

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
AVANT-PROPOS.....	iii
RÉSUMÉ.....	iv
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	x
LISTE DES SYMBOLES.....	xii
CHAPITRE I	
INTRODUCTION.....	1
1.1 Décidualisation	1
1.1.1 La décidualisation survient en seconde phase du cycle menstruel	1
1.1.2 La biologie cellulaire et moléculaire de la décidualisation.....	3
1.1.2.1 Régulation du cycle cellulaire des CSE humaines durant la décidualisation.....	6
1.1.3 Problématique de recherche liée à la décidualisation	7
1.2 p53	8
1.2.1 Historique de la protéine p53.....	8
1.2.2 Biochimie de la protéine p53	8
1.2.2.1 Domaines fonctionnels de p53	8
1.2.3 Rôle général de p53 dans la cellule	9
1.2.4 Régulation de p53	10
1.2.4.1 Régulation négative de l'activité de p53	10
1.2.4.2 Activation de la protéine p53.....	11
1.2.4.3 Régulation de p53 par des modifications post- traductionnelles.....	12
1.2.4.4 Régulation de l'activité transactivatrice de p53	14
1.2.5 Activité de p53 et son rôle de régulation du cycle cellulaire.....	15
1.2.6 Activité de p53 et son rôle dans l'induction de l'apoptose.....	16
1.2.7 Localisation intracellulaire de p53.....	17
1.3 Le rôle potentiel de p53 dans la décidualisation.....	18

1.4	Problématique de recherche.....	20
1.5	Objectifs et hypothèses.....	20
1.6	Modèle cellulaire et approches expérimentales.....	21
CHAPITRE II		
MATÉRIEL ET MÉTHODES		22
2.1	Cellules et réactifs	22
2.2	Procédures expérimentales	23
2.2.1	Décidualisation <i>in vitro</i> des HIESC.....	23
2.2.2	Validation de la décidualisation par le dosage de la prolactine sécrétée.....	23
2.2.3	Inhibition pharmacologique de la voie de la PKA à l'aide du H89.....	23
2.2.4	Validation de la décidualisation par microscopie en contraste de phase	24
2.2.5	Immunobuvardage de type Western (WB).....	24
2.2.6	Évaluation de la localisation intracellulaire de p53 par immunofluorescence.....	25
2.2.7	Analyses statistiques.....	25
CHAPITRE III		
RÉSULTATS.....		26
3.1	Validation de la décidualisation des HIESC.....	26
3.1.1	Changements morphologiques des HIESC décidualisées	26
3.1.2	Sécrétion du marqueur protéique prolactine par les HIESC décidualisées	28
3.2	Accumulation de p53 dans les HIESC au fil de la décidualisation	29
3.3	Implication de la voie de la PKA dans la régulation de p53 durant la décidualisation.....	30
3.3.1	Inhibition de la voie de la PKA dans les HIESC	30
3.3.2	Inhibition de la voie de la PKA dans les HIESC en décidualisation.....	31
3.4	Régulation de p53 par des modifications post-traductionnelles dans les HIESC au fil de la décidualisation	34
3.4.1	Analyse de la variation de la phosphorylation de la sérine 15 de p53....	35
3.4.2	Analyse de la variation de l'acétylation de la lysine 382 de p53.....	36

3.5	Étude de l'activité de p53 à travers l'analyse de gènes cibles pendant la décidualisation	38
3.5.1	Mesure des niveaux de la protéine p21 dans les HIESC	38
3.5.2	Mesure des niveaux de la protéine cycline B1 dans les HIESC	39
3.5.3	Mesure des niveaux de la protéine Cdc2 dans les HIESC	40
3.6	Localisation intracellulaire de p53 au cours de la décidualisation	41
CHAPITRE IV		
DISCUSSION		44
CHAPITRE V		
CONCLUSION.....		52
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		55

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	Le cycle menstruel chez la femme (tirée de Cha et Dey, 2012)	2
1.2	Changement cellulaire de la décidualisation (tirée de Cha et Dey, 2012).....	3
1.3	Les signaux impliqués dans la décidualisation des CSE (tirée de Gellersen et Brosens, 2003)	4
1.4	Cycle cellulaire : Phases et protéines régulatrices (tirée de Logan <i>et al.</i> , 2012)	7
1.5	Représentation schématique de la structure de p53 et ses domaines fonctionnels (tirée de Anzola et Burgos, 2003)	9
1.6	Modèle classique d'activation de p53 (tirée de Kruse et Gu, 2009).....	11
1.7	Aperçu des modifications post-traductionnelles de p53 (tirée de Kruse et Gu, 2009)	12
1.8	Impact des modifications post-traductionnelles sur l'activité de p53 (tirée de Kruse et Gu, 2009)	15
1.9	p53 contrôle l'expression de protéines impliquées dans le cycle cellulaire (tirée de Logan <i>et al.</i> , 2012).....	16
1.10	p53 initie une cascade de signalisation intracellulaire menant à l'apoptose (tirée de Amaral, 2010).....	17
3.1	Changements morphologiques des HIESC induits par le stimulus de décidualisation <i>in vitro</i>	27
3.2	Prolactine sécrétée par les HIESC, mesurée aux jours 1, 3, 6 et 10 de la décidualisation	28
3.3	Expression de p53 dans les HIESC au fil de la décidualisation	29
3.4	Inhibition pharmacologique de la voie de la PKA dans les HIESC	31
3.5	Morphologie des HIESC suite au prétraitement avec H89 suivi de trois jours de décidualisation en présence de H89	32

3.6	Expression de FOXO1 dans les HIESC suite au prétraitement avec H89 suivi de trois jours de décidualisation en présence de H89	33
3.7	Expression de p53 dans les HIESC suite au prétraitement avec H89 suivi de trois jours de décidualisation en présence de H89	34
3.8	Variation de la phosphorylation de la sérine 15 de p53 dans les HIESC aux jours 1, 3, 6 et 10 de la décidualisation.....	36
3.9	Variation de l'acétylation de la lysine 382 de p53 dans les HIESC aux jours 1, 3, 6 et 10 de la décidualisation.....	37
3.10	Variation des niveaux de la protéine p21 dans les HIESC aux jours 1, 3, 6 et 10 de la décidualisation.....	39
3.11	Variation des niveaux de la protéine cycline B1 dans les HIESC aux jours 1, 3, 6 et 10 de la décidualisation.....	40
3.12	Variation des niveaux de la protéine Cdc2 dans les HIESC aux jours 1, 3, 6 et 10 de la décidualisation.....	41
3.13	Photo de la localisation intracellulaire de p53 dans les HIESC aux jours 1, 3, 6 et 10 de la décidualisation.....	43

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

a.a.	Acide aminé
Ac	Acétylation
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
ATM	Ataxia telangiectasia mutated kinase
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein kinase
BAX	BCL-2 associated X protein
BCL-2	B-cell lymphoma 2
Br-AMPC	8-bromo-AMPC
CBP	CREB binding protein
Cdc2	Cell division control protein 2 homolog
ChIP	Immunoprécipitation de la chromatine
Chk1	Checkpoint kinase 1
Chk2	Checkpoint kinase 2
CO ₂	Dioxyde de carbone
CREB	cAMP response element binding
CSE	Cellules stromales endométriales
C-terminal	Carboxy-terminal
DCC	Dextran-coated-charcoal-treated
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EIA	Enzyme immunoassay
FBS	Sérum fœtal bovin
FOXO1	Forkhead box O1
GPCR	Récepteur couplé aux protéines G

HAT	Histone acétyltransférase
HIESC	Cellules endométriales stromales humaines immortalisées
HRP	Peroxydase du raifort
IGFBP-1	Insulin-like growth factor binding protein-1
LH	Hormone lutéinisante
MDM2	Mouse double minute 2
MPA	Acétate de médroxyprogestérone
N-terminal	Amino-terminal
P	Phosphorylation
P ₄	Progestérone
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PKA	Protéine kinase A
PK-ADN	Protéine kinase dépendante de l'ADN
PR-A	Récepteur A de la progestérone
PRL	Prolactine
Rb	Rétinoblastome
RIPA	Radio-Immunoprecipitation Assay
RPMI	Milieu de culture de l'institut Roswell Park
SV40	Virus Simien 40
TAD	Domaine de transactivation de la transcription
Trp53	Transformation related protein 53
WB	Immunobuvardage de type Western

LISTE DES SYMBOLES

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

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Décidualisation

La fonction reproductrice de la femme est caractérisée par le cycle menstruel. Au cours du cycle menstruel, sous l'influence des hormones, l'endomètre utérin subit de profondes modifications qui sont essentielles à la préparation et au maintien de la grossesse. L'une d'elles, la décidualisation, consiste en la différenciation des cellules stromales endométriales (CSE) en cellules déciduales [1]. Au fil de cette transformation, les cellules acquièrent des propriétés essentielles pour pouvoir interagir de manière privilégiée avec un embryon qui s'implanterait dans l'utérus, soutenir son développement en participant à la placentation et permettre le maintien de la grossesse.

1.1.1 La décidualisation survient en seconde phase du cycle menstruel

Le cycle menstruel chez la femme est d'une durée moyenne de 28 jours (Figure 1.1). Celui-ci débute par une première phase, la phase proliférative, où l'œstrogène circulante favorise la prolifération des cellules de l'endomètre. Ensuite, autour du quatorzième jour, l'ovulation est déclenchée suite au pic de l'hormone lutéinisante (LH). Par la suite a lieu la seconde phase du cycle menstruel, appelée phase sécrétoire. Au cours de cette dernière, il y a formation et persistance du corps jaune qui sécrète une hormone stéroïdienne très importante, la progestérone (P₄). Cette hormone est responsable du remodelage utérin, et donc de la décidualisation, qui survient au cours de la phase sécrétoire du cycle menstruel, en vue de préparer l'endomètre à une grossesse. Six jours après l'ovulation, donc au jour 20 du cycle menstruel, l'endomètre devient réceptif et donc, apte à accueillir un embryon. La décidualisation, qui est nécessaire pour soutenir l'embryon qui s'implante, survient entre les jours 23 et 28 du cycle [2], ce qui coïncide avec la période où l'endomètre est réceptif. Cependant, il est à noter que, contrairement à plusieurs espèces, la décidualisation

du stroma endométrial chez l'humain est initiée indépendamment de l'implantation d'un embryon : elle est donc initiée lors de chaque cycle menstruel.

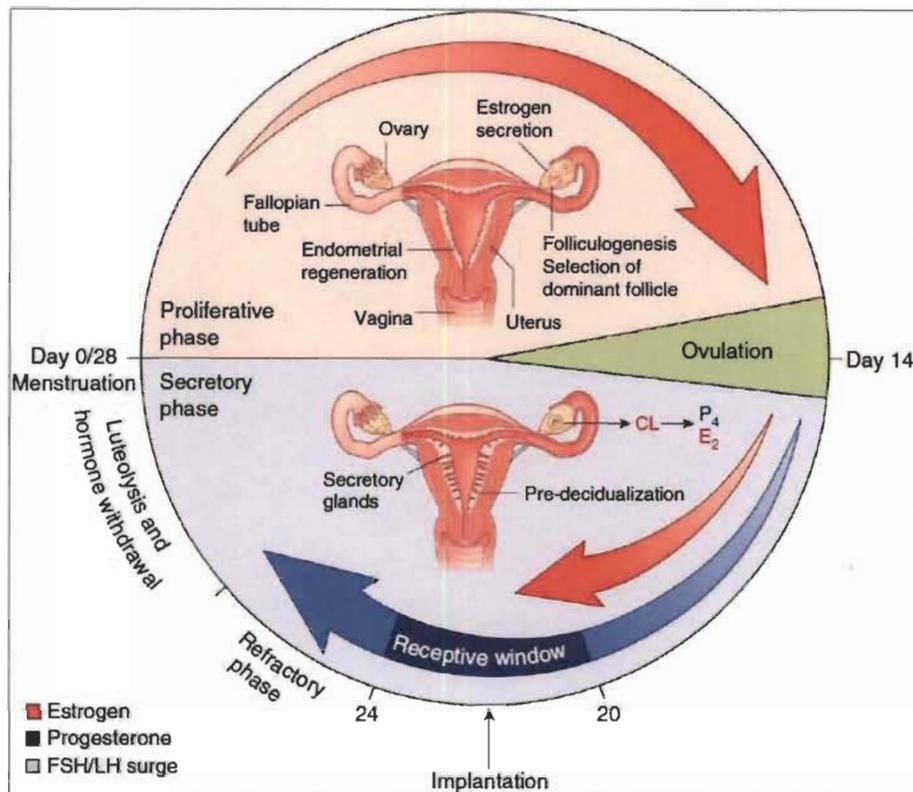


Figure 1.1 Le cycle menstruel chez la femme (tirée de Cha et Dey, 2012).

Le terme décidualisation est dérivé du verbe latin « decidere » qui veut dire « tomber ». Thomas Huxley, un savant biologiste du XIX^e siècle, a suggéré que l'ordre des mammifères devait être divisé en « deciduata » et « adeciduata » selon que la muqueuse utérine se détache ou non lors de la parturition. Chez l'humain, en l'absence de conception, la chute du niveau circulant de P₄ à la fin de la phase sécrétoire du cycle provoque le détachement de la couche superficielle décidualisée de l'endomètre ainsi que les menstruations. À l'inverse, en présence d'un embryon, la réaction déciduale se poursuit et la nouvelle couche déciduale s'étend par conséquent à toute l'épaisseur de l'endomètre jusqu'à atteindre la membrane basale [3].

1.1.2 La biologie cellulaire et moléculaire de la décidualisation

L'endomètre est constitué de plusieurs types de cellules (Figure 1.2). La décidualisation se produit en dessous de la couche de cellules épithéliales, au niveau du stroma. Ce tissu hautement spécialisé est particulièrement riche en cellules et abrite aussi de nombreux vaisseaux sanguins ainsi que des glandes utérines. Sous l'effet de la P₄, ce sont les CSE qui se différencient en cellules déciduales. Cette transformation des CSE est caractérisée par des changements morphologiques et physiologiques. D'une part, au niveau morphologique, les cellules stromales passent d'une forme fibroblastique allongée à une forme plus large et plus ronde. La Figure 1.2 illustre bien ce changement. Il en est ainsi puisque les cellules déciduales se gonflent en raison de l'augmentation de la synthèse de glycogène. D'autre part, au niveau physiologique, les cellules expriment de nouvelles protéines nécessaires pour assumer leur fonction. Aussi, certaines cellules déciduales sont polyploïdes [4]. Cette polyploïdie leur confère de nombreux avantages comme l'augmentation de la synthèse protéique, l'augmentation de l'activité mitochondriale ainsi qu'une plus grande résistance aux dommages à l'ADN et à l'apoptose [5].

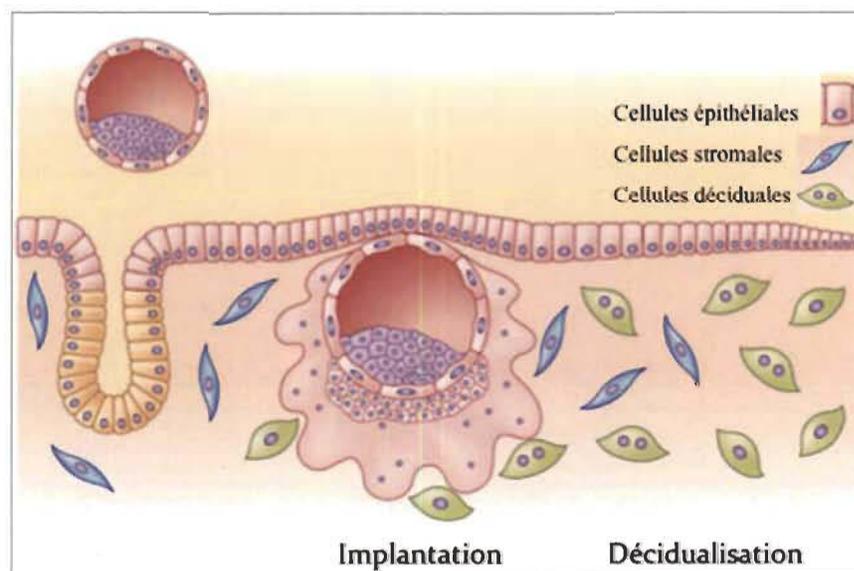


Figure 1.2 Changement cellulaire de la décidualisation (tirée de Cha et Dey, 2012).

Changements morphologiques et physiologiques ainsi que l'interaction adéquate entre l'embryon et l'endomètre qui débute au moment de l'implantation.

D'un point de vue moléculaire, la P_4 et l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) sont impliqués dans la régulation de la décidualisation (Figure 1.3). L'AMPc est responsable d'initier les premiers événements de la réponse déciduale, puis la P_4 permet une réponse plus soutenue. Les taux d'AMPc intracellulaires augmentent suite à la liaison de certaines hormones à un récepteur couplé aux protéines G (GPCR) présent à la surface des CSE [6-8]. Par la suite, l'action rapide de l'AMPc s'effectue via l'activation de la voie de signalisation de la protéine kinase A (PKA), laquelle sensibilise les CSE à l'action de la P_4 . Ainsi, l'AMPc et la P_4 impliquent deux voies de signalisation différentes mais qui convergent pour induire l'expression de gènes spécifiques déciduaux [6, 9-11]. Ces gènes contrôlent certaines fonctions biologiques dont l'arrêt du cycle cellulaire, en plus de favoriser la survie ainsi que la différenciation des cellules [6]. Des acteurs clé, exprimés au fil de la décidualisation, sont utilisés comme marqueurs phénotypiques du processus : il y en plusieurs, dont « Forkhead box O1 » (FOXO1) et la prolactine (PRL) et [10, 12, 13]. Nous abordons plus spécifiquement ceux-ci, puisqu'ils ont fait l'objet d'analyse au cours de nos travaux de recherche.

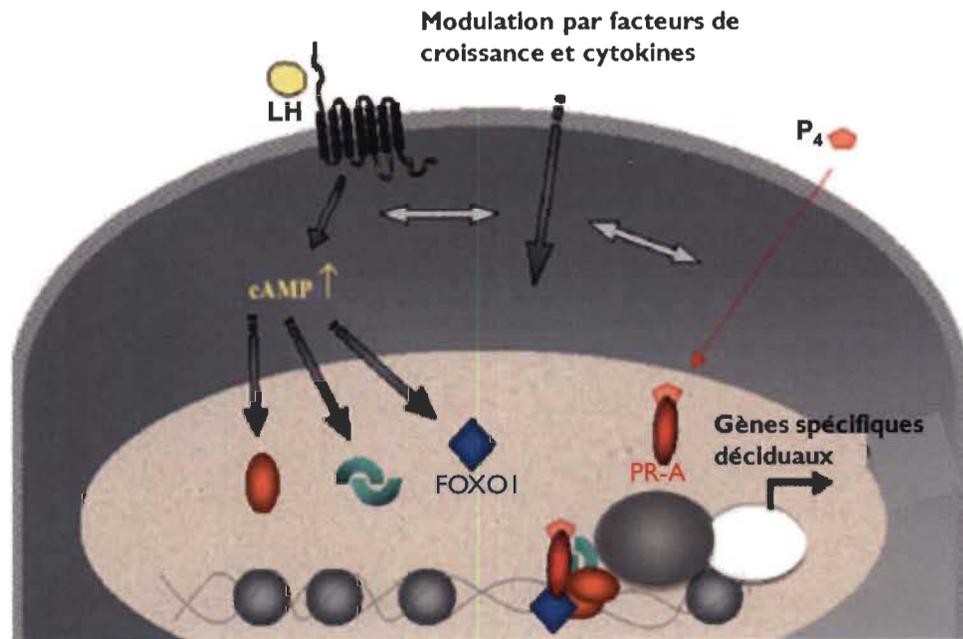


Figure 1.3 Les signaux impliqués dans la décidualisation des CSE (tirée de Gellersen et Brosens, 2003).

FOXO1 est un facteur de transcription impliqué précocement dans la régulation du processus de décidualisation. D'abord, son expression est induite par une augmentation soutenue des niveaux d'AMPc dans les CSE humaines [13]. Ensuite, FOXO1 s'associe au couple formé par la P₄ et son récepteur A (PR-A) ainsi qu'à de nombreux autres facteurs de transcription afin de former un complexe d'activation de la transcription des gènes spécifiques déciduaux, dont celui de la prolactine (Figure 1.3) [13-17].

