussite de l'induction de la décidualisation *in vitro* des HIESC, nous pouvions procéder à nos analyses d'intérêt dans les HIESC en décidualisation.

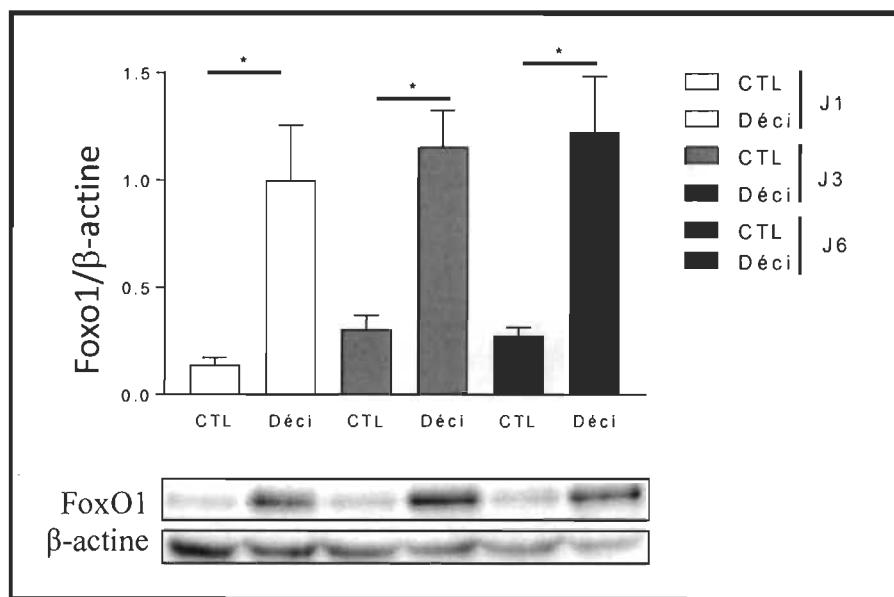


Figure 3.1 Le marqueur de décidualisation FOXO1 est régulé à la hausse lors de l'induction de la décidualisation *in vitro* des HIESC.

Les cellules HIESC ont été traitées pour les nombres de jours indiqués (1, 3 ou 6) avec un mélange Déci (0,5 mM de 8-bromo-AMPc et de 1 µm d'acétate de méthoxyprogesterone/MPA) et la quantité de la protéine Foxo1 a été déterminée par immunobuvardage de type western.

Une normalisation a été effectuée sur la quantité de b-actine. Les valeurs sont une moyenne +/- écart type de 4 expériences indépendantes. * p<0.05.

Dans le but de déterminer l'impact de l'induction de la déidualisation sur l'expression de PAX8 dans les HIESC, nous avons mesuré la quantité de son ARNm par RT-qPCR et de sa protéine par immunobuvaradage de type western. Nous avons ainsi observé qu'il y a une augmentation de la quantité de protéine PAX8 lors de la déidualisation, et ce, à partir de la troisième journée de traitement (Figure 3.2A). En même temps, la quantité de l'ARNm de PAX8 était diminuée au cours de ce processus, également à partir du 3^e jour de traitement (Figure 3.2B). Ces résultats indiquent que le facteur de transcription PAX8 s'accumule dans les HIESC au fil de la déidualisation et que son expression est régulée à la fois au palier transcriptionnel et post-traductionnel, et ce, de manière différente pour chaque palier.

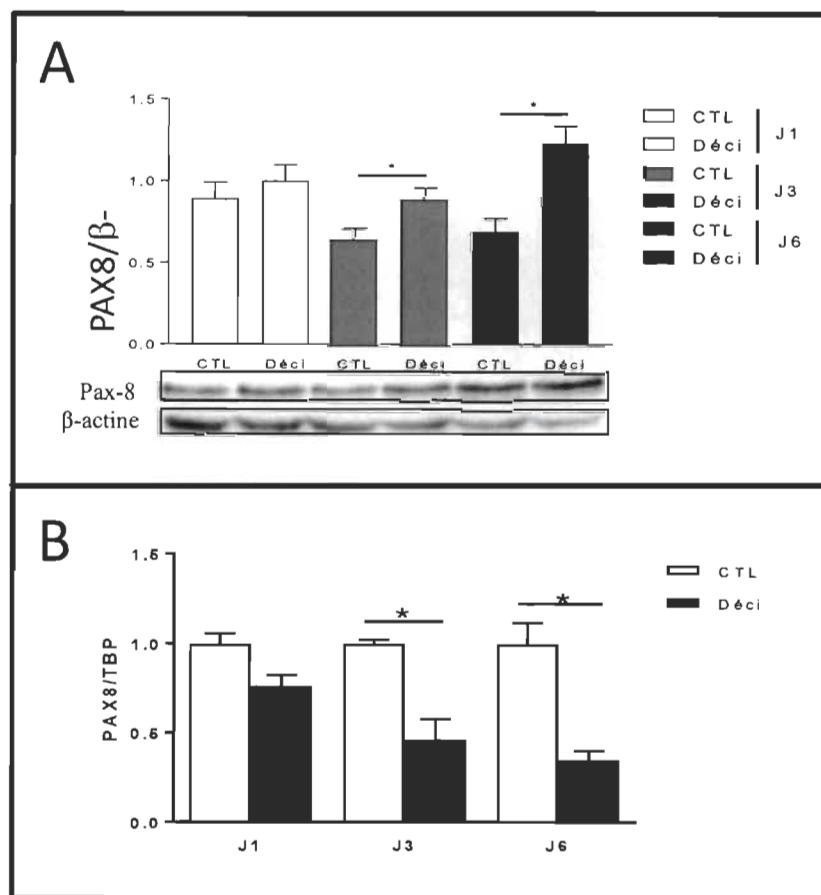


Figure 3.2 La protéine PAX8 est régulée à la hausse pendant la déidualisation des HIESC, au palier post-transcriptionnel.

Les cellules HIESC ont été traitées pour les nombres de jour indiqués (1, 3 ou 6) avec un mélange Déci (0,5 mM de 8-bromo-AMPc et de 1 µm d'acétate de méthoxyprogesterone/MPA) puis A) la quantité de la protéine PAX8 a été déterminée par immunobuvardage de type western. Une normalisation a été effectuée sur la quantité de b-actine; B) la quantité de l'ARNm de PAX8 a été déterminée par RT-qPCR. Une normalisation a été effectuée sur la quantité de Tata-box binding protein (TBP). Les valeurs sont une moyenne +/- écart type de 3 expériences indépendantes. * p<0.05.

Afin de confirmer les résultats obtenus à la figure 3.1 et 3.2 dans un autre modèle cellulaire, nous avons effectué les mêmes expériences sur une deuxième lignée cellulaire, les T-hESC. Il s'agit de cellules endométriales stromales humaines immortalisées cette fois à l'aide de la télomérase (Krikun et al. 2004 *Endocrinology* 145(5):2291-2296). Lorsque la déidualisation est induite dans ces cellules, l'augmentation du marqueur protéique Foxo1 en faisant foi (Figure 3.3A), la quantité de la protéine PAX8 est régulée à la hausse à partir du 3^e jour de la déidualisation (Figure 3.3B) à l'instar des cellules HIESC (Figure 3.2A). Ceci renforce la conclusion selon laquelle dans les cellules endométriales stromales soumises à la déidualisation, la protéine PAX8 s'accumule.

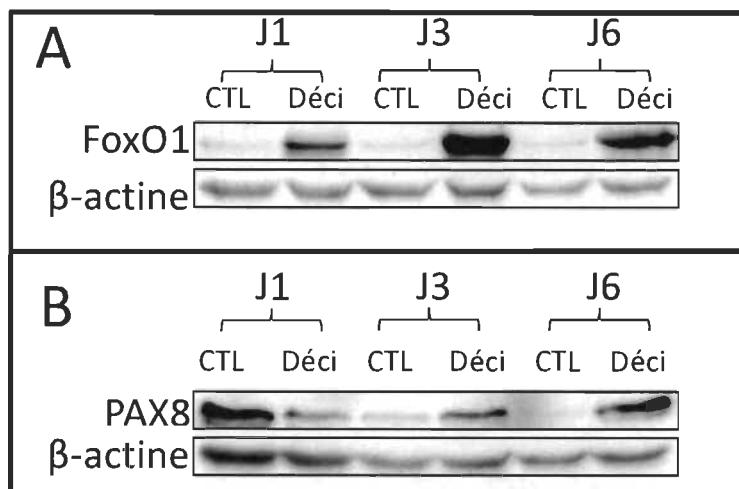


Figure 3.3 La protéine PAX8 serait régulée à la hausse pendant la déidualisation des T-HESC également.

Les cellules T-HESC ont été traitées pour les nombres de jour indiqués (1, 3 ou 6) avec un mélange Déci (0,5 mM de 8-bromo-AMPc et de 1 µm d'acétate de méthoxyprogesterone (MPA) puis la quantité de A) la protéine Foxo1; B) la protéine PAX8 ont été déterminées par immunobuvardage de type western. Une normalisation a été effectuée sur la quantité de b-actine. Cette expérience préliminaire a été effectuée une fois.

