

MAHINÈ IVANGA

**ANALYSE DU PROFIL DE L'EXPRESSION
GÉNIQUE, PAR L'ESTRADIOL ET LA
DIHYDROTESTOSTÉRONE, DANS L'UTÉRUS DE
SOURIS**

Mémoire présenté
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en Physiologie-Endocrinologie
pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)

DÉPARTEMENT D'ANATOMIE ET PHYSIOLOGIE
FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2006

Résumé

L'utérus est un tissu complexe fonctionnant sous le contrôle d'hormones stéroïdiennes et hypophysaires, et faisant intervenir de nombreux facteurs. Les hormones stéroïdiennes ovariennes jouent un rôle particulièrement important au niveau des changements morphologiques et de la différenciation vasculaire de l'utérus. Bien que l'utérus tienne une place fondamentale dans le domaine de la fertilité et de la santé des femmes, les mécanismes hormonaux, cellulaires, et moléculaires qui contrôlent le fonctionnement de l'utérus ne sont pas entièrement définis. Ainsi, nos travaux visaient l'identification des gènes modulés par l'oestradiol (E2) et la dihydrotestostérone (DHT) dans l'utérus de souris ovariectomisées. Plus précisément, l'analyse de ces gènes avait pour but de caractériser ou de raffiner la compréhension des sentiers métaboliques et/ou signalétiques impliqués dans la régulation du fonctionnement de l'utérus, et ultimement, de déterminer des gènes pouvant potentiellement servir de cibles thérapeutiques. Mettant à profit les récentes avancées technologiques pour l'acquisition et l'analyse de données génomiques, nous avons entrepris l'étude détaillée du profil de l'expression génique induit par l'E2 ou la DHT dans l'utérus de souris. Ces investigations ont confirmé l'activation par E2 d'une série d'évènements transcriptionnels, potentiellement impliqués dans le contrôle de l'effet utérothrophique de l'oestradiol. Il ressort également de nos analyses que la DHT module la transcription de gènes liés au contrôle du cycle cellulaire, et que cette hormone pourrait éventuellement participer aux modifications périodiques de la couche endométriale de l'utérus. Cette étude n'a toutefois pas encore permis la caractérisation de nouveaux sentiers métaboliques ou signalétiques. En résumé, les résultats présentés dans ce mémoire ont non seulement permis de préciser les profils d'expression génique induits par l'E2 ou la DHT dans l'utérus de souris, mais également de mettre en évidence les sentiers IGF1 (pour E2) et ATM/Gadd45g (pour DHT), et d'émettre ainsi de nouvelles hypothèses à tester par des approches de biologie moléculaire classique.

Avant-propos

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de recherche, Dre Francine Durocher, et le professionnel de recherche de l'équipe, Dr Yvan Labrie, qui ont su m'encadrer avec qualité durant plus de 2 ans. Je remercie également tous les autres membres de l'équipe, Frédéric Guénard, Sylvie Desjardins et Geneviève Ouellette pour leur soutien et leur bonne humeur, ainsi que les membres de l'équipe du Dr Simard que j'ai côtoyés avec plaisir.

Merci à tous les collaborateurs qui ont permis d'obtenir les résultats présentés dans ce mémoire.

Je remercie les organismes qui m'ont procuré un soutien financier durant mes études de maîtrise : les IRSC (Instituts de Recherche en Santé du Canada) et le gouvernement gabonais pour leurs bourses d'étude.

Merci tout particulièrement à mes parents, sans lesquels je ne me serais pas rendue jusqu'ici, et à mon frère qui a toujours su me redonner confiance dans les moments de doute.

Contributions

Chapitre 1 : Temporal analysis of E2 transcriptional induction of PTP and MAPK and down-regulation of IGF-1 pathway key components in the mouse uterus.

Auteurs : Mahinë Ivanga, Yvan Labrie, Ezequiel Calvo, Pascal Belleau, Céline Martel, Van Luu-The, Jean Morissette, Fernand Labrie et Francine Durocher.

En révision à *Physiological Genomics*

Rédaction et analyse des résultats de biopuces: Mahinë Ivanga

Chapitre 2 : Temporal analysis of DHT transcriptional modulation of the ATM/Gadd45g signaling pathways in the mouse uterus.

Auteurs : Mahinë Ivanga, Yvan Labrie, Ezequiel Calvo, Pascal Belleau, Céline Martel, Van Luu-The, Jean Morissette, Fernand Labrie et Francine Durocher.

En soumission à *Journal of Molecular Endocrinology*.

Rédaction et analyse de résultats de biopuces : Mahinë Ivanga.

« *Chak bètafè ka kléré pou nanm yo* »

Proverbe Martiniquais.

Table des matières

Liste des figures	1
Liste des abréviations	2
Introduction	3
I- L'utérus	4
1.1 Structure.....	4
1.2 Fonctionnement de l'utérus	6
1.3 Quelques pathologies.....	8
II- Régulation du fonctionnement de l'utérus.....	11
2.1 Les hormones stéroïdiennes.....	11
2.1.1 Les oestrogènes.....	13
2.1.2 Les androgènes	14
2.1.3 La progestérone	15
2.2 Les facteurs de croissance.....	16
III- La génomique fonctionnelle et les réseaux de régulation.....	17
3.1 La génomique	17
3.2 Régulation et interactions géniques	18
IV- Étude des profils d'expression géniques	23
4.1 Les biopuces	23
4.2 Les outils bioinformatiques	28
4.3 Méthode pour confirmer l'expression différentielle.....	32
V- Hypothèses et objectifs du projet.....	36
5.1 Contexte.....	36
5.2 Analyse du profil de l'expression génique par l'E2 et la DHT, dans l'utérus	36

VI- Matériel et méthode.....	37
Chapitre I : Analyse temporelle de l'activation des phosphatases tyrosine (PTP) et Map Kinase (MKP), et de la répression d'éléments clefs du sentier IGF-1, induites par E2 dans l'utérus de souris.....	41
Résumé.....	43
Abstract.....	44
Introduction.....	45
Materials and Methods.....	48
Results.....	53
Discussion.....	59
Acknowledgments	65
References.....	66
Figure Legends	77
Figures	79
Chapitre II: Analyse temporelle de la modulation transcriptionnelle du sentier de signalisation ATM/Gadd45, par la DHT, dans l'utérus de souris.....	84
Résumé.....	86
Abstract.....	87
Introduction.....	88
Materials and Methods.....	91
Results.....	96
Discussion.....	102
Acknowledgments	108