Parmi les marqueurs phénotypiques de la décidualisation, la prolactine déciduale (dPRL) est une des protéines les plus importantes [18]. La PRL est un polypeptide synthétisé et sécrété par l'hypophyse antérieure, le placenta, une variété de cellules du système immunitaire (lymphocytes T et B, cellules NK) et les cellules déciduales de l'endomètre, ce qui nous intéresse principalement. La dPRL ne se distingue pas de la PRL pituitaire selon des critères chimique, biologique et immunologique [19] : il s'agit de la même séquence d'acides aminés [20]. Cependant, le transcrit d'ARNm diffère dans la région 5' non traduite : l'ARNm de la dPRL est plus long et comporte des régions promotrices alternative de sorte que ce ne sont pas les mêmes facteurs de transcription qui sont recrutés [21, 22]. Conséquemment, ceci permet une régulation hormonale spécifique à certains tissus [22]. La dPRL agit de manière paracrine sur ses récepteurs transmembranaires situés au niveau de l'épithélium glandulaire de l'endomètre. Durant la phase sécrétoire du cycle, l'expression de la dPRL et de ses récepteurs est particulièrement abondante : la dPRL est impliquée dans la régulation de la fonction sécrétoire des glandes endométriales. Elle joue donc un rôle crucial pour l'implantation de l'embryon et le maintien de la grossesse [23, 24]. La mesure de la quantité de prolactine dans le surnageant des cellules en décidualisation, par « enzyme immunoassay » (EIA) est un outil facile à utiliser, efficace et bien validé pour caractériser le processus de décidualisation *in vitro* [11, 25].

1.1.2.1 Régulation du cycle cellulaire des CSE humaines durant la décidualisation

D'une façon générale, dans une cellule la différenciation se produit après l'arrêt du cycle cellulaire et l'inhibition de la prolifération. Il en est ainsi lors de la décidualisation [26], mais les CSE peuvent se différencier après l'arrêt du cycle cellulaire aussi bien en phase G0/G1 qu'en phase G2/M (Figure 1.4). Les voies de signalisation responsables de la décidualisation, induites par l'AMPc et la P₄, activent plusieurs mécanismes moléculaires qui provoquent l'arrêt du cycle cellulaire. Ces mécanismes impliquent plusieurs protéines régulatrices du cycle cellulaire.

D'une part, l'AMPc augmente l'expression de FOXO1 et du récepteur A de la P₄ (PR-A), diminue l'expression de cycline D1 et inhibe la protéine du rétinoblastome (Rb) (Figure 1.4) [27, 28]. Ceci occasionne l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et prévient l'entrée en phase S [29], principalement dû au fait, qu'à ce moment précis, la cycline D1 n'est pas en quantité suffisante dans la cellule pour activer le cycle. Pour que le cycle progressent de la phase G1 à S, il doit y avoir formation du complexe protéique, cycline D1 et kinases cycline-dépendante (Cdk4 et 6), responsable de la phosphorylation de Rb : Rb phosphorylée libère le facteur de transcription E2F qui induit la transcription des gènes nécessaires à l'entrée en phase S du cycle [30, 31]. Il a été démontré que, lors de la décidualisation, les niveaux de phosphorylation de Rb sont très faibles ce qui favorise l'arrêt du cycle cellulaire [29].

D'autre part, la P₄ diminue l'expression de la protéine cycline B1 ce qui bloque le cycle cellulaire en phase G2/M (Figure 1.4) [32]. Le faible taux de cycline B1 entrave la formation du complexe Cdc2/cycline B1 essentiel à la progression du cycle cellulaire de la phase G2 à M.

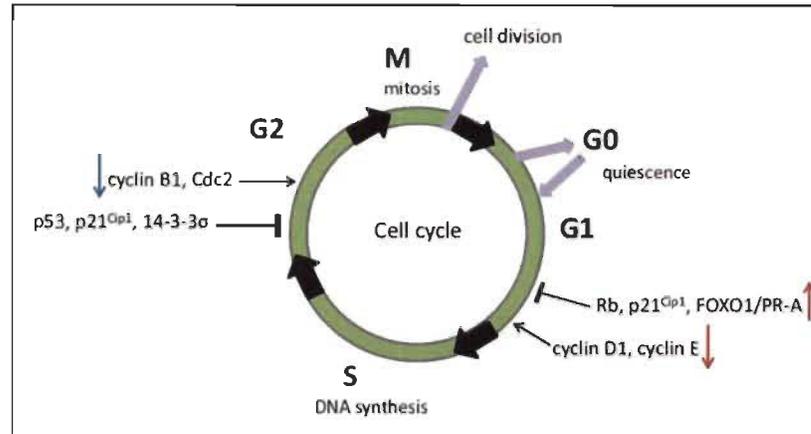


Figure 1.4 Cycle cellulaire : Phases et protéines régulatrices (tirée de Logan *et al.*, 2012).

G1 (gap 1), S (synthèse de l'ADN), G2 (gap 2) et M (mitose). Flèches rouges : effet de l'AMPc. Flèche bleue : effet de la P₄.

Ainsi, l'AMPc et la P₄ sont responsables d'initier deux voies de signalisation intracellulaire différentes qui interagissent afin de réguler le cycle cellulaire et la décidualisation. Toutefois, les mécanismes moléculaires qui régulent le cycle cellulaire durant la décidualisation ne sont pas clairement établis à ce jour.

1.1.3 Problématique de recherche liée à la décidualisation

Étant donné que le succès du processus de décidualisation est essentiel à la placentation et au bon déroulement des premières phases de la grossesse, l'échec de la décidualisation entraîne plusieurs conséquences observables en clinique : avortements spontanés récurrents, dysfonctions utéroplacentaires, naissances prématurées et infertilité féminine [33, 34]. Les mécanismes moléculaires impliqués dans la décidualisation ne sont toujours pas bien compris à ce jour. C'est pourquoi de nombreux chercheurs tentent d'élucider ce processus crucial.

1.2 p53

Cette section du présent travail consiste en une présentation de p53, l'une des principales protéines auxquelles s'attardent les travaux de recherche de l'équipe du Dr Van Themsche.

1.2.1 Historique de la protéine p53

C'est en 1979 que la protéine p53 fut découverte, par plusieurs équipes de recherche distinctes [35-37]. Puis, une décennie plus tard, p53 fut caractérisée à titre de suppresseur de tumeur par deux autres équipes de recherche [38, 39]. Depuis ce jour, p53 continue de faire l'objet de plusieurs études étant donné son rôle crucial dans la cellule.

1.2.2 Biochimie de la protéine p53

La protéine p53 est encodée par le gène *TP53* qui est situé sur le petit bras du chromosome 17 chez l'humain [40]. Ce gène est constitué de 20 000 paires de bases et comporte 11 exons. Une fois traduite, p53 est constituée de 393 acides aminés (a.a.) et a un poids moléculaire de 53 kDa, dont elle tire d'ailleurs son nom.

1.2.2.1 Domaines fonctionnels de p53

Au niveau structural, p53 peut être divisée en cinq domaines (Figure 1.5). Chaque domaine possède une fonction spécifique au sein de la protéine. Dans la partie aminoterminal (N-terminale), se trouvent deux domaines de transactivation de la transcription (TAD1 : a.a. 1 à 42 et TAD2 : a.a. 43 à 63), lesquels interagissent avec la machinerie transcriptionnelle de base [41, 42]. TAD1 contient également un site de liaison pour la protéine « mouse double minute 2 » (MDM2) [43] : lorsque MDM2 est phosphorylée et donc activée, elle peut être transportée au noyau pour lier p53 dans sa partie N-terminale. De cette façon, MDM2 inhibe l'activité transcriptionnelle de p53 [44]. À la section 1.2.4.1, plus de détails sont donnés sur MDM2, principale régulatrice des niveaux

de p53 dans la cellule [45-47]. Au centre, de la protéine p53, (a.a. 102 à 292), se trouve un domaine de liaison à des séquences spécifiques de l'ADN [48]. Enfin, la partie carboxy-terminale (C-terminale) de la protéine, contient le domaine de tétramérisation (a.a. 323 à 358) ainsi qu'un domaine de régulation négative de la transcription (a.a. 363 à 393), capable d'empêcher la liaison à l'ADN du domaine central [49-51].

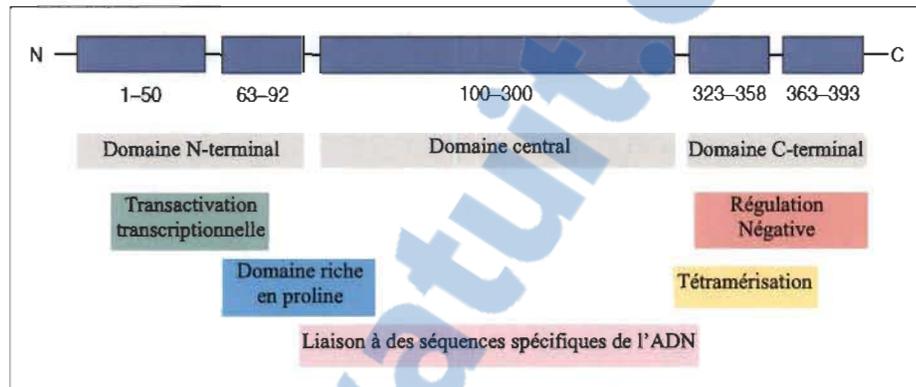


Figure 1.5 Représentation schématique de la structure de p53 et ses domaines fonctionnels (tirée de Anzola et Burgos, 2003).

1.2.3 Rôle général de p53 dans la cellule

La protéine p53 est un facteur de transcription. Faiblement exprimée dans les cellules normales, p53 s'accumule en réponse à un stress génotoxique et provoque un arrêt du cycle cellulaire au cours duquel l'ADN est réparé, sans quoi l'apoptose est induite [52, 53] (ce sujet est approfondi à la section 1.2.6). Elle a d'ailleurs été surnommée « gardienne du génome » en raison de son importance dans la cellule [54]. Il est bien connu que le facteur de transcription p53 est impliqué dans la régulation d'une variété de fonctions biologiques dont le développement, l'immunité et le cancer. Récemment, il a été démontré que le facteur p53 est également impliqué dans la régulation de certains processus associés à la fonction reproductrice maternelle [55, 56].

1.2.4 Régulation de p53

En raison de son importance dans la cellule, il n'est pas étonnant de constater que p53 est régulée de façon très rigoureuse par de multiples processus moléculaires. Ces processus de régulation sont impliqués dans le contrôle de l'activité de p53 et de sa localisation intracellulaire.

1.2.4.1 Régulation négative de l'activité de p53

L'oncoprotéine « mouse double minute 2 » (MDM2) joue un rôle clé dans la régulation négative de l'activité de p53. Les niveaux intracellulaires des deux protéines sont intimement liés par une boucle de rétroaction négative [57]. Au niveau du promoteur de MDM2, se trouve une séquence consensus sur laquelle la protéine p53 active se lie afin d'induire l'expression génique de MDM2 [58]. Une fois traduite et phosphorylée, MDM2 peut être transportée au noyau et se lier à la partie N-terminale de p53, ce qui entrave l'activité de celle-ci [44]. De plus, MDM2 possède une activité de ligase de l'ubiquitine très spécifique pour p53 : elle fixe des chaînes d'ubiquitine sur des résidus lysine de la partie C-terminale de p53, entraînant la dégradation de celle-ci par le protéasome cytoplasmique [45, 47]. Toutefois, une étude réalisée chez les souris ayant une délétion constitutive de MDM2 a démontré que, bien que les niveaux intracellulaires de p53 soient élevés, celle-ci est quand même dégradée dans la cellule [59]. Ceci suggère l'existence d'une voie alternative de dégradation de p53, indépendante de MDM2 *in vivo*. En effet, des recherches *in vitro* ont révélé que d'autres ligases de l'ubiquitine telles que COP1 [60], PIRH2 [61], Arf-BP1 [62] et MDM4 [63] sont impliquées dans le contrôle de la quantité de p53 intracellulaire. Néanmoins, le rôle précis de ces voies de dégradation indépendantes de MDM2 *in vivo* n'est pas clairement établi à ce jour.

1.2.4.2 Activation de la protéine p53

D'un point de vue général, le modèle classique d'activation de p53 en réponse à un stress cellulaire comprend d'abord la stabilisation de la protéine, suivie d'un entrelacement complexe de mécanismes de régulation permettant la liaison de p53 à l'ADN, ce qui induit la transcription de gènes cibles (Figure 1.6). Pour être stabilisée, p53 doit nécessairement être dissociée de MDM2 et ce n'est qu'une fois stabilisée que p53 peut interagir avec des promoteurs spécifiques, grâce à de multiples modifications post-traductionnelles. Suite à ces liaisons sur des sites spécifiques, p53 pourrait assumer son rôle de facteur transcriptionnel afin de réguler la transcription de gènes cibles, agissant seule ou via le recrutement de coactivateurs ou corépresseurs (Figure 1.6) [64].

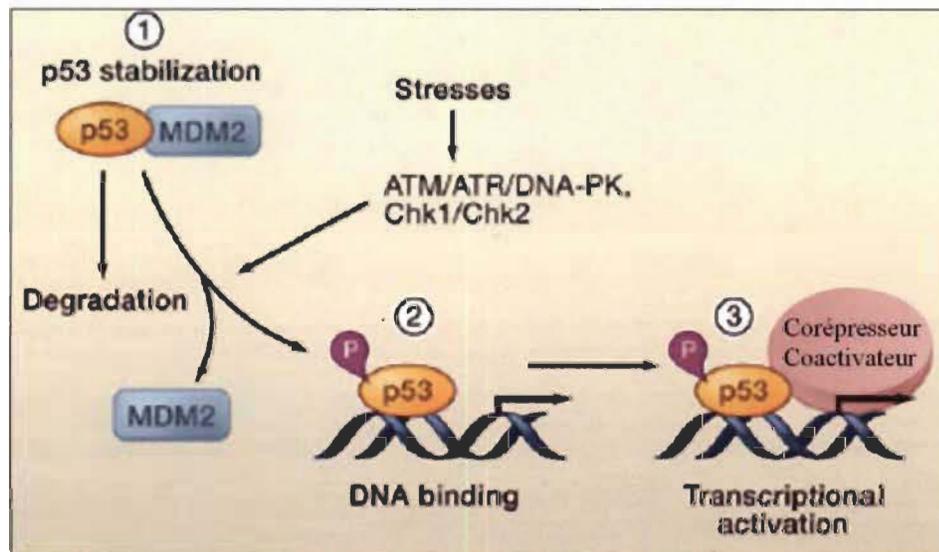


Figure 1.6 Modèle classique d'activation de p53 (tirée de Kruse et Gu, 2009).

Toutefois, des études récentes indiquent que chacune de ces étapes d'activation est beaucoup plus complexe que ce que décrit le modèle précédent, qui est insuffisant pour rendre compte de tous les aspects de l'activation de p53 *in vivo* [65, 66].

1.2.4.3 Régulation de p53 par des modifications post-traductionnelles

La régulation post-traductionnelle est essentielle au contrôle de l'activité et de la localisation intracellulaire de p53 et ce, dans des conditions normales ou de stress cellulaire. Ceci a été étudié plus particulièrement dans les cellules cancéreuses, où plus de 36 résidus d'acides aminés, situés surtout dans les régions terminales de la protéine, ont été identifiés comme cibles de modifications post-traductionnelles (Figure 1.7).

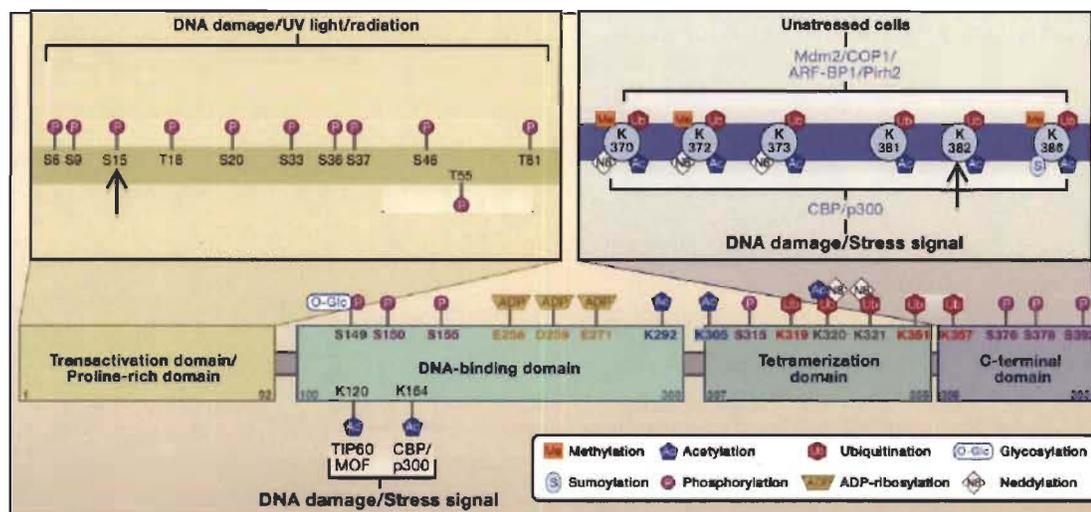


Figure 1.7 Aperçu des modifications post-traductionnelles de p53 (tirée de Kruse et Gu, 2009).

Les sites des diverses modifications sont illustrés ainsi que quelques enzymes et signaux responsables de leur induction. Les flèches indiquent les deux modifications post-traductionnelles étudiées.

D'abord, la phosphorylation de résidus sérine dans la partie N-terminale, au niveau du domaine de transactivation TAD1, a été la première modification post-traductionnelle identifiée. La phosphorylation de la sérine 15 et de la sérine 20 de p53 favorise la stabilisation de la protéine puisqu'elle diminue son interaction avec MDM2 [67]. Elle peut être catalysée par une variété de kinases impliquées dans le processus de réparation de l'ADN, dont ATM, ATR et PK-ADN (Figure 1.6) [68-70]. Aussi, d'autres kinases comme Chk1 et Chk2, impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire, peuvent également phosphoryler p53 dans cette région [71]. Une variété de modifications a aussi lieu dans la partie C-terminale de la protéine (Figure 1.7), qui est une région de régulation négative de

l'activité de p53 (Figure 1.5). Ces modifications survenant sur les 30 derniers acides aminés et donc, qui sont donc susceptibles d'influencer la capacité de p53 à lier l'ADN [72, 73], comprennent l'acétylation, la neddylation (N8), la sumoylation (S), la méthylation (Me) et l'ubiquitination (Ub) de résidus lysine (Figure 1.7). Les trois premières surviennent surtout en période de stress alors que les deux dernières sont observées de manière prépondérante en homéostasie. Par exemple, en réponse à une agression, les niveaux d'acétylation de la protéine p53 sont modulés à la hausse, ce qui favorise la stabilisation de la protéine ainsi que son activation [74-76]. L'acétylation est effectuée par une histone acétyltransférase (HAT), telle que CBP/300, sur les mêmes sites que l'ubiquitination par MDM2 (Figure 1.7). L'acétylation et l'ubiquitination sont des modifications mutuellement exclusives qui modulent toutes deux la stabilité de p53 : l'ubiquitination de p53 par MDM2 favorise sa dégradation par le protéasome tandis que l'acétylation favorise son activation en plus d'empêcher sa répression [77, 78].

L'étude des modifications post-traductionnelles de p53 par immunobuvardage de type Western (WB), couplés ou non à une immunoprécipitation, sont des techniques bien établies, grâce à la disponibilité de nombreux anticorps commerciaux ciblant des modifications post-traductionnelles précises.

Dans le cadre du présent travail, les deux modifications post-traductionnelles de p53 suivantes ont été étudiées : la phosphorylation de la sérine 15 (Ser¹⁵) et l'acétylation de la lysine 382 (Lys³⁸²). Plusieurs raisons motivent ces choix. Tout d'abord, ces modifications post-traductionnelles ont été parmi les premières à être étudiées et leur effet d'augmentation de l'activité de p53 est bien documenté [67, 75]. Ensuite, il a été démontré que ces deux modifications sont compatibles et que leur effet sur p53 est additif : 1) suite à certains signaux endommageant l'ADN, tels que les radiations ou la lumière UV (Figure 1.7), la Ser¹⁵ de p53 est phosphorylée ce qui augmente la capacité de recruter le cofacteur CBP/p300; 2) la hausse de CBP/p300 lié à p53 est suivie par l'augmentation globale du niveau d'acétylation de p53 dans sa partie C-terminale, dont l'acétylation de la Lys³⁸² [79]. En outre, il est pertinent d'investiguer ces modifications post-traductionnelles spécifiques dans les CSE puisqu'elles peuvent avoir lieu dans des cellules qui ne sont pas

cancéreuses [80-82]. Finalement, des anticorps validés permettant d'étudier spécifiquement ces modifications sont facilement disponibles.