Pour un premier aperçu de l'activité du facteur de transcription PAX8 dans les CES pendant la déidualisation, nous avons analysé la localisation intracellulaire de cette protéine à l'aide de la méthode biochimique de l'extraction cytosolique-nucléaire. Dans la figure 3.4, nous avons représenté le ratio de la quantité de protéine PAX8 dans le noyau sur sa quantité dans le cytosol des cellules, au fil de la déidualisation. Nous observons une augmentation significative de ce ratio en réponse au traitement de déidualisation, aux jours 3 et 6. Ceci indique que la déidualisation induit un changement de localisation intracellulaire pour PAX8, au profit d'une localisation nucléaire. Puisqu'un facteur de transcription tel que PAX8 doit être importé au noyau pour exercer sa fonction sur l'expression génique, ces résultats suggèrent que PAX8 est d'avantage importé au noyau cellulaire après induction de la déidualisation ce qui lui permettrait de jouer activement son rôle de régulateur de la transcription pendant ce processus.

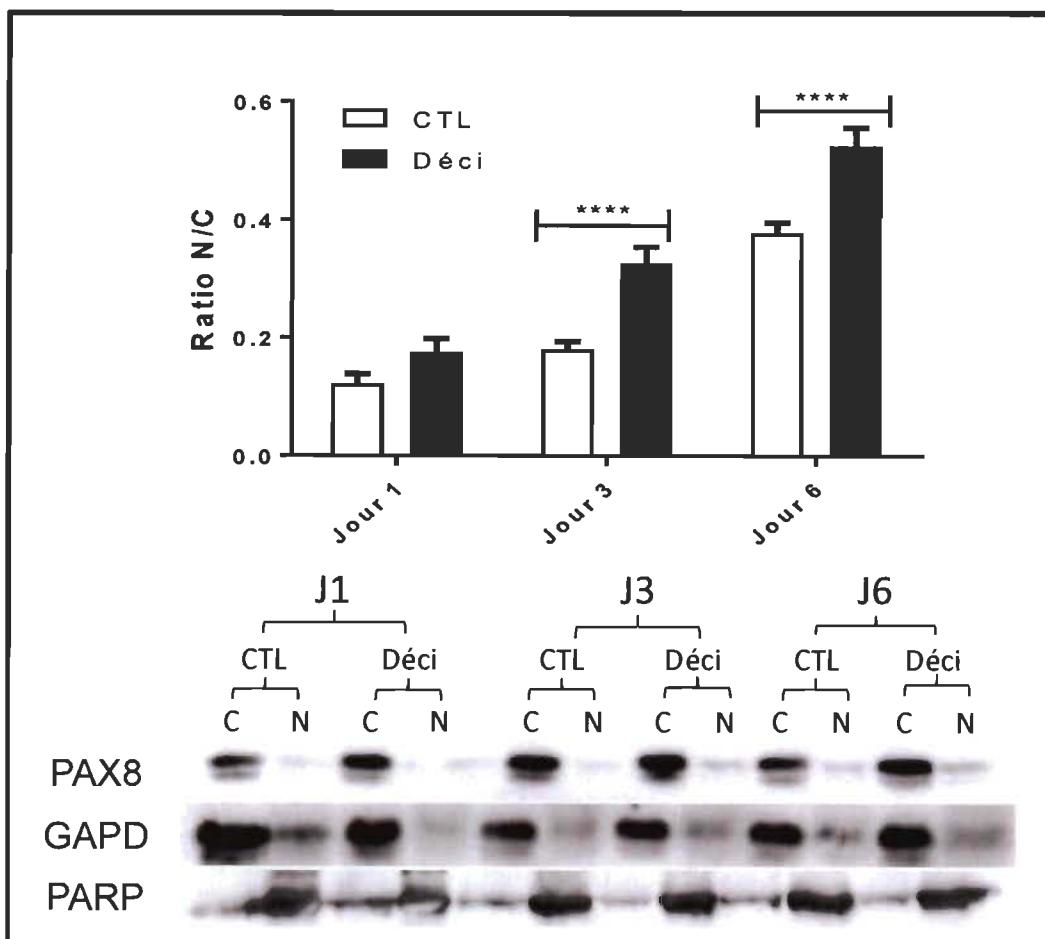


Figure 3.4 Localisation intracellulaire de la protéine PAX8 dans les CES humaines est modifiée suite à un traitement de déidualisation de 1, 3 et 6 jours.

Les cellules HIESC ont été traitées pour les nombres de jours indiqués (1, 3 ou 6) avec un mélange Déci (0,5 mM de 8-bromo-AMPc et de 1 µM d'acétate de médroxyprogesterone/MPA) puis la quantité de la protéine PAX8 a été analysée par western blot. La normalisation de la fraction cytosolique (C) est faite sur GAPDH et la fraction nucléaire (N) sur PARP. Les valeurs sont des moyennes +/- écart-type de trois expériences indépendantes.

La plupart des facteurs de transcription s'associent à de multiples cofacteurs, dont d'autres facteurs de transcription, lorsqu'ils sont activés et pour permettre leur liaison à leur gène cible. Nos résultats antérieurs avaient montré une accumulation du facteur de transcription p53 dans les HIESC au fil de la déciduallisation (Tremblay, 2016) et nous avons débuté l'examen de la possible interaction entre les protéines PAX8 et p53 dans les HIESC au fil de la déciduallisation. À cette fin, nous avons réalisé l'immunoprecipitation de PAX8 pour vérifier si la protéine p53 était co-immunoprecipitée avec PAX8. Les résultats préliminaires suggèrent que dans les HIESC à l'état basal, les deux protéines ne sont pas liées dans un même complexe (Figure 3.5). Toutefois, ceci pourrait être différent lorsqu'elles sont potentiellement activées en contexte de la déciduallisation et c'est ce que l'équipe du Dr Van Themsche déterminera sous peu.

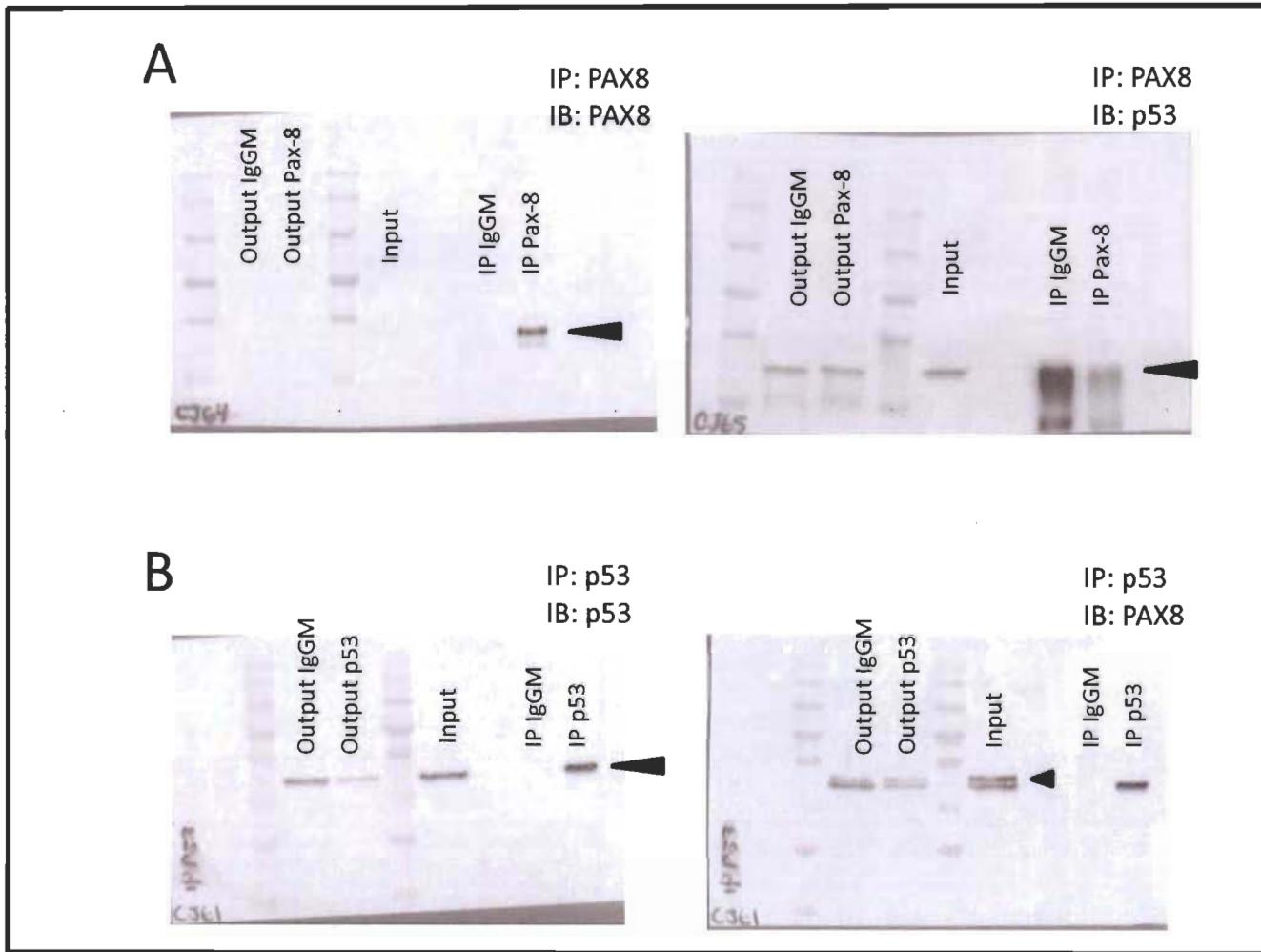


Figure 3.5 La protéine PAX8 et p53 ne semblent pas interagir dans les HIESC.
 Les cellules HIESC à l'état basal ont été lysées ont été soumises à une immunoprécipitation à l'aide d'un anticorps spécifique pour PAX8 (A) ou p53 (B) puis la quantité de la protéine p53 associée avec la protéine PAX8 (A) et la quantité de la protéine PAX8 associée avec la protéine p53 ont été déterminées par immunobuvardage de type western. Les résultats montrés sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

