

1.6.3	L'importance de p53 dans le système reproducteur féminin.....	18
1.6.4	Problématique de recherche associée à p53 et à la décidualisation.....	19
1.6.5	L'impact de la génistéine sur l'activité de p53	19
1.7	Problématique globale de recherche.....	19
1.8	Objectifs et hypothèses.....	20
1.9	Modèle cellulaire et approche expérimentale.....	21
1.10	Résultats et contribution des auteurs	22

CHAPITRE II

p53 REGULATION DURING THE DECIDUALIZATION PROCESS ON HUMAN ENDOMETRIAL STROMAL CELLS EXPOSED TO GENISTEIN. 23

2.1	Contribution des auteurs.....	23
2.2	Résumé.....	24
	Abstract.....	25
	Introduction.....	26
	Methods	28
	Cell lines and reagents	28
	In vitro decidualization of HIESCs.....	29
	Prolactin Assay	29
	Transfection with p53 siRNA.....	29
	Cell viability assay.....	29
	Apoptosis cell count.....	30
	qPCR.....	30
	Western blots	31
	Subcellular Fractionation.....	31
	Statistical analysis.....	31
	Results	31
	The fine regulation of p53 during decidualization of human ESCs	31
	Exposure to genistein affects p53 expression and the proliferation of HIESCs	33
	Genistein does not alter the decidualization of HIESC	34
	Discussion.....	34
	Acknowledgements.....	38

References.....	39
Figure legends.....	43
Supplementary data	51
Legend to supplementary figures.....	51
Supplementary figures	52
CHAPITRE III	
CONCLUSION.....	54
3.1 Régulation de p53 dans le contexte de la décidualisation	54
3.2 Impact de la génistéine les cellules endométriales stromales	59
3.3 Impact de la génistéine sur p53 dans le contexte de la décidualisation.....	62
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	64

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	Concentration des hormones sexuelles au cours du cycle menstruel (tirée de Wira et Patel, 2015)	5
1.2	Le rôle des hormones stéroïdiennes sexuelles durant le cycle menstruel (tirée de Cha et Dey, 2012)	7
1.3	Cycle cellulaire (tirée de Logan et Mitchell, 2012)	9
1.4	Affinité et activité de plusieurs composés estrogéniques sur les récepteurs à l'estradiol α et β chez l'humain (tirée de Cederroth et Nef, 2009)	11
1.5	Contenu en isoflavones de différents aliments (tirée de Patisaul et Jefferson, 2010)	12
1.6	Comparaison structurelle entre la génistéine et le 17β -estradiol (tirée de Cederroth et Nef, 2009)	13
1.7	Modifications post-traductionnelles dont p53 peut fait l'objet (tirée de Kruse et Gu, 2009)	15
1.8	Les différents rôles de p53 dépendent des modifications post-traductionnelles de la protéine (tirée de Kruse et Gu, 2009)	18

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

A	Acétylé
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
Bax	BCL-2 associated X protein
CBP	Creb binding protein
CDK	Cyclin dependant kinases
CES	Cellules endométriales stromales
CO ₂	Dioxyde de carbone
C-terminal	Carboxy-terminal
DCC	Dextran-coated-charcoal-treated
DMSO	Diméthylsulfoxyde
E2	17 β -estradiol
EIA	Enzyme immunoassay
ER- α	Récepteur de l'estrogène α
ER- β	Récepteur de l'estrogène β
ESCs	Endometrial stromal cells
FBS	Sérum foetal bovin
FoxO1	Forkhead box 01
FSH	Hormone folliculostimulante
GRP30	Protéine couplée aux récepteurs G 30
HAT	Histone acétyl-transférase
HIESC	Cellules endométriales stromales humaines
HRP	Peroxydase du raifort
LH	Hormone lutéinisante

MDM2	Mouse double minute 2
MPA	Médroxyprogestérone acétate
MTT	3-(4,5-Dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
N-terminal	Amino-terminal
P	Phosphorylé
PBS	Phosphate buffered saline
RT-PCR	Reverse-transcriptase polimerase chain reaction
qPCR	Quantitative polimerase chain reaction
PKA	Protéine kinase A
PR-A	Récepteur de la progestérone A
PR-B	Récepteur de la progestérone B
Puma	p53 upregulated modulator of apoptosis
Rb	Rétinoblastome
RIPA	Radio-immunoprecipitation assay
RPMI	Milieu de culture de l'institut Roswell Park
SV40	Virus simien 40

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 La fertilité féminine

Entre 2006 et 2010, chez les femmes américaines mariées et âgées de 15 à 44 ans, 12 % présentaient des troubles de la fertilité, soit une difficulté physique à tomber enceinte ou à porter un fœtus à terme. De plus, 6 % étaient infertiles, soit incapables de concevoir un enfant après 12 mois de relations sexuelles avec le même partenaire [1]. La fertilité féminine est affectée par de nombreux facteurs tels que l'âge, l'obésité, la cigarette, l'exposition à des produits chimiques, les aliments consommés, un trouble génétique et autres [2, 3]. Ces différents facteurs de risques vont entraver le bon déroulement d'une ou plusieurs des étapes nécessaires à la fertilité féminine. Ces étapes sont nombreuses et interdépendantes : l'ovulation, la fertilisation, le transport de l'embryon dans l'oviducte, l'implantation, la décidualisation, le développement embryonnaire et la parturition [4, 5]. Au fil de ce processus finement régulé, une communication s'établit, entre divers tissus et organes, qui implique des facteurs solubles, dont plusieurs hormones.

1.2 La décidualisation

Il s'agit de l'une des étapes de la fonction reproductive féminine où la communication intercellulaire est primordiale. L'endomètre utérin, en réponse à différents signaux hormonaux, se prépare alors à accueillir l'embryon.

L'utérus se divise en deux parties : l'endomètre, faisant face à la lumière utérine, qui comprend une couche de cellules épithéliales et une autre de cellules stromales et, sous-jacent, le myomètre, composé de cellules musculaires. Au cours de chaque cycle

menstruel, sous l'action de la progestérone et de l'estrogène, la couche de cellules stromales de l'endomètre se différencie par le processus de décidualisation. Durant ce processus, les cellules endométriales stromales (CES) subissent une transformation mésenchymale-épithéliale où les cellules passent d'une forme fibroblastique à une forme ovoïde [6]. Le processus de décidualisation se caractérise aussi par un arrêt prolifératif et une augmentation de la résistance des cellules à la mort cellulaire [7].

Au niveau moléculaire, la décidualisation se caractérise par une augmentation de l'expression des protéines Forkhead Box O1 (FoxO1) [8] et prolactine déciduale sécrétée [9, 10]. Sous l'action de la progestérone, FoxO1 s'accumule et joue un rôle dans l'inhibition de la prolifération et l'induction de la différenciation cellulaire. FoxO1 est un facteur de transcription qui, au noyau, s'associe à deux récepteurs à la progestérone. Ce complexe peut, par la suite, se lier à aux promoteurs de certains gènes, dont celui de la prolactine et en induire la synthèse [11, 12]. La protéine prolactine déciduale est sous le contrôle d'un promoteur tissu-spécifique. Ainsi, son expression ne survient qu'au cours de la décidualisation sous la stimulation conjointe de l'estradiol, via l'AMPc, et de la progestérone. La prolactine agit de manière paracrine. Pour se faire, suivant sa synthèse, cette protéine sera sécrétée des CES et agira sur les cellules endométriales épithéliales où elle activera la cascade de signalisation des protéines kinases associées à la mitogénèse (MAPK) [13, 14].

Tous ces changements associés à la décidualisation ont pour but d'offrir un milieu propice au développement de l'embryon et d'instaurer et assurer une communication cruciale entre les cellules déciduales maternelles et les cellules embryonnaires. L'embryon étant considéré par les cellules utérines maternelles comme un corps étranger, la réponse immunitaire normale dans le stroma endométrial sera également modifiée au moment de la décidualisation, afin que ce corps étranger soit toléré par le tissu décidual et que l'implantation puisse avoir lieu [5].

1.2.1 La régulation de la décidualisation

Cette transformation cellulaire est régulée par les variations hormonales au cours du cycle menstruel (tel que décrit plus en détail dans la sous-section 1.3.3). Ainsi, les CES se différencient à tous les cycles menstruels, qu'il y ait fécondation ou non [5, 15]. Cependant, en absence de grossesse, les cellules déciduales se détacheront de l'utérus et seront évacuées au cours des menstruations. Lorsqu'il y a fécondation, le cycle menstruel sera interrompu et les signaux hormonaux responsables de la décidualisation seront maintenus afin d'assurer le maintien de la tissue déciduale tout au long de la grossesse [5].

1.2.2 Problématique de recherche liée à la décidualisation

Puisque la décidualisation est une étape cruciale pour l'établissement de la grossesse, un défaut dans la complétion de ce remodelage cellulaire et tissulaire peut mener à divers types de problèmes de fertilité tels que des avortements spontanés récurrents, des dysfonctions utéroplacentaires, des naissances prématurées, une défaillance de l'implantation et l'infertilité [6]. À ce jour, les mécanismes moléculaires qui soutiennent la décidualisation ne sont pas encore bien connus. De plus, peu d'études ont été réalisées afin de caractériser l'influence du facteur alimentaire sur le succès de la décidualisation.

1.3 Les hormones sexuelles et la fonction reproductive

Tel que mentionné, la fertilité féminine requiert une étroite communication entre les cellules maternelles et embryonnaires [16]. Cette communication est assurée par la variation des hormones sexuelles, principalement les hormones stéroïdiennes, l'estrogène et la progestérone dont les niveaux varient tout au long du cycle menstruel [16, 17].

1.3.1 Le cycle menstruel

D'une durée moyenne de 28 jours, le cycle menstruel a lieu à tous les mois qu'il y ait fécondation ou non [5, 15]. Plusieurs hormones sexuelles y ont un rôle à jouer et doivent être présentes à un moment précis, pour une durée précise. Le cycle menstruel se divise en quatre phases, tel qu'illustré à la figure 1.1. Par convention, la première phase du cycle menstruel est la phase menstruelle. Elle se caractérise par la régression des artères spiralées et le détachement du tissu décidual de la paroi utérine. Il en résulte une perte de l'épaisseur du stroma utérin au cours des menstruations [18]. La seconde phase, la phase proliférative, est caractérisée par la prédominance de la sécrétion d'estrogène par les ovaires. Sous l'action de l'estrogène, les CES prolifèrent résultant en un épaissement de la paroi utérine. C'est la première étape de préparation de l'utérus en vue de l'implantation d'un embryon [15, 19]. La phase suivante est l'ovulation. Un pic d'hormones lutéinisante (LH) et folliculostimulante (FSH) induiront la libération d'un ovule mature à partir d'un follicule d'ovaire. Puis, la dernière phase est la phase sécrétoire, caractérisée par la prédominance de la progestérone. C'est durant cette phase que débute la décidualisation et cette dernière sera maintenue après une éventuelle implantation (Figure 1.2). L'initiation de la décidualisation des CES requiert une baisse de la concentration d'estrogène (afin de permettre un arrêt du cycle cellulaire) : plus tard, une hausse de la concentration de progestérone permettra de poursuivre le processus [20, 21]. La décidualisation doit être bien amorcée avant l'arrivée de l'embryon, sans quoi l'implantation ne pourra pas avoir lieu et il y aura perte embryonnaire [22]. La régulation hormonale de la décidualisation est donc très importante pour l'initiation et le maintien de la grossesse.

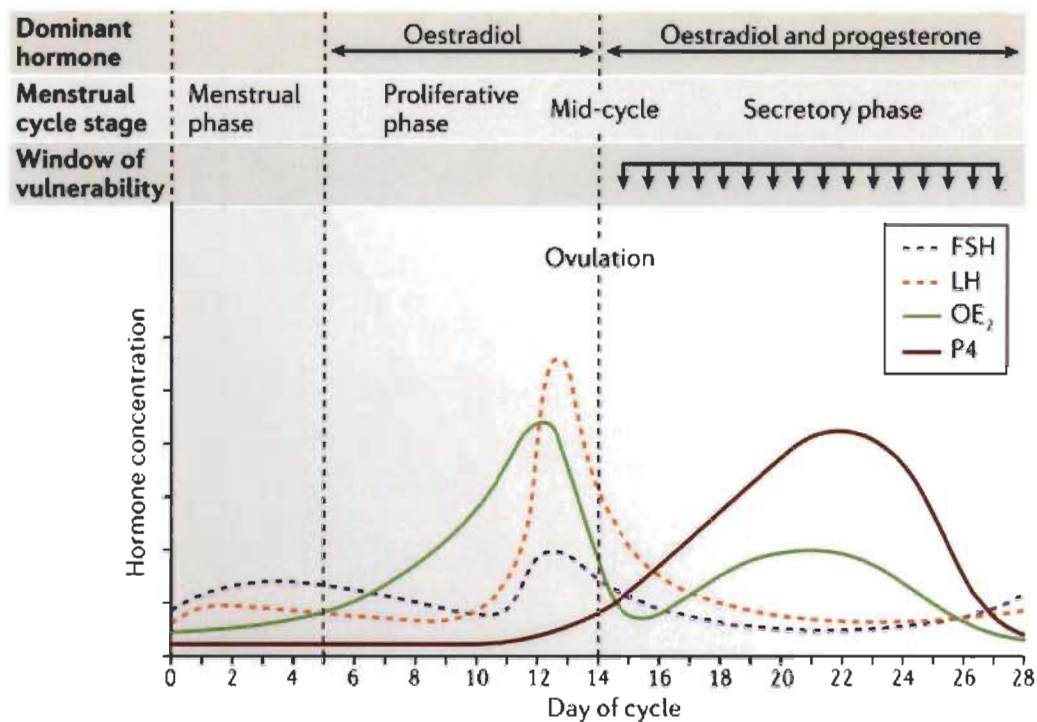


Figure 1.1 Concentration des hormones sexuelles au cours du cycle menstruel (tirée de Wira et Patel, 2015).

1.3.2 La progestérone

Initialement sécrétée par l'ovaire, la progestérone est essentielle à la décidualisation des CES. La progestérone a de nombreuses fonctions au cours de la décidualisation qui sont cruciales au bon déroulement de ce processus biologique incluant, l'initiation de la décidualisation, mais également la modulation de la réponse immune et de l'invasion du trophoblaste par l'embryon [23]. Il existe deux sous-types de récepteur à la progestérone, PR-A et PR-B [24, 25]. Tous les deux sont synthétisés à partir du même gène, mais l'induction de leur synthèse passe par un promoteur différent [24, 25]. De manière générale, la réponse cellulaire suivant l'activation du récepteur PR-B est beaucoup plus importante que celle induite par le PR-A, qui agit davantage comme un inhibiteur de l'activité transcriptionnelle induite par le PR-B [24]. L'importance du récepteur PR-B varie tout au long du cycle menstruel, devenant l'isoforme le plus fortement exprimé au cours de la phase proliférative.

La décidualisation des CES, qui a lieu durant la phase sécrétrice du cycle menstruel, requiert une baisse de la quantité de PR-B résultant ainsi en une présence majoritaire de l'isoforme A [26-28]. La faible activité transcriptionnelle de PR-A suggère que l'action de la progestérone dans le contexte de la décidualisation n'est pas seulement via la régulation de la transcription génique par les PR, mais aussi, via son interaction avec d'autres facteurs de transcription, dont FoxO1, qui est un marqueur de la décidualisation [24, 29, 30]. Au cours de la décidualisation, la fonction du facteur de transcription FoxO1, associé aux récepteurs à la progestérone, consiste à réguler l'expression de plusieurs effecteurs de la différenciation cellulaire, dont les protéines prolactine et IRF4 [23, 29]. La prolactine, un second marqueur de la décidualisation, est sécrétée et peut donc agir de manière autocrine et paracrine. De ce fait, cette protéine a un rôle important dans la communication intercellulaire. Une fonction bien documentée de la prolactine durant le processus de décidualisation est sa capacité à réguler la réponse immune locale [13, 31]. De plus, la prolactine aurait potentiellement un rôle dans la différenciation des cellules endométriales épithéliales et dans l'implantation de l'embryon [13]. IRF4 est un régulateur transcriptionnel dont sa modulation au cours de la décidualisation est nouvellement connue. Cette protéine a également une fonction régulatrice de la réponse immune et serait potentiellement importante dans le processus de tolérance maternelle au corps étranger qu'est l'embryon [29].

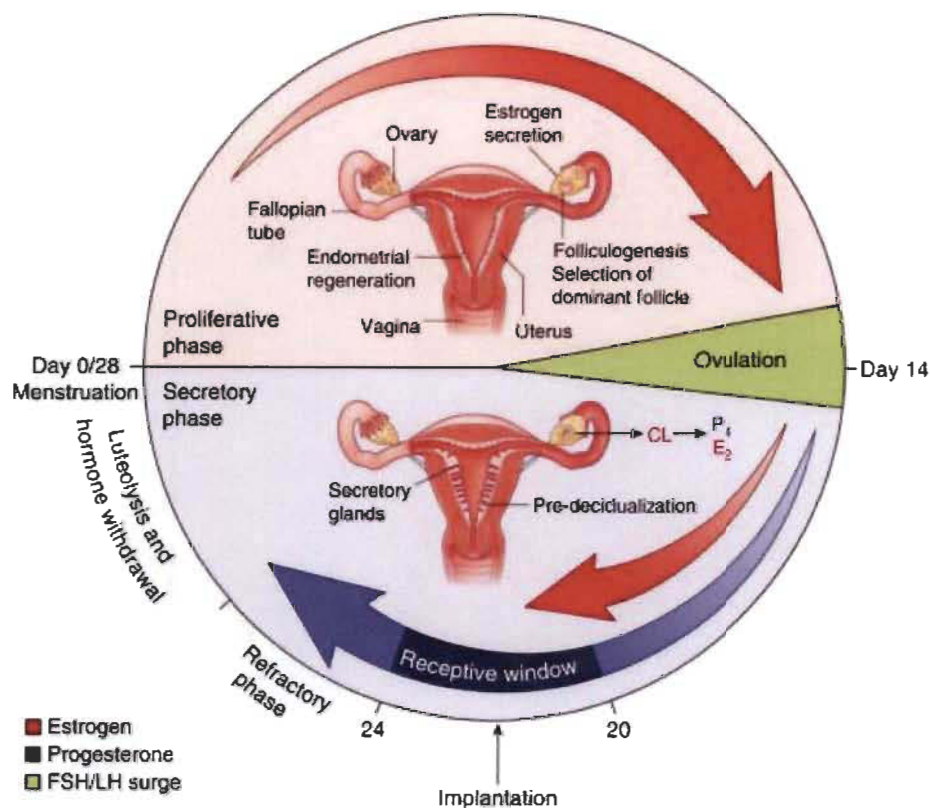


Figure 1.2 Le rôle des hormones stéroïdiennes sexuelles durant le cycle menstruel (tirée de Cha et Dey, 2012).

1.3.2.1 Contrôle de la décidualisation par la progestérone

La progestérone est nécessaire pour maintenir l'expression des gènes impliqués dans la décidualisation et pour le maintien du phénotype décidual des cellules par la suite [32].

1.3.3 L'estrogène

Il existe différents estrogènes dans le corps humain. La forme la plus fréquente est le 17 β -estradiol (E₂). Cette molécule se lie aux différents types de récepteurs à l'estrogène, ER- α et ER- β , avec sensiblement la même affinité [33]. L'estrogène joue un rôle primordial dans la préparation de l'utérus à recevoir un embryon. Durant la première moitié du cycle menstruel, il s'agit de la principale hormone responsable de la prolifération des cellules du stroma utérin et donc de l'épaississement de l'endomètre.

Cependant, il ne s'agit pas de la seule fonction de l'estrogène au cours de la préparation utérine. Durant la phase sécrétrice, l'estrogène contribuera à l'arrêt du cycle cellulaire, à l'initiation de la décidualisation aussi qu'à la sensibilisation des cellules stromales à l'action de la progestérone [19].

1.3.3.1 Synthèse et transport de l'estrogène

La synthèse et la sécrétion d'estrogène se fait principalement par les cellules de la granuleuse du follicule ovarien, stimulé par la croissance du follicule [5, 34-37]. Une fois sécrété, l'estrogène peut se rendre dans différents tissus en passant par la circulation sanguine et se lier à ses récepteurs. Puisque les récepteurs à l'estrogène se retrouvent dans le cytosol et le noyau cellulaire [38], l'hormone doit pouvoir traverser la membrane plasmique. L'estrogène est, par sa structure, une hormone non-polaire. Ainsi, elle a la capacité de traverser les membranes cellulaires par diffusion passive, lui permettant d'entrer en contact avec ses récepteurs cytoplasmiques. Une fois formé, le complexe récepteur-ligand se couplera avec un second complexe pour former un dimère. Le dimère sera transporté au noyau où il agira en tant que facteur de transcription [39].