1.2.4.4 Régulation de l'activité transactivatrice de p53

Lorsque le facteur de transcription p53 est activé, au moins trois différentes classes de gènes cibles peuvent être transcrites afin que p53 assume ses fonctions intracellulaires. L'activité de p53 doit être régulée très rigoureusement puisqu'elle peut occasionner des conséquences biologiques irréversibles, comme l'apoptose. La relation entre les modifications post-traductionnelles de p53, les gènes cibles transcrits ainsi que les conséquences biologiques qui en découlent, est illustrée à la figure 1.8. D'abord, on remarque, en (A) que plusieurs promoteurs peuvent être activés par p53, lorsque celui-ci est phosphorylé sans être acétylé. Cette première classe de gènes protège la cellule contre un excès d'activité de p53. Étant donné que l'activité de p53 est potentiellement dangereuse pour la cellule, son rétrocontrôle par les ligases de l'ubiquitine, comme MDM2 et PIRH2, constitue un palier important de la régulation de p53. Puis, en (B), l'activation des gènes requiert le recrutement d'histones acétyltransférases (HAT) spécifiques, soient CBP/p300 et Tip60/hMOF, ainsi qu'une acétylation partielle de p53, qui préviennent aussi la répression de p53 [83]. Les gènes de cette seconde classe, dont le mieux décrit est p21, sont impliqués dans la réparation de l'ADN et le contrôle du cycle cellulaire. Enfin, en (C), le recrutement d'HAT ainsi que l'acétylation de résidus spécifiques sont nécessaires pour activer des gènes pro-apoptotiques [84]. Considérant que l'activité des gènes de cette troisième classe, comme PUMA et NOXA, initient une séquence irréversible conduisant à la mort cellulaire, il importe que ce processus soit très finement régulé.

 Dommages à l'ADN ou autres stress	Gènes cibles	Conséquences biologiques	Modifications de p53 requises
A 	MDM2 Pirh2	Rétrocontrôle survie cellulaire	Phosphorylation (pas d'acétylation requise)
B 	p21 GADD45	Inhibe la prolifération Réparation ADN	Acétylation partielle suffisante
C 	PUMA FAS NOXA	Apoptose (irréversible)	Acétylation spécifique requise

Figure 1.8 Impact des modifications post-traductionnelles sur l'activité de p53 (tirée de Kruse et Gu, 2009).

Finalement, lorsque p53 a accompli ses fonctions, un retour à l'homéostasie est souhaitable. Dans le but de restaurer l'équilibre des niveaux de p53 dans la cellule, p53 peut être déacétylé par différentes histones déacétylases. En effet, la déacétylation représente une étape cruciale permettant la dégradation de p53 via son interaction avec MDM2 [78].

1.2.5 Activité de p53 et son rôle de régulation du cycle cellulaire

Une des fonctions de la protéine p53 est d'inhiber la prolifération cellulaire en transactivant de nombreux gènes impliqués dans le cycle cellulaire. Par exemple, en réponse à un dommage à l'ADN, l'augmentation de l'expression de p53 active la synthèse d'inhibiteurs de kinases cycline-dépendante, tel que p21, ce qui provoque un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 [85]. La protéine p21 est une importante régulatrice du cycle cellulaire : elle a la capacité d'inhiber des kinases cycline-dépendante aussi bien en phase G1 qu'en phase G2/M du cycle [52]. Lorsque l'arrêt du cycle cellulaire se produit en phase G2, l'activation de p53 augmente l'expression de p21, puis inactive Cdc2 et cycline B1 [52, 86-88], inhibant ainsi la formation du complexe Cdc2/cycline B1 nécessaire au passage de la phase G2 à M du cycle. Ces protéines peuvent servir de marqueurs de

l'activité de p53. Il est donc possible pour p53 activée de réguler le cycle cellulaire durant les phases G1 et G2/M (Figure 1.9) [89].

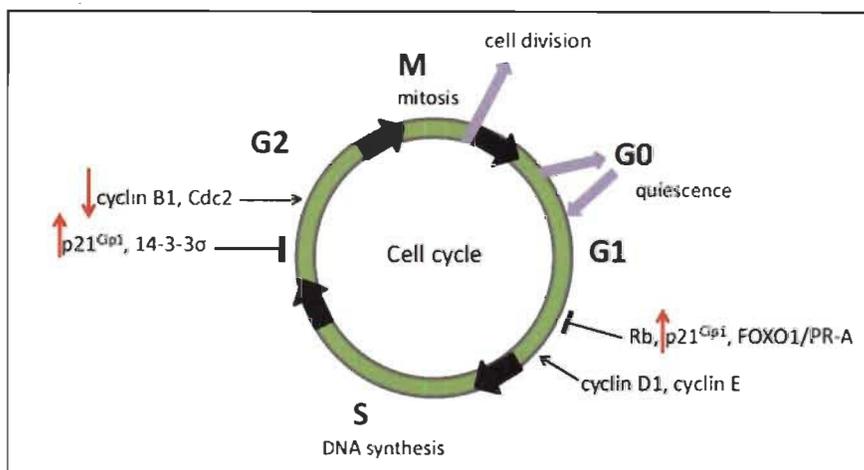


Figure 1.9 p53 contrôle l'expression de protéines impliquées dans le cycle cellulaire (tirée de Logan et al, 2012).

1.2.6 Activité de p53 et son rôle dans l'induction de l'apoptose

Lors de dommages irréversibles à l'ADN, le facteur de transcription p53 module l'expression de gènes cibles afin d'induire l'apoptose de la cellule. Pour se faire, p53 réprime l'expression génique de BCL-2, une molécule au rôle anti-apoptotique, en plus de favoriser l'expression de plusieurs gènes pro-apoptotiques tels que PUMA, NOXA et BAX [90-92]. Ceci enclenche une cascade de signalisation provoquant la mort de la cellule : PUMA interfère avec la séquestration de p53 par BCL-X_L dans le cytoplasme, permettant ainsi la libération de p53 sous sa forme activée. Cette dernière peut alors interagir avec BAX et induire sa translocation au niveau de la membrane mitochondriale, ce qui contrecarre l'effet antiapoptotique de BCL-2 et BCL-XL. Des changements de la perméabilité des membranes mitochondriales s'ensuivent qui entraînent la relâche de facteurs apoptotiques (smacDIABLO, cytochrome c...), l'activation des caspases et ultimement l'apoptose de la cellule (Figure 1.10) [90]. Ainsi, l'expression de gènes pro-apoptotiques tels que PUMA, NOXA et BAX peut servir de marqueur de l'activité pro-apoptotique de p53 dans la cellule.

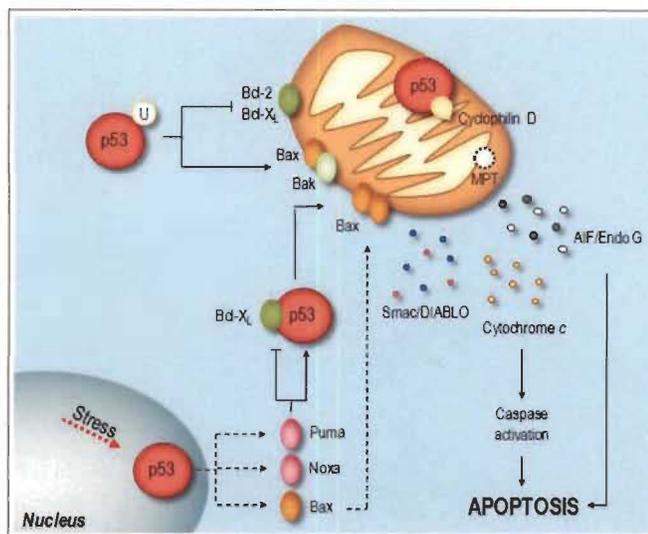


Figure 1.10 p53 initie une cascade de signalisation intracellulaire menant à l'apoptose (tirée de Amaral, 2010).

1.2.7 Localisation intracellulaire de p53

La localisation intracellulaire de p53 a d'importantes conséquences sur la cellule. L'importation ainsi que la rétention de p53 dans le noyau sont essentielles afin qu'il assume ses fonctions de régulation du cycle cellulaire [93-95]. Cependant, des études ont démontré que l'activation de p53 n'est pas requise pour qu'il soit lié à l'ADN [96-98]. En ce sens, deux équipes de recherche ont démontré, par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP), que p53 est présent au niveau des promoteurs de certains gènes cibles comme p21 et MDM2 dans les cellules en homéostasie [99, 100]. Il est donc possible que la protéine se trouve dans le noyau, lié à l'ADN tout en étant inactive.

En complément, plusieurs études ont prouvé que la localisation cytoplasmique de p53 est associée à son rôle de régulation de l'apoptose [101, 102]. Ainsi, p53 cytosolique peut assumer son rôle de régulation de l'apoptose tel que décrit à la section 1.2.6 et à la Figure 1,10. L'accumulation de p53 dans le cytoplasme est une conséquence du transport intracellulaire normal et de la mono-ubiquitination de la protéine [103-105].

De nombreuses molécules sont impliquées dans la localisation intracellulaire de p53. Par exemple, MDM2, principale protéine régulatrice des niveaux de p53 dans la cellule, effectue la translocation nucléocytoplasmique de p53 afin qu'elle soit dégradée par le protéasome [106]. D'autres protéines, comme BCL-2 et BCL-X_L, ont la capacité de séquestrer p53 au niveau du cytoplasme inhibant ainsi ses fonctions [95]. Enfin, des modifications post-traductionnelles, telle que la phosphorylation, ont également un impact sur la localisation intracellulaire de p53. Puisque la phosphorylation de p53 diminue son interaction avec MDM2, ceci favorise son accumulation dans le noyau [67].

1.3 Le rôle potentiel de p53 dans la décidualisation

L'étude de la régulation de l'expression et de l'activité d'une protéine peut donner d'importants indices quant à son rôle biologique dans un processus donné. À cet égard, la régulation de l'expression et de l'activité de p53 dans les CSE pendant la décidualisation n'a pas été investiguée en profondeur à ce jour. Une étude *in vivo*, effectuée chez le rat, a démontré que la protéine p53 est détectable dans les CSE pendant la deuxième phase de décidualisation [107]. Ensuite, une étude *in vitro*, effectuée sur des cultures primaires de CSE humaines traitées durant six jours, soit avec l'AMPc, la P₄ ou la combinaison des deux en guise de stimulus de décidualisation, a démontré une induction massive et soutenue de p53 et ce, plus particulièrement dans les CSE où le traitement de décidualisation contenait de l'AMPc [2]. Cette même étude a aussi montré que l'expression des gènes cibles de p53, tels que p21 et BAX, ne subit pas de changement après une longue période de décidualisation *in vitro* (analyse effectuée après 6 et 12 jours), autant au niveau transcriptionnel que protéomique et ce, malgré une localisation majoritairement nucléaire du facteur de transcription p53. Ces auteurs ont observé que les niveaux d'ARNm de p53 sont demeurés relativement stables au cours de la décidualisation. Cette discordance entre les niveaux d'ARNm et de la protéine p53 suggère que, dans les CSE, la régulation de la protéine p53 pourrait se faire par des modifications post-traductionnelles.

Les expériences *in vivo*, chez des souris comportant des délétions constitutives de p53 (*Trp53^{-/-}*), ont démontré que la perte d'expression de p53 pouvait entraîner des difficultés au niveau du processus d'implantation [56]. Dans ce modèle, les souris avaient des portées moins nombreuses [56]. Toutefois, en accord avec le rôle de suppresseur de tumeur associé à p53, ces souris développent des cancers généralisés à un âge précoce, ce qui complique grandement les études portant sur la reproduction. Pour contourner ce problème, d'autres expériences *in vivo* ont été réalisées, cette fois par délétion strictement utérine de p53 (*Trp53^{dl/d}*). Chez ces souris *Trp53^{dl/d}*, le nombre de sites d'implantation s'est avéré normal, mais la croissance et la différenciation du stroma endométrial au niveau de ces sites ont été significativement réduites par comparaison avec les souris contrôles et beaucoup de naissances prématurées ont été répertoriées [34, 108]. Considérant que p53 est exprimée par les CSE [2, 107], ces résultats suggèrent que la protéine p53 serait importante pour que le processus de décidualisation soit complété et pour le maintien de la grossesse jusqu'à son terme. Toutefois, la façon dont p53 jouerait ce rôle protecteur pourrait être plus complexe qu'il n'y paraît. Ainsi, des indications expérimentales suggèrent que p53 pourrait être inactive dans les CSE pendant la décidualisation. Par exemple, les gènes cibles de p53, p21, BAX et PTEN, ne sont pas régulés à la hausse dans divers modèles de décidualisation *in vitro* des CSE [52, 91, 109]. *In vivo*, p21 n'a pas été détecté dans les CSE au moment de la formation de la décidue [110]. L'accumulation de la protéine p53 dans les CSE pendant la décidualisation pourrait donc être rapidement suivie par son inactivation. Cette inactivation de p53 dans les CSE pourrait être cruciale pour que la décidualisation soit complétée avec succès. En effet, tel que mentionné plus haut, une augmentation de l'activité de p53 dans les CSE est accompagnée de l'induction de l'apoptose [107]. À cet égard, il a été montré que l'accumulation de p53 dans le noyau d'autres types cellulaires était accompagnée d'une incapacité à transactiver ses gènes cibles, dont p21 et MDM2 [111].

1.4 Problématique de recherche

Des indications expérimentales suggèrent qu'une régulation fine de p53 dans les CSE pendant la décidualisation serait essentielle pour permettre la complétion de la décidualisation et le maintien de la grossesse jusqu'à terme. Toutefois, tel que décrit dans la section 1.3, les mécanismes de régulation de p53 ainsi que son rôle dans l'endomètre au cours de la décidualisation demeurent à être établis.

1.5 Objectifs et hypothèses

L'hypothèse générale qui sous-tend le présent travail est que, par son rôle universel de régulation négative de la survie et du cycle cellulaire, p53 freinerait le bon déroulement de la décidualisation et pourrait devoir être inactivée pour que la décidualisation soit complétée avec succès.

Les objectifs de recherche retenus étaient donc les suivants : premièrement, la mise au point du modèle de décidualisation *in vitro*. Un modèle adéquat de décidualisation *in vitro* devait permettre d'observer les changements morphologiques caractéristiques des cellules déciduales qui deviennent larges et arrondies, ainsi que l'induction de marqueurs protéiques, dont la PRL déciduale. Deuxièmement, l'investigation du rôle potentiel de la voie de la PKA dans la régulation de p53 au fil de la décidualisation : l'inhibition pharmacologique de la voie de PKA devait pouvoir entraver l'expression de p53, si cette voie était impliquée dans la régulation de p53 pendant la décidualisation. Troisièmement, étant donné l'importance des modifications post-traductionnelles dans l'activité de p53, l'analyse de la régulation de p53 par des modifications post-traductionnelles durant la décidualisation. En lien avec notre hypothèse générale, selon laquelle p53 serait inactivée, il était peu probable qu'on observe des modifications activatrices telles que la phosphorylation de la Ser¹⁵ et l'acétylation de la Lys³⁸². Mais puisque que ce sont les modifications de p53 les mieux caractérisées, et que l'impact des modifications post-traductionnelles sur une protéine est intégratif et non additionnel, ce point méritait d'être investigué, d'autant plus que l'augmentation de la quantité de la protéine p53 serait intuitivement associée à une augmentation de son activation. Quatrièmement, l'étude de

l'activité de p53 au fil de la décidualisation par l'analyse de quelques-uns de ses gènes cibles dont p21, cycline B1 et Cdc2. Notre hypothèse était que si p53 était inactivée au cours de la décidualisation, nous observerions une incapacité à réguler l'expression de ses gènes cibles p21, cycline B1 et Cdc2. Cinquièmement, et dernièrement, la vérification de la localisation intracellulaire de p53 lors de la décidualisation. Il nous semblait plausible que cette protéine soit exportée du noyau cellulaire pour être inactivée, probablement au niveau du protéasome.

1.6 Modèle cellulaire et approches expérimentales

Le modèle cellulaire employé provenait d'une lignée de cellules stromales de l'endomètre humain (HIESC) transformées à l'aide de l'antigène T large de SV40 par Dr Michel A. Fortier et son équipe du Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université Laval (CHUL). L'induction de la décidualisation *in vitro* a été réalisée en se basant sur un modèle déjà bien établi qui consiste à ajouter 1 μ M d'acétate de médroxyprogestérone (MPA) et 0,5 mM de 8-bromo-AMPC (Br-AMPC) pour des durées pré-définies [11, 25]. La validation de l'efficacité du procédé de décidualisation a été faite en deux étapes : premièrement en documentant les changements morphologiques des cellules par microscopie optique en contraste de phase et deuxièmement, en mesurant la quantité de PRL sécrétée, marqueur spécifique de décidualisation, par la technique « enzyme immunoassay » (EIA). Une fois la validité du modèle de décidualisation établie, l'analyse des protéines d'intérêt, dont p53, a été réalisée par WB. L'inhibiteur pharmacologique H89 a été employé pour investiguer le rôle de la voie de la PKA dans la régulation de p53 au fil de la décidualisation. Finalement, la localisation intracellulaire de p53 a été observée par immunofluorescence.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Cellules et réactifs

La lignée de cellules immortalisées du stroma endométrial humain (HIESC) nous a été gracieusement fournie par le Dr Michel A. Fortier, du centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université Laval (Québec, Qc, Canada). Les cellules ont été cultivées à 37 °C, sous une atmosphère humidifiée contenant 5 % de CO₂ et dans un milieu de maintien: Roswell Park Memorial Institute medium de type 1640 (RPMI-1640) fourni par Life Technologies (Mississauga, On, Canada), supplémenté de 50 µg/mL de gentamycine et de sérum fœtal bovin (FBS; 10 %).

Les anticorps primaires reconnaissant spécifiquement p53, acétyl-p53, Phospho-p53, p21, Cdc2, CREB et Phospho-CREB provenaient de Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA) et celui reconnaissant cycline B1, de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). L'anticorps primaire anti bêta-actine a été fourni par Sigma Aldrich (St-Louis, MO, USA). Les anticorps secondaires conjugués à la peroxydase de raifort (HRP) ont été fournis par Bio-Rad (Mississauga, On, Canada). Il s'agissait d'anticorps de chèvre dirigés contre les immunoglobulines G de souris ou de lapin.

L'acétate de médroxyprogestérone (MPA) utilisé pour les traitements provenait de Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA) alors que le 8-bromo-AMPC avait été fourni par Enzo Life Sciences (Farmingdale, NY, USA) et le H89 par Cedarlane (Burlington, ON).

Lors des lyses cellulaires, le tampon RIPA supplémenté en inhibiteurs de protéases, de marque Complete, fabriqué par Roche (Laval, Qc, Canada) a été utilisé.

2.2 Procédures expérimentales

2.2.1 Décidualisation *in vitro* des HIESC

Les HIESC ont été mises en culture dans des plaques de six puits (500 000 cellules/puits) avec leur milieu de maintien. Après 24 heures, les HIESC confluentes ont été traitées avec du RPMI-1640 sans rouge de phénol supplémenté de 2 % de FBS traité au charbon-dextran (DCC) et 50 µg/mL de gentamycine, en présence de 0,5 mM de Br-AMPC et de 1 µM de MPA (traitement induisant la décidualisation, symbolisé par D dans les figures de résultats) ou seulement avec le diluant de ces réactifs (le DMSO; traitement contrôle, symbolisé par C dans les figures de résultats). Les milieux ont été changés et les traitements renouvelés à tous les deux jours (soit aux jours 2, 4, 6 et 8 de traitement) puis les cellules ont été récoltées après des durées croissantes (soit aux jours 1, 3, 6 et 10 de traitement). Les récoltes cellulaires ont été faites au moyen de la trypsination.