Toujours dans le but de déterminer le niveau d'activation de la protéine PAX8 dans les CES en contexte de décidualisation, nous avons débuté l'analyse des modifications post-traductionnelles de PAX8 à l'aide de la procédure d'immunoprécipitation. Après celle-ci, la présence de la modification post-traductionnelle constituant en l'ajout du groupement phosphate sur une des séries de la protéine a été analysée par immunobuvardage de type Western. Dans l'expérience préliminaire montrée, suite à un traitement de trois jours de décidualisation dans les HIESC, la phosphorylation sur sérine de la protéine PAX8 n'a pas pu être détectée parce que l'immunoprécipitation de la

protéine totale n'a pas été efficace dans ces conditions (Figure 3.6). Cependant, une grande quantité de protéine PAX8 a été immunoprécipitée dans les conditions de traitement contrôle puis il a été possible de détecter une protéine dont la taille correspondait à celle de PAX8, avec l'anticorps anti-phosphosérine. Ceci suggère qu'en conditions basales, PAX8 est phosphorylée sur sérine et pour l'instant, il n'est pas possible de tirer une conclusion préliminaire quant à la phosphorylation sur sérine de PAX8 après induction de la déciduallisation *in vitro*.

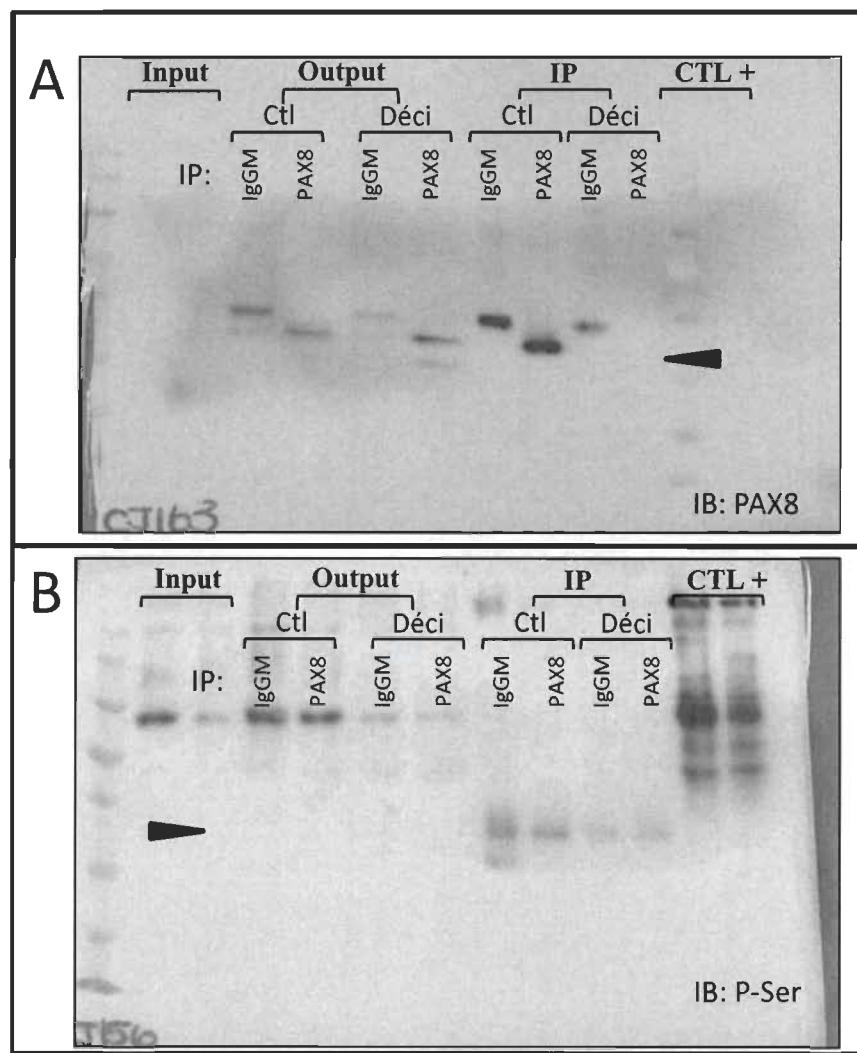


Figure 3.6 La phosphorylation sur sérine de la protéine PAX8 est inchangée dans les HIESC en déciduallisation.

A) PAX8 est immunoprécipitée avec succès à partir d'une lyse HIESC soumises à un traitement de déciduallisation pour trois jours, tel que montré par un Western blot de PAX8 après trois jours de déciduallisation.

B) Western blot réalisé à l'aide d'un anticorps anti-P-Ser à la suite d'une

immunoprecipitation de PAX8 dans les mêmes échantillons qu'en A. CTL + (positive control): p70 S6 Kinase MCF7 Control Cell Extracts. Chaque résultat montré est représentatif de deux expériences indépendantes.

Afin d'identifier des gènes cibles potentiels de PAX8 dans les CES lors de la décidualisation, le niveau d'ARNm de certains membres de la famille des Wnt, ainsi que E2F1, ont été analysés par RT-qPCR. Nous avons observé une augmentation significative de la transcription de Wnt4 alors que les autres gènes cibles potentiels de PAX8 analysés ne subissent aucune variation de leur transcription génique, pendant la décidualisation (Figure 3.7). Puisque l'expression du gène Wnt4 est augmentée pendant la décidualisation, comme l'est la quantité du facteur de transcription PAX8, et que PAX8 peut réguler à la hausse l'expression de Wnt4 dans certains types cellulaires, il est possible que PAX8 régule à la hausse l'expression de Wnt4 dans les CES en décidualisation.

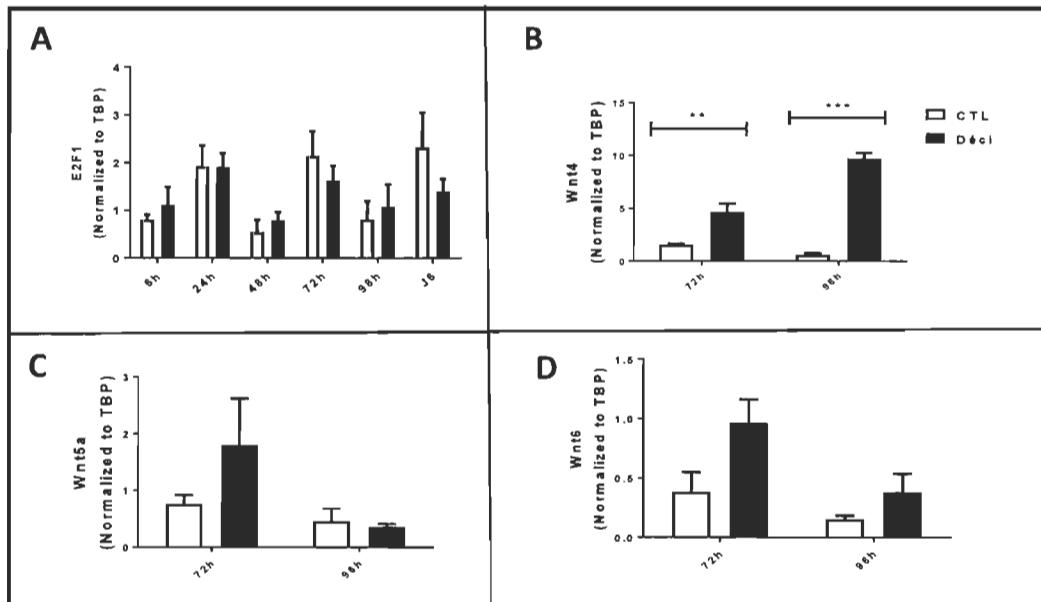


Figure 3.7 La quantité d'ARNm de Wnt4 est sélectivement augmentée dans les HIESCs lors de la décidualisation.