Funding	109
References.....	110
Figure Legends	116
Figures	118
Discussion	123
Conclusion	128
Perspectives	130
Bibliographie	131

Liste des figures

Introduction

Figure 1 : L'utérus humain	4
Figure 2 : L'utérus de souris	5
Figure 3 : Le cycle menstruel	7
Figure 4 : Régulation du fonctionnement de l'utérus de souris.....	12
Figure 5 : Réactions de phosphorylation et de déphosphorylation.....	18
Figure 6 : Activation de la transcription d'un gène par Stat1 α	19
Figure 7 : Le cycle cellulaire	20
Figure 8 : Interconnexions des gènes.....	22
Figure 9 : Hybridation des séquences d'acide nucléique de l'échantillon, sur la biopuce	24
Figure 10 : Biopuce à ADNc	25
Figure 11 : Biopuce d'oligonucléotides Affymetrix.....	26
Figure 12 : Schéma simplifié du principe de la PCR quantitative en temps réel	33
Figure 13 : Cinétique de la réaction PCR	34

Chapitre I

Figure 1 : Clustering of gene expression patterns.....	79
Figure 2 : Functional classification of clustered genes.....	80
Figure 3 : Relevant list of up- and down-regulated genes in each cluster	81
Figure 4 : Temporal changes of gene expression levels performed by quantitative Real- Time PCR	82
Figure 5 : Schematic representation of the transcriptional cascade triggered by E2 following activation of IGF-1 pathway	83

Chapitre II

Figure 1 : Clustering of gene expression patterns	118
Figure 2 : Functional classification of clustered genes.....	119
Figure 3 : Relevant list of up- and down-regulated genes in each cluster.....	120
Figure 4 : Temporal changes of gene expression levels performed by quantitative real- time PCR	121
Figure 5 : Schematic and simplified representation of the ATM/Gadd45g transcriptional cascade triggered by DHT, in the mouse uterus	122

Liste des abréviations

ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADNc :	ADN complémentaire
ARN :	Acide ribonucléique
ARNm :	ARN messenger
AR:	récepteur des androgènes
c.-à-d:	c'est-à-dire
Cp:	point du cycle seuil optique (« crossing point »)
DHEA:	déhydroépiandrostérone
DHT:	5 α -dihydrotestostérone
E2:	17 β -oestradiol
ER:	récepteur des oestrogènes
ex.:	exemple
FSH:	hormone folliculo-stimulante
GF:	facteur de croissance
GFR:	récepteur des facteurs de croissance
GnRH:	gonadotropin releasing hormone
HPV:	human papilloma virus
IGF-1:	Insulin-like growth factor 1
IGF-1R:	récepteur de IGF-1
LH:	hormone lutéinisante
LH-RH:	luteinising hormone- releasing hormone
MAPK:	Mitogen Activated Protein Kinase
P:	progestérone
PCR:	réaction de polymérisation en chaîne
polyA :	polyadénylé
PR:	récepteur de la progestérone
PTP :	protéine tyrosine phosphatase
RT-PCR:	réaction de polymérisation en chaîne, en temps réel

Introduction

I- L'utérus

1.1 Structure de l'utérus

L'utérus est l'organe reproducteur essentiel chez les femelles des mammifères. C'est un organe musculéux et creux, au sein duquel surviennent plusieurs processus physiologiques tels que la menstruation chez les primates, l'implantation de l'ovule fécondé, le développement du fœtus ainsi que l'accouchement. Chez la femme, l'utérus est en forme de poire renversée, et situé dans la cavité abdominale, entre le rectum et la vessie. Il comprend une partie arrondie située sous les trompes utérines, le fond (fundus), un corps qui constitue sa portion centrale effilée, une région rétrécie (d'environ 1cm de long) appelée isthme de l'utérus, et un col dans sa partie inférieure étroite qui s'ouvre dans le vagin (Figure 1). L'utérus est maintenu dans une position antéversée par plusieurs ligaments (prolongements du péritoine pariétal et d'autres cordons fibromusculaires). De part et d'autre de l'utérus, enfouies dans les plis des ligaments larges, on trouve 2 trompes utérines appelées trompes de Fallope qui transportent les ovocytes secondaires et les ovules fécondés des ovaires jusqu'à l'utérus (Tortora et Reynolds, 2001).

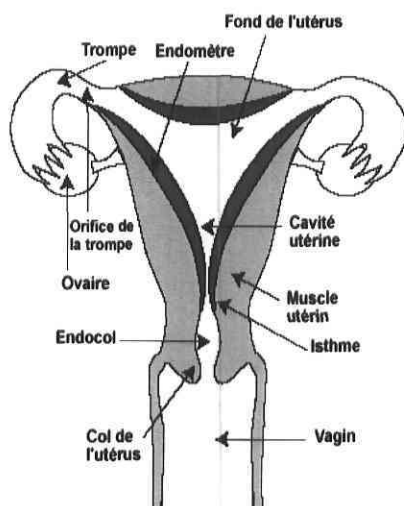


Figure 1 : L'utérus humain.

La morphologie de l'utérus peut varier considérablement chez les mammifères. En effet, chez la souris, l'utérus est en forme de Y. Il est constitué de 2 cornes latérales creuses, accrochées à la paroi dorsale par des ligaments, qui s'étendent des trompes de Fallope à une position postérieure à la vessie, où elles s'unissent en un seul corps médian à l'extrémité duquel le col s'ouvre dans la cavité vaginale (Figure 2).

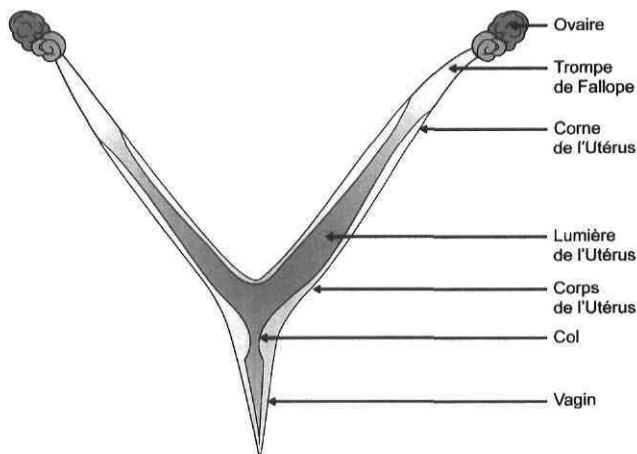


Figure 2 : L'utérus de souris. Adaptée de Foster *et al.*, 1991.