2.2.2 Validation de la décidualisation par le dosage de la prolactine sécrétée

Les niveaux de prolactine sécrétée dans le surnageant des cellules traitées (traitements décidualisation (D) et contrôle (C)) ont été mesurés aux jours 1, 3, 6 et 10 de la décidualisation, par « enzyme immunoassay » (EIA,) à l'aide de l'ensemble EIA Kit fourni par Cayman (Ann Arbor, MI, USA). Les densités optiques ont été lues à l'aide d'un spectrophotomètre Optima de BMG Labtech (Durham, NC, USA). Pour chaque jour analysé, la quantité de prolactine sécrétée a été comparée entre les traitements D et C.

2.2.3 Inhibition pharmacologique de la voie de la PKA à l'aide du H89

Les HIESC ont été mises en culture dans des plaques de six puits (500 000 cellules/puits) dans leur milieu de maintien. Après 24 heures, deux types de traitements ont été réalisés. Pour s'assurer de l'efficacité de l'inhibition de la voie de la PKA par le H89 dans nos conditions expérimentales, le milieu de maintien a été remplacé par un milieu de culture constitué de RPMI-1640 sans rouge de phénol, de 2 % de FBS

DCC et de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamycine auquel on a ajouté le H89 10 μM pour 1 h (traitement H89); pour les traitements contrôle (CTL), le milieu était plutôt supplémenté avec le diluant du H89, soit le DMSO. Pour déterminer le rôle de la voie de la PKA dans la régulation de p53 lors de la décidualisation *in vitro*, au jour 0 les cellules ont d'abord été prétraitées avec H89 (10 μM) ou avec son diluant (DMSO) pendant 1 h, avant qu'un premier stimulus de décidualisation leur soit donné (0,5 mM de Br-AMPC et de 1 μM de MPA directement dans les puits concernés). Au deuxième jour de la décidualisation, le milieu de culture a été changé : le H89 10 μM ou le DMSO ont été rajoutés directement au milieu de culture, en même temps que le stimulus de décidualisation (0,5 mM de Br-AMPC et de 1 μM de MPA). Les cellules ont été récoltées au troisième jour de décidualisation.

2.2.4 Validation de la décidualisation par microscopie en contraste de phase

La présence des changements morphologiques qui se sont produits au cours de la décidualisation des HIESC et plus spécifiquement, aux jours 1, 3, 6 et 10 a été documentée à l'aide d'un microscope Olympus BX60. Le grossissement final était de 200X.

2.2.5 Immunobuvardage de type Western (WB)

Les cellules récoltées suite aux divers traitements ont été placées dans le tampon de lyse RIPA supplémenté d'inhibiteurs de protéases et ont subi trois cycles de congélation-décongélation. Le dosage des protéines totales dans les échantillons obtenus a été réalisé par la méthode du DC protein assay (BioRad); la lecture des densités optiques a été faite à l'aide du lecteur de plaques Fluostar Optima (BMG LABTECH, Ortenberg, Allemagne). Des quantités égales de protéines totales ont été chargées sur des gels contenant 10 % d'acrylamide et soumis à une électrophorèse en conditions dénaturante. Les protéines ont ensuite été transférées sur membranes de nitrocellulose (Bio-Rad), à laquelle les divers anticorps primaires ont été ajoutés, individuellement, pendant 12 h à 4 °C, suivis de l'anticorps secondaire approprié pendant 45 minutes. Une réaction de chimiluminescence a été utilisée afin de détecter les protéines, à l'aide de l'appareil d'imagerie UVP

BioSpectrum 500 (VWR, Upland, CA). Enfin, l'analyse densitométrique de l'intensité des bandes protéiques d'intérêt a été réalisée en utilisant le logiciel Prism de GraphPad (San Diego, CA, USA).

2.2.6 Évaluation de la localisation intracellulaire de p53 par immunofluorescence

Les cellules ont été cultivées sur lamelles avant d'être traitées tel que mentionné précédemment. Les cellules ont ensuite été fixées à l'aide de paraformaldéhyde 4 % pendant 10 minutes puis lavées deux fois avec du PBS (phosphate buffered saline) et finalement perméabilisées pendant trois minutes à température ambiante, dans une solution de sodium citrate 0.1 %, Triton X-100 0.1 % dans du PBS. Ensuite, ces cellules ont été incubées à température ambiante pendant une heure, avec l'anticorps primaire p53 dilué à 1/2000 dans le PBS. Finalement, une deuxième incubation a été pratiquée, avec l'anticorps secondaire « Alexa Fluor 594 conjugated donkey anti-rabbit IgG antibody, A-21206 » d'Invitrogen (Burlington, ON), dilué à 1/200 dans le PBS. L'ADN du noyau cellulaire a été contre-coloré à l'aide de Hoechst 0,25 mg/ml (Sigma) pendant trois minutes avant que les cellules soient recouvertes d'une lamelle. Enfin, les cellules colorées ont pu être observées par microscopie à fluorescence à l'aide d'un microscope Carl Zeiss Axio Observer Z1. Le grossissement final était de 630X.

2.2.7 Analyses statistiques

Les données ont été traitées selon la méthode one-way ANOVA ou par un test Student, en utilisant le logiciel PRISM (GraphPad). Dans le cas des tests ANOVA, le post-test Tukey a été appliqué. Pour être concluants et statistiquement significatifs, les résultats devaient provenir d'au moins trois expériences indépendantes et générer une valeur $P < 0,05$.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 Validation de la décidualisation des HIESC

L'impact du traitement des HIESC avec l'AMPc et la MPA sur les HIESC, en guise de stimulus de décidualisation, est exposé dans les Figures 3.1 et 3.2.

3.1.1 Changements morphologiques des HIESC décidualisés

Les changements morphologiques des HIESC associés à la décidualisation sont illustrés à la Figure 3.1A, qui regroupe des photographies de microscopie optique à contraste de phase des cellules après 1, 3, 6 et 10 jours de traitement. Les cellules décidualisées, à droite, ont perdu leur aspect fusiforme et acquis un cytoplasme abondant qui leur confère une forme arrondie et ce, dès le troisième jour de traitement. Par opposition, la morphologie des cellules contrôles, dans la colonne de gauche, demeure inchangée. Ces changements morphologiques caractéristiques de la décidualisation sont davantage mis en évidence à la Figure 3.1B, où seulement le troisième jour de décidualisation apparaît.

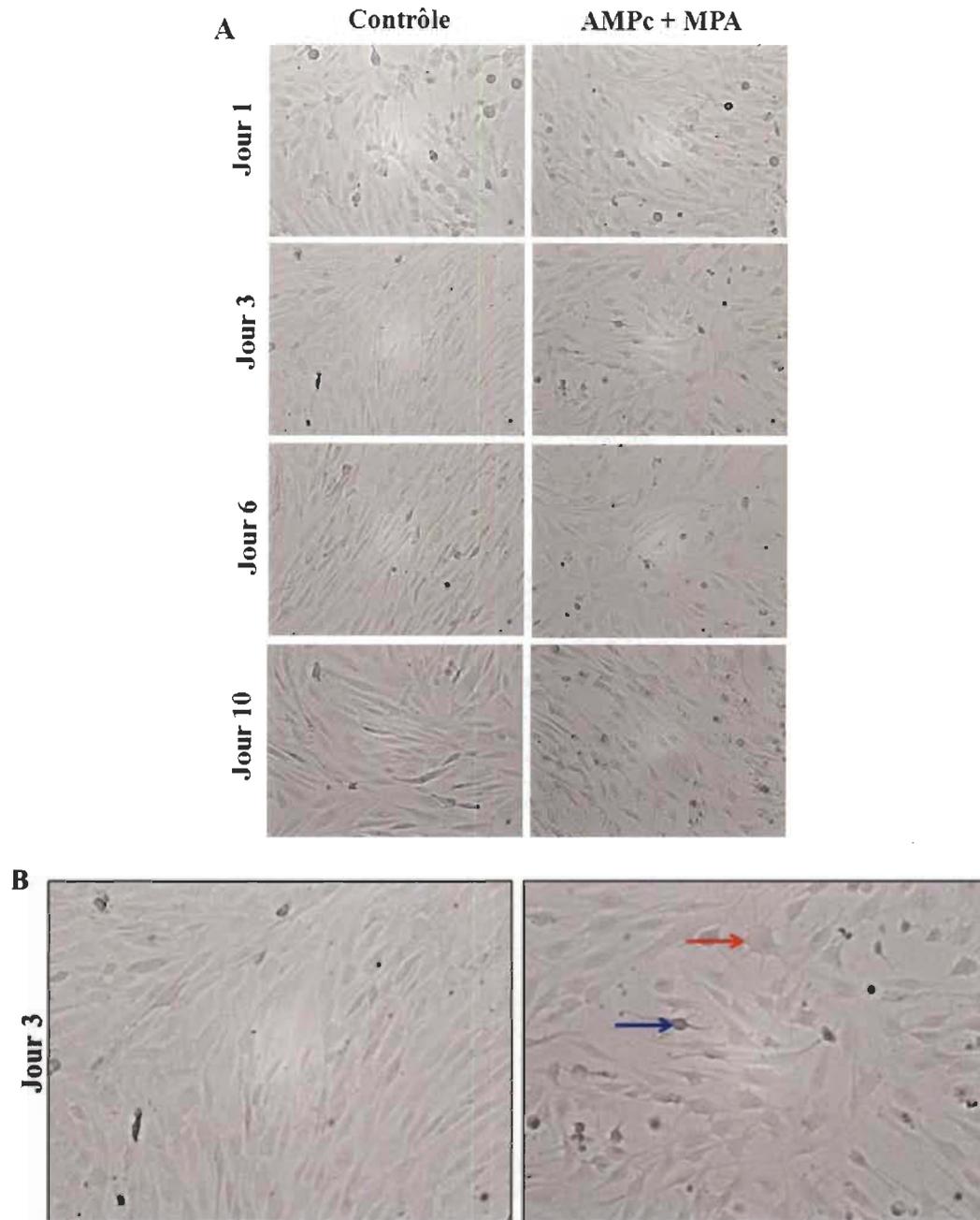


Figure 3.1 Changements morphologiques des HIESC induits par le stimulus de déciduation *in vitro*.

Les HIESC ont été traitées avec 0,5 mM d'AMPc et 1 μ M de MPA (déciduation; colonne de droite) ou avec le diluant (contrôle; colonne de gauche) et leur morphologie a été analysée par microscopie optique en contraste de phase avec un grossissement de 200X. A) Suivi des changements morphologiques aux jours 1, 3, 6, et 10 de la déciduation. B) Zoom sur le 3^e jour de la déciduation. Flèche rouge : cellule déciduale large et ronde. Flèche bleue : cellule déciduale possiblement binucléée.

3.1.2 Sécrétion du marqueur protéique prolactine par les HIESC décidualisées

Les niveaux du marqueur de décidualisation prolactine sécrétés dans le milieu de culture par les HIESC au fil de la décidualisation ont été mesurés par EIA. Ces résultats sont présentés à la Figure 3.2. Les cellules ayant reçu le traitement contrôle (C), représentées par les barres C1, C3, C6 et C10, secrètent un niveau de base relativement faible de prolactine. Les cellules ayant reçu le stimulus de décidualisation (D), par contre, présentent une augmentation significative de la sécrétion de prolactine et ce, dès le troisième jour de traitement, soit en même temps que les changements morphologiques observés en microscopie (Figure 3.1). Cet accroissement est soutenu et significatif au jour 6 également, et s'amenuise ensuite au jour 10.

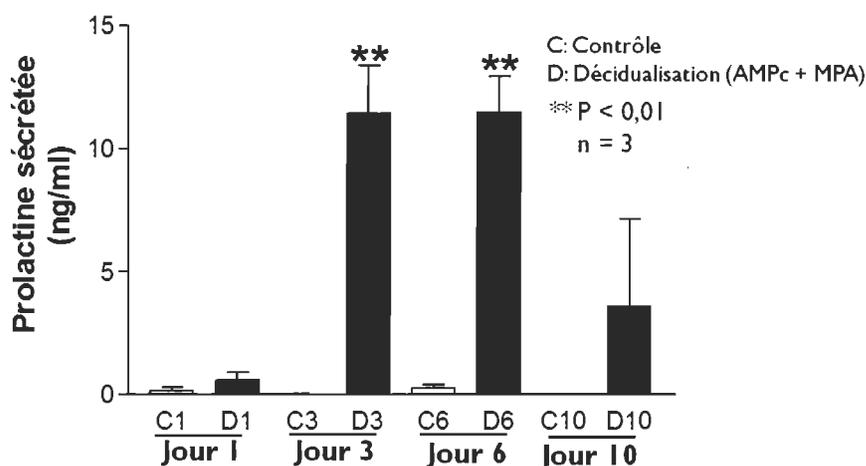


Figure 3.2 Prolactine sécrétée par les HIESC, mesurée aux jours 1, 3, 6 et 10 de la décidualisation.

Les HIESC ont été traitées avec 0,5 mM d'AMPc et 1 μ M de MPA (D) ou avec le diluant (C) pour les durées indiquées. Les mesures de la PRL sécrétée dans le milieu de culture des cellules ont été réalisées par EIA. Ces résultats représentent la moyenne +/- écart-type de trois expériences indépendantes. L'analyse statistique a été effectuée avec One-way ANOVA.

Globalement, en considérant les changements morphologiques des CSE et l'augmentation de la sécrétion de la PRL suite au traitement à l'AMPc et à la MPA, nous pouvons confirmer le succès de la procédure de décidualisation *in vitro* de notre lignée modèle HIESC.

3.2 Accumulation de p53 dans les HIESC au fil de la décidualisation

Le modèle de décidualisation *in vitro* ayant été validé, l'expression de la protéine p53 dans les HIESC a pu être analysée à diverses étapes de la décidualisation, soit aux jours 1, 3, 6 et 10. Les niveaux mesurés de la protéine p53 ont été normalisés en fonction des niveaux de la protéine β -actine, qui est exprimée de façon constitutive dans les cellules. Ces résultats sont exposés à la Figure 3.3. On peut observer que la quantité totale de la protéine p53 dans les CSE augmente significativement après induction de la décidualisation *in vitro* après 3 et 6 jours de traitement; une accumulation de p53 est mesurable à partir du jour 3 dans ces cellules et cette accumulation est supérieure au jour 6 qu'au jour 3 de même au jour 10 qu'au jour 6. Toutefois, la variation de l'expression de p53 au jour 10 de la décidualisation ne s'est pas avérée significative et ceci s'explique par l'instabilité des niveaux de β -actine dans les HIESC lors des différentes expériences.

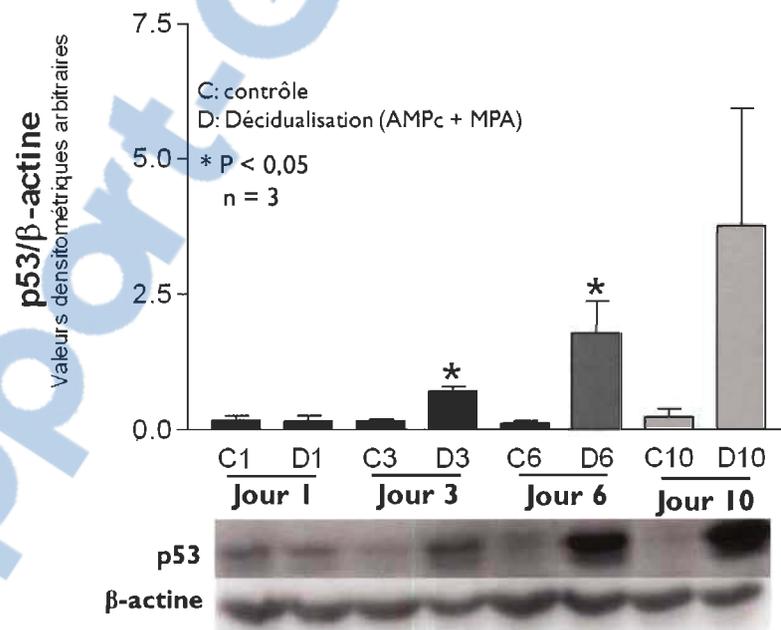


Figure 3.3 Expression de p53 dans les HIESC au fil de la décidualisation. Les HIESC ont été traitées avec 0,5 mM d'AMPc et 1 μ M de MPA (D) ou avec le diluant (C) pour les durées indiquées, puis la quantité de protéine p53 a été évaluée par WB. Ces résultats représentent la moyenne +/- écart-type de trois expériences indépendantes. L'analyse statistique a été effectuée à l'aide du test Student.

Ces résultats montrent que, non seulement la quantité de la protéine p53 est augmentée dans les HIESC en réponse à la décidualisation, mais p53 s'accumule progressivement dès le troisième jour de décidualisation. Toutefois, ils ne permettent pas de cerner par quel mécanisme l'accumulation de p53 survient, ni si cette protéine qui s'accumule se trouve sous sa forme active ou inactive.

3.3 Implication de la voie de la PKA dans la régulation de p53 durant la décidualisation

Après avoir démontré que p53 s'accumulait dans les HIESC au cours de la décidualisation, nous avons investigué si la voie de la PKA avait un rôle potentiel dans cette accumulation, puisqu'il s'agit d'une des deux voies activées lors de la procédure de décidualisation *in vitro*, via l'ajout d'AMPc. L'activité de la voie de la PKA peut être suivie par la mesure de la phosphorylation de la protéine « cAMP response element binding » (CREB).

3.3.1 Inhibition de la voie de la PKA dans les HIESC

D'abord, l'efficacité du H89, un inhibiteur pharmacologique de la voie de la PKA, le H89, a été vérifiée dans les HIESC. Le choix de la dose du H89 et du temps de traitement a été basé d'une part, sur ce qui était déjà fait dans notre laboratoire avec d'autres types de cellules et d'autre part, sur les données publiées [112]. Les HIESC ont ainsi été traitées avec le H89 à une concentration de 10 μ M, pour une durée d'une heure. Après ce traitement, les niveaux de la protéine CREB phosphorylée (P-CREB) ont été mesurés et comparés avec les niveaux totaux de la protéine CREB. Ces résultats apparaissent à la Figure 3.4, où l'on remarque que la phosphorylation de CREB a diminué significativement d'environ 50 % après traitement avec le H89 (barre H89) par comparaison avec le traitement à base de DMSO, son diluant (barre CTL). C'est l'inhibition la plus grande que nous ayons réussi à obtenir dans notre modèle expérimental.

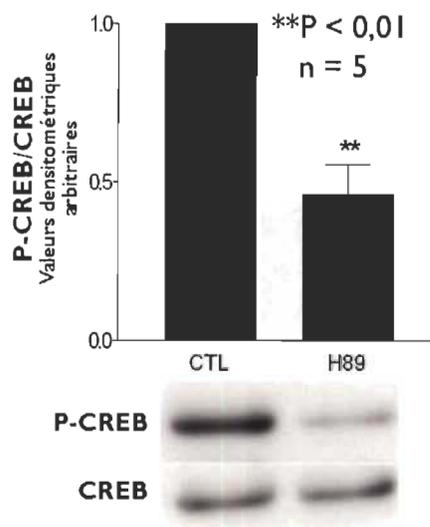


Figure 3.4 Inhibition pharmacologique de la voie de la PKA dans les HIESC.

Les HIESC ont été traitées avec 10 μ M de H89 durant 1 h puis les niveaux protéiques de P-CREB/CREB ont été mesurés par WB. Ces résultats représentent la moyenne \pm écart-type de cinq expériences indépendantes. L'analyse statistique a été effectuée à l'aide du test Student.

Ces résultats démontrent bien l'efficacité, limitée mais significative, du H89 pour inhiber la voie de la PKA dans les HIESC.

3.3.2 Inhibition de la voie de la PKA dans les HIESC en décidualisation

Pour déterminer le rôle de la voie de la PKA dans la régulation de p53 lors de la décidualisation *in vitro*, au jour 0 les HIESC ont d'abord été prétraitées avec le H89 10 μ M ou avec son diluant (DMSO) pendant 1 h, puis la décidualisation a été induite toujours en présence de H89. D'abord, l'impact de l'inhibition pharmacologique de la voie de la PKA sur la décidualisation *in vitro* des HIESC a été déterminé après trois jours de traitement en présence du H89. À cette fin, les changements morphologiques des HIESC et l'expression protéique du marqueur de décidualisation FOXO1 ont été analysés. La Figure 3.5 permet de constater que les HIESC n'ayant pas reçu le stimulus de décidualisation (images du haut), avaient une forme allongée, tandis que les HIESC décidualisées (images du bas), avaient une forme arrondie et ce malgré la présence du H89 (image du bas à droite).