Analyse par RT-qPCR de la quantité d'ARNm A) de E2F1; B) de Wnt4; C) de Wnt5a; D) de Wnt6. Analyses par la méthode de Pfaffl. TBP (tata-binding protein) est utilisé pour la normalisation. Les valeurs sont des moyennes +/- écart-type de trois expériences indépendantes.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

La décidualisation des cellules endométriales stromales de l'utérus est un processus biologique primordial à la fertilité des femelles, chez diverses espèces de mammifères incluant l'humain ((Cha, Sun et al. 2012); (Kajihara, Brosens, & Ishihara, 2013)). Au cours de ce processus, des cellules de type fibroblastique subissent un changement prolifératif et se différencient en cellules spécialisées, capables d'une interaction optimale avec un éventuel embryon. Les efforts de recherche des dernières années ont permis de mettre en lumière de nombreux facteurs endocriniens, paracrines et autocrines qui initient ou qui accompagnent la décidualisation (Zhu et al. Gene 551 (2014) 1-14). Cependant, tous n'ont probablement pas été identifiés, et encore moins compris. L'équipe du Dr Van Themsche porte son attention sur certains facteurs de transcription dont le taux de transcription est modulé dans les cellules endométriales stromales en décidualisation. Le raisonnement derrière le travail est que la caractérisation des causes, des mécanismes et des effets de ces changements de contenu pourrait permettre d'attribuer un(des) nouveau(x) rôles à ces facteurs de transcription dans un processus physiologique.

La quantité du facteur de transcription p53 est augmentée dans les cellules endométriales stromales humaines après l'ovulation, soit au moment où est induite la décidualisation (J Clin Endocrinol Metab, 2004. 89(10): p. 5233-44). Pendant la première année de ma maîtrise, j'ai participé activement à l'avancement d'une étude en cours dans l'équipe du Dr Van Themsche, portant sur la régulation du facteur de transcription p53 dans les cellules endométriales stromales en cours de décidualisation *in vitro*. Mes efforts ont ainsi accéléré la complétion du projet de maîtrise de mon collègue étudiant Roch Tremblay (Tremblay 2016). Ainsi, j'ai eu l'opportunité d'investiguer la régulation de la protéine p53 dans les HIESC sous l'influence d'un facteur alimentaire, la génistéine. En effet, puisque la décidualisation est finement régulée par l'hormone estradiol, il est

important d'étudier l'impact que la consommation de phytoestrogènes, qui sont maintenant omniprésents dans la diète occidentale, pourrait avoir sur le processus de la décidualisation ainsi que sur ses acteurs intracellulaires (Irwin, Kirk et al. 1989, Cederroth, Zimmermann et al. 2012). Parmi les aliments les plus fréquemment consommés en Occident, contenant des phytoestrogènes, nous retrouvons le tofu, le pain multigrains, le thé vert et le brocoli cru (Patisaul and Jefferson 2010). Il a ainsi été observé au cours de nos travaux que la génistéine pouvait engendrer une accumulation de la protéine p53 dans les cellules endométriales stromales au fil de la décidualisation et ce, dans le noyau des cellules spécifiquement (en vérité : une augmentation relative du contenu dans le noyau accompagné d'une diminution relative dans le cytosol).

En fait, tant l'induction de la décidualisation dans les HIESC par une combinaison d'un agent mobilisé en réponse à l'estradiol (l'AMPc) et d'un dérivé de la progestérone (l'acétate de médroxyprogesterone), que leur traitement avec un estrogène végétal (la génistéine) induisaient l'augmentation du niveau protéique de p53 ((Tremblay 2016), figures 3 et 4). Ces résultats concordent avec des études antérieures qui utilisaient des modèles *in vitro* différents de la décidualisation et qui avaient démontré que l'induction de la décidualisation induisait une accumulation de la protéine p53 (Logan et al. Reprod Sci. 2012 Aug; 19(8):883-94; Pohnke et al. J Clin Endocrinol Metab. 2004 Oct;89(10):5233-44). Les résultats concordent également avec d'autres études qui soulignent que l'expression de p53 est régulée à la hausse en réponse à des signaux estrogéniques, par exemple dans des lignées de cellules du carcinome du poumon (Mukhopadhyay et Roth, Oncogene. 1997 Jan 23;14(3):379-84) ou dans des cellules normales du colon de souris (Weige et al. J Steroid Biochem Mol Biol. 2012 Feb;128(3-5):113-20), bien que nous ayons trouvé une étude où l'exposition à de l'estradiol (dose de 10 ng/ml, de l'ordre d'une concentration physiologique (Mikkola et al. Maturitas. 1996 Oct;25(2):141-7; Santanam et al. J Lipid Res. 1998 Nov;39(11):2111-8)), diminuait le contenu protéique de p53 (ceci, dans des cellules du muscle lisse utérin cancéreuses) (Maruo et al. Hum Reprod Update. 2004 May-Jun;10(3):207-20). Une augmentation de p53 par l'estradiol est cohérente avec l'effet biologique de l'estradiol dans les cellules de type mésenchymal/fibroblastique, qui

voient leur prolifération diminuée en réponse à des doses physiologiques d'estradiol (Hong et al. *Stem Cells and Development*. 2011;20(5):925-93), une fonction largement attribuée à p53 (Taylor et Stark *Oncogene* (2001) 20, 1803; Logan et al. *Reprod Sci*. 2012 Aug;19(8):883-94). Cependant, les facteurs responsables de la régulation à la hausse de p53 dans les cellules endométriales stromales en réponse à des signaux estrogéniques demeuraient inconnus à ce point. Les résultats quant à la régulation de p53 dans les cellules en décidualisation soulèvent donc l'hypothèse d'un rôle pour cette protéine, dans un contexte biologique qui est différent de celui habituellement associé à une activation de p53, soit la réponse au stress génotoxique. D'autres données émergentes appuient le concept de rôles biologiques plus diversifiés pour p53; dans les cellules immunitaires par exemple, p53 est activé et contribue à plusieurs réponses acquises, par exemple dans la réponse antivirale (Muñoz-Fontela C, *Nat Rev Immunol*. 2016 Dec; 16(12): 741-750).

Pour la deuxième année de ma maîtrise, je me suis ainsi davantage attardée à mon propre projet de recherche, qui visait à identifier certains facteurs pouvant être responsables de réguler le contenu protéique de p53 pendant la décidualisation. Parmi eux, PAX8 représentait un candidat de choix. Cette dernière est principalement décrite dans le contexte du développement embryonnaire (Mansouri, Stoykova et al. 1994, Sharma, Sanchez-Ferrás et al. 2015) et il avait été démontré antérieurement qu'elle pouvait réguler l'expression du gène p53 dans certains types cellulaires (Stuart, Haffner et al. 1995). De plus, les premières étapes de la décidualisation consistent principalement à assurer une prolifération cellulaire accrue des CES, concordant avec le rôle prolifératif attribué à PAX8 dans certains contextes physiologiques (Irwin, Kirk et al. 1989, Di Palma, Filippone et al. 2013). La présence de PAX8 dans les cellules endométriales stromales pourrait donc être essentielle à une bonne complétion de la décidualisation ainsi qu'à la régulation de la protéine p53 en début de processus. Toutefois, la régulation et le rôle de PAX8 dans les cellules endométriales stromales pendant la grossesse, et plus précisément pendant la décidualisation, n'ont jamais été investigués en profondeur. Bien que PAX8 ait un rôle favorisant la prolifération et la survie cellulaires, nécessaires à la première partie de la décidualisation ainsi que dans la régulation de plusieurs gènes clés dans ce processus dont certains membres de la famille des Wnt et p53 (Stuart, Haffner et al. 1995, Di Palma,

Filippone et al. 2013, Wang, Lu et al. 2013, Filippone, Di Palma et al. 2014, Wang, Zhang et al. 2016), elle n'a pas été étudiée dans le contexte de la reproduction féminine. Ses modifications post-traductionnelles par exemple, qui renseigneraient sur son état d'activation et sa stabilité, sont à peu près inconnues.

Pour la deuxième année de ma maîtrise, nous avons donc entrepris de caractériser l'expression génique, la régulation du contenu protéique ainsi que l'activité de la protéine PAX8 dans les cellules endométriales stromales lors de la décidualsection. En parallèle, nous avons débuté l'étude d'une hypothétique relation fonctionnelle entre les facteurs de transcription PAX8 et p53 dans les cellules endométriales stromales dans le contexte de la décidualsection, afin de déterminer si PAX8 pourrait bel et bien réguler l'expression de la protéine p53, et si les deux facteurs de transcription se lient au sein d'un même complexe protéique, dans ce contexte. En effet, des études récentes ont démontré que p53 pouvait s'associer à divers facteurs de transcription au sein d'un complexe de préinitiation de la transcription, de manière cellule- et promoteur-spécifiques (Beckerman et Prives, *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010 Aug;2(8)).

Comme mentionné plus tôt, nous avons utilisé des cellules endométriales stromales humaines immortalisées à l'aide de l'antigène large T du virus. Il avait déjà été rapporté que l'immortalisation cellulaire à l'aide de l'antigène large T du virus simien SV40 pouvait interférer avec le bon fonctionnement de certains suppresseurs de tumeurs comme p53 et Rb, deux éléments nécessaires au processus de décidualsection (Ikeda, Jakoi et al. 1996, Chapdelaine, Kang et al. 2006, Patil, Begum et al. 2014). Ainsi, dans certaines conditions, l'antigène large T se lierait à ces deux suppresseurs de tumeur, leur permettant toujours de se lier aux promoteurs de leurs gènes cibles tout en les rendant incapables de transactiver ces derniers (Sheppard, Corneillie et al. 1999). Nous avons noté que ce mécanisme a été décrit au niveau des cellules murines, mais pas corroboré dans des cellules humaines. Au contraire, des études du fonctionnement de p53 dans les HIESC (Markovics, Carroll et al. 2005, Chapdelaine, Kang et al. 2006) ont démontré que l'antigène large T se liait effectivement aux suppresseurs de tumeurs, mais qu'il se dissociait de ces derniers lors qu'ils se lient aux promoteurs de leurs gènes cibles.