La cavité utérine interne des mammifères est constituée d'un muscle, le myomètre, et d'une tunique interne, l'endomètre. Lors de l'accouchement, les contractions coordonnées produites par le myomètre en réponse à l'ocytocine libérée par la neurohypophyse favorisent l'expulsion du fœtus. Chez les primates, l'endomètre est un tissu très vascularisé qui contient une couche fonctionnelle tapissant la cavité utérine (se desquame lors des menstruations) et une couche basale permanente élaborant la couche fonctionnelle après chaque menstruation. Les cellules sécrétrices de la muqueuse du col de l'utérus produisent la glaire cervicale (composée d'eau, de glycoprotéines, de protéines sériques, de lipides, d'enzymes et de sels inorganiques) qui s'avère être moins visqueuse et plus alcaline au moment de l'ovulation, afin de permettre l'entrée des spermatozoïdes.

1.2 Fonctionnement de l'utérus

L'utérus joue un rôle essentiel dans le maintien des espèces vivipares. Chez l'humain, le fonctionnement de l'utérus est limité dans le temps, ainsi le cycle menstruel débute à la ménarche (moment de la première menstruation) et s'achève à la ménopause (moment où les menstruations cessent définitivement). En occident, on situe l'âge de la ménarche entre 10 et 16 ans, et l'âge de la ménopause autour de 50 ans. Cependant, il existe une grande variabilité individuelle, en ce qui concerne la durée globale de la période reproductive chez la femme, même si on assiste, ces dernières années, à un abaissement de l'âge de la ménarche et à un recul de l'âge de la ménopause chez les femmes occidentales (Mauvais-Jarvis et Sitruk-Ware, 1986). Ces changements sont souvent attribués à l'amélioration des conditions alimentaires et médicales (Gluckman et Hanson, 2005), mais également à la libération dans l'environnement d'agents chimiques possédant une activité oestrogénique (pesticides, herbicides, composés polychlorés, alkylophénols), qui pourraient potentiellement perturber le système endocrinien et de ce fait le système reproducteur féminin (Iguchi *et al.*, 2001). En effet, Howdeshell *et al.* (1999) ont démontré que l'exposition *in utero* à certaines doses de bisphénol-A (BPA), avançait l'âge de la puberté de la souris femelle.

En fait, la souris atteint sa maturité sexuelle, en moyenne, entre la 5^{ème} et la 6^{ème} semaine de vie. Cependant, le moment de l'apparition de la puberté varie selon la souche et les conditions environnementales comme la température, le régime nutritionnel, ou le rapport des sexes dans la portée d'où est issue la femelle. La durée de la vie reproductive est aussi inférieure à la durée de vie des souris femelles, bien que l'on observe une grande variabilité inter- et intra-souches. Par exemple, chez les souris femelles CBA, qui peuvent vivre jusqu'à 700 jours, la période reproductive cesse lorsqu'elles ont entre 300 et 400 jours (Foster *et al.*, 1991).

La périodicité du cycle menstruel est aussi très variable selon les femmes, cependant on l'évalue en moyenne à 28 jours. Par convention, le premier jour de la menstruation est le premier jour du cycle. L'existence de l'ovulation permet de définir 2 phases dans le cycle, l'une précédant l'ovulation, la phase folliculaire (dite phase proliférative), et l'autre lui succédant, la phase lutéale (phase sécrétoire) au cours desquelles la structure de

l'endomètre varie considérablement (Figure 3). En effet, l'endomètre est en constante préparation pour l'implantation et subit des changements cycliques importants sous contrôle hormonal (Amar-Costesec *et al.*, 1992).

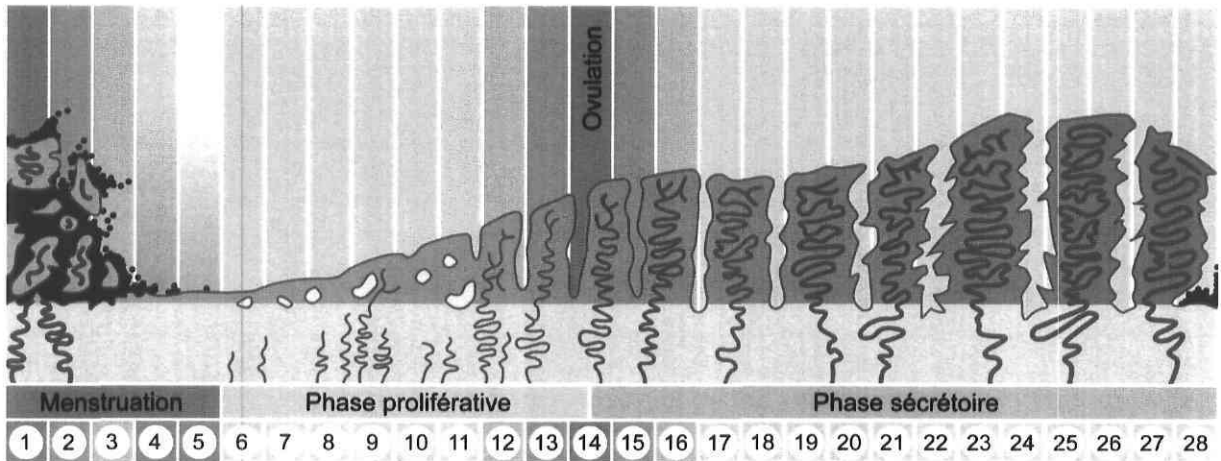


Figure 3 : Le cycle menstruel. Les jours, correspondant aux différentes phases du cycle menstruel, sont indiqués.