1.3.3.2 Les récepteurs ER- α et ER- β dans le stroma endométrial

Les taux d'estrogène dans l'endomètre utérin varient au cours du cycle menstruel, étant maximaux durant la phase proliférative (Figure 1.2) [5]. La première fonction de l'estrogène au cours du cycle menstruel à avoir été caractérisée était sa capacité à induire la prolifération cellulaire lors de la phase proliférative. Les récepteurs ER- α et ER- β proviennent de deux gènes différents et la réponse cellulaire induite par l'activation de l'un ou l'autre de ces récepteurs ne sera pas la même [33, 40, 41]. De ce fait, la prolifération cellulaire induite par l'estrogène humain passerait majoritairement par l'activation du récepteur ER- α , le sous-type de récepteur le plus fortement exprimé dans le noyau des cellules endométriales au cours de la phase proliférative [33]. En ce qui a trait au sous-type β , son action serait généralement anti-estrogénique. Son expression augmente au cours de la phase sécrétrice où l'expression du sous-type α diminue,

devenant le sous-type de récepteur le plus fortement exprimé vers la fin de la phase sécrétrice [33], caractérisée par un arrêt de la prolifération cellulaire et une différenciation des CES. La réponse cellulaire induite par l'estrogène induit un arrêt du cycle cellulaire en G2/M durant la phase sécrétrice du cycle menstruel (les différents points de contrôle du cycle cellulaire et certaines protéines impliquées, qui sont liées au présent travail de recherche et seront décrites un peu plus loin, sont montrés à la figure 1.3). L'estrogène a également une fonction dans la sensibilisation des cellules stromales utérines à l'effet de la progestérone. Globalement, puisque la décidualisation requiert un arrêt contrôlé du cycle cellulaire, l'action de l'estrogène durant la phase sécrétrice est essentielle à la décidualisation. De manière plus atypique, les récepteurs ER- α peuvent également se situer sur la membrane plasmique où ils agissent comme des récepteurs couplés aux protéines G [42]. Ainsi, l'activation de ces récepteurs induit l'accumulation d'AMPc dans les CES, une protéine qui est très importante pour l'initiation de la décidualisation des CES [11, 43].

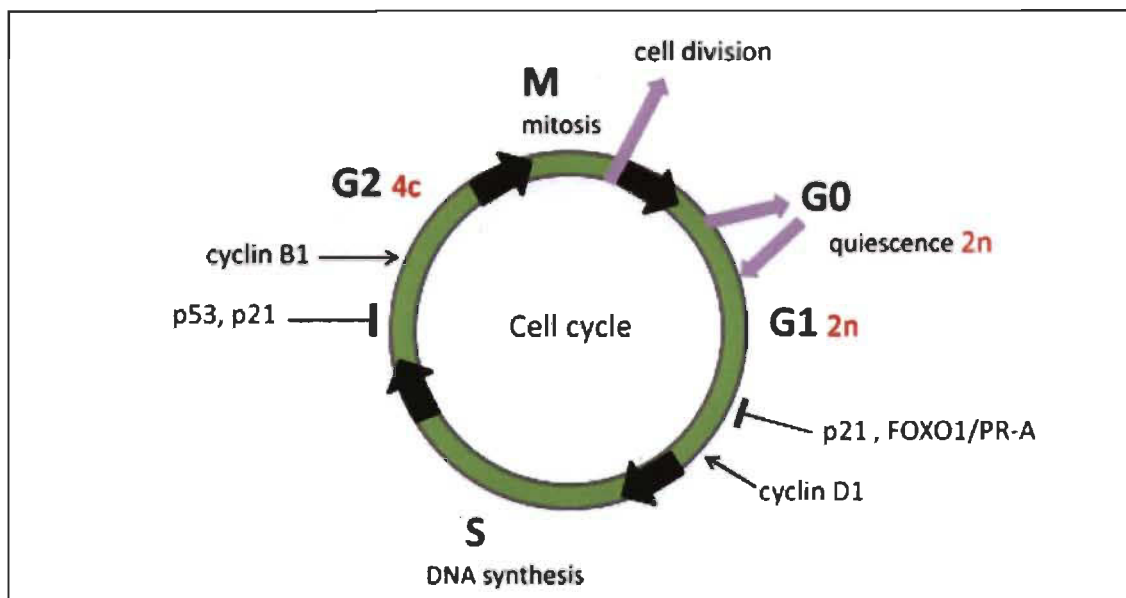


Figure 1.3 Cycle cellulaire (tirée de Logan et Mitchell, 2012).

1.3.3.3 Les récepteurs couplés aux protéines G dans le stroma endométrial

L'estrogène peut aussi agir via un autre sous-type de récepteur, soit les récepteurs couplés aux protéines G, dont GPER [44-46]. Ceux-ci sont des protéines majoritairement localisées à la membrane plasmique dont la structure comporte sept domaines transmembranaires. L'estrogène peut activer l'une de ces protéines, GPER, à la surface des cellules cibles : cependant, quelques études suggèrent que GPER peut aussi se retrouver au niveau du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi [46, 47]. Une fois activée, cette protéine induira la formation du second messager AMPc [45, 47]. L'AMPc continuellement activée dans les cellules déciduales par la présence hormonale de l'environnement [48]. À son tour, l'AMPc induira la formation de la protéine kinase A (PKA), une protéine essentielle au maintien des cellules déciduales. La principale fonction de la PKA au cours de la décidualisation est l'induction de la synthèse de prolactine par l'activation de son promoteur [11, 25, 48].

1.4 L'induction de la décidualisation

Il est possible de reproduire le processus de décidualisation des cellules endométriales stromales humaines immortalisées (HIESC) *in vitro*. La méthode la plus couramment utilisée, et celle qui a été validée pour induire la décidualisation dans les cellules qui ont été utilisées au cours de ce projet de recherche, consiste à ajouter à une culture de HIESC une combinaison de médroxyprogestérone acétate (MPA), un dérivé de la progestérone, et de adénosine monophosphate cyclique (AMPc) [32, 49]. L'AMPc mime l'effet de l'estrogène au niveau de l'induction de la décidualisation; ils induisent l'activation de la PKA [50-52]. D'autres modèles de décidualisation *in vitro* ont également été utilisés dans la littérature, dont un traitement à l'estradiol et à la progestérone [53]. Un autre modèle de décidualisation *in vitro* consiste en un traitement des HIESC avec de l'AMPc uniquement [54]. Cependant, dans ces études l'attention était portée sur les événements plus tardifs de la décidualisation, soit après quatre jours et souvent, plus de six jours après l'initiation de la décidualisation [32, 55-57].

1.5 Les phytoestrogènes

D'origine végétale, les phytoestrogènes présentent une structure et une composition semblables à celle de l'estrogène humain et ils sont capables de lier et d'activer les récepteurs à l'estradiol chez l'humain ER- α et ER- β [3, 58], bien que chacun présente son affinité propre (Figure 1.4). Les phytoestrogènes ont bonne presse; selon plusieurs études, ils ont des effets anticancéreux, aident à la prévention de l'ostéoporose et à la diminution des symptômes de la ménopause en plus d'être des antioxydants, prévenir des maladies du cœur et l'athérosclérose [59-61]. Par contre, ils sont également classés parmi les perturbateurs endocriniens [62]. Selon leur structure, les phytoestrogènes sont divisés en cinq classes : les flavonoïdes, les stilbénoides, les liganes, les chalcones et les autres [58, 62-64]. Les flavonoïdes et plus spécifiquement la sous-classe des isoflavones, sont les phytoestrogènes les plus consommés par l'humain à l'échelle planétaire [62]. Dans cette sous-classe se trouve la principale molécule phytoestrogénique en concentration dans le sang et l'urine des humains, la génistéine [58, 65]. La figure 1.5 présente la quantité de génistéine et pour comparaison, d'isoflavones totales contenues dans différents aliments.

Compound	Relative binding affinity		Relative transactivation	
	ER α	ER β	ER α	ER β
17 β -estradiol	100	100	100	100
Diethylstilbestrol (DES)	236	221	117	69
Tamoxifen	4	3	6	2
Coumestrol	20	140	102	98
Genistein	4	87	198	182
Daidzein	0.1	0.5	97	80
Formononetin	<0.01	<0.01	6	2
Biochanin A	<0.01	<0.01	36	53
Isoflavone	<0.01	<0.01	11	3
Bisphenol A	0.01	0.01	50	41
o,p'-DDT	0.01	0.02	54	10
Nonylphenol	0.05	0.09	62	34
Methoxychlor	<0.01	<0.01	9	2

Figure 1.4 Affinité et activité de plusieurs composés estrogéniques sur les récepteurs à l'estradiol α et β chez l'humain (tirée de Cederroth et Nef, 2009).

Food product	Genistein (mg/100 g)	Total isoflavones (mg/100 g)
Soy Infant Formula (powder)	13.5	26.3
Edamame (raw green soybeans)	22.6	48.9
Miso	23.2	41.5
Silken tofu	8.4	18.0
Raw tofu, regular	13	23
Textured soy flour	89.4	172.6
Soy protein isolate	57	91
Soy-based sliced cheese	6.5	14.5
Soy-based bacon bits	45.8	118.5
Soy-based burgers	5.0	6.4
Red clover	10	21
Multigrain bread	0.2	0.4
KASHI Go Lean cereal	7.7	17.4
Green tea, Japanese	0.02	0.02
Flaxseeds	0.04	0.07
Raw broccoli	0.00	0.25

Figure 1.5 Contenu en isoflavones de différents aliments (tirée de Patisaul et Jefferson, 2010).

1.5.1 Génistéine

Les isoflavones peuvent être retrouvées sous deux formes chez les végétaux, l'une biologiquement inactive (glycosides) et l'autre, active (aglycones) [58, 66]. Ainsi, la forme glycoside/inactive de la génistéine est la génistine (Figure 1.6). Cette dernière ne peut pas être absorbée par les cellules intestinales afin de rejoindre la circulation sanguine. Par contre, il y a dans l'intestin une enzyme, la β -glucosidase, qui est capable de l'hydrolyser et la génistéine obtenue est en mesure de rejoindre la circulation sanguine [58].

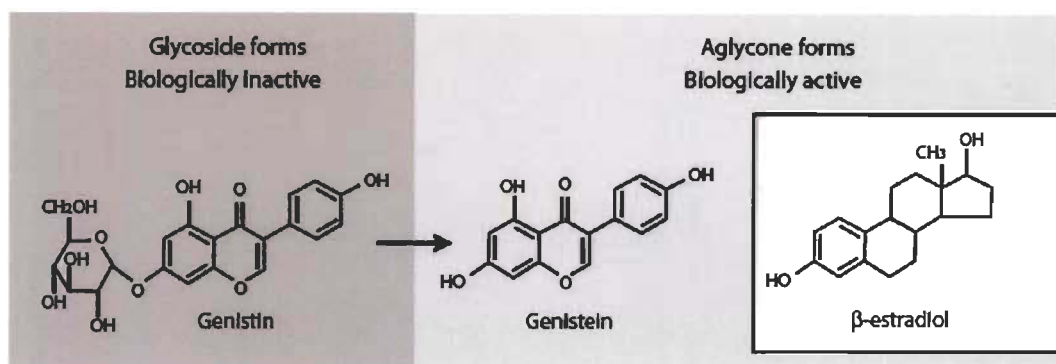


Figure 1.6 Comparaison structurelle entre la génistéine et le 17β -estradiol (tirée de Cederroth et Nef, 2009).

La source majeure de génistéine dans notre alimentation est le soya. Les produits à base de soya sont de plus en plus abondants dans la diète occidentale et la génistéine est la molécule phytoestrogénique la plus consommée [3, 66]. Pour une personne dont la diète est riche en phytoestrogènes, la concentration de génistéine dans le sang peut atteindre $4 \mu\text{M}$ [58, 67-70]. Par sa structure, la génistéine active les deux sous-types de récepteur à l'estradiol plus efficacement que le 17β -estradiol, la forme principale d'estrogène humain [58]. En accord avec cette information, la génistéine démontre, à l'instar de l'estrogène, un effet antiprolifératif sur bon nombre de lignées cellulaires répondant à l'estrogène [71-73], dont les CES [60, 61]. Néanmoins, plusieurs articles font mention d'effets prolifératifs de différentes doses de génistéine sur diverses lignées cellulaires [59-61, 74, 75]. Il semblerait que l'effet de la génistéine sur la prolifération cellulaire dépende de sa concentration, de la durée de l'exposition, de la présence d'estrogène humain et de la voie de signalisation cellulaire activé par la génistéine qui prédomine, sans oublier le type cellulaire auquel elle est administrée [58, 73-75]. Mais parmi ces facteurs, la présence d'estrogène humain semble être prédominante dans la détermination de l'effet estrogénique ou antiestrogénique de la génistéine. Ainsi, en présence d'une concentration physiologique d'estrogène humain, la génistéine aurait préférentiellement un effet antiestrogénique, alors qu'en absence d'estrogène, ce serait d'avantage un effet comparable à celui de l'estrogène humain qui serait observé [58].

1.5.2 L'effet de la génistéine sur la fonction utérine

Peu d'études ont été réalisées pour déterminer la fonction de la génistéine sur la fonction reproductrice féminine, particulièrement sur le processus de décidualisation. Certaines études suggèrent un rôle négatif de la génistéine sur le développement du système reproducteur féminin [76-78], d'autres un impact de la génistéine sur la formation de l'ovule, la fertilisation et le développement fœtal [79]. Il y a très peu d'études qui ont été réalisées afin de connaître l'effet de la génistéine sur la prolifération des CES humaines. Toutefois, une étude a montré que la génistéine a un impact prolifératif sur les HIESC, mais qu'en présence d'estrogène humain, ce phytoestrogène a un impact antiprolifératif sur ces mêmes cellules [61]. Cependant, aucune étude n'a encore investigué si la génistéine peut interférer avec le processus de décidualisation. Pourtant, la régulation hormonale est très importante pour l'initiation et le maintien de la décidualisation et donc la génistéine, par son habileté à lier et activer les récepteurs à l'estrogène, pourrait interférer avec le bon déroulement de ce processus.

1.6 p53

p53 est encodé par le gène TP53, qui est situé sur le petit bras du chromosome 17 chez l'humain [80]. Appelée gardienne du génome, la protéine p53 est un facteur de transcription dont les fonctions principales sont d'induire l'arrêt du cycle cellulaire lorsque des dommages à l'ADN surviennent et d'induire l'apoptose si ces dommages ne peuvent pas être réparés [81, 82]. Il s'agit de l'un des suppresseurs de tumeurs les plus étudiés et les mieux connus. Cependant, son rôle physiologique dans des contextes autres que ceux impliquant des dommages à l'ADN et notamment, dans la fonction reproductrice féminine, est bien mal compris [4, 19, 32, 83, 84].

1.6.1 Structure de p53

p53 est une protéine nucléaire de 393 acides aminés ayant un poids moléculaire de 43.7kDa, comportant cinq domaines fonctionnels (Figure 1.7). Sa structure est

entièrement déterminée et chaque domaine protéique a une fonction qui lui est propre (tel que revu par Kruse et Gu [82]). À l'extrémité N-terminale, le domaine de transactivation contient plusieurs sérines pouvant être phosphorylées. L'importance de la phosphorylation sera décrite dans la sous-section 1.5.2. Contigu au domaine de transactivation, se trouve le domaine riche en proline, nécessaire à la conformation et aux caractéristiques isoélectriques de la protéine. Le domaine suivant est le domaine de liaison à l'ADN, grâce auquel p53 peut se lier au promoteur ses gènes cibles et agir en tant que facteur de transcription. Puis, vient le domaine de tétramérisation. Finalement, il y a le domaine C-terminal où les modifications post-traductionnelles de la protéine sont responsables soit de l'activation ou de l'inhibition de p53. Enfin, des modifications post-traductionnelles qui surviennent sur la portion C-terminale de la protéine déterminent la localisation nucléaire ou cytosolique/mitochondriale de la protéine ainsi que son transport au protéasome en vue de sa dégradation.

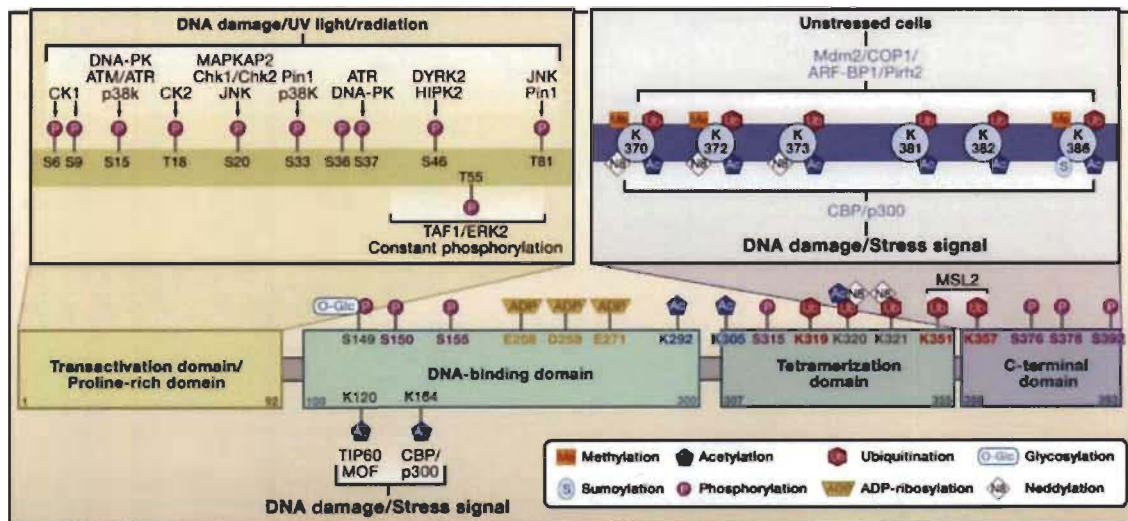


Figure 1.7 Modifications post-traductionnelles dont p53 peut faire l'objet (tirée de Kruse et Gu, 2009).

1.6.2 L'importance des modifications post-traductionnelles de p53

Une fois synthétisée, la protéine p53 doit être stabilisée. Sa liaison à la protéine mouse double minute 2 (MDM2) peut remplir cette fonction; cependant, la liaison de MDM2 inhibe l'activité de p53 [82]. Le rôle de MDM2 dans la régulation de p53

sera décrit dans la sous-sous-section 1.5.2.1. Plusieurs autres types de modifications post-traductionnelles peuvent survenir sur p53, dont l'ubiquitination, la sumoylation, l'acétylation, la méthylation et la neddilation (Figure 1.7). La combinaison de toutes les modifications que p53 subit influencera sa stabilité et son activité.

1.6.2.1 L'inhibition et la dégradation de p53

La principale protéine impliquée dans la régulation négative de p53 est MDM2. Il s'agit d'une ubiquitine ligase qui, une fois phosphorylée, est délocalisée au noyau [85]. De là, MDM2 lie le domaine de transactivation de p53. Si la quantité de MDM2 est faible, cette E3 ligase induira une mono-ubiquitination de différentes lysines de p53. En revanche, si elle est présente en grande quantité, elle induira une poly-ubiquitination, qui entraîne la délocalisation de la protéine vers le cytosol de p53 et sa dégradation par le protéasome [82, 86-88]. La mono-ubiquitination, quant à elle, n'est pas suffisante pour induire la dégradation de p53. Cependant, MDM2 induit le transport de p53 vers le cytosol, ce qui inactive ses fonctions en tant que facteur de transcription sans pour autant induire sa dégradation. La présence de p53 stable dans le cytosol a permis l'identification de nouveaux mécanismes d'action p53 pour induire la mort cellulaire par apoptose au niveau de la mitochondrie [89, 90]. Bien que MDM2 puisse induire la dégradation de p53 par la poly-ubiquitination, sa liaison avec p53 stabilise la protéine. Cette liaison n'empêche en rien p53 de se lier au promoteur de ces gènes cibles, mais inhibe son activité. Ainsi, p53 couplé à MDM2 agit plutôt comme un inhibiteur transcriptionnel en empêchant, par encombrement stérique, la liaison d'autres facteurs de transcription et l'initiation de la transcription de ses gènes cibles [82, 91].

Il y a plusieurs autres protéines qui peuvent être responsables de l'inhibition de p53. Mouse double minute 4 (Mdm4 ou MdmX), par exemple, est un analogue structurel de MDM2 qui se lie à la portion C-terminale de p53. Cependant, Mdm4 ne possède pas d'activité E3 ligase sur p53. Ainsi, Mdm4 est un inhibiteur de l'activité p53, mais elle n'induit pas la dégradation de la protéine [82].

1.6.2.2 *L'activation et les rôles de p53*

p53 a une multitude de gènes cibles qui sont impliqués dans différents processus biologiques. Les différentes modifications post-traductionnelles dont p53 fait l'objet servent à déterminer les gènes cibles sur lesquels p53 peut se lier au promoteur. La phosphorylation est suffisante afin d'activer p53 : même en absence d'acétylation, p53 peut induire la synthèse de gènes impliqués dans son autorégulation tels que MDM2 (Figure 1.7).

En plus de stabiliser la protéine, la phosphorylation des sérines de p53, dont la sérine 15, permet le recrutement des histones acétyltransférases (HAT) CBP et p300, les deux principales HAT responsables de l'acétylation de p53 [82, 92, 93]. Si elle est faiblement acétylée, p53 induira la synthèse de protéines impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire telles que p21. La protéine p21 est impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire en G0/G1 et en G2/M par l'inhibition des kinases dépendantes des cyclines (CDK) [19, 94, 95]. Ainsi, lorsque l'expression de p21 augmente, l'expression des cyclines diminue. Chaque cycline agit à un moment spécifique du cycle cellulaire. Ainsi, une diminution de cycline D1 implique un arrêt du cycle cellulaire en G0/G1, alors qu'une diminution de cycline B1 implique une inhibition en G2/M (Figure 1.3) [19, 96-98].