Cette dissociation permet donc aux suppresseurs de tumeurs d'effectuer leur pleine fonction, même dans des cellules immortalisées à l'aide de l'antigène T. Confirmant ce principe, nos données montraient que la répression de l'expression de p53 dans les HIESC à l'aide d'un petit ARN d'interférence (siRNA) interférait avec la production de plusieurs de ses gènes cibles ((Tremblay 2016) Figure 4.1). Les HIESC représentent donc un modèle cellulaire valide pour l'étude de la régulation et du rôle de p53. Elles représentent d'ailleurs un meilleur choix à cet égard qu'une deuxième lignée de cellules endométriales stromales humaines, dont nous a fait don le Dr Bruce Murphy de l'Université de Montréal, immortalisées cette fois à l'aide de la télomérase. En effet dans ces dernières, la quantité endogène de p53 était moins grande que dans les HIESC immortalisées à l'aide de l'antigène T et bien que nous parvenions à mesurer une augmentation significative du contenu protéique de p53 pendant la déciduallisation *in vitro* de ces cellules, nous étions préoccupés par des difficultés à immunoprécipiter p53 et à le détecter par immunofluorescence dans ce modèle.

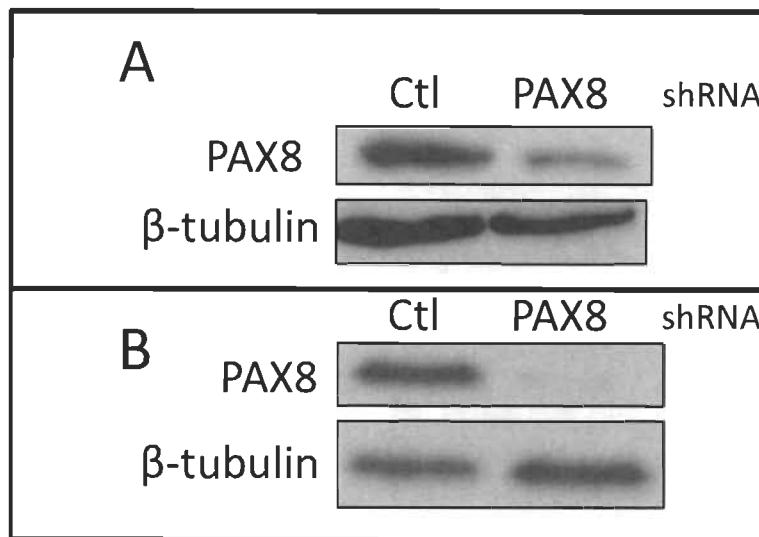


Figure 4.1 Réduction efficace de la quantité de la protéine PAX8 après interférence à l'ARN de PAX8.
Les cellules HIESC ont été transfectées avec un petit ARN en épingle à cheveux spécifique à PAX8 pendant 48 h. La quantité de la protéine PAX8 résiduelle a été déterminée par immunobuvardage de type western. Deux expériences indépendantes sont montrées.

Enfin, lorsque je traitais les HIESC immortalisées à l'aide de l'antigène T, avec le stimulus de la décidualisation *in vitro*, j'observais systématiquement une augmentation significative de la quantité du marqueur de la décidualisation FOXO1 parmi les protéines totales extraites des cellules traitées, validant également cette lignée cellulaire pour modéliser la décidualisation *in vitro*, telle que décrit précédemment par l'équipe qui l'a produite (Chapdelaine, Kang et al. 2006).

4.1 PAX8 dans la décidualisation

Le premier objectif spécifique de ma maîtrise était donc de caractériser la synthèse, l'expression protéique ainsi que l'activité de la protéine PAX8 dans les cellules endométriales stromales lors de la décidualisation. Dans notre modèle cellulaire, nous avons tout d'abord découvert pour la première fois qu'il y avait une nette augmentation de l'expression protéique de la protéine PAX8 dans les CES lors de la décidualisation. J'ai pris soin, exceptionnellement pour ce résultat fondateur de mon projet de recherche, de confirmer ce résultat en utilisant un modèle cellulaire différent. Dans une lignée de cellules endométriales stromales humaines immortalisées à l'aide de la télomérase, les T-HESC, le stimulus de la décidualisation conduisait également à l'augmentation de la quantité totale de la protéine PAX8, à partir du 3^e jour de la décidualisation.

Les deux lignées cellulaires modèles ont toutefois montré une différence dans la régulation du contenu protéique en PAX8 au tout début de la décidualisation (soit après 24 h de traitement) : dans les SV40 Tag-HIESC, la quantité de la protéine PAX8 n'était pas modulée au premier jour de la décidualisation, alors que dans les télomérase-HESC, le contenu protéique en PAX8 diminuait fortement. Pour l'instant nous ne savons pas ce qui explique cette différence entre les deux modèles, mais il ne nous paraît pas improbable qu'une diminution de la quantité totale de la protéine PAX8 s'exerce au début de la décidualisation : en effet, cette diminution de PAX8 pourrait être nécessaire pour permettre l'accumulation subséquente de la protéine p53 dans les cellules endométriales stromales en décidualisation (qui est significative à partir du 3^e jour de la décidualisation). Le raisonnement est le suivant : si PAX8 régule négativement

l'expression de p53 dans ces cellules et dans ce contexte tel qu'elle en est capable dans d'autres modèles (Stuart et al. EMBO J. 1995 Nov 15;14(22):5638-45), alors la diminution de la quantité de PAX8 durant les premières 24h de la décidualisation pourrait permettre l'expression augmentée de p53 telle que détectée par la suite (Tremblay 2016). Pour élucider le rôle de PAX8 dans la régulation de l'expression de p53, nous planifions procéder par interférence à l'ARN et à cette fin, nous avons déjà validé dans notre modèle expérimental l'efficacité d'un petit ARN d'interférence, qui induisait une diminution de la quantité totale de la protéine PAX8 de plus de 80 %. Des travaux futurs par de nouveaux membres de l'équipe du Dr Van Themsche pourront déterminer rapidement l'impact d'une telle diminution de la quantité de PAX8 dans les HIESC sur la quantité de p53 et l'efficacité de la décidualisation. L'augmentation reproductible dans les deux modèles cellulaires (deux procédés d'immortalisation) du contenu protéique de PAX8 à partir du 3^e jour de la décidualisation suggère fortement que ce facteur de transcription joue un rôle important pour la progression de la décidualisation. À cet égard, les expérimentations impliquant la répression de l'expression de PAX8 à l'aide de l'interférence à l'ARN seront poursuivies pendant un minimum de 72 h, pour déterminer le rôle de PAX8 dans la progression de la décidualisation.

L'augmentation de la quantité totale de la protéine PAX8 au moment de la décidualisation *in vitro* soulève l'excitante hypothèse que PAX8 pourrait représenter un nouveau biomarqueur pour le diagnostic de troubles utérins de l'infertilité. D'ailleurs, PAX8 a déjà été identifiée comme un biomarqueur dans les tissus thyroïdiens, pour l'établissement du diagnostic et du pronostic de certaines maladies (Perrella et al. Thyroid. 1997 Dec;7(6):817-21). Nous n'avons pour l'instant pas accès à une banque de tissus endométriaux humains pour valider cette hypothèse. Une étude a montré que l'ARN de PAX8 s'accumulait au niveau des cellules endométriales stromales humaines après l'ovulation, ce qui correspond au moment de l'initiation de la décidualisation *in vivo* (Mittag et al. 2007 Endocrinology 148(2):719-72); toutefois l'étude n'a pas été étendue à la protéine PAX8.

Par la suite, nous avons découvert que dès le début de la décidualisation, la quantité de l'ARNm de PAX8 était régulée à l'opposé de la quantité de la protéine qu'il encode, puisque le contenu en ARN diminue suite à l'induction du traitement de décidualisation alors que le contenu protéique augmente. Cette diminution rapide de l'expression du gène de PAX8 semble être nécessaire à une bonne progression de la décidualisation, puisqu'elle se maintient jusqu'à au moins six jours du processus *in vitro*. Rappelons-nous que l'observation d'une augmentation de l'ARN de PAX8 lors de la décidualisation a été faite *in vivo*. Ceci pourrait expliquer la discordance avec nos résultats *in vitro*. Il est possible de penser que, comme pour la protéine p53, il se produit une boucle de rétro-inhibition afin de diminuer la synthèse de la protéine PAX8 à un temps précis (Wang, Taplick et al. 2004). Il est également possible qu'une étape de modifications post-traductionnelles stabilise la protéine malgré la diminution de sa transcription. La stabilité de la protéine PAX8 pourrait être primordiale à la prolifération cellulaire observée en début de décidualisation (Di Palma, Filippone et al. 2013). Afin de vérifier cette hypothèse, les cellules HIESC pourront être soumises à l'interférence à l'ARN de p53, en absence puis en présence du stimulus de décidualisation, puis leur prolifération mesurée par le test MTT et validée par le test d'incorporation de BrdU. En parallèle, leur index apoptotique pourra être déterminé à la suite d'un marquage Hoescht puis validé à l'aide du test d'Annexine V.