Ainsi, comme la majorité des cycles ne sont pas associés à une conception, l'endomètre subit tout au long de sa vie reproductive une prolifération cellulaire suivie d'une régression, de saignements, d'une desquamation et d'une régénérescence. Lors de la menstruation, on assiste à une desquamation fragmentaire de l'endomètre (1^{er} au 4^e jour du cycle) qui laisse persister une zone de 0,5mm d'épaisseur. Durant la phase folliculaire, la tunique utérine interne, l'endomètre, prolifère et atteint une épaisseur de 3 à 5mm (8^e au 14^e jour du cycle). Cette régénération de la muqueuse endométriale est marquée par la reconstruction d'un épithélium, et par le développement de glandes longilignes avec lumière étroite et présence de chorion. Puis, l'ovulation survient et se caractérise par un pic sécrétoire de l'hormone lutéinisante (LH)¹, une modification de la glaire sécrétoire, et par une élévation de 5 degrés centigrades de la courbe ménothermique aux alentours du 14^e jour du cycle résultant de l'effet thermogène de la progestérone ou de ses métabolites 5 β -réduits. Ensuite, lors la

¹ La sécrétion de LH est cyclique chez la femme et la souris femelle avec une augmentation en fin de phase folliculaire, un pic pré-ovulatoire, puis une décroissance en phase lutéale.

phase lutéale, la taille des cellules glandulaires augmente. Finalement, en l'absence d'implantation, l'œdème régresse, des lymphocytes apparaissent et vers le 25^e jour du cycle survient la menstruation. Cette dernière résulte de la privation hormonale caractéristique de cette période.

Soulignons que la régression de l'endomètre sous forme de saignements ne survient que chez les primates, et notamment chez la femme. Chez la plupart des autres mammifères, on n'observe qu'un petit saignement vaginal au moment de l'*œstrus* (fureur en latin), période correspondant à l'ovulation et associée à un comportement sexuel propice à l'accouplement. Le cycle oestrien se caractérise également par des modifications périodiques de l'utérus et du vagin, sous le contrôle d'hormones stéroïdiennes et hypophysaires. Chez la souris, le cycle oestrien est court et dure communément entre 4 et 6 jours durant lesquels différentes phases sont observées. Ainsi, le pro œstrus peut-être assimilé à la phase folliculinique, il est suivi de l'œstrus qui est assimilable à la période d'ovulation (survient 12 heures après le pic de LH), puis le méta- œstrus est assimilable à la phase lutéale, et enfin le di- œstrus (inexistant en physiologie humaine) marque le retour au repos de l'utérus. Cependant, une grande variabilité dans la durée du cycle est aussi constatée chez les souris. D'autre part, l'environnement exerce un effet particulièrement important sur le déroulement du cycle de la souris. Par exemple, l'alternance de la lumière et de l'obscurité a une influence sur le cycle. Ainsi, des souris en élevage, quotidiennement exposées à 14 heures de lumière suivies de 10 heures d'obscurité, présentent un cycle de 4-6 jours, ce qui est plus rarement observé chez des souris vivant dans leur habitat naturel. De plus, il est intéressant de noter que la sécrétion des hormones stéroïdiennes est supprimée en l'absence d'alternance de lumière et d'obscurité (Foster *et al.*, 1991).

1.3 Quelques pathologies de l'utérus

Les hormones stéroïdiennes sont impliquées dans le développement de nombreuses pathologies de l'utérus. Pourtant, en dépit du rôle essentiel que tient l'utérus dans le domaine de la fertilité et de la santé des femmes, les mécanismes hormonaux, cellulaires, et moléculaires qui contrôlent le fonctionnement de l'utérus, ne sont pas entièrement définis.

De plus, la compréhension des mécanismes à l'origine de certaines pathologies gynécologiques ainsi que leur traitement, sont compliqués par la difficulté à trouver des organismes modèles adéquats. En effet, des pathologies comme le cancer de l'endomètre ou l'endométriose, que l'on retrouve généralement chez l'humain, ne sont pas spontanément développées par la souris. Cependant, il a été observé que les œstrogènes ont un effet cancérogène sur le système reproducteur des souris (Anisimov *et al.*, 2005; Story et Kennedy, 2004). Il a également été démontré que les androgènes peuvent induire le cancer de l'endomètre chez des souris (Van Nie, 1964). D'autre part, les connaissances grandissantes que l'on a du génome de souris, de même que notre capacité à l'exploiter par des méthodes de transgénèse, font de cet organisme un excellent modèle pour ce type d'étude.

Chez la femme, différentes couches de l'utérus peuvent être touchées par un cancer. Au niveau du col, le cancer se traduit par un changement dans la forme, la croissance et le nombre des cellules cervicales (dysplasie cervicale). L'incidence de cette affection est souvent associée à des infections par des virus du genre papillome (Human Papilloma Virus, HPV) ou herpès (Tortora et Reynolds, 2001). De ce fait, des souris transgéniques HPV-16 E6/E7 ont été développées, et des études ont démontré que de faibles doses d'œstrogènes peuvent causer un cancer du col de l'utérus chez ces souris (Elson *et al.*, 2000).

Au niveau de l'endomètre, le cancer survient communément après la ménopause, surtout en Amérique du Nord et en Europe de l'Ouest, et son incidence augmente avec l'espérance de vie. Le cancer de l'endomètre de type I est principalement lié à une hyperœstrogénie relative d'origine endogène (ménarche précoce, ménopause tardive etc...) ou exogène (traitement substitutif de la ménopause par œstrogénothérapie exclusive, tamoxifène etc...). Le cancer de l'endomètre de type II est, quant à lui, moins fréquent et semble œstrogéno-indépendant. Les femmes ayant des niveaux anormalement élevés d'androgènes (ex. syndrome de l'ovaire polykystique) ont également un risque accru de développer un cancer de l'endomètre (Scott *et al.*, 2003). De plus, des facteurs génétiques peuvent être associés au développement du cancer de l'endomètre. Ainsi, plusieurs modèles de souris ont été

développés en utilisant des approches transgéniques permettant de moduler l'expression de gènes tels que *Pten* ou *Mlh1* (Ellenson *et al.*, 2004).