Si p53 est fortement acétylé sur des lysines spécifiques dont K120, K320 ou encore d'autres lysines situées sur sa portion C-terminale dont K382, p53 induira la synthèse de protéines impliquées dans l'apoptose telles que Bax et PUMA (Figure 1.8) [82, 88]. L'acétylation de p53 en son domaine C-terminal revêt une importance particulière puisque son impact ne se limite pas à l'activation de la protéine, mais il s'étend également à la stabilisation de la protéine. Tel qu'illustré à la figure 1.6, les six lysines en C-terminal peuvent recevoir différents types de modifications post-traductionnelles dont l'acétylation qui active le facteur de transcription et l'ubiquitination qui l'inactive et induit sa dégradation [82, 88].

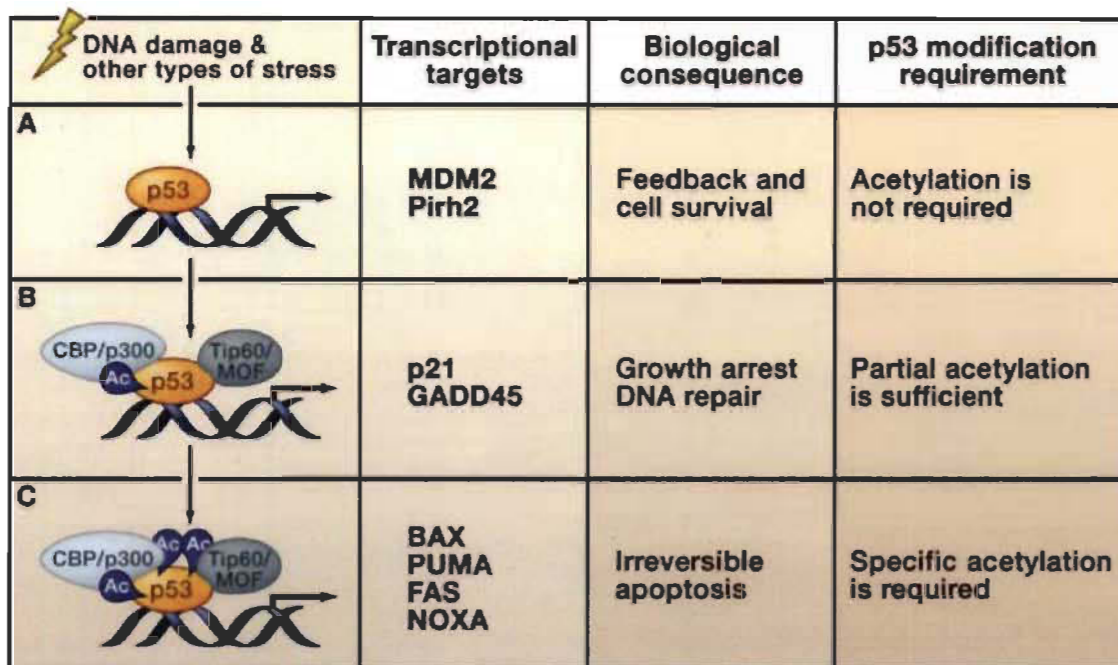


Figure 1.8 Les différents rôles de p53 dépendent des modifications post-traductionnelles de la protéine (tirée de Kruse et Gu, 2009).

1.6.3 L'importance de p53 dans le système reproducteur féminin

Au niveau physiologique, plusieurs études ont suggéré un rôle de p53 au sein des cellules en différenciation [81, 84, 99]. Ainsi, p53 aurait un rôle de surveillance, s'assurant qu'aucune cellule ne mute et prolifère de façon incontrôlée. Cependant, au cours de la décidualisation des CES, la fonction de p53 ne se limiterait pas à la surveillance. Chez la souris, le facteur de transcription p53 est aussi responsable d'induire la synthèse de Lif, une protéine essentielle à l'implantation. Ainsi, des défauts d'implantation sont observés dans les souris où Lif a été supprimé [5, 57]. Similairement, les souris où p53 a été supprimé ont des portées moins fréquentes et nombreuses et les naissances sont prématurées [5]. Chez l'humain, les femmes fertiles ont des niveaux de Lif plus élevés que les femmes infertiles autour du moment de l'implantation [100-102]. Toutefois, la nécessité de Lif est moins claire et de plus amples études sont nécessaires afin de caractériser l'importance de Lif dans l'implantation chez l'humain [5]. Quant à p53, sa suppression limitée à l'utérus des souris est associée, au cours de la décidualisation, à un excès de la différenciation

cellulaire résultant en une sénescence précoce de la décidue, des avortements spontanés et des naissances prématurées [4].

1.6.4 Problématique de recherche associée à p53 et à la décidualisation

Une accumulation de la protéine p53 dans les HIESC est observable au cours de la décidualisation [32]. Cependant, les mécanismes qui régulent l'expression et l'activité de p53 dans le stroma utérin pendant la grossesse, ainsi que le rôle de p53 dans ce contexte, sont très mal connus [4].

1.6.5 L'impact de la génistéine sur l'activité de p53

L'accumulation de p53 pendant la décidualisation serait due, du moins en partie, à l'augmentation des niveaux intracellulaires d'AMPc [32]. La génistéine peut induire un stimulus de type estrogénique dans différents types cellulaires [103-105]. Ainsi, l'apport de phytoestrogène par l'alimentation est susceptible d'influencer la régulation de p53 dans de nombreux processus biologiques impliquant l'estrogène.

1.7 Problématique globale de recherche

Puisque la décidualisation est un processus qui se doit d'être finement régulé et que l'apport de phytoestrogènes par l'alimentation est susceptible d'interférer avec le bon déroulement de ce processus, l'étude de l'impact de la consommation des phytoestrogènes sur les mécanismes moléculaires impliqués dans la décidualisation s'avère importante pour la compréhension de nouvelles causes d'infertilité féminine et pour l'élaboration subséquente de traitements adaptés. Malheureusement, les connaissances actuelles dans ce domaine sont très limitées. Afin de répondre partiellement à cette vaste problématique, le projet de recherche présenté ici s'est attardé à déterminer l'impact de la génistéine sur p53 dans le contexte de la décidualisation des HIESC.

1.8 Objectifs et hypothèses

L'hypothèse générale du travail était que la génistéine, par son action estrogénique, pourrait nuire au bon déroulement de la décidualisation en interférant avec l'arrêt contrôlé du cycle cellulaire et en dérégulant l'expression et l'activité de p53.

Le premier objectif spécifique que nous avons poursuivi était de caractériser la régulation de la synthèse, de l'expression et de l'activité de p53 dès les premières étapes de la décidualisation, sans l'influence de la génistéine. Puisque d'autres avaient déjà rapporté, d'une part, que dans une lignée de cellules endométriales humaine, l'activation de la voie de l'AMPc induisait une accumulation de la protéine p53 (du moins, après une longue période d'incubation) [32] et, d'autre part, que la suppression de p53 interférait avec la formation de la décidue dans un modèle murin [4], nous nous attendions à observer une accumulation de la protéine p53 dans notre lignée modèle soumise à la décidualisation *in vitro*, ainsi qu'une hausse de ses formes phosphorylées et acétylées et une augmentation de l'expression de ses gènes cibles, ce qui indiquerait une plus grande activité de p53 durant la décidualisation.

Notre deuxième objectif spécifique était d'investiguer la réponse des HIESC à la génistéine en dehors du contexte de la décidualisation. Nous posions l'hypothèse que par ses effets agonistes et antagonistes de l'estrogène, la génistéine était susceptible d'augmenter la prolifération des HIESC, qui expriment de nombreux récepteurs à l'estradiol [106-109]. Par ailleurs, puisque la génistéine module l'expression et l'activité de p53 dans divers types de cellules répondant à l'estrogène [110-112] et que p53 s'accumule dans les HIESC en réponse à l'AMPc [32], un second messager modulé par l'estrogène, nous posions l'hypothèse que la génistéine induirait une accumulation de p53, sous une forme stable et active.

Finalement, notre troisième objectif spécifique était d'investiguer l'effet de la génistéine sur la régulation de p53 au cours de la décidualisation des HIESC. Notre hypothèse à cet égard était que la génistéine pourrait modifier la régulation de p53

associée à la décidualisation, avec un impact sur la prolifération des cellules et l'efficacité de la décidualisation.

1.9 Modèle cellulaire et approche expérimentale

Nous avons utilisé, comme modèle cellulaire, des HIESC 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). L'induction de la décidualisation était réalisée par l'ajout de 1 μM de MPA et de 0,5 μM de 8-bromo-AMPC, une méthode bien établie depuis plusieurs années [49, 54]. Les traitements de génistéine quant à eux impliquaient l'ajout de 10 μM de génistéine au milieu de culture. La validation de la décidualisation s'est fait par l'analyse de marqueurs de la décidualisation, soit la synthèse de prolactine par q-PCR, la sécrétion accrue de prolactine par EIA, l'expression augmentée de la protéine FoxO1 par immunobuvardage de type western et par observation des changements morphologiques caractéristiques des HIESC via microscopie en contraste de phase. L'analyse des protéines d'intérêt, soit FoxO1, p53, p21 MDM2, cycline B1, Parp clivé ainsi que des formes phosphorylée et acétylée de p53 a été effectuée par immunobuvardage de type Western. L'analyse de l'expression de ces gènes a été effectuée par RT-qPCR. La localisation cellulaire de p53 a été analysée Western blot à la suite de l'extraction cytosolique-nucléaire à l'aide du kit Subcellular protein fractionation (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL). L'analyse de la mort cellulaire par apoptose a été effectuée par microscopie (dénombrement de cellules à morphologie apoptotique après marquage nucléaire au Hoechst) et par l'analyse d'un marqueur biochimique, le fragment clivé de Parp, via immunobuvardage de type Western. La détermination de l'habileté de p53 à réguler ses gènes cibles dans notre modèle de décidualisation *in vitro* s'appuyait sur l'interférence à l'ARN de p53, réalisée à l'aide de petits ARN d'interférence (siRNAs) commerciaux.

1.10 Résultats et contribution des auteurs

Les résultats produits au cours de ma maîtrise seront présentés sous la forme d'un article qui est actuellement en préparation. J'ai participé à l'analyse de l'expression de FoxO1 et de cycline B1 au cours de la décidualisation, en collaboration avec Gabriel Châteauneuf, Mélanie St-Cyr et Jessica Dion (respectivement stagiaire de premier cycle et étudiantes de 2^e cycle). J'ai produit, avec Jessica Dion, les résultats de la régulation de l'expression et de l'activité de p53 durant la décidualisation (Figure 2). J'ai également produit tous les résultats de l'analyse de la réponse cellulaire à la génistéine (Figure 3) ainsi que ceux relatifs à la régulation de l'activité de p53 (Figure 4). J'ai réalisé les expériences de prolifération cellulaire en réponse à la génistéine au cours de la décidualisation (Figure 5A) ainsi que la qPCR de prolactine dans les mêmes conditions (Figure 5B). J'ai également produit les résultats de la régulation de p53 au cours de la décidualisation en réponse à la génistéine (Figure 5C à 5F) avec l'aide de Carol-Ann Joly, une autre étudiante à la maîtrise. Finalement, j'ai réalisé les expériences de validation de l'activité de p53 (Figure supplémentaire 1) et de dose-réponse de génistéine (Figure supplémentaire 2).

Dans l'article présenté dans le chapitre II, certains résultats ont été réalisés sans mon aide. Mélanie St-Cyr a mis au point la technique de décidualisation *in vitro* des HIESC et l'a validée par microscopie en contraste de phase (Figure 1A) et par EIA (Figure 1B). Jessica Dion a réalisé les expériences de viabilité cellulaire au cours de la décidualisation (Figure 1D). Enfin, c'est moi qui ai rédigé la première version de l'article en préparation présenté dans le chapitre II.

CHAPITRE II

p53 REGULATION DURING THE DECIDUALIZATION PROCESS ON HUMAN ENDOMETRIAL STROMAL CELLS EXPOSED TO GENISTEIN

2.1 Contribution des auteurs

Mélanie St-Cyr a réalisé les expériences d'EIA et de microscopie en contraste de phase. En collaboration avec Jessica Dion, Gabriel Châteauneuf et moi, elle a réalisé l'analyse de FoxO1 au cours de la décidualisation. Jessica Dion a réalisé les tests de prolifération cellulaire au cours de la décidualisation.

L'analyse de p53 dans la décidualisation a été effectuée par Mélanie St-Cyr et Jessica Dion. Gabriel Châteauneuf et moi avons contribué à la réalisation de toutes ces expériences.

La réponse des HIESC à la génistéine ont été réalisées par moi-même.

Finalement, l'étude de l'impact de la génistéine sur la décidualisation et sur la régulation de p53 dans le contexte de la décidualisation des HIESC a été réalisée par moi, avec l'aide de Carol-Ann Joly. Ces expériences ont montré que la génistéine n'a pas d'impact sur le bon déroulement de la décidualisation. Valérie Leblanc, une professionnelle de recherche, a contribué à la réalisation de l'ensemble de ces expériences. C'est moi qui ai compilé et analysé l'ensemble des résultats présentés ici, ainsi que rédigé la première version de l'article en préparation.

2.2 Résumé

La principale hormone estrogénique du soya, la génistéine, est connue pour son habileté à moduler la prolifération cellulaire, l'apoptose et l'expression de p53 dans plusieurs lignées de cellules qui expriment les récepteurs à l'estrogène. Les cellules endométriales stromales (CES) expriment les récepteurs à l'estrogène et répondent à une stimulation estrogénique. Cependant, l'impact de la génistéine sur l'endomètre utérin et sur le processus de décidualisation n'est pas bien compris. Dans cette étude, nous avançons que la décidualisation des HIESC s'effectue plus rapidement que démontré auparavant. En effet, les marqueurs de la décidualisation sont régulés à la hausse après trois jours suivant les stimuli de décidualisation, contrairement à six jours dans d'autres modèles expérimentaux. De même, le cycle cellulaire est altéré dès le premier jour de la décidualisation. Nous montrons également pour la première fois que l'expression de la protéine p53 est augmentée dans les HIESC dès le troisième jour de la décidualisation. Toutefois, cette hausse n'est pas associée à une hausse de l'expression génique de p53, démontrant pour la première fois que la régulation du contenu intracellulaire de p53 à cette phase précoce de la décidualisation est post-transcriptionnelle. L'accumulation de p53 s'accompagne de sa phosphorylation sur la ser15 et de son acétylation sur la lys392, deux modifications post-traductionnelles stabilisatrices et activatrices. Cependant, ses gènes cibles ne sont pas induits : au contraire, la quantité totale de p21 diminue. Ainsi, nous postulons que p53 est inactive (du moins dans les premiers jours de la décidualisation). Par ailleurs, nos résultats montrent qu'une courte exposition à la génistéine induit rapidement le déplacement de p53 vers le compartiment nucléaire et que le phytoestrogène a un impact positif mais tardif sur l'accumulation de la protéine dans les HIESC. Finalement, la génistéine ne semble pas influencer la décidualisation ni la fonction de p53 dans les événements précoces de ce processus. L'inactivation rapide de p53 et la régulation à la baisse de p21 pendantes premières étapes de la décidualisation, même en présence de génistéine, suggère que le maintien de la décidualisation nécessite cette inactivation. Ainsi, nous postulons que cette dernière pourrait permettre l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M, accompagnant la différenciation caractéristique des HIESC en cellules déciduales.

The effect of genistein on decidualization process of human ESCs

Running title: Genistein effects on p53 in the context of decidualization

Key word: Endometrium, decidualization, genistein, p53, cell cycle, human endometrial stromal cells, p21.

Roch Tremblay, Jessica Dion, Carol-Ann Joly, Mélanie St-Cyr, Valérie Leblanc, Céline Van Themsche¹

¹ Cellular signaling research group, Department of medical biology, Université du Québec à Trois-Rivières, Québec, Canada.

Correspondence: Céline Van Themsche, Department of medical biology, Université du Québec à Trois-Rivières, Québec, Canada, E-mail: celine.vanthsche@uqtr.ca

ABSTRACT

Genistein, the main phytoestrogen of soy, is known to modulate cell proliferation, apoptosis and p53 expression in many cell lines that express oestrogen receptors. Endometrial stromal cells (ESCs) express oestrogens receptors and respond to oestrogen and phytoestrogens stimulation. They undergo cyclic differentiation, through a process called decidualization, along which they acquire the ability to interact with and support properly an implanting embryo. p53 has been suggested to play a role in the decidualization process and maintenance of pregnancy, but its regulation at the early steps of decidualization, and the impact of genistein exposure in this context, is poorly described. We report here timely regulation of *in vitro* decidualization of ESCs, which occurs more rapidly than previously described. Indeed, the putative arrest of cell cycle at G2/M that was suggested to accompany cellular differentiation can be observed as soon as one day following the induction of decidualization. In addition, decidualization markers are upregulated three days following the decidualization stimulus, whereas it has been previously shown to only occur after six days in other experimental models. We also show that p53 content is upregulated after three days of decidualization.

Although p53 protein is the site of post-translational modifications associated with the activation of the protein, the expression of its target genes is not modulated. This strongly suggests that decidualization-induced p53 protein conformational state is inactive. Inactivation of p53 may be necessary for p21 levels to be reduced and cell cycle arrest to G2/M before differentiation. Finally, our results show that exposure to genistein has a late impact on p53 expression and does not influence the early events of decidualization. This adds to a role of p53 in the early events of the decidualization process.

INTRODUCTION

Female infertility is a common health problem worldwide. Nowadays, 6% of married North American women aged between 15-44 are completely infertile and another 12% have decreased fecundity [1]. Infertility can be caused by multiple factors including age, oxidative stress and diseases [2, 3]. One common female fertility problem involves altered decidualization of endometrial stromal cells (ESCs). Decidualization occurs in the endometrium at each menstrual cycle, in presence or absence of fertilization, upon exposure to progesterone and estrogen, two steroid hormones secreted by the ovaries [4, 5]. If decidualization does not occur properly, implantation is flawed and pregnancy is interrupted [6]. Indeed, decidualization is needed for the establishment of a good communication between maternal cells and embryonic cells and is essential to proper implantation of the blastocyst and development of the placenta [7, 8]. At the cellular level, decidualization of ESCs has been showed to involve controlled cell cycle arrest: the cells would enter into an alternate program of endoreduplication, involving blockade of cell cycle at G2 phase and formation of polyploid cells [9]. Decidualization further involves the induction of cellular differentiation, where superficial endometrial stromal cells, which are fibroblastic in nature, transform into decidualized cells with a large, ovoid shape and increased resistance to oxidative stress, notably through FoxO1-dependent expression of superoxyde dismutase [10]. Increased expression of FOXO1 and secretion of prolactin is a hallmark of ESCs decidualization in vivo [11] and in vitro [5].

In the last decade, the consumption of soy products in occidental countries showed a dramatic increase. Soy products contain high level of phytoestrogens [12], which are plant oestrogens with high structural similarity to human oestrogens. In fact, phytoestrogens are able to link and activate oestrogen receptors (both ER α and ER β) and, consequently, to perturb the hormonal system and cause health defects [12, 13]. Genistein is the aglycone form of genistin, the main phytoestrogenic molecule in soy [12-14]. It was previously reported that exposure to genistein modulates the proliferation in endometrial stromal cell (ESC) lines [13] and therefore, it is possible that exposure to soy-containing genistein could modulate the decidualization process in these cells.

In cell lines expressing oestrogens receptors, genistein can modulate the expression of various intracellular factors including p53 [15]. In ESCs, p53 could play a central role in the maintenance of homeostasis, especially at the time of decidualization. This protein known as the guardian of the genome is a transcription factor that induces cell cycle arrest, senescence or apoptosis after cellular stress like DNA damage in adult cells [16]. p53 levels are low in unstressed cells and its expression increases for a short time when its action is required [17]. As a general rule, p53 can induce cell cycle arrest by directly promoting the synthesis of p21 and indirectly inhibiting the synthesis of Cyclin B1. It can also induce cellular apoptosis, notably by promoting the synthesis of Bax. p53 expression is low in unstressed cells and its expression increases for a short time when its action is required [17]. However, many studies have already demonstrated a distinct function for p53 in the endometrium during early pregnancy. Those studies showed that p53 is required for up-regulation of the leucocyte migration inhibition factor (LIF) in mouse endometrial cells during implantation. They also indicated that without p53 expression mouse have poor implantation and small litters [6, 18, 19]. p53 is up-regulated in human endometrial stromal cells at the time of decidualization [20] and recent studies suggest that p53 would play a central role in the decidualization process, both in mouse and human models [18, 21]. The regulation of p53 expression and activity in ESCs at the time of decidualization, however, is only partly elucidated [20].

p53 has been shown to be regulated by genistein exposure in various cell types [15] and we hypothesized that if genistein can modulate p53 expression and activity in ESCs, this could alter p53 dependent decidualization process. To study the regulation of p53 expression and activity in ESCs during the decidualization process and the impact of genistein in this context, we used a human immortalized endometrial stromal cells (HIESC) model: these cells had previously been immortalized using simian virus 40 (SV40) large T antigen [5] and can be induced to undergo in vitro decidualization [5]. In this in vitro decidualization model, we found that p53 protein accumulates as soon as three days post decidualization but is unable to activate two target genes, p21 and MDM2. We also found that although in resting HIESCs, genistein induces cellular proliferation and triggers the accumulation of p53 protein in cell nucleus in a putative inactive state, genistein does not interfere with the decidualization of HIESCs, even if it modulates p53 expression and cellular proliferation in this context.