L'analyse des fractions cytosolique et nucléaire a été une première étape de l'examen du niveau d'activation de la protéine PAX8 dans les cellules endométriales stromales en décidualisation, en plus de renseigner sur sa distribution normale dans des conditions basales. Nous avons découvert pour la première fois que la protéine PAX8 voyait sa proportion nucléaire augmenter après 3 et 6 jours de décidualisation. Puisque la protéine PAX8 est un facteur de transcription, il est fort probable que l'augmentation la localisation des protéines PAX8 dans le compartiment nucléaire, au détriment du compartiment cytosolique, soit associée à une augmentation du niveau d'activation de la protéine et à sa capacité de liaison et de transactivation de ses promoteurs cibles. Nous posons l'hypothèse que ce changement de la distribution intracellulaire de PAX8 au fil de la décidualisation soit causé par certaines modifications post-traductionnelles, et la

seule que nous puissions pointer du doigt pour l'instant, faute de davantage de description dans la littérature à ce sujet, est la phosphorylation. Une étude datant de 1997 qui a recouru au radiomarquage à l'aide du ^{32}P a montré que la protéine PAX8 extraite de lignées de cellules de la thyroïde était phosphorylée en conditions basales (Poleev et al. Eur. J. Biochem. 247, 860-869 (1997)). Il n'a pas été déterminé subséquemment sur quel acide aminé cette phosphorylation avait lieu. Par ailleurs, les événements potentiels d'ubiquitination, sumoylation et autres sur cette protéine n'ont pas été encore étudiés, peu importe le contexte cellulaire. Enfin, il n'existe à notre connaissance aucun anticorps reconnaissant spécifiquement certaines modifications post-traductionnelles sur la protéine PAX8. Il est donc de mise de procéder à une large étude de la phosphorylation (sur sérine, sur thréonine), de l'ubiquitination et de la sumoylation, en effectuant en premier lieu l'immunoprécipitation de la protéine PAX8 à l'aide d'un anti-PAX8, puis la détection générique de tous les sites de phosphorylation sur sérine par exemple, à l'aide d'un anti-phosphoséristine. C'est ce que j'ai entrepris et dans une expérience préliminaire, PAX8 a été efficacement immunoprécipitée dans les conditions de traitement contrôle. Du complexe protéique immunoprécipité, l'anti-phosphoséristine a reconnu une protéine phosphorylée sur sérine dont la taille correspond à celle de PAX8, ce qui suggère fortement que PAX8 soit phosphorylée sur sérine dans les conditions basales. Cependant dans les cellules en déciduïalisation, l'immunoprécipitation de PAX8 n'a pas permis de détecter la protéine totale et donc, il était impossible de déduire quoi que ce soit quant à l'impact de la déciduïalisation sur la phosphorylation sur sérine de PAX8. Un souci technique explique probablement la difficulté à immunoprécipiter PAX8 dans ces conditions, mais il n'y a aucun motif raisonnable pour suggérer qu'elle soit plus difficile à réussir dans les cellules en déciduïalisation que dans les cellules en condition contrôle. Cette expérience mérite d'être reproduite et je ne doute pas que l'étudiant qui la réalisera parviendra à immunoprécipiter PAX8, autant dans les cellules soumises au traitement de déciduïalisation que celles ayant reçu le traitement contrôle. Pour ce faire, il devra y avoir une optimisation du protocole d'immunoprécipitation afin de détecter PAX8 lors de la déciduïalisation.

La fonctionnalité et l'activité d'un facteur de transcription peuvent également être mesurées par l'analyse de l'expression de ses gènes cibles. Certains gènes cibles ont déjà été attribués à PAX8, dans d'autres cellules que celles de l'endomètre toutefois, dont Wnt4, Wnt5 et Wnt6 (Filipone 2014;), E2F1 (Li 2011), p53 (Stuart 1995). Pour mieux comprendre le rôle de PAX8 dans les cellules en déidualisation, il est important d'y identifier puis d'y mesurer certains de ses gènes cibles. Bien qu'il ait déjà été démontré que la protéine Wnt4 était nécessaire au processus de déidualisation en régulant le marqueur de déidualisation FoxO1, la régulation de son expression demeure peu comprise (Franco, Dai et al. 2011). Le lien fonctionnel entre la protéine PAX8 et le gène Wnt4 a déjà été observé dans les cellules épithéliales de la glande thyroïde (Di Palma, Filippone et al. 2013, Filippone, Di Palma et al. 2014). Nous avions posé pour hypothèse que dans les cellules endométriales en déidualisation, PAX8 représenterait un régulateur positif de l'expression de Wnt4. En accord avec cette hypothèse, nous avons observé que dans les cellules endométriales stromales, la quantité de l'ARNm de Wnt4 est augmentée significativement après 72 h et 96 h d'induction de la déidualisation, soit au moment et dans les 24 h suivant l'augmentation de la quantité totale de la protéine PAX8 (qui est détectable après 72 h mais pas 48 h de déidualisation). Il s'agit d'un résultat d'autant plus intéressant que l'augmentation de l'expression est sélective pour Wnt4 : la quantité de l'ARNm de Wnt5 et Wnt6, dans les mêmes conditions expérimentales, n'est pas modulée.

Par rapport aux données disponibles dans la littérature, ce résultat constitue une nouveauté, parce que jusqu'ici il avait été rapporté que l'expression de Wnt5a dans les cellules endométriales stromales pouvait être augmentée par un traitement à la progestérone (Matsuoka et al. J Clin Endocrinol Metab. 2010 Nov;95(11): E291-9), mais à notre connaissance aucune étude n'a investigué l'impact de la déidualisation sur l'expression de Wnt5a ou de Wnt6 et ceci, même s'il a été montré que leur présence était importante pour certains processus dans l'endomètre dont la prolifération (Wang et al. Biol Reprod. 2013 Jan 3;88(1):5) ou l'activation des voies intracellulaires en réponse à la progestérone au début de la déidualisation (Matsuoka et al. J Clin Endocrinol Metab. 2010 Nov;95(11): E291-9).

Pour la suite du projet, l'équipe du Dr Van Themsche vérifiera si l'augmentation observée de Wnt4 est effectivement PAX8-dépendante, tout simplement en tirant profit de l'outil d'interférence à l'ARN de PAX8 décrit plus haut. Si tel est le cas, une répression de plus de 80 % de l'expression de PAX8 devrait prévenir, au moins en partie, l'augmentation de l'ARNm de Wnt qui a lieu après 72 h ou 96 h de décidualisation *in vitro*. Les résultats obtenus à ce jour sont très excitants, parce qu'ils suggèrent l'existence d'un axe PAX8-Wnt4-FOXO1 impliqué dans la complétion de la décidualisation.

4.2 PAX8 et p53 dans le stroma utérin

Notre second objectif spécifique était d'étudier la relation entre les deux facteurs de transcription PAX8 et p53 dans les cellules endométriales stromales dans le contexte de la décidualisation. Comme mentionné plus tôt, plusieurs facteurs de transcription s'associent à des cofacteurs, pouvant être d'autres facteurs de transcription, afin notamment de les rendre aptes à se lier au promoteur de leurs gènes cibles. Jusqu'ici, aucune donnée de la littérature ne suggère que PAX8 et p53 s'associeraient physiquement au sein d'un complexe protéique dans les cellules. Toutefois, peu de recherches ont été effectuées sur la protéine PAX8 jusqu'ici et cette l'hypothèse demeure plausible, d'autant plus que l'une régule l'expression de l'autre, ce qui est commun parmi des protéines interagissant physiquement. Par exemple, p53 interagit physiquement avec MDM2, l'un de ses gènes cibles, et en retour MDM2 ubiquitine p53 (Fuchs SY et al. Oncogene. 1998 Nov 12;17(19):2543-7.). Enfin, l'augmentation significative de PAX8 mais aussi de p53 suite à l'induction de la décidualisation porte à croire que ces deux protéines pourraient y jouer un rôle convergent. Dans notre laboratoire, nous avons débuté pour la première fois, l'étude de la relation entre ces deux protéines dans les cellules endométriales stromales. J'ai eu le temps, avant la fin de ma maîtrise, d'examiner une interaction potentielle entre les deux protéines dans les cellules en conditions basales (avant l'induction de la décidualisation). Dans ces conditions, suite à l'immunoprécipitation avec succès de p53, la protéine PAX8 n'était pas détectable. Bien qu'il demeure une faible probabilité que nous n'ayons pas atteint le seuil de détection dans nos conditions expérimentales, et nous

considérons que l'absence d'immunoprécipitation ne soit pas en soi suffisante pour conclure à l'absence d'interaction physique (il faudrait confirmer par une méthode alternative, par exemple le test de double hybride), nos résultats suggèrent qu'avant la décidualsection, les protéines PAX8 et p53 ne soient pas associées dans les cellules endométriales stromales. Pour la suite, l'équipe du Dr Van Themsche pourra répéter les expérimentations, mais cette fois avec des cellules en décidualsection.