Le léiomyosarcome utérin est une tumeur maligne rare du muscle lisse qui touche en moyenne des femmes âgées de 43 à 53 ans (Scott *et al.*, 2003). Ce cancer est hautement agressif et létal du fait de sa localisation au sein du myomètre, couche utérine riche en vaisseaux sanguins, et de sa tendance à former des métastases (Wu *et al.*, 2005; Aaro *et al.*, 1966). La présence de récepteurs stéroïdiens chez les tumeurs de certaines patientes (57% ER⁺ et 43% PR⁺) suggère que des hormones stéroïdiennes pourraient être impliquées dans le développement de certains léiomyosarcomes utérins (Bodner *et al.*, 2003). Politi *et al.* (2004) ont utilisé la recombinaison cre/loxP pour induire le léiomyosarcome utérin chez des souris femelles.

D'autres pathologies, comme les léiomyomes (ou fibromes utérins), sont des tumeurs bénignes du myomètre que l'on rencontre en moyenne chez 30% des femmes en âge de procréer, et particulièrement chez les femmes d'origine africaine ou afro-caribéenne (Hart, 2003). La plupart des fibromes sont asymptomatiques, cependant certains d'entre eux peuvent causer des ménorragies² et diminuer la fertilité des femmes (Wallach *et al.*, 1996; Farhi *et al.*, 1995; Hart *et al.*, 2001). Il a été démontré que les œstrogènes et la progestérone pourraient être impliqués dans le développement des fibromes utérins (Scott *et al.*, 2003). D'autre part, des études cytogénétiques ont montré que certains léiomyomes présentent des aberrations chromosomiques telles que la translocation entre les chromosomes 12 et 14, la délétion du bras court du chromosome 7 et des réarrangements du bras long du chromosome 6 (Scott *et al.*, 2003). Aucun modèle de souris n'est à l'heure actuelle disponible pour cette maladie (Walker et Stewart, 2005). Cependant, des études ont démontré que le levobunolol (antagoniste des récepteurs adrénergiques-β) induit des léiomyomes chez les souris (Rothwell *et al.*, 1992), et que des souris transgéniques exprimant l'antigène SV40-T, suite à l'activation œstrogéno-dépendante du promoteur de la calbindin, semblent développer des léiomyomes (Romagnolo *et al.*, 1996).

² règles anormalement abondantes et prolongées qui dépassent la durée habituelle de trois à cinq jours

L'endométriose se caractérise par la croissance de l'endomètre à l'extérieur de l'utérus. Même à l'extérieur de l'utérus, le tissu endométrial réagit aux fluctuations hormonales en proliférant et en se dégradant, ce qui provoque des saignements causant une inflammation, de la douleur et la formation de tissu cicatriciel. On observe fréquemment des douleurs prémenstruelles, menstruelles (dysménorrhée) ou post-menstruelles particulièrement sévères, mais aussi une augmentation du risque d'avortements spontanés et une diminution de la fertilité. Les œstrogènes et des facteurs immunologiques seraient reliés au développement de l'endométriose (Kitawaki *et al.*, 2003; Hart, 2003). Afin d'étudier cette maladie, l'endomètre humain peut être introduit avec succès chez des souris nues (Story et Kennedy, 2004). Il est également possible, en utilisant des souris syngéniques, de couper l'utérus de l'animal donneur et d'en introduire des sections dans la cavité péritonéale de l'animal receveur (Somigliana *et al.*, 1999).

II- Régulation du fonctionnement de l'utérus

Tel que mentionné à la section 1.2, à chaque cycle sexuel, l'endomètre subit des changements caractéristiques pour l'implantation de l'œuf fécondé. Ces changements sont sous le contrôle d'hormones stéroïdiennes et hypophysaires, mais font également intervenir de nombreux autres facteurs tels que les facteurs de croissance (Figure 4). En effet, les hormones stéroïdiennes sécrétées par les ovaires et les glandes surrénaliennes, ainsi que les facteurs de croissance sécrétés par les ovaires, exercent leur action sur les cellules utérines à travers leur interaction avec des récepteurs spécifiques.

2.1 Les hormones stéroïdiennes

Tel qu'illustré à la Figure 4, le fonctionnement de l'utérus est étroitement régulé par des hormones stéroïdiennes de nature lipidique, synthétisées dans le cytosol à partir du cholestérol plasmatique, et qui traversent sans difficulté la bicouche lipophile. Les hormones stéroïdiennes forment des complexes avec des protéines plasmatiques et agissent directement sur la cellule productrice dans le cas d'une action intra/autocrine, ou sont transportées par le flux sanguin à une cellule voisine dans le cas d'une action paracrine.