METHODS

Cell lines and reagents

Human endometrial stromal cells (HIESC) immortalized with Simian virus large T antigen were generously provided by Dr Michel A. Fortier (Centre de Recherche du CHUL, QC, Canada). Cells were routinely maintained in RPMI-1640 medium containing 50 µg/ml gentamycin and supplemented with 10% fetal bovine serum. Cells were cultured at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Antibodies against p53, Acetyl p53, Phospho-p53, p21, and Parp were purchased from Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Cyclin B1 and MDM2 antibodies were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX), GADPH was purchased from Abcam (Toronto, ON) and HRP-conjugated goat anti-rabbit and mouse secondary antibodies were purchased from Bio-Rad Laboratories (Mississauga, ON). MedroxyProgesterone 17 Acetate (MPA) was obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), 8-bromo-cAMP was purchased from Enzo Life Sciences Inc. (Farmingdale, NY) and genistein (purity: ≥98%) was purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO). p53 siRNAs were purchased from Life Technologies (Burlington, ON).

In vitro decidualization of HIESCs

Sub-confluent (approximately 85% confluent) HIESCs in 6-well plates cultured in phenol red-free RPMI (Life Technologies, Burlington, ON) containing 2% FBS dextran-coated charcoal-treated (DCC) and 50 µg/ml gentamycin, were treated with a mixture of 0.5 mM 8-bromo-cAMP and 1 µM MPA (or with vehicle only for control cells). Medium was changed and treatment was repeated every 48h and cells were collected at days 1, 3 and 6 of decidualization.

Prolactin Assay

Prolactin levels were measured in the culture medium from days 1, 3 and 6 of decidualization. Prolactin (PRL) measurement was done by enzyme immunoassay with the EIA Kit (Cayman, Ann Arbor, MI) and the optical density was read with Fluostar OPTIMA BMG spectrophotometer (BMG Labtech Inc., Durham, NC) at 450 nm.

Transfection with p53 siRNA

HIESC cells were seeded in 6 well. After 24h, medium was replaced and plates were incubated for another 24h. p53 siRNAs and control siRNAs were added to cells using a ratio of 1:3 µL siRNA: lipofectamine 2000 (Invitrogen) (ug:ul/well). After 24h transfection, medium was replaced and plates were incubated for 24h at 37°C. Then cells were treated with genistein and/or decidualization mixture. p53 siRNA sequence: #605 5'-GUAAUCUACUGGACGGAATT-3'.

Cell viability assay

3-(4,5-Dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT; Sigma) was used to estimate the viability of HIESC. Briefly, cells were seeded in flat bottom 96-well plate and were placed for 24h at 37°C in a humidified incubator with 5% CO₂. Then, genistein treatment and/or decidualization treatment were started. All treatments were performed in duplicate. At the end of the treatments, cells were incubated with

0.5 mg/mL MTT for 4h, followed by 10% sodium dodecyl sulfate (SDS; Sigma) to solubilize crystals. Then, cells were incubated for 24h for color development. Absorbance at 550 nm of treated cells was finally determined using the FLUOstar OPTIMA system (BMG Labtech, Offenburg, Germany). Cellular proliferation was quantified as the DO 550 nm ratio between treated cells and control cells (therefore, control cells present a ratio of 1).

Apoptosis cell count

At the end of treatment with genistein, control and treated cells were harvested and washed twice in PBS 1X. Then, cells were stained with a 5 µg/mL Hoechst 33258 (ACROS ORGANICS) and 5% formalin mixture overnight at 4°C. Fixed cells were laid on a slide and observed under a fluorescent microscope. Morphological changes of the nuclei like nuclear shrinkage or compaction of the chromatin were used to identify apoptotic cells. Two hundreds cells were counted per sample and the number of cells with apoptotic morphology was used to calculate the percentage of apoptotic cells.

qPCR

Total RNA was isolated from HIESC cells using Trizol Reagent (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) and Direct-zol RNA MiniPrep (ZYMO RESEARCH, Irvine, CA, USA). First strand cDNA was synthesized from RNA using Qscript reverse transcriptase (Quanta BioSciences; Gaithersburg, MD, USA). The reverse-transcribed RNA was then amplified by qPCR using specific primers (Table 1). Human TBP was used as the normalization control in the quantitative analysis. qPCR was performed in Stratagene Mx 3000P (Agilent Technologies; Santa Clara, CA, USA) using PerfeCTa SYBR Green SuperMix, Low Rox (Quanta BioSciences, Gaithersburg, MD, USA) at recommended dilution, 600 nM of forward and reverse primers and optimized dilution of ADNc in a final volume of 20 µL. The PCR conditions were: 95°C for 10 sec, 62°C for 30 sec for 40 cycles.

Western blots

Treated cells were lysed in cold RIPA buffer containing protease inhibitors (Complete™ from Roche, Laval, Quebec, Canada), followed by three freeze-thaw cycles. Equal amounts of cell lysates were separated into 11% polyacrylamide gels and then transferred into nitrocellulose membranes (Bio-Rad). The membranes were probed with primary antibody overnight at 4°C and incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody for 45 min. Detection was performed by chemiluminescence using SuperSignal West Femto substrate (Pierce, Arlington Heights, IL, USA), as described by the manufacturer.

Subcellular Fractionation

A subcellular protein fractionation kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL) was used to fractionate proteins into nuclear and cytoplasmic fractions according to the manufacturer's instructions.

Statistical analysis

Data were subjected to Student paired T-test (PRISM software version 3.03; GraphPad, San Diego, CA, USA) (Figures 1 to 4) or Two-Way Anova test (SPSS software version 23; IBM, Chicago, IL, USA) (Figure 5). Statistical significance was accepted when $p < 0.05$.

RESULTS

The fine regulation of p53 during decidualization of human ESCs

We have established and validated our in vitro model of decidualization in HIESCs, based on previous studies [5]. Human endometrial stromal cells immortalized with SV40 large T antigen were treated with a combination of cAMP + MPA, or with vehicle only (control treatment). Phase contrast microscopy showed the presence of cells

with characteristic enlarged, ovoid shape at days 3 and 6 of decidualization, but not at day 1 (Figure 1A). Decidualization markers were also increased starting at day three of decidualization, including secreted prolactin (Figure 1B) and intracellular FoxO1 protein (Figure 1C). Altogether, the observations indicate that in our experimental conditions, decidualization is efficiently induced in HIESCs and phenotypic changes can be observed as early as three days of treatment. We also verified the activity status of p53 in our model cell line using RNAi: p53 knockdown resulted in decreased levels of MDM2 and p21 (Supplementary Figure 1), showing that p53 efficiently regulates the expression of its target genes in our experimental conditions.

MTT assay showed that cell growth/viability was reduced starting at 1 day of decidualization treatment (Figure 1D), suggesting reduced cellular proliferation as reported in another decidualization model [22]. However, protein levels of G2 phase marker cyclin B1 were not significantly modulated up to 6 days of treatment (Figure 1E): this observation is in agreement with previous studies suggesting that decidualizing HIESCs could undergo endoreduplication, e.g. cell cycle arrest at G2/M without further cytokinesis [9]. p53 expression and activity has been linked to endoreduplication [23, 24] and accordingly, we observed increased p53 mRNA levels in decidualizing ESCs, although only at day 6 of decidualization (Figure 2A). p53 protein content, on the other hand, was increased starting at day 3 of decidualization (Figure 2B): this suggests that in ESCs during decidualization, p53 expression is predominantly regulated at the post-transcriptional level. P53 activity would also be regulated at the post-transcriptional level in these cells: we have measured an increase of serine 15-phosphorylation and lysine 382-acetylation on p53 protein, starting at days 6 and 3 respectively (Figure 2C). These two modifications are classically associated with an increase of p53 activity (reviewed in [25]). However, analysis of the expression of p53 target genes showed no increase of their expression at days 3 or 6 of decidualization. In fact, MDM2 gene expression was reduced at day 3 (Figure 2D) and total p21 protein content was significantly decreased at day 3 (Figure 2E). This suggests that p53 protein accumulating in ESCs during decidualization would not be able to transactivate its target genes.

Exposure to genistein affects p53 expression and the proliferation of HIESCs

To evaluate the impact of genistein on HIESCs, we first investigated cellular proliferation. MTT viability assays showed that cell growth/viability was modestly but significantly increased at 24h of treatment, but this effect was transient and became undetectable after 48h of treatment (Figure 3A). Contrary to decidualization stimulus, genistein increased the levels of cyclin B1 protein in HIESCs, both after 24h and 48 h of treatment (Figure 3B). This indicates that at the administered dose, genistein induces the proliferation of HIESCs. Hoechst staining revealed no increase of apoptotic index in HIESCs in response to genistein (Figure 3C), and western blot analysis showed no modulation of the levels of cleaved fragments of Parp (Figure 3D). Altogether, these experiments reveal that in our experimental conditions, genistein does not alter the viability of HIESCs and increases their cellular proliferation.

We next investigated the impact of genistein exposure on p53 expression and activity in HIESCs. We found that genistein treatment reduced p53 mRNA levels, starting at 24h of treatment (Figure 3E); however, the same treatment significantly increased the levels of p53 protein, starting at 24h (Figure 3F). This suggests that although genistein reduces gene expression of p53, post-transcriptional mechanisms stabilize its protein content. Cytoplasmic-nuclear fractionation further showed that cytosolic p53 protein content decreases while nuclear p53 content increases, as early as 1h of genistein treatment (Figure 3G): this reveals that in response to genistein treatment, p53 is imported to the nucleus of HIESCs. Increased nuclear p53 content could allow for increased cis-acting transcriptional activity of the protein and accordingly, we found an upregulation of ser-15 phosphorylation and lys382-acetylation of p53 in HIESCs, starting at 24h of treatment with genistein (Figure 4A), suggesting that p53 could exert increased activity on its target genes. However, we found that in response to genistein, MDM2 mRNA levels were decreased whereas p21 mRNA levels were not modulated (Figure 4B). This strongly suggests that p53 protein is inactive in HIESCs in response to genistein. Genistein treatment had no impact on total MDM2 protein content but in the case of p21, total protein levels were increased starting at 24h of genistein treatment (Figure 4C): this suggests that p53-independent post-translational

mechanisms dictate p21 protein content in response to genistein in our experimental conditions. Altogether, these experiments suggest that p53 protein accumulating in the nucleus of HIESCs in response to genistein is unable to activate its target genes.

Genistein does not alter the decidualization of HIESC

Exposure to genistein alone had significantly increased the proliferation of HIESCs (Figure 3A and B) and when it was given as a pre-treatment to HIESCs before induction of in vitro decidualization, genistein counteracted the decrease of cell growth/viability that is induced by decidualization stimulus (Figure 5A). However, genistein did not modulate decidualization-induced increase of prolactin mRNA (Figure 5) or FoxO1 protein (Figure 5C). This strongly suggests that genistein does not alter global decidualization of HIESCs.

Genistein significantly increased decidualization-induced upregulation of p53 protein content in HIESCs, at least after 6 days of decidualization (Figure 5D); at the same time, genistein increased ser15-phosphorylation and lys382-acetylation of p53 protein (Figure 5E). However, as observed when genistein alone was administered to the cells, this increase of activation state markers was not accompanied by an increase (or a decrease) of decidualization-induced MDM2 and p21 protein content (Figure 5F). Altogether these results suggest that even if genistein would potentiate the effect of in vitro decidualization stimulus on p53 protein content and post-translational modification, it does not modulate global p53 activity on its target genes. This may account for the above-mentioned observations suggesting that genistein does not alter global decidualization of HIESCs.

DISCUSSION

In this study, we investigated p53 regulation during decidualization of human endometrial stromal cells and the impact of genistein in this context. As an in vitro model, we used primary human ESCs immortalized with SV40 large T antigen. This

antigen can bind p53 protein directly and in mouse cells, when p53 is linked to large T antigen, it is still able to bind the promoter of its target genes but unable to induce their synthesis [26]. In human cells however, interaction with large T antigen is interrupted when p53 binds to the promoter of its target genes [27] and p53 recapitulates its ability to induce the expression of several target genes [26, 28]. Indeed, in our model cell line, p53 knockdown resulted in decreased levels of MDM2 and p21 showing that p53 can efficiently regulate the expression of its target genes in our human model cell line. Therefore, this cell line represents a good model to study the impact of genistein on p53 activity. This HIESC cell line has also been validated previously as a good *in vitro* model to study the decidualization process [5] and in our hands also, a standard combination of cAMP and MPA was found to increase the levels of decidualization markers FoxO1 and secreted prolactin, and to shifted cellular morphology from fibroblastic cells to larger, ovoid cells [6].

Decidualization is known to induce cell cycle arrest in ESCs; in accordance, MTT assay has revealed a decrease of HIESC growth/viability upon *in vitro* induction of decidualization. This effect could be observed as rapidly as 24h after decidualization stimulus, whereas in previous studies it was documented to start only at day 2 of decidualization [29]. We have monitored the expression of cyclin B1: this protein plays a key role in human endometrial cell cycle inhibition by progesterone [30] and has been shown to be upregulated at the time of G2/M transition [31]. We found that Cyclin B1 levels were not modulated in HIESCs during the decidualization process: cell growth/viability reduction in HIESCs upon induction of decidualization could therefore be associated with cell cycle arrest at G2/M stage. P53 has been shown to regulate G2/M transition [23] and we have investigated its regulation in ESCs during decidualization. Our results showed increased p53 expression; this effect may be cAMP-dependent, as described in other cell types in response to cAMP-inducing oestrogen [20].

A previous study had reported that p53 is upregulated from day 6 of decidualization in human ESCs [20], but earlier regulation of p53 had not been investigated. Here, we found that p53 protein is upregulated as early as day 3 of

decidualization in human ESCs. Since the accumulation of p53 protein during decidualization preceded the increased of p53 transcript levels, p53 regulation of expression probably occurs only in part through transcriptional mechanisms. To our knowledge, such quantitative measurement of p53 mRNA levels throughout in vitro decidualization has never been carried out before. We further observed that p53 protein can be found in the nucleus at the time of decidualization, similar to a previous report [20]. It is important to consider, however, the absence of any evidence suggesting that import of p53 to the nucleus was accompanied by increased expression of its target genes (at least, with regards to p21 and MDM2). To the contrary, MDM2 gene expression was decreased. This suggests that p53 protein would not adopt an active conformational state in HIESCs during decidualization [8], despite the increase in ser15-phosphorylation and lys382-acetylation of the protein, which are usually associated with activation of the protein (reviewed in [25]). Other post translational modifications which are known to regulate p53 stability and activity need to be evaluated during decidualization of ESCs, to obtain a more complete understanding of post-translational regulation of p53 protein in this context.

In our experimental model, decidualization was thus accompanied by decreased p21 protein content. Reduction of p21 content is associated with induction of G2/M arrest and induction of endoreduplication [32, 33]; this may provide the first evidence of a new role for p21 in ESCs at the time of decidualization, namely, regulation of cell cycle arrest at G2/M. This could be a prerequisite for subsequent differentiation of ESCs into decidual cells. The mechanisms underlying p21 decrease during decidualization still remain to be elucidated. Since p21 mRNA levels are not diminished during decidualization, downregulation of p21 content in these conditions would involve post-translational mechanisms. MDM2 has been shown to promote p21 degradation by facilitating binding of p21 with the proteasomal C8 subunit [34]; however, MDM2 protein levels remain stable during decidualization suggesting that p21 downregulation is MDM2-independent. SCF^{Skp2} is a better candidate as it was shown to ubiquitinate and to induce proteasomal degradation of p21 [35].

The apparent inactivation of p53 in genistein-treated decidualizing cells may be necessary for p21 content to be reduced and cells to arrest at G2/M before differentiation. Furthermore, p53 expression and/or activity is associated with growth suppression and apoptosis induction in ESCs [36] and with reduced expression of a differentiation marker, prolactin [37]. Therefore, the inactivation of p53 that is highlighted here may be primordial for successful decidualization, by preventing p53 from exerting a pro-apoptotic role in addition to allowing p21 content decrease and endoreduplication.

In resting HIESCs, genistein was found to increase cell proliferation, as previously reported in other cell lines [38]. During decidualization, genistein had a similar impact and modestly counteracted the decrease of cell growth/viability that is induced by decidualization stimulus. However, exposure to genistein did not modulate decidualization-induced prolactin and FOXO1 gene expression, strongly suggesting that genistein does not alter global extent of decidualization of HIESCs. Accompanying this absence of change of decidualization markers levels, genistein only influenced decidualization-induced upregulation of p53 protein content at the 6th day of decidualization, and there was no modulation of decidualization-induced MDM2 and p21 protein content, even after 6 days of decidualization. These observations add support to a role for p53 early in the decidualization process. Finally, it should be considered that we used only one concentration of genistein for the present study (10 μ M; lower concentration had no impact on p53 expression and higher concentrations had no significantly higher impact on p53 content (Supplementary Figure 2)). Nonetheless, the effects of phytoestrogens vary with dose and time [39-42] and thus, a range of concentrations of genistein may need to be tested before concluding with certainty that exposure to genistein does not alter the early events of decidualization, *in vitro*.

In conclusion, we report here that decidualization of ESCs occurs more rapidly than previously thought. Indeed, the putative arrest of cell cycle at G2/M, that is described to precede cellular differentiation (reviewed in [43]), can be observed after

only one day following the induction of decidualization. In addition, decidualization markers are upregulated 3 days following the decidualization stimulus, whereas it has been previously shown to only occur after 6 days in other experimental models [20]. We also show that p53 protein content is increased as early as three days of decidualization. Although in this context p53 protein was found to be the site of post-translational modifications typically associated with activation of the protein, the expression of its target genes was not modulated, strongly suggesting that decidualization-induced p53 protein is not active. It has indeed previously been shown that serine 15-phosphorylated p53 can accumulate in cell nucleus and nonetheless be unable to activate its target genes [44]. Inactivation of p53 may be necessary for p21 levels to be reduced and cells arrest to G2/M before differentiation, and also to prevent the cells from entering apoptosis. Finally, we provide evidence that during decidualization, exposure to genistein has a late impact on p53 expression and does not influence the early events of decidualization. This adds to a role of p53 in the early events of the decidualization process. We are currently investigating the impact of exposure to genistein in vivo in the rat, on p53 pathway, decidualization extent and fertility rate.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Mr Kevin Brasseur, for technical advice regarding q-PCR and Dr Carole Lavoie for assistance with statistical analysis. This study was funded by NSERC. J Dion was holder of a RQR fellowship.

REFERENCES

1. Chandra, A., C.E. Copen, and E.H. Stephen, Infertility and Impaired Fecundity in the United States, 1982–2010: Data From the National Survey of Family Growth National Health Statistics Reports, 2013. 67: p. 1-18.
2. Kuramoto, G., et al., Preventive effect of oral mucosal epithelial cell sheets on intrauterine adhesions. *Hum Reprod*, 2015. 30(2): p. 406-16.
3. Aitken, R.J., Age, the environment and our reproductive future: bonking baby boomers and the future of sex. *Reproduction*, 2014. 147(2): p. S1-S11.
4. Niklaus, A.L., et al., Assessment of the proliferative status of epithelial cell types in the endometrium of young and menopausal transition women. *Hum Reprod*, 2007. 22(6): p. 1778-88.
5. Chapdelaine, P., et al., Decidualization and maintenance of a functional prostaglandin system in human endometrial cell lines following transformation with SV40 large T antigen. *Mol Hum Reprod*, 2006. 12(5): p. 309-19.
6. Cha, J., X. Sun, and S.K. Dey, Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy. *Nat Med*, 2012. 18(12): p. 1754-67.
7. Bosens, J.J., N. Hayashi, and J.O. White, Progesterone Receptor Regulates Decidual Prolactin Expression in Differentiating Human Endometrial Stromal Cells. *Endocrinology*, 1999. 140(10): p. 4809-4820.
8. Logan, P.C., et al., Cell cycle regulation of human endometrial stromal cells during decidualization. *Reprod Sci*, 2012. 19(8): p. 883-94.
9. Tan, J., et al., Evidence for coordinated interaction of cyclin D3 with p21 and cdk6 in directing the development of uterine stromal cell decidualization and polyploidy during implantation. *Mechanisms of development*, 2002. 111(1): p. 99-113.
10. Kajihara, T., et al., Differential expression of FOXO1 and FOXO3a confers resistance to oxidative cell death upon endometrial decidualization. *Molecular Endocrinology*, 2006. 20(10): p. 2444-2455.
11. Ormandy, C.J., et al., Null mutation of the prolactin receptor gene produces multiple reproductive defects in the mouse. *Genes & development*, 1997. 11(2): p. 167-178.