CHAPITRE V

CONCLUSION

Ce projet s'inscrit dans une programmation de recherche plus large du Dr Van Themsche visant à caractériser la régulation et le rôle de nouveaux acteurs moléculaires dans le processus central à la fertilité féminine que représente la décidualisation de l'endomètre utérin humain. Mes travaux de maîtrise ont permis de mettre en lumière que la quantité de la protéine PAX8 était augmentée suite à l'induction de la décidualisation, révélant pour la première fois une régulation de l'expression de PAX8 dans des cellules utérines humaines en dehors du contexte du développement embryonnaire. De plus, PAX8 est très finement régulée dans les cellules en décidualisation, le niveau de son expression génique diminuant tandis que le niveau protéique augmente, et la proportion de PAX8 augmentant dans le noyau par rapport au cytosol ce qui pourrait faciliter le travail de transactivation génique par PAX8 sur ses gènes cibles dans le noyau cellulaire. Par la suite, j'ai pu montrer que dans nos conditions expérimentales, l'expression génique de Wnt4 était augmentée de manière sélective (contrairement à Wnt5 et Wnt6) dans les cellules endométriales stromales en décidualisation. Ceci nous amène à poser l'hypothèse que Wnt4 pourrait représenter l'un des gènes cibles de PAX8 dans les cellules en décidualisation; si cette hypothèse s'avère exacte, Wnt4 deviendra le premier gène cible de PAX8 à être identifié dans les cellules en décidualisation et un tout nouveau rôle sera conféré à PAX8, dans la physiologie de la reproduction, au niveau du processus de décidualisation. Tous ces résultats suggèrent fortement que PAX8 joue un nouveau rôle dans la bonne complétion de la décidualisation dans les cellules endométriales stromales. Ces résultats nous aideront à faire de la lumière sur la cascade signalétique d'une bonne complétion de la décidualisation.

Mes travaux pavent la voie à de nombreuses études, qui examineront en détail le rôle de PAX8 dans le stroma endométrial au moment de la décidualisation, ainsi que la

régulation post-traductionnelle de cette protéine dans ce contexte, sans oublier l'impact de l'exposition à des facteurs alimentaires tels des phytoestrogènes, sur sa structure et son activité dans ce contexte. À court terme, le modèle de la décidualisation *in vitro* demeurera celui qui sera privilégié parce qu'il est idéal pour l'étude des mécanismes cellulaires et moléculaires en général. Ensuite, il sera possible de recourir à un modèle expérimental *in vivo* de la décidualisation, chez des rongeurs, afin de valider dans un modèle physiologique complet les principales observations qui auront été faites *in vitro*. Enfin, notre observation que la quantité de la protéine PAX8 est augmentée au moment de la décidualisation *in vitro* soulève l'excitante hypothèse que PAX8 pourrait représenter un nouveau biomarqueur pour le diagnostic de troubles utérins de l'infertilité. Des équipes qui ont accès à des banques de tissus endométriaux, isolés de patientes fertiles et infertiles dont les profils hormonaux et la fonction ovarienne sont normaux, pourraient tester cette hypothèse.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aitken, R. J. (2014). "Age, the environment and our reproductive future: bonking baby boomers and the future of sex." Reproduction **147**(2): S1-S11.
- Akdemir, K. C., A. K. Jain, K. Allton, B. Aronow, X. Xu, A. J. Cooney, W. Li and M. C. Barton (2014). "Genome-wide profiling reveals stimulus-specific functions of p53 during differentiation and DNA damage of human embryonic stem cells." Nucleic Acids Res **42**(1): 205-223.
- Brosens, J. J., M. S. Wilson and E. W. Lam (2009). "FOXO transcription factors: from cell fate decisions to regulation of human female reproduction." Adv Exp Med Biol **665**: 227-241.
- Carbillon, L., M. Uzan, J. C. Challier, P. Merviel and S. Uzan (2000). "Fetal-placental and decidua-placental units: role of endocrine and paracrine regulations in parturition." Fetal Diagn Ther **15**(5): 308-318.
- Cederroth, C. R., C. Zimmermann and S. Nef (2012). "Soy, phytoestrogens and their impact on reproductive health." Mol Cell Endocrinol **355**(2): 192-200.
- Cha, J., X. Sun and S. K. Dey (2012). "Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy." Nat Med **18**(12): 1754-1767.
- Chandra, A., C. E. Copen and E. H. Stephen (2013). "Infertility and impaired fecundity in the United States, 1982-2010: data from the National Survey of Family Growth." Natl Health Stat Report(67): 1-18, 11 p following 19.
- Chapdelaine, P., J. Kang, S. Boucher-Kovalik, N. Caron, J. P. Tremblay and M. A. Fortier (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.
- Cloke, B., K. Huhtinen, L. Fusi, T. Kajihara, M. Yliheikkila, K. K. Ho, G. Teklenburg, S. Lavery, M. C. Jones, G. Trew, J. J. Kim, E. W. Lam, J. E. Cartwright, M. Poutanen and J. J. Brosens (2008). "The androgen and progesterone receptors regulate distinct gene networks and cellular functions in decidualizing endometrium." Endocrinology **149**(9): 4462-4474.

- 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
- Di Palma, T., M. G. Filippone, G. M. Pierantoni, A. Fusco, S. Soddu and M. Zannini (2013). "Pax8 has a critical role in epithelial cell survival and proliferation." *Cell Death Dis* 4: e729.
- Dunn, C. L., R. W. Kelly and H. O. Critchley (2003). "Decidualization of the human endometrial stromal cell: an enigmatic transformation." *Reprod Biomed Online* 7(2): 151-161.
- Fabian, P., I. Kozmikova, Z. Kozmik and C. N. Pantzartzi (2015). "Pax2/5/8 and Pax6 alternative splicing events in basal chordates and vertebrates: a focus on paired box domain." *Front Genet* 6: 228.
- Feng, Z., C. Zhang, H. J. Kang, Y. Sun, H. Wang, A. Naqvi, A. K. Frank, Z. Rosenwaks, M. E. Murphy, A. J. Levine and W. Hu (2011). "Regulation of female reproduction by p53 and its family members." *FASEB J* 25(7): 2245-2255.
- Filippone, M. G., T. Di Palma, V. Lucci and M. Zannini (2014). "Pax8 modulates the expression of Wnt4 that is necessary for the maintenance of the epithelial phenotype of thyroid cells." *BMC Mol Biol* 15: 21.
- Franco, H. L., D. Dai, K. Y. Lee, C. A. Rubel, D. Roop, D. Boerboom, J. W. Jeong, J. P. Lydon, I. C. Bagchi, M. K. Bagchi and F. J. DeMayo (2011). "WNT4 is a key regulator of normal postnatal uterine development and progesterone signaling during embryo implantation and decidualization in the mouse." *FASEB J* 25(4): 1176-1187.
- Gellersen, B. and J. Brosens (2003). "Cyclic AMP and progesterone receptor cross-talk in human endometrium: a decidualizing affair." *J Endocrinol* 178(3): 357-372.
- Grinius, L., C. Kessler, J. Schroeder and S. Handwerger (2006). "Forkhead transcription factor FOXO1A is critical for induction of human decidualization." *J Endocrinol* 189(1): 179-187.
- Guzeloglu-Kayisli, O., U. A. Kayisli and H. S. Taylor (2009). "The role of growth factors and cytokines during implantation: endocrine and paracrine interactions." *Semin Reprod Med* 27(1): 62-79.

- Hirota, Y., T. Daikoku, S. Tranguch, H. Xie, H. B. Bradshaw and S. K. Dey (2010). "Uterine-specific p53 deficiency confers premature uterine senescence and promotes preterm birth in mice." J Clin Invest **120**(3): 803-815.
- Hu, W., Z. Feng, A. K. Teresky and A. J. Levine (2007). "p53 regulates maternal reproduction through LIF." Nature **450**(7170): 721-724.
- Ikeda, M. A., L. Jakoi and J. R. Nevins (1996). "A unique role for the Rb protein in controlling E2F accumulation during cell growth and differentiation." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(8): 3215-3220.
- Irwin, J. C., D. Kirk, R. J. King, M. M. Quigley and R. B. Gwatkin (1989). "Hormonal regulation of human endometrial stromal cells in culture: an in vitro model for decidualization." Fertil Steril **52**(5): 761-768.
- Jabbour, H. N. and H. O. Critchley (2001). "Potential roles of decidual prolactin in early pregnancy." Reproduction **121**(2): 197-205.
- Jividen, K., M. J. Movassagh, A. Jazaeri and H. Li (2014). "Two methods for establishing primary human endometrial stromal cells from hysterectomy specimens." J Vis Exp(87).
- Kajihara, T., J. J. Brosens and O. Ishihara (2013). "The role of FOXO1 in the decidual transformation of the endometrium and early pregnancy." Med Mol Morphol **46**(2): 61-68.
- Kruse, J. P. and W. Gu (2009). "Modes of p53 regulation." Cell **137**(4): 609-622.
- Large, M. J. and F. J. DeMayo (2012). "The regulation of embryo implantation and endometrial decidualization by progesterone receptor signaling." Mol Cell Endocrinol **358**(2): 155-165.
- Larsen, C. M. and D. R. Grattan (2010). "Prolactin-induced mitogenesis in the subventricular zone of the maternal brain during early pregnancy is essential for normal postpartum behavioral responses in the mother." Endocrinology **151**(8): 3805-3814.
- Lee, C. T., L. Li, N. Takamoto, J. F. Martin, F. J. Demayo, M. J. Tsai and S. Y. Tsai (2004). "The nuclear orphan receptor COUP-TFII is required for limb and skeletal muscle development." Mol Cell Biol **24**(24): 10835-10843.