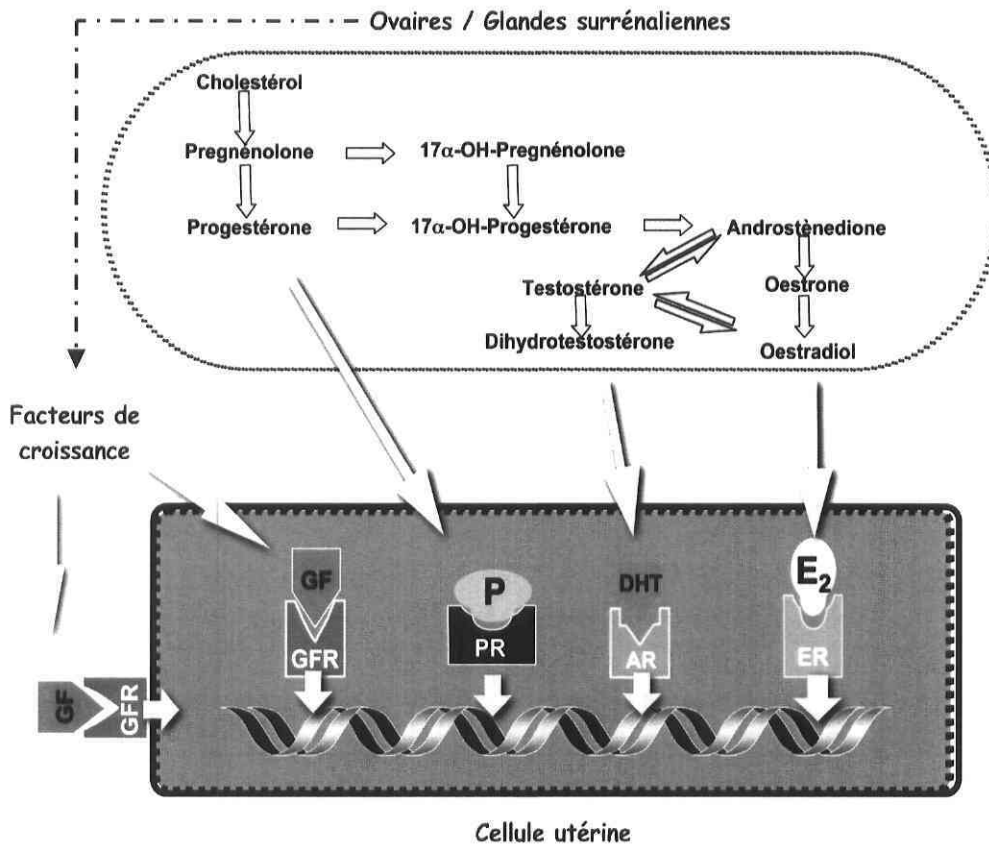


Figure 4: Régulation du fonctionnement de l'utérus de souris. Les hormones stéroïdiennes (P, DHT et E₂) produites par les ovaires et les glandes surrénaliennes, ainsi que les facteurs de croissance (GF) produits par les ovaires, régulent l'expression de gènes-cibles dans les cellules utérines, *via* leur interaction avec leurs récepteurs respectifs (PR, AR, ER et GFR).

C'est la présence de récepteur qui confère à une cellule sa sensibilité par rapport à une hormone stéroïdienne donnée. En effet, dans une cellule donnée (notamment une cellule utérine), les hormones stéroïdiennes se lient, *via* leurs récepteurs spécifiques, à des gènes-cibles et régulent leur transcription. Les réponses cellulaires stimulées ou inhibées par ces hormones sont souvent de type métabolique, et concernent la modulation des divisions cellulaires ou la différenciation cellulaire.

La régulation hormonale de l'utérus fait intervenir, d'une part, les ovaires qui sécrètent des hormones stéroïdiennes jouant un rôle particulièrement important au niveau des changements morphologiques et de la différenciation vasculaire de l'utérus : les œstrogènes, les androgènes et la progestérone. En fait, les sécrétions hormonales ovariennes sont contrôlées par les hormones folliculo-stimulante (FSH) et lutéinisante (LH), elles-mêmes sécrétées par l'hypophyse en réponse à une stimulation par la gonadolibérine (LH-RH chez la souris ou GnRH chez l'humain) libérée par l'hypothalamus. Les ovaires exercent, en retour, un rétrocontrôle hormonal sur le système hypothalamo-hypophysaire.

D'autre part, les glandes surrénaliennes produisent également des androgènes, des œstrogènes et la progestérone. Les variations des taux plasmatiques de ces hormones sexuelles sont donc déterminées de façon majeure par les activités ovariennes, mais aussi par les activités surrénaliennes, et quelquefois par la transformation périphérique de précurseurs. En effet, certains mammifères tels que l'humain possèdent tout le matériel enzymatique nécessaire pour synthétiser de petites quantités d'E2 et de DHT à partir de précurseurs (ex. DHEA-S ou androstènedione), au niveau de divers tissus comme l'utérus, les fibroblastes de la peau, ou le tissu adipeux (Labrie *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 1993).

2.1.1 Les œstrogènes

Les œstrogènes naturels comprennent l'oestrone et la 17 β -œstradiol (E2). Les œstrogènes stimulent la prolifération de l'endomètre et la croissance des glandes utérines, ainsi que l'apparition des glaires cervicales au niveau du col de l'utérus. La phase proliférative du cycle menstruel est principalement dominée par les œstrogènes, et se caractérise par une activité mitotique intense des cellules endométriales. Chez la souris, on observe des niveaux élevés d'œstrogènes durant le pro-œstrus (Foster *et al.*, 1991). Les œstrogènes induisent une augmentation importante de la formation des capillaires, une augmentation de leur perméabilité, et un accroissement du flux sanguin utérin. Ces modifications facilitent l'apport d'oxygène, de nutriments et de facteurs de croissance, qui permettent la prolifération de l'utérus. Les effets des œstrogènes sont transmis par deux récepteurs nucléaires, ER α et ER β .

La 17 β -œstradiol (E2)

L'œstradiol, l'œstrogène le plus actif, joue un rôle capital sur le fonctionnement cyclique de l'appareil génital des mammifères. Il a été démontré que chez la souris, E2 stimule la croissance du myomètre et de l'endomètre (Foster, 1991). Chez la femme, la concentration d'œstradiol atteint son maximum 24 heures avant l'ovulation en soi. Durant la phase folliculaire, la production d'œstradiol augmente fortement due essentiellement à une sécrétion ovarienne, et accessoirement à une conversion périphérique d'oestrone en œstradiol. En phase lutéale, l'œstradiol présente une nouvelle ascension moins forte qu'en phase folliculaire mais plus prolongée. En absence de fécondation, il se produit une chute brutale de la production d'œstradiol (et de progestérone) chez la femme, et ce 12 à 13 jours après l'ovulation, suivie 48h plus tard de la menstruation. L'œstradiol jouerait donc un rôle important dans la néovascularisation de l'endomètre (Lecce G *et al.*, 2001). Chez la souris, en absence de coït, le cycle s'achève lorsque les taux d'estrogènes (et de progestérone) sont bas.

2.1.2 Les androgènes

Les androgènes naturels comprennent la testostérone, son dérivé la 5 α -dihydrotestostérone (DHT), ainsi que la déhydroépiandrostérone (DHEA, uniquement détecté chez les primates) et l'androstènedione (A-Dione) qui peuvent être convertis en testostérone dans les tissus périphériques (Bardin *et al.*, 1981). Cependant, seuls la testostérone et la DHT, qui possèdent une affinité élevée pour le récepteur intracellulaire spécifique des androgènes (AR), sont considérées comme des androgènes actifs. Les androgènes peuvent aussi être convertis en œstrogènes. Ainsi, le système enzymatique ovarien peut convertir l'androstènedione en oestrone et la testostérone en œstradiol (Figure 4). Les taux plasmatiques des androgènes chez la femme en période reproductive montrent des variations cycliques, les taux étant modérément plus élevés durant la période péri-ovulatoire et diminuant durant la phase folliculaire. Ces variations sont la conséquence de variations dans la stéroïdogénèse ovarienne (Mauvais-Jarvis et Sitruk-Ware, 1986). Des taux élevés d'androgènes semblent affecter différentes fonctions endométriales incluant l'implantation de l'œuf fécondé, et conduiraient à une fertilité diminuée ainsi qu'à des

avortements spontanés récurrents (cas du syndrome de l'ovaire polykystique). L'androstènedione, notamment, peut inhiber la croissance et l'activité sécrétoire des cellules épithéliales de l'endomètre humain, *in vitro* (Tuckerman *et al.*, 2000).