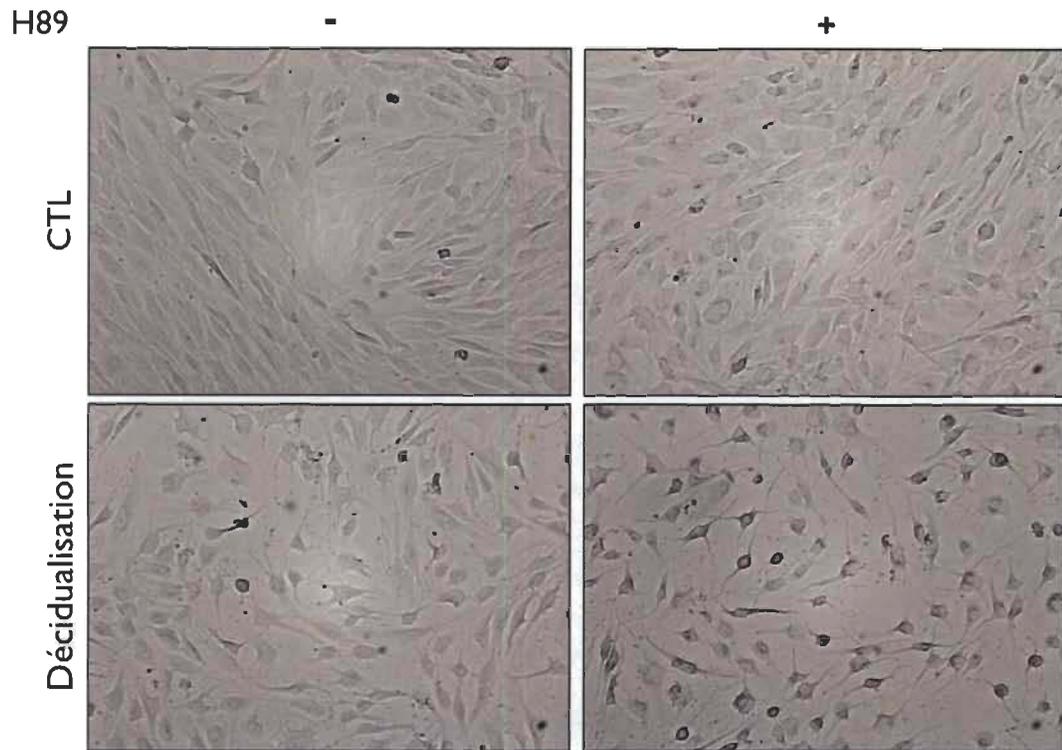


Figure 3.5 Morphologie des HIESC suite au prétraitement avec H89 suivi de trois jours de décidalisation en présence de H89.

Les HIESC ont été traitées avec le H89 10 μM ou son diluant (DMSO) pour une durée d'une heure, suivi du stimulus de décidalisation (0,5 mM d'AMPC et 1 μM de MPA) toujours en présence du H89, pendant trois jours. Photos prises par microscopie optique en contraste de phase (grossissement 200X).

Ceci indique donc que les HIESC ont subi des changements morphologiques caractéristiques des cellules déciduales malgré la présence de l'inhibiteur pharmacologique de la voie de la PKA. Mais qu'en est-il des changements protéiques spécifiques à la décidalisation? Pour vérifier cet aspect, l'analyse de l'expression protéique du marqueur de décidalisation FOXO1 par WB a été retenue [13]. Les résultats, illustrés à la Figure 3.6, montrent que les niveaux protéiques de FOXO1, normalisés sur ceux de la β -actine, ont augmenté de façon significative lors de la décidalisation que ce soit en présence ou en l'absence du H89. Cette analyse biochimique suggère que la décidalisation des CSE n'a pas été compromise.

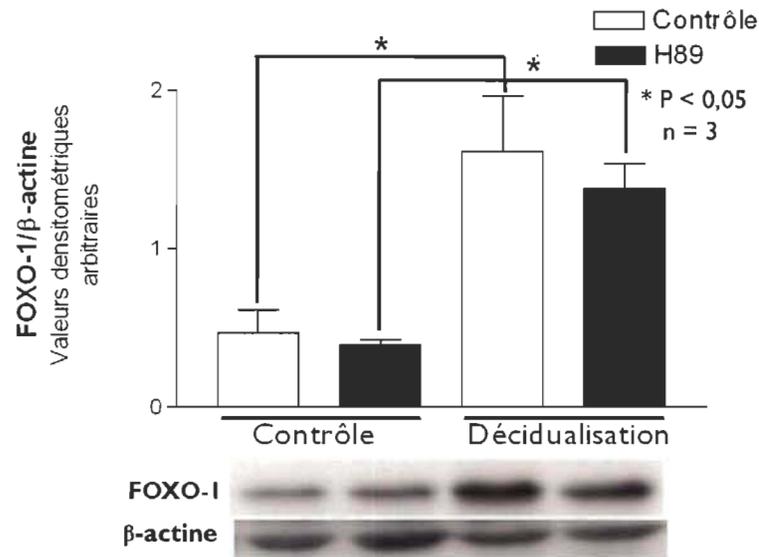


Figure 3.6 Expression de FOXO1 dans les HIESC suite au prétraitement avec H89 suivi de trois jours de décidualisation en présence de H89.

Les HIESC ont été traitées avec le H89 10 μ M ou son diluant (DMSO) pour une durée d'une heure, suivi du stimulus de décidualisation (0,5 mM d'AMPc et 1 μ M de MPA) toujours en présence du H89, pendant trois jours. La quantité de protéine FOXO1 a été évaluée par WB. Ces résultats représentent la moyenne \pm écart-type de trois expériences indépendantes. L'analyse statistique a été effectuée à l'aide du test Student.

Collectivement, les résultats des Figures 3.5 et 3.6 suggèrent que les HIESC ont subi une décidualisation malgré l'inhibition d'à peu près 50 % de la voie de la PKA par le H89 (Figure 3.4). Ceci n'exclut pas, par contre, que cette inhibition puisse avoir un impact sur p53 et c'est ce que nous avons déterminé.

Dans ce but, les niveaux totaux de la protéine p53 ont été dosés dans les cellules et comparés avec ceux de la β -actine. Ces résultats sont représentés à la Figure 3.7. En l'absence de H89, les niveaux de p53 ont augmenté significativement dans les HIESC après trois jours de décidualisation, ce qui est fidèle aux résultats obtenus à la Figure 3.3. Toutefois, en présence du H89, donc dans des conditions d'inhibition de la voie de la PKA, bien que la quantité de p53 tende à augmenter dans les HIESC après trois jours de décidualisation, l'augmentation n'est plus significative.

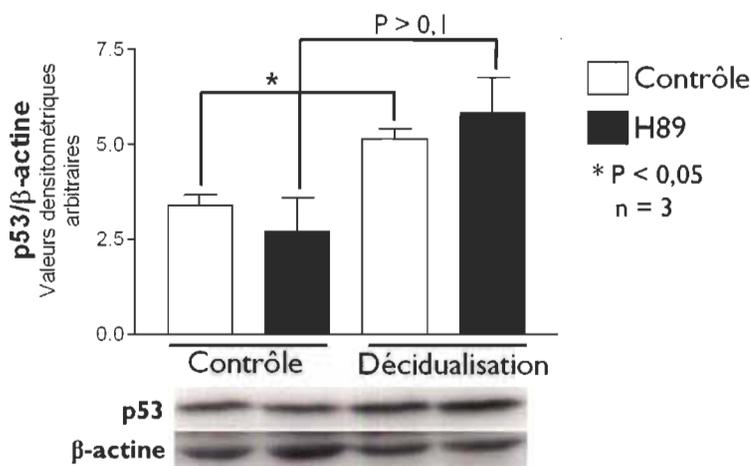


Figure 3.7 Expression de p53 dans les HIESC suite au prétraitement avec H89 suivi de trois jours de décidualisation en présence de H89.

Les HIESC ont été traitées avec le H89 10 μ M ou son diluant (DMSO) pour une durée d'une heure, suivi du stimulus de décidualisation (0,5 mM d'AMPc et 1 μ M de MPA) toujours en présence du H89, pendant trois jours. La quantité de protéine p53 a été évaluée par WB. Ces résultats représentent la moyenne \pm écart-type de trois expériences indépendantes. L'analyse statistique a été effectuée à l'aide du test Student.

L'augmentation de la quantité de p53 dans les HIESC en décidualisation n'est donc pas modulée lorsque la voie de la PKA est inhibée de moitié, ce qui suggère fortement que la régulation de la quantité de la protéine p53, dans ce contexte, est indépendante de la voie de la PKA. Cependant, en raison de la variabilité des résultats, il faudrait refaire l'expérience au moins une fois supplémentaire pour parvenir à une conclusion définitive.

3.4 Régulation de p53 par des modifications post-traductionnelles dans les HIESC au fil de la décidualisation

Suite à l'observation d'une augmentation de la quantité totale de la protéine p53 dans les HIESC pendant la décidualisation, le niveau d'activité de p53 et sa régulation ont également été étudiés. Puisque l'activité de p53 est grandement influencée par les différentes modifications post-traductionnelles qu'elle peut subir, ces dernières ont donc été examinées dans le contexte de la décidualisation. Les taux de phosphorylation de la Ser¹⁵ et d'acétylation de la Lys³⁸² de cette protéine ont été mesurés, même si chacune de

ces deux modifications post-traductionnelles de p53 est habituellement associée avec le maintien d'une conformation active de la protéine. Ces deux modifications de p53 sont parmi les mieux caractérisées et d'excellents anticorps sont disponibles commercialement pour leur analyse; enfin, l'impact des modifications post-traductionnelles sur une protéine est intégratif et non additionnel, de sorte que certaines modifications activatrices peuvent survenir en même temps que des modifications inhibitrices et dans ce cas, l'effet global sur l'état d'activité de la protéine est dicté par la balance entre les deux types de modifications, certaines en annulant d'autres.

3.4.1 Analyse de la variation de la phosphorylation de la sérine 15 de p53

En premier lieu, la quantité de protéine p53 phosphorylée sur Ser¹⁵ (P-p53) a été mesurée et normalisée sur la quantité totale de p53 dans les HIESC à diverses étapes de la décidualisation, soit aux jours 1, 3, 6 et 10 (Figure 3.8). D'abord, P-p53 était détectable dans les HIESC avant même de débiter la décidualisation ce qui indique que, dans nos conditions expérimentales, p53 est constitutivement phosphorylée; de plus ceci suggère que p53 est constitutivement active dans les HIESC. Ensuite, nous avons observé que le ratio de p53 phosphorylé sur la quantité totale de p53 était invariable dans les HIESC au fil de la décidualisation, ce qui indique que la protéine p53 qui s'accumule dans ce contexte est phosphorylée sur Ser¹⁵ et donc, que la décidualisation ne module pas les mécanismes responsables de la phosphorylation de p53. Enfin, ces résultats suggèrent que la protéine p53 qui s'accumule pourrait être active, étant donné que la phosphorylation sur Ser¹⁵ est connue pour avoir un effet positif sur l'activité de p53.

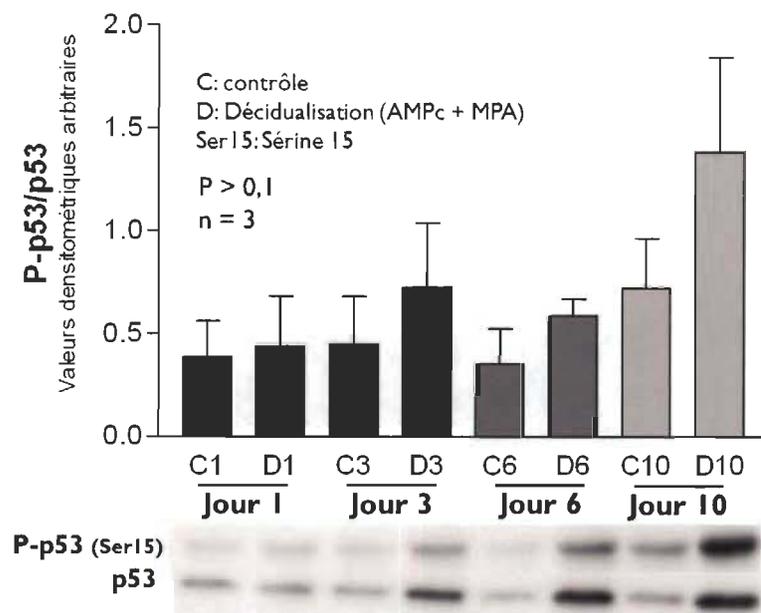


Figure 3.8 Variation de la phosphorylation de la sérine 15 de p53 dans les HIESC aux jours 1, 3, 6 et 10 de la décidualisation.

Les HIESC ont été traitées avec 0,5 mM d'AMPc et 1 μ M de MPA (D) ou avec le diluant (C) pour les durées indiquées. Les niveaux de P-p53 (Ser¹⁵)/p53 ont été mesurés par WB. Ces résultats représentent la moyenne +/- écart-type de trois expériences indépendantes. L'analyse statistique a été effectuée à l'aide du test Student.

3.4.2 Analyse de la variation de l'acétylation de la lysine 382 de p53

En second lieu, la quantité de protéine p53 acétylée sur Lys³⁸² (A-p53) a été mesurée et normalisée sur la quantité totale de p53 dans les HIESC à diverses étapes de la décidualisation, soit aux jours 1, 3, 6 et 10 (Figure 3.9). Dans le même sens que les résultats obtenus à la Figure 3.8, un niveau d'acétylation basal de p53 sur Lys³⁸² a été détecté, ce qui pourrait contribuer à conférer une activité basale à la protéine. De la même façon que la phosphorylation (Figure 3.8), le niveau d'acétylation de la Lys³⁸² de p53 n'a pas été modifié significativement par la décidualisation, de sorte que la protéine p53 qui s'accumule est acétylée ce qui suggère qu'elle soit activée. Collectivement, ces résultats et ceux présentés à la figure 3.8 suggèrent que, conséquemment à la phosphorylation sur Ser¹⁵ et l'acétylation sur Lys³⁸², la protéine p53 qui s'accumule dans les HIESC au fil de la décidualisation pourrait être active.

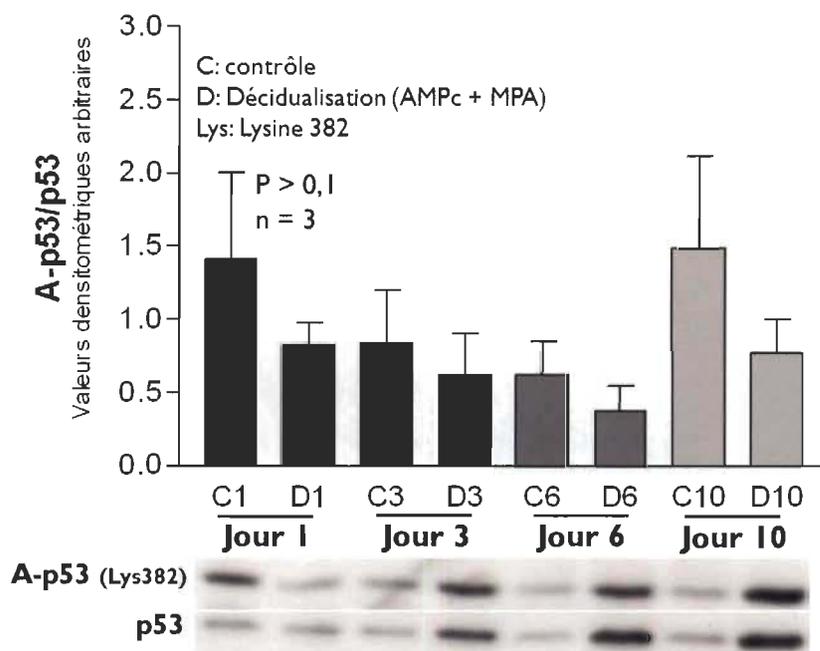


Figure 3.9 Variation de l'acétylation de la lysine 382 de p53 dans les HIESC aux jours 1, 3, 6 et 10 de la décidalisation.

Les HIESC ont été traitées avec 0,5 mM d'AMPc et 1 μ M de MPA (D) ou avec le diluant (C) pour les durées indiquées. Les niveaux d'A-p53 (Lys³⁸²)/p53 ont été mesurés par WB. Ces résultats représentent la moyenne +/- écart-type de trois expériences indépendantes. L'analyse statistique a été effectuée à l'aide du test Student.

En résumé, les résultats présentés jusqu'ici montrent que la protéine p53 s'accumule dans les HIESC en cours de décidalisation, mais que cette accumulation n'est pas accompagnée d'une modification de son état d'activation, si l'on se base sur l'analyse des deux modifications post-traductionnelles activatrices couramment étudiées sur p53. Ainsi, sa phosphorylation et son acétylation sur des résidus clés pourraient faire en sorte de maintenir la protéine dans une conformation active, lorsqu'elle s'accumule dans les HIESC en décidalisation. Toutefois, le type d'analyse effectué investigate l'état d'activation et non le niveau réel d'activité; d'autres types d'analyses sont nécessaires pour vérifier l'activité de p53 et la plus classique consiste à mesurer l'expression de gènes cibles du facteur de transcription.

3.5 Étude de l'activité de p53 à travers l'analyse de gènes cibles pendant la décidualisation

Tel que mentionné plus tôt, une des fonctions de la protéine p53 lorsqu'elle est activée est de réguler négativement le cycle cellulaire. Pour y parvenir, le facteur de transcription p53 contrôle l'expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire : il favorise notamment l'expression de gènes qui inhibent ce cycle, tel que p21, et réprime des gènes activateurs du cycle cellulaire, tels que cycline B1 et Cdc2 (Figure 1.9). Ces trois protéines ont donc servi à titre de marqueur de l'activité de p53.

3.5.1 Mesure des niveaux de la protéine p21 dans les HIESC

Premièrement, l'expression de la protéine p21 dans les HIESC a été mesurée à diverses étapes de la décidualisation, soit aux jours 1, 3, 6 et 10, et a été normalisée sur la β -actine. Ces résultats sont illustrés à la Figure 3.10. On remarque que l'induction de la décidualisation n'a pas provoqué de variation significative des niveaux de p21. Toutefois, p21 semble augmenter après le jour 1 et ce, indépendamment du stimulus de décidualisation. Bien que ces résultats ne soient pas significatifs, cette tendance suggère une hausse de l'activité de p53 dans les HIESC au cours de la décidualisation. Cependant, en raison de la grande variabilité des résultats, il faudrait répéter ces expériences pour parvenir à une conclusion définitive en ce qui concerne p21; de plus, il serait hâtif de conclure quant à l'activité de p53 sur la base d'un seul gène cible.

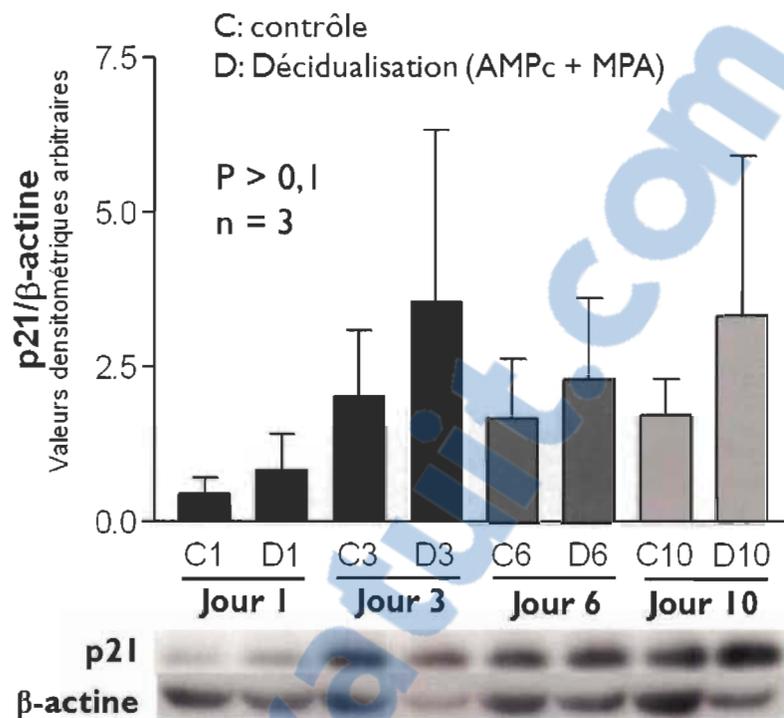


Figure 3.10 Variation des niveaux de la protéine p21 dans les HIESC aux jours 1, 3, 6 et 10 de la décidualisation.