12. Cederroth, C.R., C. Zimmermann, and S. Nef, Soy, phytoestrogens and their impact on reproductive health. *Mol Cell Endocrinol*, 2012. 355(2): p. 192-200.
13. Sampey, B.P., et al., Genistein effects on stromal cells determines epithelial proliferation in endometrial co-cultures. *Exp Mol Pathol*, 2011. 90(3): p. 257-63.
14. Cederroth, C.R. and S. Nef, Soy, phytoestrogens and metabolism: A review. *Mol Cell Endocrinol*, 2009. 304(1-2): p. 30-42.
15. Rahal, O.M. and R.C. Simmen, PTEN and p53 cross-regulation induced by soy isoflavone genistein promotes mammary epithelial cell cycle arrest and lobuloalveolar differentiation. *Carcinogenesis*, 2010. 31(8): p. 1491-500.
16. Hu, W., et al., p53: a new player in reproduction. *Cell Cycle*, 2008. 7(7): p. 848-52.
17. Hu, W., et al., A single nucleotide polymorphism in the MDM2 gene disrupts the oscillation of p53 and MDM2 levels in cells. *Cancer Res*, 2007. 67(6): p. 2757-65.
18. Hirota, Y., et al., Uterine-specific p53 deficiency confers premature uterine senescence and promotes preterm birth in mice. *J Clin Invest*, 2010. 120(3): p. 803-15.
19. Feng, Z., et al., Regulation of female reproduction by p53 and its family members. *FASEB J*, 2011. 25(7): p. 2245-55.
20. Pohnke, Y., et al., Wild-type p53 protein is up-regulated upon cyclic adenosine monophosphate-induced differentiation of human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004. 89(10): p. 5233-44.
21. Soloveva, V. and D.I. Linzer, Differentiation of placental trophoblast giant cells requires downregulation of p53 and Rb. *Placenta*, 2004. 25(1): p. 29-36.
22. Saleh, L., et al., Evaluation of human first trimester decidual and telomerase-transformed endometrial stromal cells as model systems of in vitro decidualization. *Reprod Biol Endocrinol*, 2011. 9: p. 155.
23. Taylor, W.R. and G.R. Stark, Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene*, 2001. 20(15): p. 1803-1815.

24. Nair, J.S., A.L. Ho, and G.K. Schwartz, The induction of polyploidy or apoptosis by the Aurora A kinase inhibitor MK8745 is p53-dependent. *Cell Cycle*, 2012. 11(4): p. 807-817.
25. Kruse, J.P. and W. Gu, Modes of p53 regulation. *Cell*, 2009. 137(4): p. 609-22.
26. Patil, P.B., et al., Phenotypic and in vivo functional characterization of immortalized human fetal liver cells. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 2014. 49(6): p. 705-714.
27. Sheppard, H.M., et al., New insights into the mechanism of inhibition of p53 by simian virus 40 large T antigen. *Mol Cell Biol*, 1999. 19(4): p. 2746-53.
28. Markovics, J.A., et al., Intestinal dysplasia induced by simian virus 40 T antigen is independent of p53. *J Virol*, 2005. 79(12): p. 7492-502.
29. Xie, Y., D. Cui, and Y. Kong, FoxM1 influences embryo implantation and is regulated by 17 beta-estradiol and progesterone in mouse uteri and endometrium cells. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014. 7(10): p. 6585-95.
30. Tang, L., et al., Involvement of cyclin B1 in progesterone-mediated cell growth inhibition, G2/M cell cycle arrest, and apoptosis in human endometrial cell. *Reprod Biol Endocrinol*, 2009. 7(1): p. 144.
31. Seo, H., et al., Cyclin G1 overcomes radiation-induced G2 arrest and increases cell death through transcriptional activation of cyclin B1. *Cell Death & Differentiation*, 2006. 13(9): p. 1475-1484.
32. Stewart, Z.A., S.D. Leach, and J.A. Pietsenpol, p21Waf1/Cip1 inhibition of cyclin E/Cdk2 activity prevents endoreduplication after mitotic spindle disruption. *Molecular and cellular biology*, 1999. 19(1): p. 205-215.
33. Gizatullin, F., et al., The Aurora kinase inhibitor VX-680 induces endoreduplication and apoptosis preferentially in cells with compromised p53-dependent postmitotic checkpoint function. *Cancer Research*, 2006. 66(15): p. 7668-7677.
34. Zhang, Z., et al., MDM2 is a negative regulator of p21WAF1/CIP1, independent of p53. *Journal of Biological Chemistry*, 2004. 279(16): p. 16000-16006.
35. Wang, W., et al., Ubiquitination of p21Cip1/WAF1 by SCFSkp2: substrate requirement and ubiquitination site selection. *Biochemistry*, 2005. 44(44): p. 14553-14564.

36. Xia, H.-F., et al., Implantation-associated gene-1 (Iag-1): a novel gene involved in the early process of embryonic implantation in rat. *Human reproduction*, 2008. 23(7): p. 1581-1593.
37. Schneider-Merck, T., et al., Physical interaction and mutual transrepression between CCAAT/enhancer-binding protein β and the p53 tumor suppressor. *Journal of Biological Chemistry*, 2006. 281(1): p. 269-278.
38. Gaete, L., et al., Daidzein-estrogen interaction in the rat uterus and its effect on human breast cancer cell growth. *J Med Food*, 2012. 15(12): p. 1081-90.
39. Amin, A.R., et al., Evasion of anti-growth signaling: A key step in tumorigenesis and potential target for treatment and prophylaxis by natural compounds. *Semin Cancer Biol*, 2015.
40. Chan, W.H., Impact of genistein on maturation of mouse oocytes, fertilization, and fetal development. *Reprod Toxicol*, 2009. 28(1): p. 52-8.
41. Jefferson, W.N., et al., Oral exposure to genistin, the glycosylated form of genistein, during neonatal life adversely affects the female reproductive system. *Environmental health perspectives*, 2009: p. 1883-1889.
42. Kayisli, U.A., et al., Estrogenicity of isoflavones on human endometrial stromal and glandular cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002. 87(12): p. 5539-44.
43. Das, S.K., Cell cycle regulatory control for uterine stromal cell decidualization in implantation. *Reproduction*, 2009. 137(6): p. 889-899.
44. Arva, N.C., et al., A chromatin-associated and transcriptionally inactive p53-MDM2 complex occurs in mdm2 SNP309 homozygous cells. *Journal of Biological Chemistry*, 2005. 280(29): p. 26776-26787.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: *Induction of in vitro decidualization in HIESC.* HIESC were induced to decidualize *in vitro* upon treatment with a mixture of 1 μ M of cAMP and 0.5 μ M of MPA (cAMP + MPA), for the indicated periods of time. Control cells received vehicle only (CTL). A) Phase contrast pictures were taken (magnification: 400X). B) Secreted prolactin was measured in conditioned medium, by EIA. C) FoxO1 protein levels were measured by western blot. D) Cell growth/viability was assessed using MTT assay. E) Cyclin B1 protein levels were measured as a marker of cell cycle (G2 phase), using Western blot. All values are mean \pm standard deviation; in the case of western blots, β -actin was used as a control to normalize for protein content and representative blots are shown for six independent experiments.

Figure 2: *Regulation of p53 expression in activity during decidualization of HIESCs.* HIESC were treated without (CTL) or with 1 μ M of cAMP and 0.5 μ M of MPA for the indicated time periods. A) p53 mRNA levels were measured using qRT-PCR. GAPDH was used as a control to normalize for total mRNA content. B) p53 protein levels were measured using western blots. β -actin was used as a loading control to normalize for protein content. D) p21 and MDM2 mRNA levels were measured using qRT-PCR. GAPDH was used as a control to normalize for total mRNA content. E) p21 and MDM2 protein levels were measured using western blots. β -actin was used as a loading control to normalize for protein content. In each panel, data are mean \pm standard deviation of three independent experiments and bands shown are representative of three independent experiments.

Figure 3: *Regulation of p53 expression, cellular viability and survival/apoptosis by genistein in HIESCs.* Cells were treated without or with 10 μ M of genistein for the indicated time periods. A) Cell growth/viability was assessed using MTT assay. B) Cyclin B1 protein levels were measured as a marker of cell cycle (G2 phase), using Western blot. β -actin was used as a loading control to normalize for protein content. C) Apoptotic index was calculated using Hoechst staining. D) The ratio of cleaved PARP fragment to total PARP protein levels was determined using western blot. β -actin was used as a loading control to normalize for protein content. E) p53 mRNA levels were measured using qRT-PCR. TBP was used as a control to normalize for total mRNA content. F) p53 protein levels were measured using western blot. β -actin was used as a loading control to normalize for protein content. G) Distribution of p53 protein content between cytosol and nucleus was assessed using nuclear-cytoplasmic fractionation. B tubulin was used as a control to normalize for total protein content in the cytosol, and PARP was used as a control to

normalize for total protein content in the nucleus. In each panel, data are mean \pm standard deviation of three independent experiments and bands shown are representative of three independent experiments.

Figure 4: *Genistein induces post-translational modifications on p53 protein without impact on p53 target gene expression in HIESCs.* Cells were treated without or with 10 μ M of genistein for the indicated time periods. A) Ser-15 phosphorylation and lys382 acetylation of p53 protein were measured using Western blot. B) p53 target genes (p21 and MDM2) mRNA was measured using qRT-PCR. C) P21 and MDM2 protein levels were measured using western blot. In all western blot experiments, β -actin was used as a control to normalize for protein content and in all qRT-PCR experiments, GAPDH was used as a control to normalized for cDNA content. In all panels, data are mean \pm standard deviation of three independent experiments.

Figure 5: *Genistein does not influence the early steps of decidualization in HIESCs.* HIESC were treated without (CTL) or with 10 μ M genistein for 24h as a pre-treatment, and without (CTL) or with 1 μ M of cAMP and 0.5 μ M of MPA for the indicated treatment periods. A) Growth/viability of HIESCs was measured using MTT assay. B) Prolactin mRNA levels were measured using qRT-PCR. TBP was used as a control to normalize for total mRNA content. C) FOXO1 protein levels were measured using western blot. D) P53 protein levels were measured using western blot. E) Ser15 phosphorylation and lys382-acetylation of p53 protein were measured using Western blot. F) p53 protein levels were measured using western blot. All values are mean \pm standard deviation; in all western blots, β -actin was used as a control to normalize for protein content and representative blots are shown for three independent experiments.

Table 1: Primers used for RT-PCR

Primer Name	Orientation	Primer Sequence	Product Size (bp)
Prolactin	Forward	AAA GGA TCG CCA TGG AAA G	60
	Reverse	GCA CAG GAG CAG GTT TGA	
p53	Forward	CCC AGC CAA AGA AGA AAC CA	102
	Reverse	GTT CCA AGG CCT CAT TCA GCT	
p21	Forward	CCT CAT CCC GTG TTC TCC TTT	97
	Reverse	GTA CCA CCC AGC GGA CAA GT	
Cyclin B1	Forward	CAG TCA GAC GCA AAA TAC CTA CTG GGT	185
	Reverse	ACA CCA ACC AGC TGC AGC ATC TTC TT	
MDM2	Forward	CCC AAG ACA AAG AAG AGA GTG TGG	174
	Reverse	CTG GGC AGG GCT TAT TCC TTT TCT	
TBP	Forward	AGA CCA TTG CAC TTC GTG CC	145
	Reverse	TGT TCT TCA CTC TTG GCT CCT	

Figure 1 Tremblay et al.

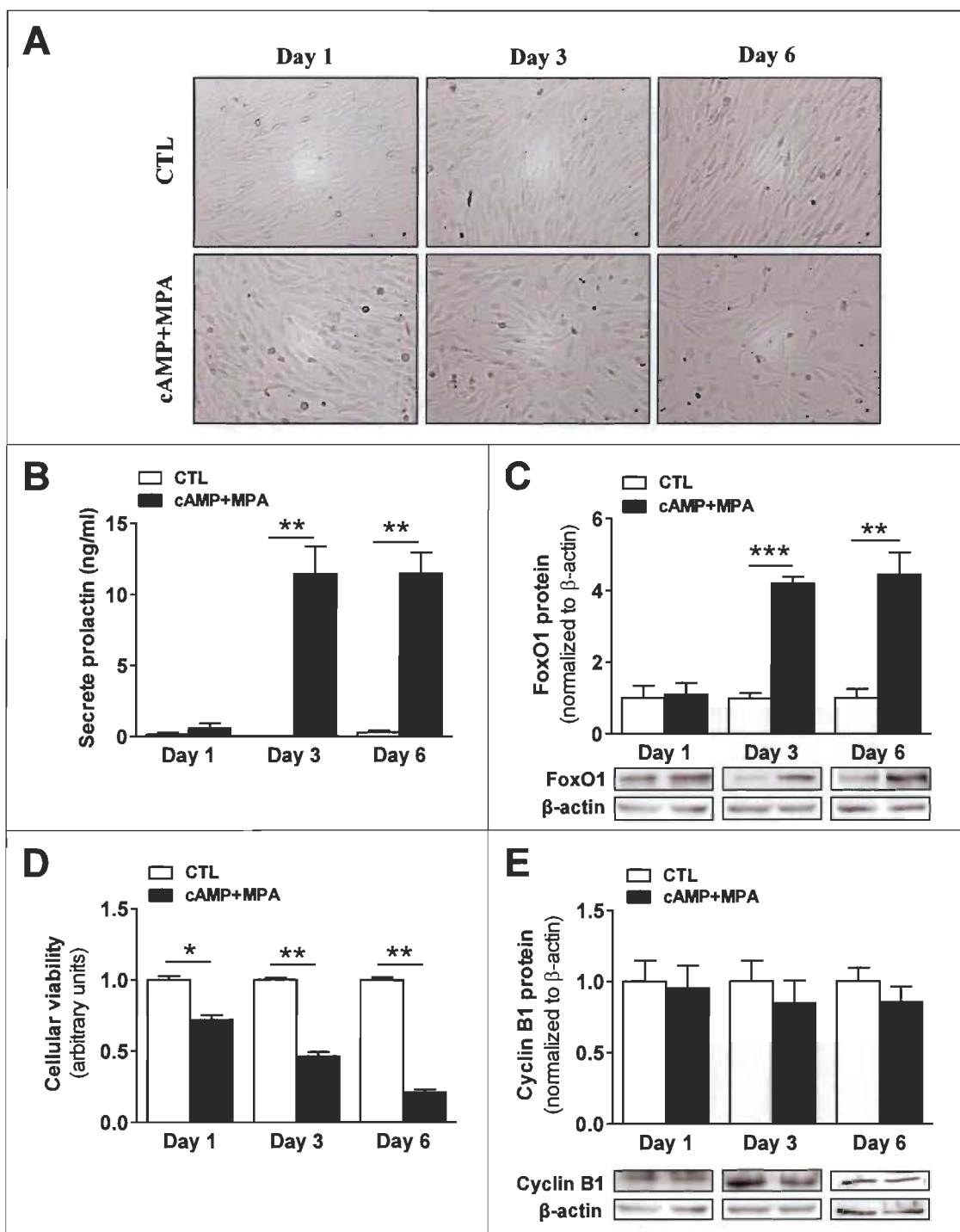


Figure 2 Tremblay et al.

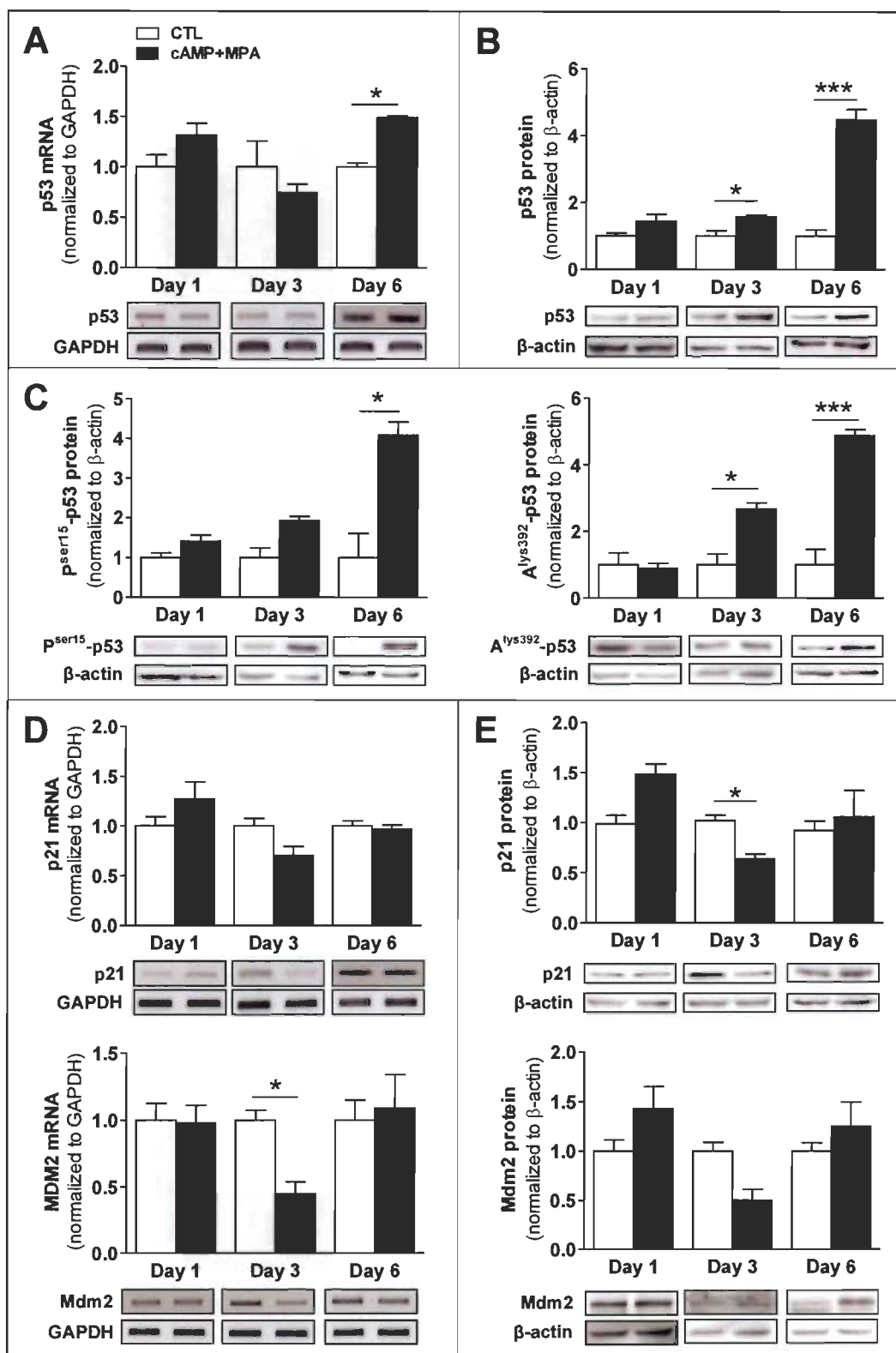


Figure 3 Tremblay et al.

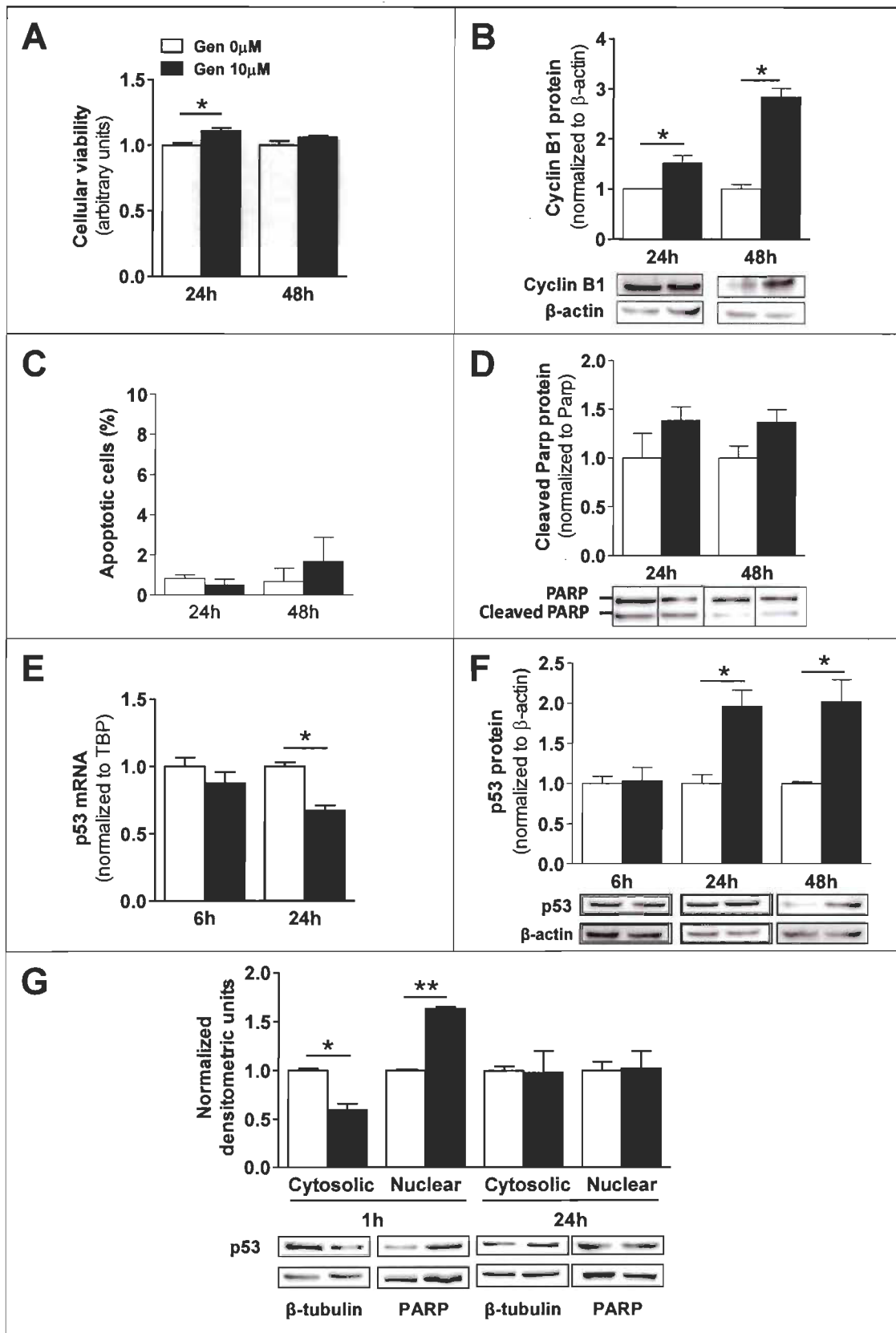


Figure 4 Tremblay et al.