La 5 α -dihydrotestostérone (DHT)

Il est généralement admis que c'est la DHT qui est l'androgène actif, et que l'action androgénique de la testostérone est amplifiée par sa conversion en DHT. De plus, la DHT possède dans plusieurs tissus cibles une affinité pour le récepteur des androgènes (AR) plus élevée que celle de la testostérone (Giroud *et al.*, 1988). Les effets directs de la DHT sur la physiologie de l'utérus ne sont pas clairement définis, cependant Fujimoto *et al.* (1994 et 1995) ont suggéré que la DHT affecterait la prolifération des cellules endométriales, tandis que la testostérone agirait plutôt au niveau de la différenciation des cellules de l'endomètre. De plus, Zhang J *et al.* (2004) ont montré que la DHT induit, chez les souris, la prolifération des cellules myométriales et des cellules épithéliales de l'endomètre.

2.1.3 La progestérone

Tel qu'indiqué à la Figure 4, le système enzymatique ovarien convertit la pregnénolone, première étape de transformation du cholestérol, en progestérone. La progestérone signifie, étymologiquement, hormone de gestation. Elle permet, notamment, la transformation de l'endomètre prolifératif en endomètre sécrétoire (le rendant apte à une nidation éventuelle), et le maintien de la gestation. Certains effets de la progestérone sont reliés à des activités anti-hormonales, incluant des activités anti-œstrogènes ou anti-androgènes (Giroud *et al.*, 1988). Son action passe par l'interaction avec des récepteurs spécifiques à la progestérone (PR) appelés PR-A et PR-B.

La phase sécrétoire du cycle menstruel est principalement dominée par la progestérone, et se caractérise par la différenciation des glandes endométriales ainsi que par la prolifération et la différenciation des cellules déciduales. En effet, suite à l'implantation et sous le contrôle de concentration croissante de progestérone, l'endomètre subit des modifications caractéristiques aboutissant à la formation de la décidue (muqueuse du corps utérin lors de la gestation). La progestérone réduit également la perméabilité vasculaire, modifie la

composition de la glaire cervicale (coagulation empêchant l'entrée des spermatozoïdes), possède un effet relaxant sur le myomètre, et limite la croissance cellulaire oestrogéno-dépendante de l'endomètre (Gerchenson *et al.*, 1977). Chez la souris, la progestérone peut être utilisée pour retarder la mise-bas, par la suppression des contractions du myomètre (Foster, 1991). En l'absence de fécondation, les menstruations surviennent, chez la femme, 48 heures après la chute brutale de la production de progestérone (et d'oestradiol), et ce 12 à 13 jours après l'ovulation. De plus, le métabolisme de la progestérone en dérivés 5β réduits, au niveau de l'hypothalamus, entraîne une action hyperthermisante qui se traduit par une augmentation de la température basale au-dessus de 37°C (Mauvais-Jarvis et Sitruk-Ware, 1986). Chez la souris femelle, en absence de coït, le cycle s'achève lorsque les taux de progestérone (et d'oestrogènes) sont bas. D'autre part, la progestérone est convertie en dihydroprogestérone et entre alors en compétition avec la testostérone auprès de l'enzyme 5α -réductase, limitant ainsi la réduction de la testostérone en DHT.

2.2 Les facteurs de croissance

Les facteurs de croissance (GF, Growth Factor), dérivés des cellules stromales de l'utérus ou provenant des ovaires, jouent un rôle important au niveau de la prolifération et de la différenciation des cellules épithéliales de l'utérus (Spencer *et al.*, 2005). En effet, si l'ovaire sécrète trois types d'hormones stéroïdiennes (œstrogènes, progestérone et androgènes), il produit également un grand nombre de peptides, incluant de nombreux facteurs de croissance tels que les « Insulin-like Growth Factors » (IGF), qui comme les hormones agissent de façon intracrine/autocrine ou paracrine (Larsen, 2003). Ainsi, les souris transgéniques dont l'expression du gène IGF-I est abolie, sont infertiles (Baker *et al.*, 1996). De plus, chez les humains, les IGFs sont impliqués dans la prolifération des cellules endométriales en réponse à l'œstradiol (Giudice *et al.*, 1994). Les effets des facteurs de croissance sont transmis par les récepteurs des facteurs de croissances (GFR, Growth Factor Receptor) qui sont soit nucléaires, soit membranaires (Figure 4).

À la lecture des pages précédentes, il apparaît donc clairement qu'une balance adéquate, entre les différentes actions des hormones stéroïdiennes (E2, DHT, P) et des facteurs de

croissance, est essentielle pour une régulation appropriée du fonctionnement de l'utérus. Ainsi, des études supplémentaires sont nécessaires afin de mieux comprendre les mécanismes hormonaux qui régissent la physiologie de ce tissu et certaines de ses maladies.

III- La génomique fonctionnelle et les réseaux de régulation

3.1 La génomique

La génomique est la science qui étudie l'organisation et l'évolution des génomes, ainsi que l'expression et la fonction des gènes. En pratique, la génomique vise, de façon non exhaustive, l'identification de gènes impliqués dans des pathologies (cibles thérapeutiques, marqueurs diagnostiques), de gènes responsables de résistances (ex. aux antibiotiques), et une meilleure compréhension des mécanismes qui régulent les interactions gène - gène ou gène - environnement. Elle regroupe également des techniques qui permettent de cartographier et séquencer les génomes, et de déterminer la structure des gènes (promoteur, ARNm, introns/exons, cadres de lectures ouverts) ainsi que leurs produits. La génomique fonctionnelle concerne, principalement, la détermination des fonctions des gènes (activité, domaines, partenaires), et l'établissement des profils d'expression des gènes (ex. dans les tissus sains ou malades) (Gautheret, 2004).