Les HIESC ont été traitées avec 0,5 mM d'AMPc et 1 μ M de MPA (D) ou avec le diluant (C) pour les durées indiquées, puis la quantité de protéine p21 a été évaluée par WB. Ces résultats représentent la moyenne +/- écart-type de trois expériences indépendantes. L'analyse statistique a été effectuée à l'aide du test Student.

3.5.2 Mesure des niveaux de la protéine cycline B1 dans les HIESC

Deuxièmement, l'expression de la protéine cycline B1 dans les HIESC a été mesurée aux jours 1, 3, 6 et 10 de la décidualisation, et normalisée sur la β -actine. Ces résultats apparaissent à la Figure 3.11. On remarque que la quantité de cycline B1 tend à augmenter dans les cellules en réponse au stimulus de décidualisation, sans que ce soit significatif. Il serait approprié de répéter cette expérience étant donné la variabilité des résultats. Mais pour l'instant, puisque p53 régule négativement l'expression de cycline B1, ces résultats suggèrent qu'en réponse au stimulus de décidualisation, il n'y ait pas d'augmentation suffisante de l'activité de p53 pour qu'il y ait diminution de l'expression de son gène cible cycline B1.

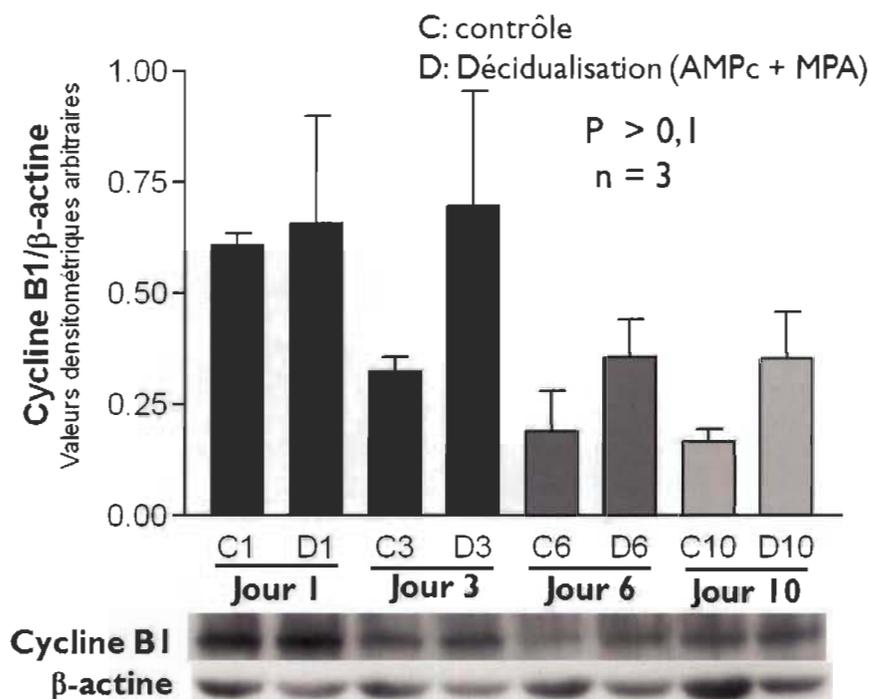


Figure 3.11 Variation des niveaux de la protéine cycline B1 dans les HIESC aux jours 1, 3, 6 et 10 de la décidualisation.

Les HIESC ont été traitées avec 0,5 mM d'AMPc et 1 μ M de MPA (D) ou avec le diluant (C) pour les durées indiquées, puis la quantité de protéine cycline B1 a été évaluée par WB. Ces résultats représentent la moyenne \pm écart-type de trois expériences indépendantes. L'analyse statistique a été effectuée à l'aide du test Student.

3.5.3 Mesure des niveaux de la protéine Cdc2 dans les HIESC

Troisièmement, l'expression de la protéine Cdc2 dans les HIESC a été mesurée aux jours 1, 3, 6 et 10 de la décidualisation et normalisée sur celle de la β -actine. La Figure 3.12 révèle les résultats obtenus. Cette fois, on note une augmentation significative du niveau de Cdc2 dans les cellules décidualisées par rapport aux cellules contrôles et ce, au sixième jour de la décidualisation. Bien que n'étant pas significative, cette tendance à la hausse est aussi notée au jour 3 de la décidualisation. Puisque p53 est un régulateur négatif de l'expression de Cdc2, tout comme pour cycline B1, ces résultats suggèrent que l'activité de p53 n'est globalement pas augmentée durant la décidualisation et même, pourrait être diminuée. Encore une fois, compte tenu de la grande variabilité des résultats, l'expérience serait à répéter.

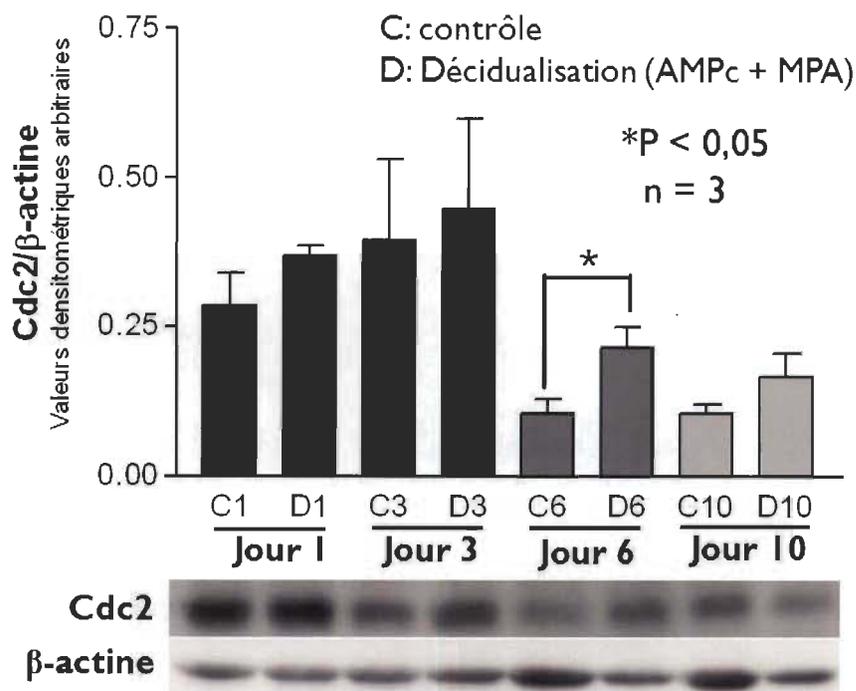


Figure 3.12 Variation des niveaux de la protéine Cdc2 dans les HIESC aux jours 1, 3, 6 et 10 de la décidualisation.

Les HIESC ont été traitées avec 0,5 mM d'AMPc et 1 μ M de MPA (D) ou avec le diluant (C) pour les durées indiquées, puis la quantité de protéine Cdc2 a été évaluée par WB. Ces résultats représentent la moyenne \pm écart-type de trois expériences indépendantes. L'analyse statistique a été effectuée à l'aide du test Student.

Collectivement, tous les résultats décrits plus haut suggèrent fortement que pendant la décidualisation, la protéine p53 s'accumule dans les HIESC, dans un état d'activation basal inchangé.

3.6 Localisation intracellulaire de p53 au cours de la décidualisation

La localisation de p53, au niveau cytoplasmique ou nucléaire, a d'importantes conséquences sur son activité et sa fonction dans la cellule. Nous avons donc évalué la localisation intracellulaire de p53 dans les HIESC durant la décidualisation. Ces résultats sont exposés à la Figure 3.13. Contrairement à notre hypothèse de départ selon laquelle p53 pourrait être exportée du noyau cellulaire pour être inactivée lors de la décidualisation, la localisation intracellulaire de p53 est demeurée invariable tout au long de la

décidualisation. Que ce soit dans les cellules contrôles, dans la colonne de gauche, ou dans les cellules décidualisées, dans la colonne de droite, on visualise bien que p53, représenté par le marquage rouge, se situait principalement dans le compartiment nucléaire, co-localisé avec l'ADN nucléaire, qui était coloré en bleu grâce au Hoeschst. Bien que l'immunofluorescence ne permette en rien une évaluation quantitative ou même semi-quantitative d'une protéine d'intérêt dans les cellules, nous avons observé que le marquage rouge, représentant p53, apparaissait plus intense dans les cellules recevant le stimulus de décidualisation, ce qui est en accord avec l'observation de l'accumulation de la protéine totale au fil de la décidualisation (Figure 3.3). Quoiqu'il en soit, l'analyse de la localisation intracellulaire de p53 devra être faite par une procédure alternative, telle que le fractionnement cytosolique-nucléaire.

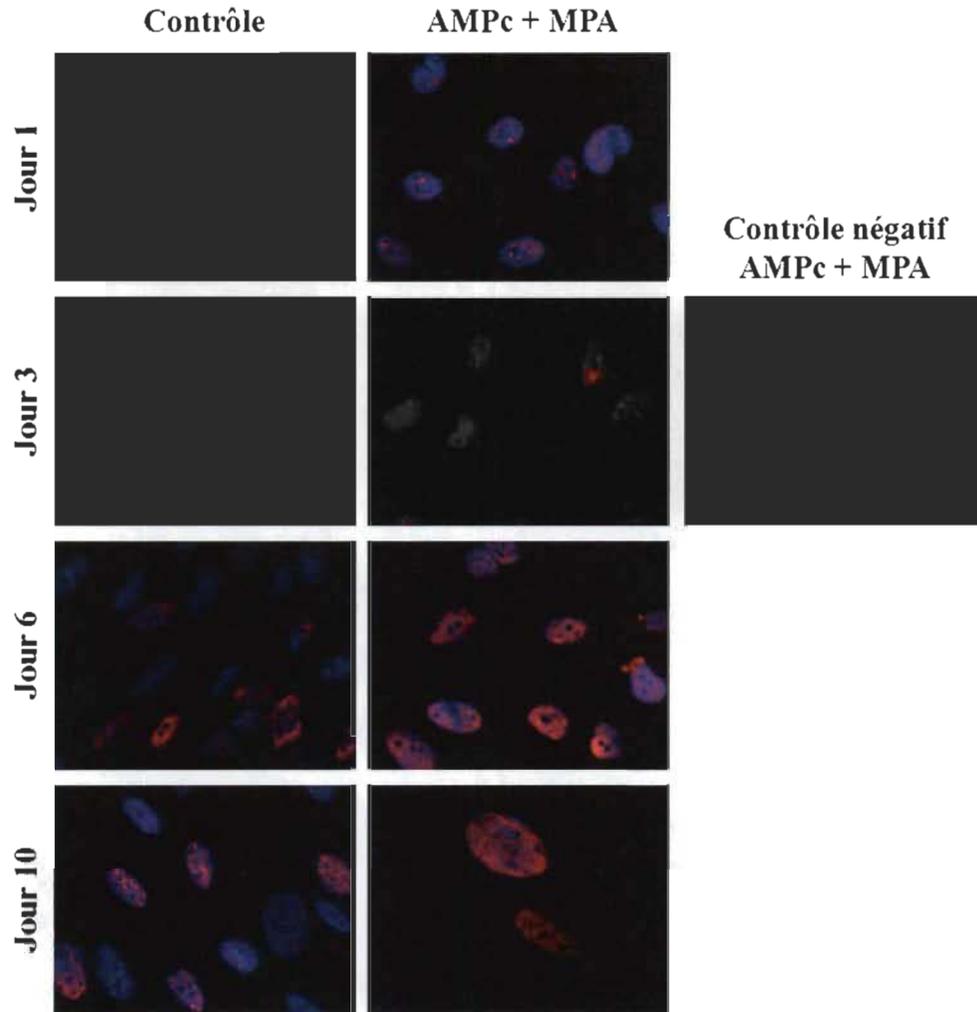


Figure 3.13 Photo de la localisation intracellulaire de p53 dans les HIESC aux jours 1, 3, 6 et 10 de la décidualisation.

Les HIESC ont été traitées avec 0,5 mM d'AMPc et 1 μ M de MPA ou avec le diluant (Contrôle) pour les durées indiquées, puis la localisation intracellulaire de p53 a été examinée par microscopie à immunofluorescence (Grossissement 630X). Bleu : ADN (Hoechst) Rouge : p53 (Alexa).

CHAPITRE IV

DISCUSSION

La régulation et le rôle de p53 dans les cellules endométriales stromales au cours de la grossesse, et plus précisément pendant la décidualisation, n'a jamais été investigué en profondeur. Pourtant, p53 est un régulateur majeur de la prolifération et la survie cellulaire en général, et ces processus sont grandement sollicités au cours de la décidualisation. Dans le cadre de ma maîtrise, j'ai eu l'opportunité d'investiguer la régulation de la protéine p53 dans les HIESC au fil de la décidualisation.

Pour débiter ce travail de recherche, j'ai mis au point un modèle de décidualisation *in vitro* des HIESC. Comme cette expérience était réalisée pour la première fois dans le laboratoire de ma directrice de recherche, j'ai aussi vérifié la validité de notre modèle. En réponse à un traitement à l'AMPc et à la MPA, les HIESC ont exhibé des changements morphologiques et protéomiques entièrement conformes au modèle de décidualisation décrit par nos prédécesseurs [25] : d'une part, les cellules ont acquis une forme large et ronde caractéristique, et d'autre part, elles ont sécrété un niveau plus élevé du marqueur de décidualisation prolactine.

Notre modèle expérimental optimisé, j'ai pu étudier l'impact du stimulus de décidualisation sur la régulation de la protéine p53 dans les HIESC. Mes travaux ont permis de mettre en lumière une accumulation substantielle de la protéine p53 dans les HIESC en cours de décidualisation *in vitro* induite par AMPc et MPA. Ces résultats sont en accord avec des études précédentes effectuées par d'autres équipes de recherche et utilisant des modèles expérimentaux distincts du nôtre : 1) une augmentation de p53 avait déjà été rapportée dans des cultures primaires de CSE humaines traitées avec de l'AMPc seulement [2]; 2) puis *in vivo*, chez les cellules endométriales du rat durant la deuxième phase de la décidualisation [107].

Mes travaux ont cependant permis de comprendre davantage la cinétique de ce processus. En effet, dans notre modèle, l'accumulation significative de p53 est mesurable dès le troisième jour du processus de décidualisation *in vitro*, alors que dans la seule autre étude disponible, elle n'avait été investiguée qu'après 6 jours de traitement. L'augmentation de la quantité totale de p53 que nous avons observée dans les HIESC dès le 3^e jour de décidualisation coïncidait avec l'induction des changements morphologiques et de la sécrétion du marqueur de décidualisation prolactine : ceci suggère une possibilité jamais encore investiguée, soit celle d'un rôle possible pour p53 dans le contrôle de la décidualisation. J'ai été emballée par cette perspective et de nombreuses questions ont fait surface : Quel est le rôle de cette accumulation de p53 dans les CSE en décidualisation? Par quels mécanismes cette accumulation de p53 est-elle régulée? Est-ce que l'activité transactivatrice de p53 sur ses gènes cibles est modulée dans ces cellules au fil de la décidualisation?

Le plus souvent, p53 s'accumule dans les cellules en réponse à un stress génotoxique, ce qui provoque un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 ou G2 pour permettre la réparation de l'ADN, sans quoi l'apoptose est induite [52, 53]. Toutefois, la présence d'un stress génotoxique dans les HIESC en décidualisation est très peu probable et n'a jamais été décrite. Une élévation soutenue de p53 est également associée aux cellules cancéreuses qui expriment une forme mutante de la protéine qui ne peut se lier sur le promoteur de son gène cible MDM2. Cette mutation de p53 conduit à sa stabilisation et son accumulation dans les cellules cancéreuses [113]. Dans notre contexte, il est possible que l'accumulation de p53 que nous observons, résulte d'une régulation à la baisse de MDM2, principale protéine régulatrice des niveaux de p53 dans la cellule. En effet, une équipe a déjà observé une diminution de la quantité totale de la protéine MDM2 dans des CSE après 6 et 12 jours de traitement avec de l'AMPc [2]. Par conséquent, il serait pertinent d'étudier l'expression de la protéine MDM2 au fil de la décidualisation. Toutefois, faute d'avoir pu optimiser une procédure de détection de MDM2 par immunobuvardage de type Western pendant le temps dont je disposais, je n'ai pu vérifier cette hypothèse. Une étudiante qui complète actuellement le projet de recherche que j'avais entamé dans le laboratoire du Dr Van Themsche aura l'opportunité de le faire.

Il est possible que la validité de notre modèle expérimental soit remise en question puisque les HIESC ont été immortalisées à l'aide de l'antigène T large de SV40, et que celui-ci peut modifier l'activité de p53. En effet, l'antigène T large de SV40 est un puissant proto-oncogène capable de transformer un large éventail de lignées cellulaires. Il agit principalement en inactivant des suppresseurs de tumeur dans la cellule, dont la protéine du rétinoblastome (Rb) et p53 [114]. Toutefois, il a été démontré que dans certains types de cellules, cette transformation est indépendante de p53 [115, 116]. Dans les HIESC utilisées au cours de notre travail de recherche, il nous a été possible d'observer une augmentation de la quantité de p53 suite au stimulus de décidualisation. De plus, des niveaux de base de phosphorylation de p53 sur la Ser¹⁵ et d'acétylation de p53 sur Lys³⁸² ont été détectés. Cette modulation de l'expression de la protéine p53 et la présence de ces modifications post-traductionnelles activatrices suggèrent que, dans notre modèle, l'antigène T large de SV40 n'inactive pas cette protéine. Enfin, pour exclure définitivement cette probabilité, il serait pertinent de réaliser une expérience qui nous permettrait d'étudier l'interaction entre ces deux protéines, la co-immunoprécipitation par exemple.

Deux voies de signalisation sont activées lors de l'induction de la décidualisation des HIESC *in vitro* : la voie de la PKA, et celle de la P₄. L'implication de la voie de la PKA a été examinée dans le cadre des travaux présentés ici, parce que certains auteurs ont déjà observé que, dans l'étude de la décidualisation citée plus haut, l'augmentation de p53 survenait dans des cellules traitées à l'AMPC seulement, donc en absence de P₄ [2].

Un inhibiteur pharmacologique de la voie de la PKA, le H89, a donc été employé afin d'inhiber cette voie et vérifier l'impact sur l'expression de p53 au fil de la décidualisation *in vitro*. Il était souhaitable d'obtenir des conditions d'utilisation dans lesquelles le H89 pourrait ralentir l'activité de la voie de la PKA sans entraver le processus de décidualisation *in vitro*. Les résultats obtenus ont démontré que le traitement des HIESC avec le H89, a diminué l'activité de la voie de la PKA d'environ 50 %. Cette baisse a été jugée comme étant minimale mais satisfaisante pour analyser l'impact de la voie de la PKA sur l'expression de p53 au cours de la décidualisation. Les résultats de l'analyse

de l'expression de p53, dans ces conditions d'inhibition de la voie de la PKA, ont révélé que, bien que la quantité de p53 tende à augmenter dans les HIESC après trois jours de décidualisation, l'augmentation n'est plus significative. Il est donc possible que l'expression de p53 durant la décidualisation soit indépendante de la voie de la PKA.