- Lei, W., X. H. Feng, W. B. Deng, H. Ni, Z. R. Zhang, B. Jia, X. L. Yang, T. S. Wang, J. L. Liu, R. W. Su, X. H. Liang, Q. R. Qi and Z. M. Yang (2012). "Progesterone and DNA damage encourage uterine cell proliferation and decidualization through up-regulating ribonucleotide reductase 2 expression during early pregnancy in mice." *J Biol Chem* **287**(19): 15174-15192.
- Leno-Duran, E., M. J. Ruiz-Magana, R. Munoz-Fernandez, F. Requena, E. G. Olivares and C. Ruiz-Ruiz (2014). "Human decidual stromal cells secrete soluble pro-apoptotic factors during decidualization in a cAMP-dependent manner." *Hum Reprod* **29**(10): 2269-2277.
- Li, C. G., J. E. Nyman, A. W. Braithwaite and M. R. Eccles (2011). "PAX8 promotes tumor cell growth by transcriptionally regulating E2F1 and stabilizing RB protein." *Oncogene* **30**(48): 4824-4834.
- Liverman, C. S., Brown, J. W., Sandhir, R., McCarson, K. E., & Berman, N. E. (2009). Role of the oestrogen receptors GPR30 and ER α in peripheral sensitization: relevance to trigeminal pain disorders in women. *Cephalgia*, **29**(7), 729-741.
- Logan, P. C., M. Steiner, A. P. Ponnampalam and M. D. Mitchell (2012). "Cell cycle regulation of human endometrial stromal cells during decidualization." *Reprod Sci* **19**(8): 883-894.
- Ma, R., R. Latif and T. F. Davies (2015). "Human embryonic stem cells form functional thyroid follicles." *Thyroid* **25**(4): 455-461.
- Mansouri, A., A. Stoykova and P. Gruss (1994). "Pax genes in development." *J Cell Sci Suppl* **18**: 35-42.
- Markovics, J. A., P. A. Carroll, M. T. Robles, H. Pope, C. M. Coopersmith and J. M. Pipas (2005). "Intestinal dysplasia induced by simian virus 40 T antigen is independent of p53." *J Virol* **79**(12): 7492-7502.
- Marotta, P., E. Amendola, M. Scarfo, P. De Luca, P. Zoppoli, A. Amoresano, M. De Felice and R. Di Lauro (2014). "The paired box transcription factor Pax8 is essential for function and survival of adult thyroid cells." *Mol Cell Endocrinol* **396**(1-2): 26-36.
- Mayank, A. K., S. Sharma, R. K. Deshwal and S. K. Lal (2014). "LIMD1 antagonizes E2F1 activity and cell cycle progression by enhancing Rb function in cancer cells." *Cell Biol Int* **38**(7): 809-817.

- Mazur, E. C., Y. M. Vasquez, X. Li, R. Kommagani, L. Jiang, R. Chen, R. B. Lanz, E. Kovanci, W. E. Gibbons and F. J. DeMayo (2015). "Progesterone receptor transcriptome and cistrome in decidualized human endometrial stromal cells." Endocrinology **156**(6): 2239-2253.
- Menendez, S., S. Camus and J. C. Izpisua Belmonte (2010). "p53: guardian of reprogramming." Cell Cycle **9**(19): 3887-3891.
- Mikihiro Yoshie, K. K. a. K. T. (2015). "Molecular mechanisms of human endometrial decidualization activated by cyclic adenosine monophosphate signaling pathways." Ova Res. **32**: 95-102.
- Mizuno, K., T. Tanaka, N. Umesaki and S. Ogita (1998). "Establishment and characterization of in vitro decidualization in normal human endometrial stromal cells." Osaka City Med J **44**(1): 105-115.
- Niklaus, A. L., M. Aubuchon, G. Zapantis, P. Li, H. Qian, B. Isaac, M. Y. Kim, G. Adel, J. W. Pollard and N. F. Santoro (2007). "Assessment of the proliferative status of epithelial cell types in the endometrium of young and menopausal transition women." Hum Reprod **22**(6): 1778-1788.
- Okada, H., T. Tsuzuki, H. Shindoh, A. Nishigaki, K. Yasuda and H. Kanzaki (2014). "Regulation of decidualization and angiogenesis in the human endometrium: mini review." J Obstet Gynaecol Res **40**(5): 1180-1187.
- Paixao-Cortes, V. R., F. M. Salzano and M. C. Bortolini (2013). "Evolutionary history of chordate PAX genes: dynamics of change in a complex gene family." PLoS One **8**(9): e73560.
- Patil, P. B., S. Begum, M. Joshi, M. I. Kleman, M. Olausson and S. Sumitran-Holgersson (2014). "Phenotypic and in vivo functional characterization of immortalized human fetal liver cells." Scand J Gastroenterol **49**(6): 705-714.
- Patisaul, H. B. and W. Jefferson (2010). "The pros and cons of phytoestrogens." Front Neuroendocrinol **31**(4): 400-419.
- Pohnke, Y., T. Schneider-Merck, J. Fahnenstich, R. Kempf, M. Christian, K. Milde-Langosch, J. J. Brosens and B. Gellersen (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.
- Purvis, J. E., K. W. Karhohs, C. Mock, E. Batchelor, A. Loewer and G. Lahav (2012). "p53 dynamics control cell fate." Science **336**(6087): 1440-1444.

- Ramathal, C. Y., I. C. Bagchi, R. N. Taylor and M. K. Bagchi (2010). "Endometrial decidualization: of mice and men." Semin Reprod Med **28**(1): 17-26.
- Rivlin, N., R. Brosh, M. Oren and V. Rotter (2011). "Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Important Milestones at the Various Steps of Tumorigenesis." Genes Cancer **2**(4): 466-474.
- Sharma, R., O. Sanchez-Ferraz and M. Bouchard (2015). "Pax genes in renal development, disease and regeneration." Semin Cell Dev Biol **44**: 97-106.
- Sheppard, H. M., S. I. Corneillie, C. Espiritu, A. Gatti and X. Liu (1999). "New insights into the mechanism of inhibition of p53 by simian virus 40 large T antigen." Mol Cell Biol **19**(4): 2746-2753.
- Sonderegger, S., J. Pollheimer and M. Knofler (2010). "Wnt signalling in implantation, decidualisation and placental differentiation--review." Placenta **31**(10): 839-847.
- Stuart, E. T., R. Haffner, M. Oren and P. Gruss (1995). "Loss of p53 function through PAX-mediated transcriptional repression." EMBO J **14**(22): 5638-5645.
- Telgmann, R. and B. Gellersen (1998). "Marker genes of decidualization: activation of the decidual prolactin gene." Hum Reprod Update **4**(5): 472-479.
- Torgovnik, Jonathan 2018, OMS <http://www.who.int/reproductivehealth/fr/>
- Tremblay, R. (2016). "Effet de la génisteine sur p53 dans les cellules endométriales stromales humaines dans le contexte de la décidualisation." (Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières): 77.
- Vasquez, Y. M., E. C. Mazur, X. Li, R. Kommagani, L. Jiang, R. Chen, R. B. Lanz, E. Kovanci, W. E. Gibbons and F. J. DeMayo (2015). "FOXO1 is required for binding of PR on IRF4, novel transcriptional regulator of endometrial stromal decidualization." Mol Endocrinol **29**(3): 421-433.
- Wang, G., Z. Zhang, C. Chen, Y. Zhang and C. Zhang (2016). "Dysfunction of WNT4/WNT5A in decidua: possible relevance to the pathogenesis of preeclampsia." J Hypertens **34**(4): 719-727.
- Wang, Q., J. Lu, S. Zhang, S. Wang, W. Wang, B. Wang, F. Wang, Q. Chen, E. Duan, M. Leitges, A. Kispert and H. Wang (2013). "Wnt6 is essential for stromal cell proliferation during decidualization in mice." Biol Reprod **88**(1): 5.

- Wang, X., J. Taplick, N. Geva and M. Oren (2004). "Inhibition of p53 degradation by Mdm2 acetylation." FEBS Lett **561**(1-3): 195-201.
- Wetendorf, M. and F. J. DeMayo (2012). "The progesterone receptor regulates implantation, decidualization, and glandular development via a complex paracrine signaling network." Mol Cell Endocrinol **357**(1-2): 108-118.
- Yu-Lee, L. Y. (1997). "Molecular actions of prolactin in the immune system." Proc Soc Exp Biol Med **215**(1): 35-52.
- Zhang, H., X. Zhu, J. Chen, Y. Jiang, Q. Zhang, C. Kong, J. Xing, L. Ding, Z. Diao, X. Zhen, H. Sun and G. Yan (2015). "Kruppel-like factor 12 is a novel negative regulator of forkhead box O1 expression: a potential role in impaired decidualization." Reprod Biol Endocrinol **13**: 80.
- Zhu, H., C. C. Hou, L. F. Luo, Y. J. Hu and W. X. Yang (2014). "Endometrial stromal cells and decidualized stromal cells: origins, transformation and functions." Gene **551**(1): 1-14.