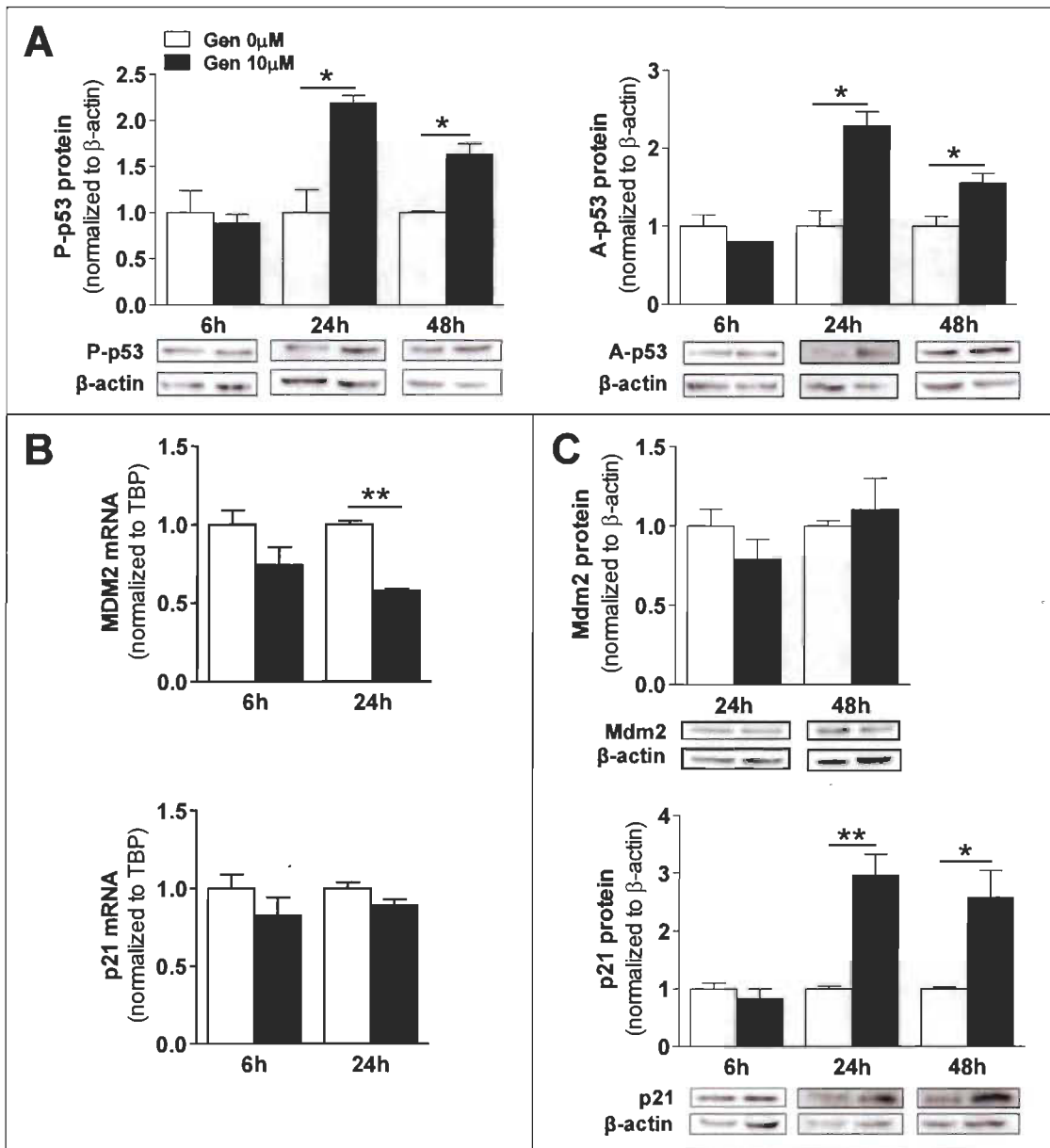
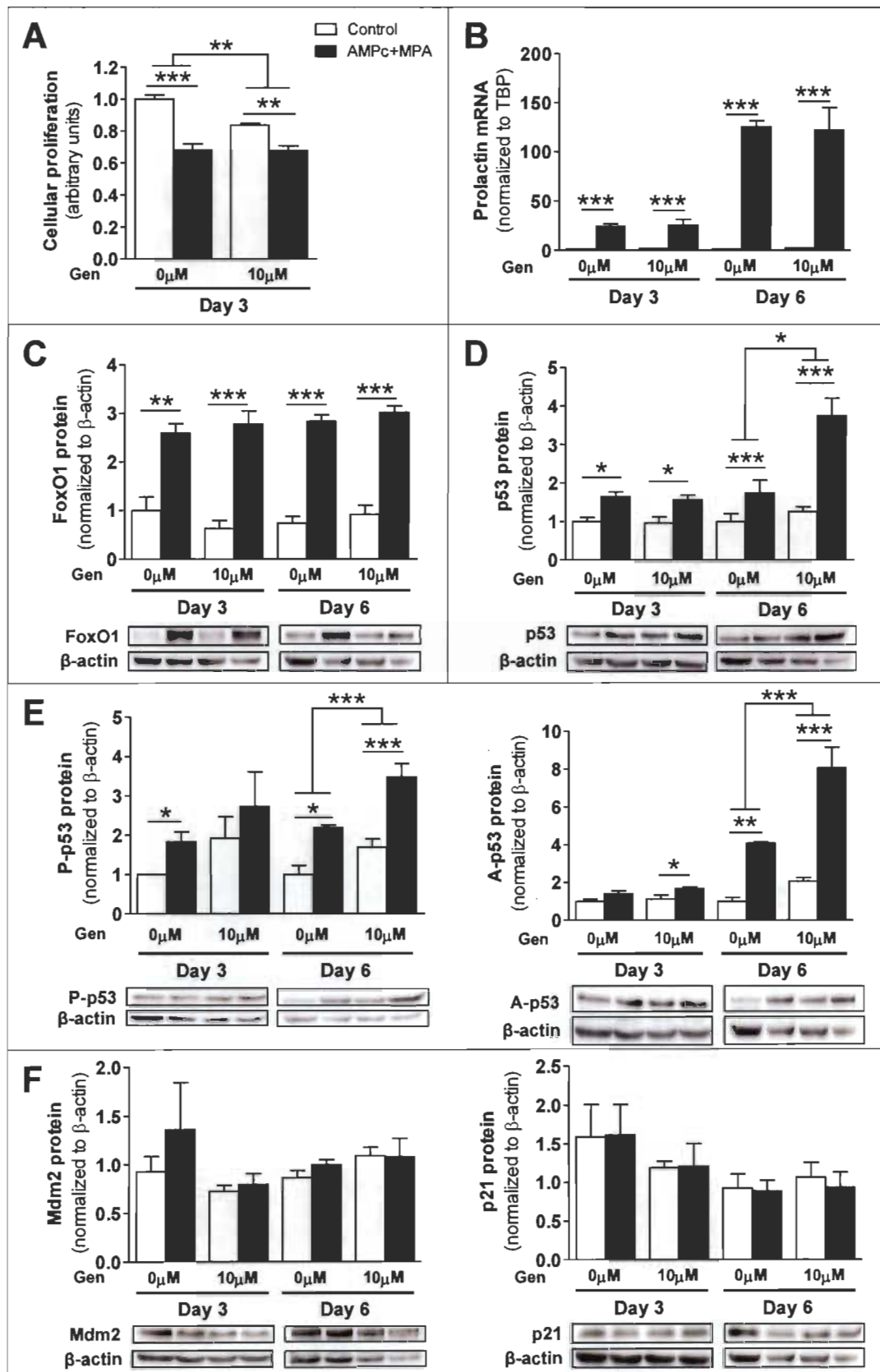


Figure 5 Tremblay et al.

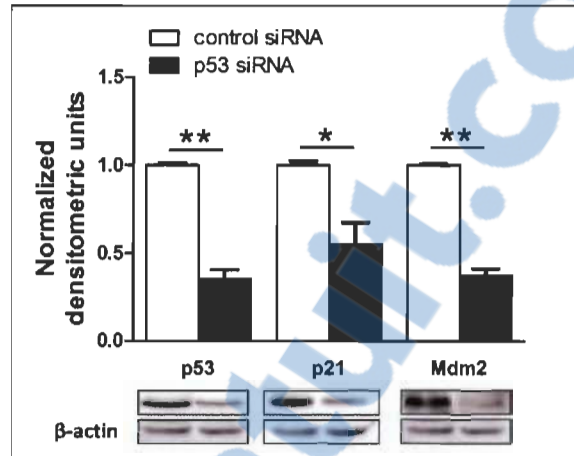


SUPPLEMENTARY DATA**LEGEND TO SUPPLEMENTARY FIGURES**

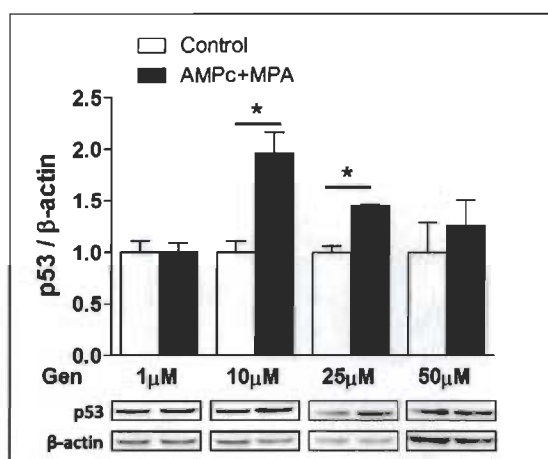
- Figure S1** *p53 is able to regulate its target genes in HIESCs.* Cells were transfected with p53 or control siRNAs for 24h and protein levels of two target genes, p21 and MDM2, were measured 48h post transfection using western blot. β -actin was used as a loading control to correct for total protein content. Results are mean \pm SD of three independent experiments and blots shown are representative of these three experiments.
- Figure S2** *Impact of genistein on p53 protein content in HIESCs.* Cells were treated with increasing concentrations of genistein as indicated, for 24h and protein levels of p53, p21 and MDM2, were measured using western blot. β -actin was used as a loading control to correct for total protein content. Results are mean \pm SD of three independent experiments and blots shown are representative of these three experiments.

SUPPLEMENTARY FIGURES

Suppl. Figure 1. Trembly et al.



Suppl. Figure 2. Tremblay et al.



CHAPITRE III

CONCLUSION

3.1 Régulation de p53 dans le contexte de la décidualisation

La décidualisation est un processus biologique essentiel à la fertilité féminine, mais les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents sont encore mal compris. Un concept émerge que p53 jouerait un rôle physiologique dans l'endomètre utérin et de nombreuses études, recourant à des modèles variés, soulignent que la protéine p53 s'accumule dans le stroma utérin en préparation pour la gestation et que sa présence serait importante pour la complétion de la décidualisation et le maintien de la grossesse [4, 32, 57, 113-115]. Cependant, ces études n'ont pas permis de déterminer quels sont les mécanismes cellulaires et moléculaires qui régissent l'accumulation de la protéine, comment est régulée son activité dans l'endomètre pendant la décidualisation et de quelle manière elle influence le cycle cellulaire des CES et leur différenciation vers le phénotype décidual. Par ailleurs, la décidualisation fait l'objet d'une fine régulation hormonale, mais encore très peu d'études ont été réalisées afin de déterminer l'impact de la consommation de molécules phytoestrogéniques telles que la génistéine sur les facteurs clés de la décidualisation. Mes travaux de maîtrise ont permis d'investiguer l'impact de l'exposition à la génistéine sur les toutes premières étapes de la décidualisation et la régulation de p53 dans ce contexte.

Mes travaux de maîtrise se sont conclus par la rédaction d'un article regroupant mes résultats de recherche avec ceux de plusieurs membres, anciens ou actuels, de l'équipe du Dr Van Themsche de l'UQTR. Avant d'amorcer mes travaux, nous avons reproduit et validé le modèle de décidualisation *in vitro* des HIESC, tel qu'établi dans le laboratoire du Dr Michel A. Fortier. Ainsi, en ajoutant de l'AMPc et du MPA, un moyen d'induire la décidualisation fréquemment utilisé [24, 49], nos HIESC adoptaient les

changements morphologiques attendus et nous pouvions observer une hausse caractéristique des marqueurs biochimiques de la décidualisation.

Les cellules que nous utilisons pour modèle, les HIESC, avaient été obtenues par l'immortalisation de cellules endométriales stromales humaines à l'aide de l'antigène large T du virus SV40 [49]. Il a été déjà décrit que lors de ce processus d'immortalisation, l'antigène T pouvait se lier et inhiber des suppresseurs de tumeurs dont p53 et Rb [49, 116]. [49, 116]. p53 lié à l'antigène large T aurait toujours la capacité de se lier au promoteur de ses gènes cibles, mais serait incapable de les transactiver [117]. Cependant, ces événements sont beaucoup mieux caractérisés dans les lignées de cellules murines que dans les lignées humaines. Une étude a été réalisée afin de comparer le mécanisme d'action du SV40 dans les lignées murines et humaines. L'étude conclut que, chez la souris, la liaison de l'antigène large T avec p53 inhibe l'activité de p53. Chez l'humain en revanche, l'antigène large T du virus SV40 se lie à p53, mais lorsque ce dernier se lie au promoteur de ses gènes cibles, l'antigène T se sépare du facteur de transcription et ce dernier demeure capable de transactiver ses gènes cibles [117]. Cette conclusion corrèle avec d'autres études démontrant que p53 est toujours actif et peut induire l'expression de ses gènes cibles dans différentes lignées cellulaires immortalisées à l'aide du SV40 [116, 118]. La figure supplémentaire 1 de notre article en préparation (chapitre II du présent mémoire) montre d'ailleurs que p53 est capable de réguler ses gènes cibles p21 et MDM2 dans notre modèle cellulaire, puisque lorsque son expression est réprimée par la technologie de l'interférence à l'ARN, l'expression de p21 et MDM2 diminue. Afin de dissiper tout doute sur la possibilité que le SV40 inhibe p53 dans notre modèle, il serait pertinent d'exposer les cellules à un stress qui induirait normalement une activité de p53, des rayons UV par exemple, puis de mesurer le niveau d'activité de la protéine : nous nous attendons à ce que dans ce contexte, l'expression de certains gènes cibles, dont p21 soit augmentée.

Le premier objectif de recherche était de caractériser la régulation de la synthèse, de l'expression et de l'activité de p53 dès les premières étapes de la décidualisation. Après initiation de la décidualisation, un arrêt du cycle cellulaire dans les cellules

endométrales stromales est observable [5, 19, 119], et ce, dès le second jour suivant l'induction de la décidualisation [32, 119, 120]. Dans notre modèle expérimental, nous avons effectivement observé une diminution de la croissance/viabilité cellulaire lorsque mesurée par le test MTT. Un premier élément novateur de notre étude est qu'elle démontre que l'arrêt du cycle cellulaire après initiation de la décidualisation peut survenir plus rapidement que précédemment décrit (dès 24 h au lieu de 2-3 jours après l'induction de la décidualisation [32, 119, 120]).

Dans la littérature, on rapporte que l'arrêt initial du cycle cellulaire associé à la décidualisation *in vitro* se produit à la phase G0/G1 et résulterait de l'exposition combinée à l'estrogène et la progestérone ou leurs dérivés [19]. Puis, un peu plus tard, il y aurait un second arrêt du cycle à la phase G2/M, sous l'action de la progestérone ou d'une stimulation alternative par le MPA [19, 120]. Dans notre modèle, l'administration aux HIESC d'AMPc et de MPA induit fort probablement un arrêt du cycle cellulaire à la phase G2/M. En effet, en parallèle avec une diminution de la viabilité/croissance cellulaire, nous pouvions observer une absence de diminution de la quantité de la cycline B1, ce qui est caractéristique de l'arrêt du cycle cellulaire en G2/M [19, 120]. Dans le futur, pour vérifier s'il y a également arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1, nous allons mesurer le niveau d'expression de cycline D1, une protéine impliquée dans la transition à ce point de contrôle [19, 98]. L'analyse du cycle cellulaire par marquage à l'iodure de propidium (PI) et lecture au cytomètre en flux serait une autre alternative permettant de confirmer nos résultats [19]. Il s'agit d'une stratégie expérimentale que nous avons déjà tentée. Cependant, nous n'avons pas réussi à mettre au point les paramètres nous permettant de bien discriminer les phases G0/G1, S et G2/M dans les HIESC. Pour contourner ce problème, nous allons exploiter des connaissances récentes sur la régulation épigénétique du cycle cellulaire en général et mesurer par électrophorèse de type Western la phosphorylation sur sérine 10 de l'histone 3, un nouveau marqueur de la phase M [121].

En parallèle avec l'arrêt du cycle cellulaire, l'initiation de la décidualisation des HIESC *in vitro* était associée avec une diminution de la quantité de la protéine p21.

Le rôle de p21 dans le contrôle des transitions G0/G1 et G2/M est bien établi [19, 95, 96]. Toutefois, il a également été démontré que la baisse du contenu cellulaire en p21 peut être associée à un arrêt du cycle cellulaire en G2/M et à l'induction d'un phénomène d'endoréduplication [95, 122]. Au cours de ce processus, le matériel génétique des cellules est reproduit à de nombreuses reprises sans qu'il n'y ait de division cellulaire (cytokinèse). L'endoréduplication se caractérise donc par une altération du cycle cellulaire résultant en l'apparition de cellules polyploïdes. Dans l'utérus, les cellules déciduales polyploïdes sont identifiables par une augmentation marquée de leur taille ainsi que par la présence d'un ou de plusieurs noyaux en leur sein [96]. Ainsi le cycle cellulaire des CES en décidualisation présente les caractéristiques de l'endoréduplication : une ou plusieurs divisions du noyau cellulaire, sans cytokinèse [123].

La régulation de l'endoréduplication constituerait ainsi un rôle inédit pour p21 dans les HIESC. Parce que l'endoréduplication a été décrite dans des cellules en différenciation [124], le contrôle par p21 de l'endoréduplication des HIESC pourrait être essentiel à leur différenciation et à la bonne complétion de la décidualisation. À cet égard, les mécanismes induisant la baisse de l'expression de p21 au cours de la décidualisation sont primordiaux, mais ils restent à être élucidés. Puisque nous n'avons pas observé de modulation de l'expression génique de p21 dans ce contexte, des événements post-traductionnels sont fort probablement responsables de dicter son contenu intracellulaire. Il a déjà été démontré que MDM2 pouvait induire la dégradation de p21 en facilitant sa liaison avec la sous-unité C8 du protéasome [125]. Cependant, durant la décidualisation, le niveau d'expression de MDM2 reste stable, suggérant que la baisse de l'expression de p21 est indépendante de MDM2. En ce sens, SCF^{Skp2}, une autre protéine apte à ubiquitiner p21 et induire sa dégradation par le protéasome, constituerait un meilleur candidat pour expliquer la diminution de la protéine p21 observée [126].

Il a déjà été rapporté que la quantité du facteur de transcription p53 augmentait dans les cellules endométriales stromales, à partir de six jours après l'induction via

l'ajout d'AMPc et de MPA de la décidualisation *in vitro* [32]. Nous sommes les premiers à montrer que l'accumulation de p53, dans les HIESC, peut survenir aussi rapidement que trois jours suivant l'induction de la décidualisation. Les résultats que nous avons obtenus indiquent par ailleurs que l'accumulation initiale de p53 résulte d'événements post-transcriptionnels. Ceci est une information nouvelle, car aucune autre étude n'avait jusqu'à maintenant examiné la régulation transcriptionnelle de p53 dès la première phase de la décidualisation. Le fait que p53 soit régulée au palier post-transcriptionnel n'est pas si surprenant puisque dans bon nombre d'autres cellules, saines et cancéreuses, de multiples modifications post-traductionnelles permettant de stabiliser la protéine p53 ont été décrites [82, 127-130] et il est maintenant acquis qu'en absence de signaux d'activation, la protéine est rapidement dégradée [83].