Ces résultats méritent cependant d'être confirmés par des expériences supplémentaires, étant donné que : 1) les expériences que j'ai faites examinaient seulement l'impact de l'inhibition de la voie de la PKA après trois jours de décidualisation. Il serait utile de les réaliser dans le contexte d'une décidualisation prolongée, à six jours de décidualisation notamment, où nous observons une augmentation significative de la quantité de p53 dans les HIESC; 2) H89 présentent une grande variabilité d'une expérience à l'autre et il m'est arrivé fréquemment de ne pas réussir à atteindre la valeur seuil que nous nous étions fixée de 50 % d'inhibition du ratio P-CREB/CREB. Ces expériences étaient rejetées mais elles constituent un indice permettant de soupçonner que l'efficacité du H89 n'était pas constante dans nos conditions expérimentales. À cet égard, bien que le H89 soit commercialisé à titre d'inhibiteur sélectif de la voie de la PKA, il n'est pas complètement spécifique à celle-ci et peut inhiber d'autres kinases [117]. Par conséquent, la grande variabilité de l'impact du H89 sur la quantité totale de la protéine p53 pourrait résulter d'une inhibition inconstante d'autres kinases que la PKA. Des études complémentaires seront donc nécessaires pour établir définitivement le rôle de la PKA dans la régulation de p53 dans les HIESC; l'approche que l'équipe du Dr Van Themsche a choisie pour l'avenir est celle de l'ARN d'interférence.

Il n'est pas exclu que la voie de signalisation induite par la P₄ soit également impliquée dans la régulation de l'expression de p53 dans notre modèle de décidualisation. Étant donné que la voie de la PKA et celle de la P₄ convergent lors de la décidualisation, les deux voies pourraient être responsables de moduler l'expression de p53. Des travaux destinés à vérifier cette hypothèse sont actuellement en cours dans le laboratoire du Dr Van Themsche, à l'aide du stéroïde synthétique RU486 inhibant l'action de la P₄.

L'accumulation de la quantité de p53 dans une cellule peut résulter de différentes modifications post-traductionnelles qui affectent la stabilité autant que l'état d'activation de la protéine. Deux de ces modifications ont été étudiées dans le présent travail soit la phosphorylation de la sérine 15 et l'acétylation de la lysine 382. Or, les quantités de p53 phosphorylée sur Ser¹⁵ et de p53 acétylée sur Lys³⁸² n'ont pas présenté de variation significative au cours du processus de décidualisation *in vitro*, pour la lignée de cellules HIESC. Ainsi, la protéine p53 qui s'accumule au cours de ce processus est à la fois phosphorylée et acétylée, sur des résidus clés associés au maintien de la conformation active de cette protéine. Ceci suggère que p53 puisse être active dans ces conditions, contrairement à notre hypothèse de départ. Toutefois, il faut émettre quelques réserves sur cette affirmation : d'autres modifications post-traductionnelles peuvent survenir sur p53, dont certaines sont activatrices et d'autres, inhibitrices. Ainsi, plusieurs autres sites sur la protéine p53 pourraient faire l'objet d'analyse, dans le contexte de la décidualisation des HIESC, pour compléter cet aspect de l'étude : par exemple, la phosphorylation de la sérine 20 [118, 119] ou l'acétylation des autres lysines de la partie C-terminale (Lys³⁷⁰, Lys³⁷², Lys³⁷³, Lys³⁸¹, Lys³⁸⁶) (Figure 1.7) [120].

Enfin, dans le but d'évaluer l'activité du facteur de transcription p53 dans les HIESC au fil de la décidualisation, l'expression de quelques-uns de ses gènes cibles, qui sont impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, a été étudiée. Parce que notre laboratoire possédait une expertise très limitée à ce moment au niveau de la PCR en temps réel, j'ai consacré mes efforts à la quantification de l'expression des cibles de p53 au niveau protéique. La première protéine analysée a été p21. Celle-ci est une protéine qui inhibe le cycle cellulaire, et il est bien établi dans différents modèles, mais pas encore investigué dans les HIESC, que p53 augmente son expression [52]. Si p53 régule positivement l'expression de p21 dans les HIESC, les niveaux de p21 et de p53 devraient varier dans le même sens au fil de la décidualisation. Toutefois, en lien avec l'hypothèse générale selon laquelle p53 serait inactivée durant la décidualisation, on s'attendait à ce que les niveaux de p21 ne soient pas modulés dans les cellules au fil de la décidualisation. En accord avec notre hypothèse, nos résultats ont démontré que l'induction de la décidualisation n'a pas engendré de variation significative des niveaux de p21, ce qui suggère que p53 n'est pas

actif dans les HIESC en décidualisation. Par contre, il est documenté que p21, outre son rôle au sein du cycle cellulaire, est aussi un acteur important dans la différenciation cellulaire et que, dans ce contexte, son expression peut être indépendante de p53 [121, 122]. Puisque d'autres facteurs de transcription que p53 régulent habituellement l'expression de p21 dans les divers types cellulaires [121, 122], il est possible que p21 ne soit pas un bon marqueur pour suivre l'état d'activité de p53 dans les HIESC. D'ailleurs, dans une étude récente, les niveaux de la protéine p21 corrélaient négativement avec ceux de la protéine p53 dans les HIESC en décidualisation *in vitro* [20]. Il était donc crucial de combiner l'analyse de p21 avec celle d'autres cibles de p53.

Dans le contexte de la régulation du cycle cellulaire, p53 active peut inhiber l'expression des protéines Cdc2 et cycline B1 empêchant ainsi la formation du complexe Cdc2/cycline B1 essentiel à la progression du cycle cellulaire de la phase G2 à M. Nous avons donc choisi d'analyser l'expression de ces deux protéines dans les HIESC au fil de la décidualisation. La cycline B1 remplit un rôle d'activateur du cycle cellulaire et son expression est régulée à la baisse lorsque p53 est active [123]. Ainsi, si p53 est activée pendant la décidualisation, l'expression de cycline B1 devrait diminuer. Or, nous n'avons observé aucune variation significative des niveaux de cycline B1 lors de la décidualisation. Même si nos résultats montraient une grande variabilité, nous avons plutôt observé une tendance à la hausse de la quantité de cycline B1 dans les cellules en réponse au stimulus de décidualisation, ce qui renforcerait l'hypothèse selon laquelle p53 serait inactivée durant ce processus. Toutefois, les résultats que nous avons obtenus vont à l'encontre de ce qui avait déjà été démontré par Tang et ses collaborateurs [32] : ceux-ci avait constaté que l'expression de la cycline B1, dans des cultures primaires de cellules endométriales humaines, diminuait sous l'effet de la P₄. Ceci peut s'expliquer entre autres, par la différence entre les modèles expérimentaux : l'équipe de Tang a travaillé avec des cultures primaires de cellules endométriales humaines constituées de cellules stromales et épithéliales, nous avons travaillé plus spécifiquement avec des cellules endométriales stromales.

Comme c'est le cas pour cycline B1, l'expression de Cdc2 au cours du cycle cellulaire, est aussi régulée négativement par l'activité de p53 [124]. Nos résultats ont révélé une augmentation significative du niveau de Cdc2 dans les cellules décidualisées par rapport aux cellules contrôles au sixième jour de la décidualisation et une fois de plus, ces résultats corroborent l'hypothèse selon laquelle p53 serait inactivée durant la décidualisation.

Les expériences concernant les changements au niveau de l'expression des cibles transcriptionnelles de p53, soit p21, cycline B1 et Cdc2, sont difficiles à interpréter dû au fait que leurs niveaux changent dans les cellules contrôles au cours de l'expérience. Ceci suggère qu'un arrêt du cycle cellulaire se produit, potentiellement parce que les cellules deviennent confluentes. Les changements dans les cellules décidualisées qui devraient déjà avoir arrêté leur cycle cellulaire sont donc difficiles à comparer avec les cellules contrôles. Enfin, puisque la régulation du cycle cellulaire durant la décidualisation est encore mal comprise, il est possible que d'autres mécanismes influencent l'expression des trois protéines de manière p53-indépendante, ce qui pourrait expliquer la grande variabilité de nos résultats.

En conclusion, en accord avec l'analyse des modifications post-traductionnelles décrite plus haut, l'analyse de l'expression de gènes cibles de p53 durant la décidualisation suggère fortement que l'accumulation de p53 ne s'accompagne pas d'une recrudescence de son activité. Néanmoins, en raison de la variabilité des résultats, ces expériences devraient être répétées pour arriver à une conclusion définitive. Aussi, pour confirmer ces résultats, il faudrait mesurer, par PCR, les niveaux des transcrits des principaux gènes cibles de p53 qui ont fait l'objet de cette étude, soient p21, cycline B1 et Cdc2.

Pour compléter mon travail de recherche, l'analyse de la localisation intracellulaire de p53 à l'aide de l'immunofluorescence a révélé que p53 était essentiellement confinée dans le compartiment nucléaire des HIESC au repos et que cette localisation demeurerait constante tout au long de la décidualisation. Ces observations pourraient être confirmées par une méthode biochimique courante, soit celle du fractionnement cytoplasmique-

nucléaire. Nos résultats actuels, conjointement avec ceux de l'accumulation de p53 au cours de la décidualisation, suggèrent fortement que la protéine p53 s'accumule principalement au niveau du noyau des HIESC au fil de la décidualisation. Si c'est le cas, ceci contreviendrait donc à notre hypothèse de départ selon laquelle p53, lors de la décidualisation, serait exportée du noyau cellulaire pour être inactivée. De façon générale, la localisation nucléaire de p53 est associée à la présence d'activité transcriptionnelle, mais il est aussi possible que cette protéine se trouve dans le noyau, lié à l'ADN tout en étant inactive [98]. Ceci suscite donc un questionnement quant au rôle de la protéine p53 inactive qui s'accumule dans le noyau des CSE durant un processus physiologique aussi important et finement régulé que la décidualisation. L'hypothèse qui nous semble la plus plausible est celle où le facteur de transcription p53 inactivé serait lié à l'ADN au niveau des sites consensus du promoteur de ses gènes cibles, mais incapable de réguler leur expression. Ceci pourrait empêcher d'autres facteurs de transcription d'exercer leur fonction de redondance ou de compensation, de sorte que l'expression des gènes cibles de p53, dans ce contexte, soit stablement compromise afin de permettre que la décidualisation se déroule avec succès.

CHAPITRE V

CONCLUSION

La décidualisation des CSE est primordiale à la réussite de l'implantation de l'embryon et au bon déroulement de la grossesse ce qui en fait donc une étape cruciale dans la physiologie de la reproduction. L'expression de la protéine p53, qui augmente plus particulièrement en seconde phase de la décidualisation [2, 107], est importante dans la fonction reproductrice maternelle [125]. Toutefois les mécanismes de régulation de la protéine p53 ainsi que son rôle dans le processus de décidualisation ne sont pas clairement établis.

Au cours de ce travail de recherche, un modèle de décidualisation *in vitro* de CSE humaines immortalisées (HIESC) a été validé morphologiquement et fonctionnellement. Dans ce modèle de décidualisation, une accumulation significative de la protéine p53 dans les HIESC a été démontrée et ce, dès le troisième jour de traitement; nous avons obtenu des indications expérimentales suggérant que cette accumulation est indépendante de la voie de la PKA. Il n'est toutefois pas possible d'énoncer une conclusion définitive, en raison de la variabilité de nos résultats. De plus, l'accumulation de p53 dans les HIESC, tout au long de la période de décidualisation *in vitro*, ne s'accompagne pas d'une accumulation de certaines modifications post-traductionnelles activatrices ni d'une recrudescence de son activité sur ses gènes cibles traditionnels : au contraire, l'activité de p53 semble fortement diminuée dans ce contexte. Enfin, si p53 a été localisée principalement dans le compartiment nucléaire des HIESC maintenues en conditions basales, cette situation est demeurée inchangée au cours de la décidualisation.

Toutes ces nouvelles données montrent comment la protéine p53 est régulée au niveau du noyau des CSE au cours du processus de décidualisation, où elle serait maintenue dans une conformation inactive. Ceci renforce notre hypothèse selon laquelle

p53 doit être inactivée dans les CSE pour permettre une décidualisation adéquate et le maintien de la grossesse. Les mécanismes impliqués dans l'accumulation et l'inactivation de p53 méritent d'être approfondis, autant que son rôle et l'importance de son activation.

Au terme de mes travaux, de nombreuses perspectives de recherche sont dégagées :

- 1) Déterminer le rôle de p53 dans les HIESC en décidualisation. La technique d'interférence ARN de p53 pourrait être utilisée afin de déterminer si p53 est nécessaire au processus de décidualisation; si p53 s'accumule sous une forme inactive dans le noyau cellulaire de manière à assurer l'inhibition de la transactivation de ses gènes cibles par des facteurs de transcription redondants, l'interférence à l'ARN de p53 devrait permettre une régulation à la hausse de cycline B1 et Cdc2 lors de la décidualisation;
- 2) Vérifier l'implication potentielle de la voie de la P4 dans l'accumulation de p53, pour enrichir notre compréhension sur la manière dont est régulé cet important facteur de transcription dans le contexte de la décidualisation. L'interférence à l'ARN, de même que l'inhibition pharmacologique du récepteur à la progestérone, sont deux avenues simples et peu coûteuses qui pourront être empruntées à cette fin;
- 3) Compléter l'étude de la régulation post-traductionnelles de p53, par l'analyse de différentes modifications activatrices et inhibitrices associées à cette protéine. Ceci nous renseignera sur les mécanismes qui régulent l'état d'activation de la protéine et potentiellement, sa localisation intracellulaire également;
- 4) Analyser l'expression de p53 et ses gènes cibles au niveau transcriptionnel dans les HIESC en décidualisation, par la technique de PCR en temps réel. Il est possible que p53 ne soit pas régulée par le palier transcriptionnel puisque l'augmentation de la quantité de cette protéine survient suite à un délai relativement prolongé, soit trois jours de décidualisation. Également, nous proposons que ses gènes cibles cycline B1 et Cdc2 ne montreront pas de variation transcriptionnelle au fil de la décidualisation, ce qui confirmerait notre hypothèse selon laquelle p53 est inactivée pendant ce processus;
- 5) En dernier lieu, il serait important de vérifier si les résultats obtenus dans notre modèle de décidualisation *in vitro* sont reproductibles dans un modèle *in vivo*. À cette fin, l'équipe du Dr Van Themsche planifie recourir au modèle de décidualisation *in vivo* chez le rat. Il sera possible de collecter le stroma endométrial des animaux et de faire l'analyse *ex vivo* de la protéine p53 et ses cibles.

Collectivement, ces expériences en association avec celles que j'ai déjà conduites permettront d'acquérir une connaissance nouvelle du rôle et de la régulation de p53 dans le processus de décidualisation des CSE. Toutes les informations recueillies seront très importantes pour atteindre une meilleure compréhension de la physiologie et de la biologie cellulaire de la fonction reproductrice maternelle.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Brar AK, Frank GR, Kessler CA, Cedars MI, Handwerger S: **Progesterone-dependent decidualization of the human endometrium is mediated by cAMP.** *Endocrine* 1997, **6**(3):301-307.
2. Pohnke Y, Schneider-Merck T, Fahnenstich J, Kempf R, Christian M, Milde-Langosch K, Brosens JJ, Gellersen B: **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):5233-5244.
3. Brosens JJ, Pijnenborg R, Brosens IA: **The myometrial junctional zone spiral arteries in normal and abnormal pregnancies: a review of the literature.** *Am J Obstet Gynecol* 2002, **187**(5):1416-1423.
4. Tan Y, Li M, Cox S, Davis MK, Tawfik O, Paria BC, Das SK: **HB-EGF directs stromal cell polyploidy and decidualization via cyclin D3 during implantation.** *Dev Biol* 2004, **265**(1):181-195.
5. Ma X, Gao F, Rusie A, Hemingway J, Ostmann AB, Sroga JM, Jegga AG, Das SK: **Decidual cell polyploidization necessitates mitochondrial activity.** *PLoS One* 2011, **6**(10):e26774.
6. Gellersen B, Brosens J: **Cyclic AMP and progesterone receptor cross-talk in human endometrium: a decidualizing affair.** *The Journal of endocrinology* 2003, **178**(3):357-372.
7. Tierney EP, Tulac S, Huang ST, Giudice LC: **Activation of the protein kinase A pathway in human endometrial stromal cells reveals sequential categorical gene regulation.** *Physiol Genomics* 2003, **16**(1):47-66.
8. Gilchrist RL, Ryu KS, Ji I, Ji TH: **The luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor has distinct transmembrane conductors for cAMP and inositol phosphate signals.** *The Journal of biological chemistry* 1996, **271**(32):19283-19287.
9. Telgmann R, Maronde E, Tasken K, Gellersen B: **Activated protein kinase A is required for differentiation-dependent transcription of the decidual prolactin gene in human endometrial stromal cells.** *Endocrinology* 1997, **138**(3):929-937.

10. Daly DC, Maslar IA, Riddick DH: **Prolactin production during in vitro decidualization of proliferative endometrium.** *Am J Obstet Gynecol* 1983, **145**(6):672-678.
11. Brosens JJ, Hayashi N, White JO: **Progesterone receptor regulates decidual prolactin expression in differentiating human endometrial stromal cells.** *Endocrinology* 1999, **140**(10):4809-4820.
12. Telgmann R, Gellersen B: **Marker genes of decidualization: activation of the decidual prolactin gene.** *Hum Reprod Update* 1998, **4**(5):472-479.
13. Christian M, Zhang X, Schneider-Merck T, Unterman TG, Gellersen B, White JO, Brosens JJ: **Cyclic AMP-induced forkhead transcription factor, FKHR, cooperates with CCAAT/enhancer-binding protein beta in differentiating human endometrial stromal cells.** *The Journal of biological chemistry* 2002, **277**(23):20825-20832.
14. Kajihara T, Jones M, Fusi L, Takano M, Feroze-Zaidi F, Pirianov G, Mehmet H, Ishihara O, Higham JM, Lam EW *et al.*: **Differential expression of FOXO1 and FOXO3a confers resistance to oxidative cell death upon endometrial decidualization.** *Mol Endocrinol* 2006, **20**(10):2444-2455.
15. Christian M, Pohnke Y, Kempf R, Gellersen B, Brosens JJ: **Functional association of PR and CCAAT/enhancer-binding protein beta isoforms: promoter-dependent cooperation between PR-B and liver-enriched inhibitory protein, or liver-enriched activatory protein and PR-A in human endometrial stromal cells.** *Mol Endocrinol* 2002, **16**(1):141-154.
16. Labied S, Kajihara T, Madureira PA, Fusi L, Jones MC, Higham JM, Varshochi R, Francis JM, Zoumpoulidou G, Essafi A *et al.*: **Progestins regulate the expression and activity of the forkhead transcription factor FOXO1 in differentiating human endometrium.** *Mol Endocrinol* 2006, **20**(1):35-44.
17. Mak IY, Brosens JJ, Christian M, Hills FA, Chamley L, Regan L, White JO: **Regulated expression of signal transducer and activator of transcription, Stat5, and its enhancement of PRL expression in human endometrial stromal cells in vitro.** *J Clin Endocrinol Metab* 2002, **87**(6):2581-2588.
18. Anzola M, Burgos JJ: **Hepatocellular carcinoma: molecular interactions between hepatitis C virus and p53 in hepatocarcinogenesis.** *Expert Rev Mol Med* 2003, **5**(28):1-16.

19. Anzola M, Cuevas N, Lopez-Martinez M, Saiz A, Burgos JJ, de Pancorbo MM: **Frequent loss of p53 codon 72 Pro variant in hepatitis C virus-positive carriers with hepatocellular carcinoma.** *Cancer Lett* 2003, **193**(2):199-205.
20. Kusama K, Yoshie M, Tamura K, Nakayama T, Nishi H, Isaka K, Tachikawa E: **The role of exchange protein directly activated by cyclic AMP 2-mediated calreticulin expression in the decidualization of human endometrial stromal cells.** *Endocrinology* 2014, **155**(1):240-248.
21. Gellersen B, DiMattia GE, Friesen HG, Bohnet HG: **Prolactin (PRL) mRNA from human decidua differs from pituitary PRL mRNA but resembles the IM-9-P3 lymphoblast PRL transcript.** *Mol Cell Endocrinol* 1989, **64**(1):127-130.
22. Gellersen B, Kempf R, Telgmann R, DiMattia GE: **Nonpituitary human prolactin gene transcription is independent of Pit-1 and differentially controlled in lymphocytes and in endometrial stroma.** *Mol Endocrinol* 1994, **8**(3):356-373.
23. Horseman ND, Zhao W, Montecino-Rodriguez E, Tanaka M, Nakashima K, Engle SJ, Smith F, Markoff E, Dorshkind K: **Defective mammopoiesis, but normal hematopoiesis, in mice with a targeted disruption of the prolactin gene.** *The EMBO journal* 1997, **16**(23):6926-6935.
24. Ormandy CJ, Camus A, Barra J, Damotte D, Lucas B, Buteau H, Edery M, Brousse N, Babinet C, Binart N *et al.*: **Null mutation of the prolactin receptor gene produces multiple reproductive defects in the mouse.** *Genes & development* 1997, **11**(2):167-178.
25. Chapdelaine P, Kang J, Boucher-Kovalik S, Caron N, Tremblay JP, Fortier MA: **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):309-319.
26. Rider V, Potapova T, Dai G, Soares MJ: **Stimulation of a rat uterine stromal cell line in culture reveals a molecular switch for endocrine-dependent differentiation.** *The Journal of endocrinology* 2005, **184**(1):119-127.
27. Schmidt M, Fernandez de Mattos S, van der Horst A, Klompaker R, Kops GJ, Lam EW, Burgering BM, Medema RH: **Cell cycle inhibition by FoxO forkhead transcription factors involves downregulation of cyclin D.** *Molecular and cellular biology* 2002, **22**(22):7842-7852.