Dans notre modèle expérimental de décidualisation, des modifications post-traductionnelles stabilisatrices de la protéine p53 sont en effet observables : il s'agit de la phosphorylation sur sérine 15 et de l'acétylation de la lysine 382 [127, 128, 131]. Il est probable que ces modifications contribuent à l'accumulation de la protéine pendant la décidualisation. Il serait tentant de spéculer également qu'elles augmentent l'activité de p53 sur ses gènes cibles, tel que rapporté ailleurs [82, 132-135]. Toutefois, nous avons observé que la quantité de produits de deux de ses gènes cibles, p21 et MDM2, n'augmentait pas dans les HIESC en décidualisation. Ceci suggère très fortement que bien que p53 soit stabilisée, elle l'est sous une forme inactive. Une hypothèse plausible pour expliquer ces observations serait que p53, dans les premiers jours de la décidualisation, agirait en tant qu'inhibiteur transcriptionnel. Par compétition, il se lierait au promoteur de ses gènes cibles sans en activer la transcription et bloquerait, par encombrement stérique, la liaison d'autres facteurs de transcription et ainsi inhiberait leur synthèse. Ce mode d'action de p53 a déjà été observé dans d'autres processus biologiques [82, 91]. Des expériences supplémentaires devront toutefois être effectuées afin de mieux caractériser cet aspect et une bonne façon de vérifier notre hypothèse serait de procéder à un test classique de gène rapporteur (reporter assay). Ce dernier consiste à transférer des HIESC avec des constructions moléculaires comportant des fragments du promoteur de p53, placés en amont du gène de la luciférase [136, 137].

Ainsi, à la lumière de nos résultats actuels, nous pensons qu'une diminution, ou une absence d'augmentation de la bioluminescence émise par les cellules transfectées sera observée après induction de la décidualisation, ce qui indiquerait que la protéine p53 est inactivée dans les cellules en décidualisation.

En résumé, l'inactivation de p53, et celle de p21 en résultant, pourraient être nécessaires à l'arrêt du cycle cellulaire et à l'induction de l'endoréduplication associés à la différenciation, une étape clé de la décidualisation des CES. Et ceci serait parfaitement compatible avec les observations faites dans les souris knockout utéro-spécifiques pour p53 [4], où il a été démontré que l'absence de p53 engendrait un défaut de décidualisation, une sénescence utérine prématurée et l'interruption plus fréquente de la gestation avant terme. En effet, même si p53 était inactive dans le stroma en décidualisation, sa présence pourrait être nécessaire si, par exemple, elle agit comme compétiteur d'autres facteurs de transcription qui régulent ses gènes cibles dont p21. En effet, l'expression de p21 est régulée par de nombreux autres facteurs de transcription dont p300, Sp1 et Sp3 [138].

3.2 Impact de la génistéine les cellules endométriales stromales

Notre deuxième objectif spécifique était d'investiguer la réponse des HIESC à la génistéine en dehors du contexte de la décidualisation. La génistéine peut lier les récepteurs à l'œstrogène humains [3] et y agir comme un agoniste ou un antagoniste, tout dépendant du ratio des récepteurs ER- α et ER- β présents, du temps de traitement et de la dose utilisée [59-61, 71-75]. À cet égard, nous avons utilisé dans notre modèle une dose de génistéine du même ordre que la concentration plasmatique d'isoflavones mesurable après ingestion d'un repas riche en soya (soit l'ordre du μM) [67, 68, 70, 139]. Des doses de l'ordre du μM sont couramment utilisées pour mesurer l'effet de la génistéine sur divers processus biologiques normaux [140-145]. Puisqu'il a déjà été rapporté que l'exposition à la génistéine induit la prolifération de cultures primaires de cellules endométriales stromales humaines [61], notre hypothèse de départ était que la génistéine pouvait induire la prolifération des HIESC et interférer avec l'arrêt du cycle

cellulaire au moment de l'induction de la décidualisation *in vitro*. Nous avons bel et bien observé une augmentation de la prolifération des HIESC en réponse à la génistéine : non seulement la réponse cellulaire lors du test MTT était-elle significativement augmentée, mais la quantité de la cycline B1 l'était également. Nous avons toutefois noté que l'induction de la prolifération par la génistéine, à la dose de 10 μ M utilisée pour toute l'étude, était transitoire et déjà disparue après 48 h de traitement, même si la quantité de cycline B1, elle, demeurée plus élevée dans les cellules traitées avec la génistéine que dans les cellules contrôles. Ceci suggère que la proportion des cellules au stade G2/M du cycle cellulaire était supérieure après exposition à la génistéine. Ceci pourra également être confirmé par la mesure de la phosphorylation de la sérine 10 de l'histone 3, tel que décrit plus haut.

L'identification des récepteurs à l'estradiol potentiellement activés par la génistéine dans notre modèle expérimental reste à faire. L'hypothèse qui nous paraît la plus plausible est que la génistéine agirait dans un premier temps sur les récepteurs ER- α , puisqu'il s'agit du principal type de récepteur à l'œstrogène présent dans les cellules endométriales stromales en situation normale [146]. Pour vérifier cette hypothèse, nous privilégierions la stratégie suivante : 1) prétraitement des HIESC visant à inhiber ER- α (au palier de l'expression via ARN d'interférence ou technologie d'édition de l'ADN CRISPR-Cas9, ou encore au palier de l'activité via un antagoniste pur du récepteur, le ICI 182780), puis 2) traitement des cellules avec la génistéine tel que déjà réalisé. Une telle approche a déjà été utilisée dans les CES [147] (il est à noter que dans l'étude citée en référence, des contrôles importants ont été omis, dont le traitement à la génistéine seule ainsi que le traitement au ICI 182780 seul, contrôles qui aurait permis de voir si l'inhibition de ER- α empêche la génistéine d'activer le cycle cellulaire des HIESC et/ou d'augmenter leur prolifération).

Nous avons également pu démontrer qu'en parallèle avec l'augmentation de la prolifération cellulaire, la génistéine augmente le contenu protéique de p53 dans les HIESC. Cette augmentation survient après six heures de traitement, ce qui suggère qu'une régulation transcriptionnelle pourrait être impliquée, mais au contraire, la

quantité de l'ARNm de p53 est diminuée en réponse à la génistéine. Ceci indique clairement que l'accumulation de la protéine p53 dans ce contexte s'explique par des événements post-transcriptionnels. À cet égard, nous avons pu observer que la phosphorylation sur sérine 15 et l'acétylation sur lysine 382 de p53 étaient toutes les deux augmentées en réponse à la génistéine et il s'agit de deux modifications post-traductionnelles stabilisatrices [130, 133, 134]. Considérant que très rapidement (1 h) après l'administration de génistéine aux cellules, un enrichissement de la protéine p53 au niveau du noyau cellulaire, au détriment du cytosol, est mesurable, nous nous attendions à ce que p53 soit davantage active et augmente l'expression de ses gènes cibles dans les HIESC en réponse à la génistéine. Toutefois, nous avons observé grâce à la PCR quantitative que dans nos conditions expérimentales, l'expression des gènes p21 et MDM2 n'était pas augmentée, ce qui suggère fortement que bien que p53 soit stabilisée et s'accumule dans le noyau des HIESC en réponse à la génistéine, elle n'est pas plus active sur les promoteurs de ses gènes cibles.

Nous avons débuté l'analyse par électrophorèse de type Western de la phosphorylation de p53 sur d'autres résidus afin de mieux caractériser la régulation post-traductionnelle de la protéine dans les HIESC exposées à la génistéine. Ainsi, nous suivons la phosphorylation des sérines 6, 9, 20, 37 et 392 ainsi que de la thréonine 81. Nos résultats préliminaires obtenus suggèrent que, contrairement à la phosphorylation sur sérine 15 et l'acétylation sur lysine 382, ces autres modifications post-traductionnelles ne sont pas modulées en réponse à la génistéine dans les HIESC. Toutefois, des expériences indépendantes supplémentaires sont requises avant de pouvoir tirer une conclusion à cet égard.

Nous nous interrogeons sur la raison et l'importance de l'augmentation de la protéine p53 sous une forme apparemment inactive dans les HIESC en réponse à la génistéine. Parce que toutes nos expérimentations ont été faites en absence d'estradiol dans le milieu de culture, ainsi que de rouge de phénol dont l'effet agoniste sur les récepteurs à l'estradiol est bien décrit [148], nous croyons qu'il s'impose de déterminer dans un second temps si l'effet de la génistéine dans les HIESC est différent lorsque de

l'œstrogène est également présent. Ceci mimerait davantage les conditions physiologiques prévalant *in vivo*. D'autres études ont effectivement soumis des cellules à un co-traitement de génistéine et d'œstrogène [19, 61]. Plusieurs études font mention d'un effet pro-apoptotique de la génistéine et que cet effet passerait par l'activation de la protéine p53 [72, 73, 110, 149, 150]. Dans les conditions que nous avons utilisées, aucune induction de l'apoptose n'est observée. Conséquemment, il est possible que l'inactivation de p53 soit nécessaire pour prévenir une induction inappropriée de l'apoptose des cellules en décidualisation.

3.3 Impact de la génistéine sur p53 dans le contexte de la décidualisation

Finalement, le troisième objectif spécifique était d'investiguer l'effet de la génistéine sur la régulation de p53 au cours de la décidualisation des HIESC. Tel que décrit plus haut, lorsqu'analysées séparément, autant l'induction de la décidualisation *in vitro* que l'exposition à la génistéine influencent le cycle cellulaire des HIESC. Cependant, leur effet est opposé : l'induction de la décidualisation engendre un arrêt du cycle cellulaire alors que la génistéine active le cycle et la prolifération cellulaires. Nous posons donc comme hypothèse que l'exposition à la génistéine pourrait interférer avec l'arrêt du cycle cellulaire associé à l'induction de la décidualisation. Nous avons donc procédé à l'analyse de l'effet combiné de la génistéine et du stimulus de la décidualisation, sur la prolifération des HIESC. Nos résultats ont montré qu'il demeurait un effet net d'inhibition du cycle cellulaire après induction de la décidualisation. En complément, l'étude des marqueurs de la décidualisation prolactine sécrétée et FoxO1 nous a également montré que la présence de génistéine n'interférait pas avec l'induction du phénotype décidual dans les HIESC.

La génistéine a néanmoins eu un impact, bien que plus tardif, sur la régulation de p53 pendant la décidualisation : ainsi, l'ajout de cette dernière a engendré la régulation à la hausse du contenu intracellulaire de protéine p53 au sixième jour de la décidualisation *in vitro*. De même, la quantité des formes phosphorylées sur sérine 15 et acétylées sur lysine 382 ont été augmentées dans les cellules en décidualisation où était ajoutée la

génistéine. Cependant, tel qu'observé autant dans le contexte de la décidualisation seule, la protéine p53, bien qu'accumulée, semble inactive puisque deux de ses gènes cibles ne sont pas davantage exprimés (p21 et MDM2). Cette conclusion que p53 est inactive pourrait expliquer pourquoi l'exposition à la génistéine n'altère pas l'instauration du phénotype décidual dans les HIESC. Et encore une fois, ceci pourrait permettre de prévenir l'induction de l'apoptose au cours de ce processus de profonde transformation cellulaire.

Cette étude est parmi les premières à investiguer la régulation de p53 dès les toutes premières étapes de la décidualisation des cellules endométriales stromales humaines. De plus, au meilleur de notre connaissance, aucune autre étude n'a été réalisée afin de caractériser l'impact de l'exposition aux phytoestrogènes dans le contexte de la décidualisation.

Bien entendu, une des étapes subséquentes du projet serait de répéter les expériences présentées ici, dans un modèle *in vivo* de décidualisation chez le rongeur. Ceci serait également nécessaire considérant que l'on étudie l'impact d'une molécule dont la source est exogène, via l'alimentation. Plusieurs modèles *in vivo*/voies d'administration sont ainsi à considérer : la grande majorité utilisant le rat plutôt que la souris. Certains fournissent ainsi à des rats une diète riche en génistéine [151], alors que d'autres procèdent par gavage [152]; d'autres leur injectent de la génistéine par voie sous-cutanée [151, 153, 154] ou par voie intrapéritonéale [155]. Le premier modèle nous paraît beaucoup plus adéquat, même s'il est probablement plus coûteux et difficile à contrôler.

L'étude présentée dans le présent mémoire sera bonifiée, puis soumise pour publication. Elle contribuera à accéder à un niveau supérieur de compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires qui sous-tendent la régulation de p53 dans le processus de décidualisation, et l'impact de l'alimentation sur tout ce processus. Il s'agira par ailleurs, de nouvelles données qui seront utiles pour l'identification de nouvelles causes d'infertilité féminine et pour l'élaboration subséquente de traitements.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Chandra, A., C.E. Copen, and E.H. Stephen, *Infertility and Impaired Fecundity in the United States, 1982–2010: Data From the National Survey of Family Growth* National Health Statistics Reports, 2013. **67**: p. 1-18.
2. Aitken, R.J., *Age, the environment and our reproductive future: bonking baby boomers and the future of sex*. *Reproduction*, 2014. **147**(2): p. S1-S11.
3. Cederroth, C.R., C. Zimmermann, and S. Nef, *Soy, phytoestrogens and their impact on reproductive health*. *Mol Cell Endocrinol*, 2012. **355**(2): p. 192-200.
4. Hirota, Y., et al., *Uterine-specific p53 deficiency confers premature uterine senescence and promotes preterm birth in mice*. *J Clin Invest*, 2010. **120**(3): p. 803-15.
5. Cha, J., X. Sun, and S.K. Dey, *Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy*. *Nat Med*, 2012. **18**(12): p. 1754-67.
6. Zhang, H., et al., *Krüppel-like factor 12 is a novel negative regulator of forkhead box O1 expression: a potential role in impaired decidualization*. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2015. **13**(1): p. 1-11.
7. Ramathal, C.Y., et al. *Endometrial decidualization: of mice and men*. in *Seminars in reproductive medicine*. 2010. NIH Public Access.
8. Kajihara, T., J.J. Brosens, and O. Ishihara, *The role of FOXO1 in the decidual transformation of the endometrium and early pregnancy*. *Med Mol Morphol*, 2013. **46**(2): p. 61-8.
9. Horseman, N.D., et al., *Defective mammopoiesis, but normal hematopoiesis, in mice with a targeted disruption of the prolactin gene*. *Embo j*, 1997. **16**(23): p. 6926-35.
10. Ormandy, C.J., et al., *Null mutation of the prolactin receptor gene produces multiple reproductive defects in the mouse*. *Genes & development*, 1997. **11**(2): p. 167-178.
11. Christian, M., et al., *Cyclic AMP-induced forkhead transcription factor, FKHR, cooperates with CCAAT/enhancer-binding protein beta in differentiating human endometrial stromal cells*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(23): p. 20825-32.

12. Takano, M., et al., *Transcriptional cross talk between the forkhead transcription factor forkhead box O1A and the progesterone receptor coordinates cell cycle regulation and differentiation in human endometrial stromal cells*. *Molecular endocrinology*, 2007. **21**(10): p. 2334-2349.
13. Jabbour, H.N. and H. Critchley, *Potential roles of decidual prolactin in early pregnancy*. *Reproduction*, 2001. **121**(2): p. 197-205.
14. Das, R. and B.K. Vonderhaar, *Transduction of prolactin's (PRL) growth signal through both long and short forms of the PRL receptor*. *Molecular Endocrinology*, 1995. **9**(12): p. 1750-1759.
15. Wira, C.R., M. Rodriguez-Garcia, and M.V. Patel, *The role of sex hormones in immune protection of the female reproductive tract*. *Nat Rev Immunol*, 2015. **15**(4): p. 217-30.
16. Dey, S., et al., *Molecular cues to implantation*. *Endocrine reviews*, 2004. **25**(3): p. 341-373.
17. Raghunath, R.S., Z.C. Venables, and G.W. Millington, *The menstrual cycle and the skin*. *Clin Exp Dermatol*, 2015. **40**(2): p. 111-5.
18. Brosens, I. and G. Benagiano, *Menstrual preconditioning for the prevention of major obstetrical syndromes in polycystic ovary syndrome*. *Am J Obstet Gynecol*, 2015. **213**(4): p. 488-93.
19. Logan, P.C., et al., *Cell cycle regulation of human endometrial stromal cells during decidualization*. *Reprod Sci*, 2012. **19**(8): p. 883-94.
20. Smith, M.S., M. Freeman, and J. Neill, *The Control of Progesterone Secretion During the Estrous Cycle and Early Pseudopregnancy in the Rat: Prolactin, Gonadotropin and Steroid Levels Associated with Rescue of the Corpus Luteum of Pseudopregnancy I 2*. *Endocrinology*, 1975. **96**(1): p. 219-226.
21. Niswender, G.D., *Molecular control of luteal secretion of progesterone*. *Reproduction*, 2002. **123**(3): p. 333-339.
22. Yanushpolsky, E.H., *Luteal phase support in in vitro fertilization*. *Semin Reprod Med*, 2015. **33**(2): p. 118-27.
23. Cloke, B., et al., *The androgen and progesterone receptors regulate distinct gene networks and cellular functions in decidualizing endometrium*. *Endocrinology*, 2008. **149**(9): p. 4462-4474.

24. Gellersen, B. and J. Brosens, *Cyclic AMP and progesterone receptor cross-talk in human endometrium: a decidualizing affair*. Journal of Endocrinology, 2003. **178**(3): p. 357-372.
25. Brosens, J.J., N. Hayashi, and J.O. White, *Progesterone Receptor Regulates Decidual Prolactin Expression in Differentiating Human Endometrial Stromal Cells*. Endocrinology, 1999. **140**(10): p. 4809-4820.
26. Saleh, L., et al., *Evaluation of human first trimester decidual and telomerase-transformed endometrial stromal cells as model systems of in vitro decidualization*. Reprod Biol Endocrinol, 2011. **9**: p. 155.
27. Mulac-Jericevic, B. and O.M. Conneely, *Reproductive tissue selective actions of progesterone receptors*. Reproduction, 2004. **128**(2): p. 139-146.
28. Mylonas, I., et al., *Steroid receptors ER α , ER β , PR-A and PR-B are differentially expressed in normal and atrophic human endometrium*. 2012.
29. Vasquez, Y.M., et al., *FOXO1 is required for binding of PR on IRF4, novel transcriptional regulator of endometrial stromal decidualization*. Molecular Endocrinology, 2015. **29**(3): p. 421-433.
30. Mazur, E.C., et al., *Progesterone receptor transcriptome and cistrome in decidualized human endometrial stromal cells*. Endocrinology, 2015. **156**(6): p. 2239-53.
31. Yu-Lee, L.-Y., *Molecular actions of prolactin in the immune system*. Experimental Biology and Medicine, 1997. **215**(1): p. 35-52.
32. Pohnke, Y., et al., *Wild-type p53 protein is up-regulated upon cyclic adenosine monophosphate-induced differentiation of human endometrial stromal cells*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(10): p. 5233-44.
33. Hapangama, D.K., A.M. Kamal, and J.N. Bulmer, *Estrogen receptor beta: the guardian of the endometrium*. Hum Reprod Update, 2015. **21**(2): p. 174-93.
34. Falck, B., *Site of Production of Oestrogen in Rat Ovary as Studied in Micro-Transplants*. Acta Physiologica Scandinavica, 1960. **47**(4): p. 1-101.
35. Millier, S.G., P.F. Whitelaw, and C.D. Smyth, *Follicular oestrogen synthesis: the 'two-cell, two-gonadotrophin' model revisited*. Molecular and cellular endocrinology, 1994. **100**(1): p. 51-54.

36. McNatty, K.P., *Hormonal correlates of follicular development in the human ovary*. Australian journal of biological sciences, 1981. **34**(3): p. 249-268.
37. Hillier, S.G., et al., *Granulosa cell steroidogenesis before in vitro fertilization*. Biol Reprod, 1984. **31**(4): p. 679-86.
38. Pastore, M., et al., *Estrogen receptor-alpha and 609 estrogen receptor-beta in the uterine vascular endothelium during pregnancy: functional 610 implications for regulating uterine blood flow*. Semin Reprod Med, 2012. **30**(46-61): p. 611.
39. Thomas, M.P. and B.V. Potter, *The structural biology of oestrogen metabolism*. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, 2013. **137**: p. 27-49.
40. Jia, M., K. Dahlman-Wright, and J.-Å. Gustafsson, *Estrogen receptor alpha and beta in health and disease*. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism, 2015. **29**(4): p. 557-568.
41. Mosselman, S., J. Polman, and R. Dijkema, *ERβ: identification and characterization of a novel human estrogen receptor*. FEBS letters, 1996. **392**(1): p. 49-53.
42. Evinger, A.J. and E.R. Levin, *Requirements for estrogen receptor α membrane localization and function*. Steroids, 2005. **70**(5): p. 361-363.
43. Brar, A.K., et al., *Progesterone-dependent decidualization of the human endometrium is mediated by cAMP*. Endocrine, 1997. **6**(2): p. 301-307.
44. Liverman, C.S., et al., *Role of the oestrogen receptors GPR30 and ERα in peripheral sensitization: relevance to trigeminal pain disorders in women*. Cephalalgia, 2009. **29**(7): p. 729-741.
45. Micevych, P., J. Kuo, and A. Christensen, *Physiology of membrane oestrogen receptor signalling in reproduction*. Journal of neuroendocrinology, 2009. **21**(4): p. 249-256.
46. Papaioannou, S., et al., *G-protein signalling pathways and oestrogen: a role of balanced maintenance in osteoblasts*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 1999. **1449**(3): p. 284-292.
47. Prossnitz, E.R., J.B. Arterburn, and L.A. Sklar, *GPR30: AG protein-coupled receptor for estrogen*. Molecular and cellular endocrinology, 2007. **265**: p. 138-142.

48. Telgmann, R. and B. Gellersen, *Marker genes of decidualization: activation of the decidual prolactin gene*. Hum Reprod Update, 1998. **4**(5): p. 472-9.
49. Chapdelaine, P., et al., *Decidualization and maintenance of a functional prostaglandin system in human endometrial cell lines following transformation with SV40 large T antigen*. Mol Hum Reprod, 2006. **12**(5): p. 309-19.
50. Aronica, S.M., W.L. Kraus, and B.S. Katzenellenbogen, *Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1994. **91**(18): p. 8517-8521.
51. Filardo, E.J., et al., *Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis*. Molecular endocrinology, 2002. **16**(1): p. 70-84.
52. Boulware, M.I., et al., *Estradiol activates group I and II metabotropic glutamate receptor signaling, leading to opposing influences on cAMP response element-binding protein*. The Journal of neuroscience, 2005. **25**(20): p. 5066-5078.
53. Irwin, J.C., et al., *Hormonal regulation of human endometrial stromal cells in culture: an in vitro model for decidualization*. Fertility and sterility, 1989. **52**(5): p. 761-768.
54. Ogita, S., *of In Vitro Decidualization in Normal Human Endometrial Stromal Cells*. Osaka city medical journal, 1998. **44**(1): p. 105-115.
55. Grinius, L., et al., *Forkhead transcription factor FOXO1A is critical for induction of human decidualization*. J Endocrinol, 2006. **189**(1): p. 179-87.
56. Leno-Duran, E., et al., *Human decidual stromal cells secrete soluble pro-apoptotic factors during decidualization in a cAMP-dependent manner*. Hum Reprod, 2014. **29**(10): p. 2269-77.
57. Feng, Z., et al., *Regulation of female reproduction by p53 and its family members*. FASEB J, 2011. **25**(7): p. 2245-55.
58. Cederroth, C.R. and S. Nef, *Soy, phytoestrogens and metabolism: A review*. Mol Cell Endocrinol, 2009. **304**(1-2): p. 30-42.

59. Terra, V., et al., *Genistein prevents ultraviolet B radiation-induced nitrosative skin injury and promotes cell proliferation*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2015. **144**: p. 20-27.
60. Sampey, B.P., et al., *Genistein effects on stromal cells determines epithelial proliferation in endometrial co-cultures*. Exp Mol Pathol, 2011. **90**(3): p. 257-63.
61. Kayisli, U.A., et al., *Estrogenicity of isoflavones on human endometrial stromal and glandular cells*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(12): p. 5539-44.
62. Guerrero-Bosagna, C.M. and M.K. Skinner, *Environmental epigenetics and phytoestrogen/phytochemical exposures*. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, 2014. **139**: p. 270-276.
63. Burns, J., et al., *Plant foods and herbal sources of resveratrol*. J Agric Food Chem, 2002. **50**(11): p. 3337-40.
64. Michel, T., M. Halabalaki, and A.-L. Skaltsounis, *New concepts, experimental approaches, and dereplication strategies for the discovery of novel phytoestrogens from natural sources*. Planta Med, 2013. **79**(7): p. 514-532.
65. Patisaul, H.B. and W. Jefferson, *The pros and cons of phytoestrogens*. Frontiers in neuroendocrinology, 2010. **31**(4): p. 400-419.
66. Ganai, A.A. and H. Farooqi, *Bioactivity of genistein: A review of in vitro and in vivo studies*. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2015. **76**: p. 30-38.
67. Adlercreutz, H., H. Markkanen, and S. Watanabe, *Plasma concentrations of phyto-oestrogens in Japanese men*. The Lancet, 1993. **342**(8881): p. 1209-1210.
68. Watanabe, S., et al., *Pharmacokinetics of soybean isoflavones in plasma, urine and feces of men after ingestion of 60 g baked soybean powder (kinako)*. The Journal of nutrition, 1998. **128**(10): p. 1710-1715.
69. Xu, C.K. and S.B. Tang, *Alteration of endometrial receptivity in rats with ovarian hyperstimulation syndrome*. J Obstet Gynaecol, 2014. **34**(2): p. 146-52.
70. King, R.A. and D.B. Bursill, *Plasma and urinary kinetics of the isoflavones daidzein and genistein after a single soy meal in humans*. The American journal of clinical nutrition, 1998. **67**(5): p. 867-872.

71. Lepri, S.R., et al., *The effects of genistein and daidzein on cell proliferation kinetics in HT29 colon cancer cells: the expression of CTNNBIP1 (β -catenin), APC (adenomatous polyposis coli) and BIRC5 (survivin)*. Human cell, 2014. **27**(2): p. 78-84.
72. Wang, H., et al., *Effects of genistein on cell cycle and apoptosis of two murine melanoma cell lines*. Tsinghua Science & Technology, 2007. **12**(4): p. 372-380.
73. Chodon, D., N. Ramamurty, and D. Sakthisekaran, *Preliminary studies on induction of apoptosis by genistein on HepG2 cell line*. Toxicology in vitro, 2007. **21**(5): p. 887-891.
74. Di, X., et al., *A low concentration of genistein induces estrogen receptor-alpha and insulin-like growth factor-I receptor interactions and proliferation in uterine leiomyoma cells*. Hum Reprod, 2008. **23**(8): p. 1873-83.
75. Chen, W.-F. and M.-S. Wong, *Genistein enhances insulin-like growth factor signaling pathway in human breast cancer (MCF-7) cells*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2004. **89**(5): p. 2351-2359.
76. Jefferson, W.N., et al., *Oral exposure to genistin, the glycosylated form of genistein, during neonatal life adversely affects the female reproductive system*. Environmental health perspectives, 2009: p. 1883-1889.
77. Jefferson, W.N., et al., *Neonatal exposure to genistein disrupts ability of female mouse reproductive tract to support preimplantation embryo development and implantation*. Biol Reprod, 2009. **80**(3): p. 425-31.
78. Kaludjerovic, J., J. Chen, and W.E. Ward, *Early life exposure to genistein and daidzein disrupts structural development of reproductive organs in female mice*. J Toxicol Environ Health A, 2012. **75**(11): p. 649-60.
79. Chan, W.H., *Impact of genistein on maturation of mouse oocytes, fertilization, and fetal development*. Reprod Toxicol, 2009. **28**(1): p. 52-8.
80. Isobe, M., et al., *Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13*. 1986.
81. Akdemir, K.C., et al., *Genome-wide profiling reveals stimulus-specific functions of p53 during differentiation and DNA damage of human embryonic stem cells*. Nucleic acids research, 2013: p. gkt866.
82. Kruse, J.P. and W. Gu, *Modes of p53 regulation*. Cell, 2009. **137**(4): p. 609-22.

83. Gellersen, B. and J.J. Brosens, *Cyclic decidualization of the human endometrium in reproductive health and failure*. *Endocr Rev*, 2014. **35**(6): p. 851-905.
84. Purvis, J.E., et al., *p53 dynamics control cell fate*. *Science*, 2012. **336**(6087): p. 1440-1444.
85. Momand, J., et al., *The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation*. *Cell*, 1992. **69**(7): p. 1237-1245.
86. Hu, W., *The role of p53 gene family in reproduction*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2009. **1**(6): p. a001073.
87. Hu, W., et al., *p53: a new player in reproduction*. *Cell Cycle*, 2008. **7**(7): p. 848-52.
88. Dai, C. and W. Gu, *p53 post-translational modification: deregulated in tumorigenesis*. *Trends in molecular medicine*, 2010. **16**(11): p. 528-536.
89. Vaseva, A.V. and U.M. Moll, *Identification of p53 in mitochondria*. *p53 Protocols*, 2013: p. 75-84.
90. Hoshino, A., et al., *Cytosolic p53 inhibits Parkin-mediated mitophagy and promotes mitochondrial dysfunction in the mouse heart*. *Nature communications*, 2013. **4**.
91. Cheng, Q., et al., *Autoactivation of the MDM2 E3 ligase by intramolecular interaction*. *Mol Cell Biol*, 2014. **34**(15): p. 2800-10.
92. Proietti, S., et al., *Melatonin down-regulates MDM2 gene expression and enhances p53 acetylation in MCF-7 cells*. *Journal of pineal research*, 2014. **57**(1): p. 120-129.
93. Brochier, C., et al., *Specific acetylation of p53 by HDAC inhibition prevents DNA damage-induced apoptosis in neurons*. *The Journal of Neuroscience*, 2013. **33**(20): p. 8621-8632.
94. Taylor, W.R. and G.R. Stark, *Regulation of the G2/M transition by p53*. *Oncogene*, 2001. **20**(15): p. 1803-1815.
95. Stewart, Z.A., S.D. Leach, and J.A. Pietsenpol, *p21Waf1/Cip1 inhibition of cyclin E/Cdk2 activity prevents endoreduplication after mitotic spindle disruption*. *Molecular and cellular biology*, 1999. **19**(1): p. 205-215.

96. Tan, J., et al., *Evidence for coordinated interaction of cyclin D3 with p21 and cdk6 in directing the development of uterine stromal cell decidualization and polyploidy during implantation*. *Mechanisms of development*, 2002. **111**(1): p. 99-113.
97. Mullers, E., et al., *Nuclear translocation of Cyclin B1 marks the restriction point for terminal cell cycle exit in G2 phase*. *Cell Cycle*, 2014. **13**(17): p. 2733-43.
98. Baldin, V., et al., *Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1*. *Genes & development*, 1993. **7**(5): p. 812-821.
99. Menendez, S., S. Camus, and J.C.I. Belmonte, *p53: guardian of reprogramming*. *Cell Cycle*, 2010. **9**(19): p. 3887-3891.
100. Hambartsoumian, E., *Endometrial leukemia inhibitory factor (LIF) as a possible cause of unexplained infertility and multiple failures of implantation*. *American journal of reproductive immunology*, 1998. **39**(2): p. 137-143.
101. Piccinni, M.-P., et al., *Defective production of both leukemia inhibitory factor and type 2 T-helper cytokines by decidual T cells in unexplained recurrent abortions*. *Nature medicine*, 1998. **4**(9): p. 1020-1024.
102. Laird, S., et al., *The production of leukaemia inhibitory factor by human endometrium: presence in uterine flushings and production by cells in culture*. *Human Reproduction*, 1997. **12**(3): p. 569-574.
103. Liu, X., et al., *Genistein enhances the radiosensitivity of breast cancer cells via G(2)/M cell cycle arrest and apoptosis*. *Molecules*, 2013. **18**(11): p. 13200-17.
104. Rahal, O.M. and R.C. Simmen, *PTEN and p53 cross-regulation induced by soy isoflavone genistein promotes mammary epithelial cell cycle arrest and lobuloalveolar differentiation*. *Carcinogenesis*, 2010. **31**(8): p. 1491-500.
105. Chen, F.P. and M.H. Chien, *Phytoestrogens induce apoptosis through a mitochondria/caspase pathway in human breast cancer cells*. *Climacteric*, 2014. **17**(4): p. 385-92.
106. Lecce, G., et al., *Presence of Estrogen Receptor β in the Human Endometrium through the Cycle: Expression in Glandular, Stromal, and Vascular Cells 1*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2001. **86**(3): p. 1379-1386.

107. Brandenberger, A.W., et al., *Oestrogen receptor (ER)- α and ER- β isoforms in normal endometrial and endometriosis-derived stromal cells*. Molecular human reproduction, 1999. **5**(7): p. 651-655.
108. Johnson, T.L., et al., *Inhibition of Cell Proliferation and MAP Kinase and Akt Pathways in Oral Squamous cell Carcinoma by Genistein and Biochanin A*. Evid Based Complement Alternat Med, 2010. **7**(3): p. 351-8.
109. Punt, A., et al., *Effect of combining in vitro estrogenicity data with kinetic characteristics of estrogenic compounds on the in vivo predictive value*. Toxicol In Vitro, 2013. **27**(1): p. 44-51.
110. Seo, H.S., et al., *Induction of apoptotic cell death by phytoestrogens by up-regulating the levels of phospho-p53 and p21 in normal and malignant estrogen receptor alpha-negative breast cells*. Nutr Res, 2011. **31**(2): p. 139-46.
111. Ye, R., et al., *The plant isoflavenoid genistein activates p53 and Chk2 in an ATM-dependent manner*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(7): p. 4828-4833.
112. Rauth, S., J. Kichina, and A. Green, *Inhibition of growth and induction of differentiation of metastatic melanoma cells in vitro by genistein: chemosensitivity is regulated by cellular p53*. British journal of cancer, 1997. **75**(11): p. 1559.
113. Hu, W., et al., *p53 regulates maternal reproduction through LIF*. Nature, 2007. **450**(7170): p. 721-724.
114. Levine, A.J., et al., *The p53 family: guardians of maternal reproduction*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. **12**(4): p. 259-65.
115. Kang, H.J., et al., *Single-nucleotide polymorphisms in the p53 pathway regulate fertility in humans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(24): p. 9761-6.
116. Patil, P.B., et al., *Phenotypic and in vivo functional characterization of immortalized human fetal liver cells*. Scandinavian Journal of Gastroenterology, 2014. **49**(6): p. 705-714.
117. Sheppard, H.M., et al., *New insights into the mechanism of inhibition of p53 by simian virus 40 large T antigen*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(4): p. 2746-53.
118. Markovics, J.A., et al., *Intestinal dysplasia induced by simian virus 40 T antigen is independent of p53*. J Virol, 2005. **79**(12): p. 7492-502.

119. Xie, Y., D. Cui, and Y. Kong, *FoxM1 influences embryo implantation and is regulated by 17 beta-estradiol and progesterone in mouse uteri and endometrium cells*. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014. **7**(10): p. 6585-95.
120. Tang, L., et al., *Involvement of cyclin B1 in progesterone-mediated cell growth inhibition, G2/M cell cycle arrest, and apoptosis in human endometrial cell*. *Reprod Biol Endocrinol*, 2009. **7**(1): p. 144.
121. Goto, H., et al., *Identification of a novel phosphorylation site on histone H3 coupled with mitotic chromosome condensation*. *Journal of Biological Chemistry*, 1999. **274**(36): p. 25543-25549.
122. Gizatullin, F., et al., *The Aurora kinase inhibitor VX-680 induces endoreduplication and apoptosis preferentially in cells with compromised p53-dependent postmitotic checkpoint function*. *Cancer Research*, 2006. **66**(15): p.7668-7677.
123. Edgar, B.A. and T.L. Orr-Weaver, *Endoreplication cell cycles: more for less*. *Cell*, 2001. **105**(3): p. 297-306.
124. Ravid, K., et al., *Roads to polyploidy: the megakaryocyte example*. *Journal of cellular physiology*, 2002. **190**(1): p. 7-20.
125. Zhang, Z., et al., *MDM2 is a negative regulator of p21WAF1/CIP1, independent of p53*. *Journal of Biological Chemistry*, 2004. **279**(16): p. 16000-16006.
126. Wang, W., et al., *Ubiquitination of p21Cip1/WAF1 by SCFSkp2: substrate requirement and ubiquitination site selection*. *Biochemistry*, 2005. **44**(44): p. 14553-14564.
127. Xu, Y., *Regulation of p53 responses by post-translational modifications*. *Cell Death & Differentiation*, 2003. **10**(4).
128. Ashcroft, M., Y. Taya, and K.H. Vousden, *Stress signals utilize multiple pathways to stabilize p53*. *Molecular and cellular biology*, 2000. **20**(9): p. 3224-3233.
129. Li, M., et al., *Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53 stabilization*. *Nature*, 2002. **416**(6881): p. 648-653.
130. Lavin, M.a. and N. Gueven, *The complexity of p53 stabilization and activation*. *Cell Death & Differentiation*, 2006. **13**(6): p. 941-950.

131. Appella, E. and C.W. Anderson, *Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses*. European Journal of Biochemistry, 2001. **268**(10): p. 2764-2772.
132. Sakaguchi, K., et al., *DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade*. Genes & development, 1998. **12**(18): p. 2831-2841.
133. Barlev, N.A., et al., *Acetylation of p53 activates transcription through recruitment of coactivators/histone acetyltransferases*. Molecular cell, 2001. **8**(6): p. 1243-1254.
134. Imamura, K., et al., *Cell cycle regulation via p53 phosphorylation by a 5'-AMP activated protein kinase activator, 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside, in a human hepatocellular carcinoma cell line*. Biochemical and biophysical research communications, 2001. **287**(2): p. 562-567.
135. Banin, S., et al., *Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage*. Science, 1998. **281**(5383): p. 1674-1677.
136. Datto, M.B., et al., *Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1995. **92**(12): p. 5545-5549.
137. Wang, F., et al., *microRNA-214 enhances the invasion ability of breast cancer cells by targeting p53*. Int J Mol Med, 2015. **35**(5): p. 1395-402.
138. Xiao, H., T. Hasegawa, and K.-i. Isobe, *p300 collaborates with Sp1 and Sp3 in p21 waf1/cip1 promoter activation induced by histone deacetylase inhibitor*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(2): p. 1371-1376.
139. Xu, X., et al., *I. Daidzein is a more bioavailable soymilk isoflavone than is genistein in adult women*. Human bioavailability and health protective effects of soy isoflavones, 1994: p. 26.
140. Liu, X.J., et al., *Effects of resveratrol and genistein on nuclear factor-kappaB, tumor necrosis factor-alpha and matrix metalloproteinase-9 in patients with chronic obstructive pulmonary disease*. Mol Med Rep, 2016. **13**(5): p. 4266-72.
141. Florio, P., et al., *Transthyretin Binding Heterogeneity and Anti-amyloidogenic Activity of Natural Polyphenols and Their Metabolites*. Journal of Biological Chemistry, 2015. **290**(50): p. 29769-29780.

142. Jia, Z., et al., *Genistein inhibits TNF- α -induced endothelial inflammation through the protein kinase pathway A and improves vascular inflammation in C57BL/6 mice*. International journal of cardiology, 2013. **168**(3): p. 2637-2645.
143. Jefremov, V., et al., *17 β -Oestradiol Stimulation of G-Proteins in Aged and Alzheimer's Human Brain: Comparison with Phytoestrogens*. Journal of neuroendocrinology, 2008. **20**(5): p. 587-596.
144. Kajta, M., et al., *Genistein inhibits glutamate-induced apoptotic processes in primary neuronal cell cultures: An involvement of aryl hydrocarbon receptor and estrogen receptor/glycogen synthase kinase-3 β intracellular signaling pathway*. Neuroscience, 2007. **145**(2): p. 592-604.
145. Liu, D., et al., *Genistein acutely stimulates insulin secretion in pancreatic β -cells through a cAMP-dependent protein kinase pathway*. Diabetes, 2006. **55**(4): p. 1043-1050.
146. Paterni, I., et al., *Estrogen receptors alpha (ER α) and beta (ER β): subtype-selective ligands and clinical potential*. Steroids, 2014. **90**: p. 13-29.
147. Edmunds, K.M., et al., *The effects of dietary phytoestrogens on aromatase activity in human endometrial stromal cells*. Reprod Nutr Dev, 2005. **45**(6): p. 709-20.
148. Rajendran, K., T. Lopez, and I. Parikh, *Estrogenic effect of phenol red in MCF-7 cells is achieved through activation of estrogen receptor by interacting with a site distinct from the steroid binding site*. Biochemical and biophysical research communications, 1987. **142**(3): p. 724-731.
149. Spinozzi, F., et al., *The natural tyrosine kinase inhibitor genistein produces cell cycle arrest and apoptosis in Jurkat T-leukemia cells*. Leukemia research, 1994. **18**(6): p. 431-439.
150. Seo, Y.J., et al., *Apoptotic effects of genistein, biochanin-A and apigenin on LNCaP and PC-3 cells by p21 through transcriptional inhibition of polo-like kinase-1*. J Korean Med Sci, 2011. **26**(11): p. 1489-94.
151. Hertrampf, T., et al., *Comparison of the bone protective effects of an isoflavone-rich diet with dietary and subcutaneous administrations of genistein in ovariectomized rats*. Toxicology letters, 2009. **184**(3): p. 198-203.
152. Lewis, R.W., et al., *The effects of the phytoestrogen genistein on the postnatal development of the rat*. Toxicological Sciences, 2003. **71**(1): p. 74-83.

153. Chinigarzadeh, A., et al., *Genistein-induced fluid accumulation in ovariectomised rats' uteri is associated with increased cystic fibrosis transmembrane regulator expression*. *Clinics*, 2014. **69**(2): p. 111-119.
154. Cotroneo, M.S., W.A. Fritz, and C.A. Lamartiniere, *Dynamic profiling of estrogen receptor and epidermal growth factor signaling in the uteri of genistein- and estrogen-treated rats*. *Food and chemical toxicology*, 2005. **43**(5): p. 637-645.
155. Bitto, A., et al., *Genistein aglycone effect on bone loss is not enhanced by supplemental calcium and vitamin D 3: a dose ranging experimental study*. *Phytomedicine*, 2011. **18**(10): p. 879-886.