28. Takano M, Lu Z, Goto T, Fusi L, Higham J, Francis J, Withey A, Hardt J, Cloke B, Stavropoulou AV *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.** *Mol Endocrinol* 2007, **21**(10):2334-2349.
29. Cloke B, Huhtinen K, Fusi L, Kajihara T, Yliheikkila M, Ho KK, Teklenburg G, Lavery S, Jones MC, Trew G *et al.*: **The androgen and progesterone receptors regulate distinct gene networks and cellular functions in decidualizing endometrium.** *Endocrinology* 2008, **149**(9):4462-4474.
30. Flemington EK, Speck SH, Kaelin WG, Jr.: **E2F-1-mediated transactivation is inhibited by complex formation with the retinoblastoma susceptibility gene product.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993, **90**(15):6914-6918.
31. Helin K, Harlow E, Fattaey A: **Inhibition of E2F-1 transactivation by direct binding of the retinoblastoma protein.** *Molecular and cellular biology* 1993, **13**(10):6501-6508.
32. Tang L, Zhang Y, Pan H, Luo Q, Zhu XM, Dong MY, Leung PC, Sheng JZ, Huang HF: **Involvement of cyclin B1 in progesterone-mediated cell growth inhibition, G2/M cell cycle arrest, and apoptosis in human endometrial cell.** *Reproductive biology and endocrinology : RB&E* 2009, **7**:144.
33. Maruyama T, Yoshimura Y: **Molecular and cellular mechanisms for differentiation and regeneration of the uterine endometrium.** *Endocr J* 2008, **55**(5):795-810.
34. Hirota Y, Daikoku T, Tranguch S, Xie H, Bradshaw HB, Dey SK: **Uterine-specific p53 deficiency confers premature uterine senescence and promotes preterm birth in mice.** *The Journal of clinical investigation* 2010, **120**(3):803-815.
35. DeLeo AB, Jay G, Appella E, Dubois GC, Law LW, Old LJ: **Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1979, **76**(5):2420-2424.
36. Kress M, May E, Cassingena R, May P: **Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum.** *Journal of virology* 1979, **31**(2):472-483.

37. Linzer DI, Levine AJ: **Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells.** *Cell* 1979, **17**(1):43-52.
38. Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Jessup JM, vanTuinen P, Ledbetter DH, Barker DF, Nakamura Y *et al.*: **Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas.** *Science* 1989, **244**(4901):217-221.
39. Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ: **The P53 Proto-Oncogene Can Act as a Suppressor of Transformation.** *Cell* 1989, **57**(7):1083-1093.
40. Isobe M, Emanuel BS, Givol D, Oren M, Croce CM: **Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13.** *Nature* 1986, **320**(6057):84-85.
41. Unger T, Nau MM, Segal S, Minna JD: **p53: a transdominant regulator of transcription whose function is ablated by mutations occurring in human cancer.** *The EMBO journal* 1992, **11**(4):1383-1390.
42. Chang J, Kim DH, Lee SW, Choi KY, Sung YC: **Transactivation ability of p53 transcriptional activation domain is directly related to the binding affinity to TATA-binding protein.** *The Journal of biological chemistry* 1995, **270**(42):25014-25019.
43. Kussie PH, Gorina S, Marechal V, Elenbaas B, Moreau J, Levine AJ, Pavletich NP: **Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain.** *Science* 1996, **274**(5289):948-953.
44. Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ: **The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation.** *Cell* 1992, **69**(7):1237-1245.
45. Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M: **Mdm2 promotes the rapid degradation of p53.** *Nature* 1997, **387**(6630):296-299.
46. Honda R, Tanaka H, Yasuda H: **Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53.** *FEBS Lett* 1997, **420**(1):25-27.
47. Kubbutat MH, Jones SN, Vousden KH: **Regulation of p53 stability by Mdm2.** *Nature* 1997, **387**(6630):299-303.

48. Kern SE, Kinzler KW, Bruskin A, Jarosz D, Friedman P, Prives C, Vogelstein B: **Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein.** *Science* 1991, **252**(5013):1708-1711.
49. Kraiss S, Quaiser A, Oren M, Montenarh M: **Oligomerization of oncoprotein p53.** *Journal of virology* 1988, **62**(12):4737-4744.
50. May P, May E: **Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein.** *Oncogene* 1999, **18**(53):7621-7636.
51. Zotchev SB, Protopopova M, Selivanova G: **p53 C-terminal interaction with DNA ends and gaps has opposing effect on specific DNA binding by the core.** *Nucleic acids research* 2000, **28**(20):4005-4012.
52. el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B: **WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression.** *Cell* 1993, **75**(4):817-825.
53. Oren M: **Relationship of p53 to the control of apoptotic cell death.** *Semin Cancer Biol* 1994, **5**(3):221-227.
54. Lane DP: **Cancer. p53, guardian of the genome.** *Nature* 1992, **358**(6381):15-16.
55. Hu W, Feng Z, Atwal GS, Levine AJ: **p53: a new player in reproduction.** *Cell Cycle* 2008, **7**(7):848-852.
56. Hu W, Feng Z, Teresky AK, Levine AJ: **p53 regulates maternal reproduction through LIF.** *Nature* 2007, **450**(7170):721-724.
57. Picksley SM, Lane DP: **The p53-mdm2 autoregulatory feedback loop: a paradigm for the regulation of growth control by p53?** *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 1993, **15**(10):689-690.
58. Barak Y, Juven T, Haffner R, Oren M: **mdm2 expression is induced by wild type p53 activity.** *The EMBO journal* 1993, **12**(2):461-468.
59. Ringshausen I, O'Shea CC, Finch AJ, Swigart LB, Evan GI: **Mdm2 is critically and continuously required to suppress lethal p53 activity in vivo.** *Cancer cell* 2006, **10**(6):501-514.
60. Dornan D, Wertz I, Shimizu H, Arnott D, Frantz GD, Dowd P, O'Rourke K, Koeppen H, Dixit VM: **The ubiquitin ligase COP1 is a critical negative regulator of p53.** *Nature* 2004, **429**(6987):86-92.

61. Leng RP, Lin Y, Ma W, Wu H, Lemmers B, Chung S, Parant JM, Lozano G, Hakem R, Benchimol S: **Pirh2, a p53-induced ubiquitin-protein ligase, promotes p53 degradation.** *Cell* 2003, **112**(6):779-791.
62. Chen D, Kon N, Li M, Zhang W, Qin J, Gu W: **ARF-BP1/Mule is a critical mediator of the ARF tumor suppressor.** *Cell* 2005, **121**(7):1071-1083.
63. Marine JC, Jochemsen AG: **Mdmx as an essential regulator of p53 activity.** *Biochemical and biophysical research communications* 2005, **331**(3):750-760.
64. Kruse JP, Gu W: **Modes of p53 regulation.** *Cell* 2009, **137**(4):609-622.
65. Iwakuma T, Lozano G: **Crippling p53 activities via knock-in mutations in mouse models.** *Oncogene* 2007, **26**(15):2177-2184.
66. Wahl GM: **Mouse bites dogma: how mouse models are changing our views of how P53 is regulated in vivo.** *Cell Death Differ* 2006, **13**(6):973-983.
67. Shieh SY, Ikeda M, Taya Y, Prives C: **DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2.** *Cell* 1997, **91**(3):325-334.
68. Banin S, Moyal L, Shieh S, Taya Y, Anderson CW, Chessa L, Smorodinsky NI, Prives C, Reiss Y, Shiloh Y *et al.*: **Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage.** *Science* 1998, **281**(5383):1674-1677.
69. Tibbetts RS, Brumbaugh KM, Williams JM, Sarkaria JN, Cliby WA, Shieh SY, Taya Y, Prives C, Abraham RT: **A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53.** *Genes & development* 1999, **13**(2):152-157.
70. Araki R, Fukumura R, Fujimori A, Taya Y, Shiloh Y, Kurimasa A, Burma S, Li GC, Chen DJ, Sato K *et al.*: **Enhanced phosphorylation of p53 serine 18 following DNA damage in DNA-dependent protein kinase catalytic subunit-deficient cells.** *Cancer research* 1999, **59**(15):3543-3546.
71. Shieh SY, Ahn J, Tamai K, Taya Y, Prives C: **The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites.** *Genes & development* 2000, **14**(3):289-300.
72. Appella E, Anderson CW: **Signaling to p53: breaking the posttranslational modification code.** *Pathologie-biologie* 2000, **48**(3):227-245.
73. Prives C, Hall PA: **The p53 pathway.** *The Journal of pathology* 1999, **187**(1):112-126.

74. Brooks CL, Gu W: **Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation.** *Current opinion in cell biology* 2003, **15**(2):164-171.
75. Sakaguchi K, Herrera JE, Saito S, Miki T, Bustin M, Vassilev A, Anderson CW, Appella E: **DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade.** *Genes & development* 1998, **12**(18):2831-2841.
76. Tang Y, Zhao W, Chen Y, Zhao Y, Gu W: **Acetylation is indispensable for p53 activation.** *Cell* 2008, **133**(4):612-626.
77. Ito A, Lai CH, Zhao X, Saito S, Hamilton MH, Appella E, Yao TP: **p300/CBP-mediated p53 acetylation is commonly induced by p53-activating agents and inhibited by MDM2.** *The EMBO journal* 2001, **20**(6):1331-1340.
78. Li M, Luo J, Brooks CL, Gu W: **Acetylation of p53 inhibits its ubiquitination by Mdm2.** *The Journal of biological chemistry* 2002, **277**(52):50607-50611.
79. Lambert PF, Kashanchi F, Radonovich MF, Shiekhattar R, Brady JN: **Phosphorylation of p53 serine 15 increases interaction with CBP.** *The Journal of biological chemistry* 1998, **273**(49):33048-33053.
80. O'Brien EA, Barnes V, Zhao L, McKnight RA, Yu X, Callaway CW, Wang L, Sun JC, Dahl MJ, Wint A *et al.*: **Uteroplacental insufficiency decreases p53 serine-15 phosphorylation in term IUGR rat lungs.** *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 2007, **293**(1):R314-322.
81. Illuzzi JL, Vickers CA, Kmiec EB: **Modifications of p53 and the DNA damage response in cells expressing mutant form of the protein huntingtin.** *Journal of molecular neuroscience : MN* 2011, **45**(2):256-268.
82. Bartlett JD, Close GL, Drust B, Morton JP: **The emerging role of p53 in exercise metabolism.** *Sports Med* 2014, **44**(3):303-309.
83. Tang Y, Luo J, Zhang W, Gu W: **Tip60-dependent acetylation of p53 modulates the decision between cell-cycle arrest and apoptosis.** *Molecular cell* 2006, **24**(6):827-839.
84. Sykes SM, Mellert HS, Holbert MA, Li K, Marmorstein R, Lane WS, McMahon SB: **Acetylation of the p53 DNA-binding domain regulates apoptosis induction.** *Molecular cell* 2006, **24**(6):841-851.

85. Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW: **Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage.** *Cancer research* 1991, **51**(23 Pt 1):6304-6311.
86. Taylor WR, Stark GR: **Regulation of the G2/M transition by p53.** *Oncogene* 2001, **20**(15):1803-1815.
87. Levine AJ, Hu W, Feng Z: **The P53 pathway: what questions remain to be explored?** *Cell Death Differ* 2006, **13**(6):1027-1036.
88. Hermeking H, Lengauer C, Polyak K, He TC, Zhang L, Thiagalingam S, Kinzler KW, Vogelstein B: **14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression.** *Molecular cell* 1997, **1**(1):3-11.
89. Agarwal ML, Agarwal A, Taylor WR, Stark GR: **p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995, **92**(18):8493-8497.
90. Amaral JD, Xavier JM, Steer CJ, Rodrigues CM: **The role of p53 in apoptosis.** *Discovery medicine* 2010, **9**(45):145-152.
91. Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, Hoffman B, Reed JC: **Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo.** *Oncogene* 1994, **9**(6):1799-1805.
92. Selvakumaran M, Lin HK, Miyashita T, Wang HG, Krajewski S, Reed JC, Hoffman B, Liebermann D: **Immediate early up-regulation of bax expression by p53 but not TGF beta 1: a paradigm for distinct apoptotic pathways.** *Oncogene* 1994, **9**(6):1791-1798.
93. Knippschild U, Oren M, Deppert W: **Abrogation of wild-type p53 mediated growth-inhibition by nuclear exclusion.** *Oncogene* 1996, **12**(8):1755-1765.
94. Moll UM, Ostermeyer AG, Haladay R, Winkfield B, Frazier M, Zambetti G: **Cytoplasmic sequestration of wild-type p53 protein impairs the G1 checkpoint after DNA damage.** *Molecular and cellular biology* 1996, **16**(3):1126-1137.
95. Ryan JJ, Prochownik E, Gottlieb CA, Apel IJ, Merino R, Nunez G, Clarke MF: **c-myc and bcl-2 modulate p53 function by altering p53 subcellular trafficking during the cell cycle.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994, **91**(13):5878-5882.

96. Cain C, Miller S, Ahn J, Prives C: **The N terminus of p53 regulates its dissociation from DNA.** *The Journal of biological chemistry* 2000, **275**(51):39944-39953.
97. Kim E, Rohaly G, Heinrichs S, Gimnopoulos D, Meissner H, Deppert W: **Influence of promoter DNA topology on sequence-specific DNA binding and transactivation by tumor suppressor p53.** *Oncogene* 1999, **18**(51):7310-7318.
98. White DE, Talbott KE, Arva NC, Bargonetti J: **Mouse double minute 2 associates with chromatin in the presence of p53 and is released to facilitate activation of transcription.** *Cancer research* 2006, **66**(7):3463-3470.
99. Kaeser MD, Iggo RD: **Chromatin immunoprecipitation analysis fails to support the latency model for regulation of p53 DNA binding activity in vivo.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002, **99**(1):95-100.
100. Szak ST, Mays D, Pietenpol JA: **Kinetics of p53 binding to promoter sites in vivo.** *Molecular and cellular biology* 2001, **21**(10):3375-3386.
101. Marchenko ND, Moll UM: **The role of ubiquitination in the direct mitochondrial death program of p53.** *Cell Cycle* 2007, **6**(14):1718-1723.
102. Tasdemir E, Maiuri MC, Galluzzi L, Vitale I, Djavaheri-Mergny M, D'Amelio M, Criollo A, Morselli E, Zhu C, Harper F *et al.*: **Regulation of autophagy by cytoplasmic p53.** *Nature cell biology* 2008, **10**(6):676-687.
103. Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin NM, Newmeyer DD, Schuler M, Green DR: **Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis.** *Science* 2004, **303**(5660):1010-1014.
104. Marchenko ND, Wolff S, Erster S, Becker K, Moll UM: **Monoubiquitylation promotes mitochondrial p53 translocation.** *The EMBO journal* 2007, **26**(4):923-934.
105. Mihara M, Erster S, Zaika A, Petrenko O, Chittenden T, Pancoska P, Moll UM: **p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria.** *Molecular cell* 2003, **11**(3):577-590.
106. Roth J, Dobbstein M, Freedman DA, Shenk T, Levine AJ: **Nucleo-cytoplasmic shuttling of the hdm2 oncoprotein regulates the levels of the p53 protein via a pathway used by the human immunodeficiency virus rev protein.** *The EMBO journal* 1998, **17**(2):554-564.

107. Xia HF, Sun J, Sun QH, Yang Y, Peng JP: **Implantation-associated gene-1 (Iag-1): a novel gene involved in the early process of embryonic implantation in rat.** *Hum Reprod* 2008, **23**(7):1581-1593.
108. Burnum KE, Hirota Y, Baker ES, Yoshie M, Ibrahim YM, Monroe ME, Anderson GA, Smith RD, Daikoku T, Dey SK: **Uterine deletion of Trp53 compromises antioxidant responses in the mouse decidua.** *Endocrinology* 2012, **153**(9):4568-4579.
109. Juven T, Barak Y, Zauberman A, George DL, Oren M: **Wild type p53 can mediate sequence-specific transactivation of an internal promoter within the mdm2 gene.** *Oncogene* 1993, **8**(12):3411-3416.
110. Korgun ET, Celik-Ozenci C, Acar N, Cayli S, Desoye G, Demir R: **Location of cell cycle regulators cyclin B1, cyclin A, PCNA, Ki67 and cell cycle inhibitors p21, p27 and p57 in human first trimester placenta and deciduas.** *Histochem Cell Biol* 2006, **125**(6):615-624.
111. Arva NC, Gopen TR, Talbott KE, Campbell LE, Chicas A, White DE, Bond GL, Levine AJ, Bargonetti J: **A chromatin-associated and transcriptionally inactive p53-Mdm2 complex occurs in mdm2 SNP309 homozygous cells.** *The Journal of biological chemistry* 2005, **280**(29):26776-26787.
112. Yoshino O, Osuga Y, Hirota Y, Koga K, Yano T, Tsutsumi O, Taketani Y: **Akt as a possible intracellular mediator for decidualization in human endometrial stromal cells.** *Mol Hum Reprod* 2003, **9**(5):265-269.
113. Lane DP, Hall PA: **MDM2--arbiter of p53's destruction.** *Trends Biochem Sci* 1997, **22**(10):372-374.
114. Ali SH, DeCaprio JA: **Cellular transformation by SV40 large T antigen: interaction with host proteins.** *Semin Cancer Biol* 2001, **11**(1):15-23.
115. Markovics JA, Carroll PA, Robles MT, Pope H, Coopersmith CM, Pipas JM: **Intestinal dysplasia induced by simian virus 40 T antigen is independent of p53.** *Journal of virology* 2005, **79**(12):7492-7502.
116. Peden KW, Srinivasan A, Farber JM, Pipas JM: **Mutants with changes within or near a hydrophobic region of simian virus 40 large tumor antigen are defective for binding cellular protein p53.** *Virology* 1989, **168**(1):13-21.
117. Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P: **Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors.** *Biochem J* 2000, **351**(Pt 1):95-105.

118. Chehab NH, Malikzay A, Appel M, Halazonetis TD: **Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53.** *Genes & development* 2000, **14**(3):278-288.
119. Hirao A, Kong YY, Matsuoka S, Wakeham A, Ruland J, Yoshida H, Liu D, Elledge SJ, Mak TW: **DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2.** *Science* 2000, **287**(5459):1824-1827.
120. Gu W, Roeder RG: **Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain.** *Cell* 1997, **90**(4):595-606.
121. Macleod KF, Sherry N, Hannon G, Beach D, Tokino T, Kinzler K, Vogelstein B, Jacks T: **p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage.** *Genes & development* 1995, **9**(8):935-944.
122. Steinman RA, Hoffman B, Iro A, Guillouf C, Liebermann DA, el-Houseini ME: **Induction of p21 (WAF-1/CIP1) during differentiation.** *Oncogene* 1994, **9**(11):3389-3396.
123. Innocente SA, Abrahamson JL, Cogswell JP, Lee JM: **p53 regulates a G2 checkpoint through cyclin B1.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999, **96**(5):2147-2152.
124. Sugrue MM, Shin DY, Lee SW, Aaronson SA: **Wild-type p53 triggers a rapid senescence program in human tumor cells lacking functional p53.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997, **94**(18):9648-9653.
125. Levine AJ, Tomasini R, McKeon FD, Mak TW, Melino G: **The p53 family: guardians of maternal reproduction.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011, **12**(4):259-265.