Contexte

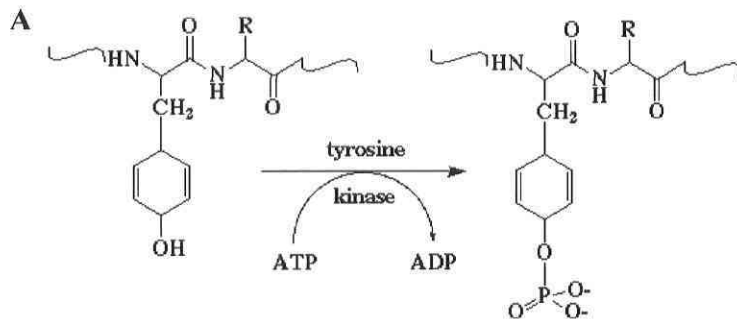
La quantité des informations biologiques s'est accrue de façon considérable ces dernières années. En effet, les génomes partiels ou complets d'une centaine d'organismes ont été décryptés (Pevsner, 2003), incluant celui de mammifères (homme, souris et rat), d'insectes (*Drosophila*, *C. elegans*), de plusieurs types de levures et de plantes (*Arabidopsis*). Actuellement, plus de 200 génomes procaryotes ont déjà été publiés et au moins 500 sont en cours de séquençage, alors que moins de 300 génomes eucaryotes sont présentement décryptés ou en voie de l'être (Medina, 2005). Cette avancée a été rendue possible par le développement de puissantes technologies de pointe pour l'acquisition de données en

génomique et protéomique (science étudiant les protéines). Cependant, l'interprétation de ces données en termes de fonctionnement biologique, s'avère une tâche colossale. Cela s'explique, en partie, par le fait que plus de la moitié des gènes identifiés chez la plupart de ces organismes n'ont pas de fonction biologique évidente (Lee, 2005). Ainsi, l'un des grands défis de la prochaine décennie en recherche génomique, est d'assigner des fonctions à ces gènes, d'en étudier les interactions et les modes de régulation. Tel qu'illustré à la section suivante (section 3.2), la connaissance des différentes interactions entre les protéines codées par les gènes est nécessaire et essentielle afin d'expliquer et prédire les fonctions cellulaires et la physiologie des tissus.

3.2 Régulation et interactions géniques

Régulation des gènes

La cellule possède de nombreux mécanismes qui lui permettent de réagir aux conditions dans lesquelles une protéine spécifique est désirable ou non, et se traduisant généralement par la stimulation (c.-à-d. l'activation ou l'induction) ou l'inhibition (c.-à-d. la répression) de l'expression d'un ou plusieurs gènes. L'un des mécanismes de régulation les plus importants, chez les eucaryotes, est la phosphorylation qui consiste en l'addition d'un groupe phosphate (PO_4) sur un substrat. La phosphorylation est catalysée par des protéines kinases spécifiques, alors que la déphosphorylation est assurée par des protéines phosphatases (Figure 5).



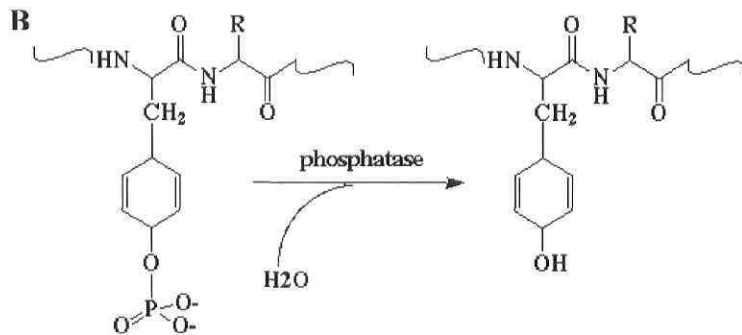


Figure 5. Réactions de phosphorylation et de déphosphorylation. La phosphorylation est catalysée par des protéines kinases. A : estérification de la chaîne latérale de la tyrosine par une tyrosine kinase par addition d'un groupement phosphate. B : la déphosphorylation est catalysée par des phosphatases qui clivent le groupement phosphate ajouté. Tirée de E., Jaspard (2004).

En effet, de nombreux récepteurs ou protéines sont activés ou réprimés par une phosphorylation ou une déphosphorylation. Dans certains cas (ex. Stat1 α), la phosphorylation des facteurs de transcription module leur aptitude à se lier à l'ADN (Figure 6).

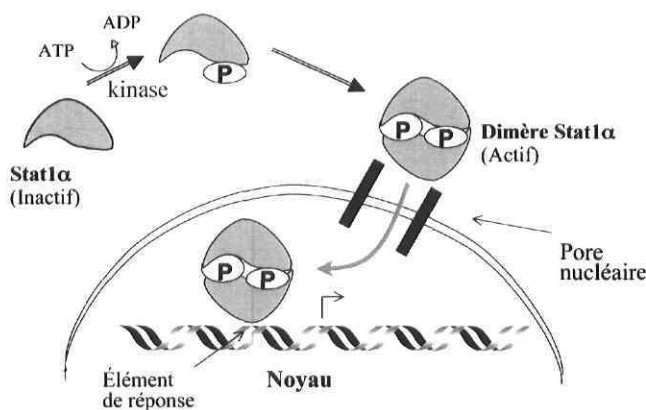


Figure 6 : Activation de la transcription d'un gène par Stat1 α . Stat1 α est phosphorylé par une kinase. Il peut ainsi former des dimères, et effectuer une translocation dans le noyau où il se lie à des éléments de réponse du gène-cible, afin d'en activer la transcription. Adaptée de Lodish *et al.*, 2001.

Dans d'autres cas (ex. CREB), c'est sous leur forme non phosphorylée que les facteurs de transcription se lient à l'ADN. En fait, la phosphorylation permet de modifier le

fonctionnement des domaines d'activation afin que la protéine puisse stimuler ou non la transcription d'un gène (Lodish *et al.*, 2001). La capacité de nombreux récepteurs de surface cellulaire à transmettre des signaux intracellulaires, est également augmentée ou diminuée par la phosphorylation (Lodish *et al.*, 2001). Par exemple, en réponse à une hormone, des récepteurs tyrosine-kinases peuvent induire la transcription de protéines spécifique à la prolifération cellulaire. L'hormone provoque l'autophosphorylation des portions cytosoliques de ces récepteurs, et entraîne la phosphorylation en série des protéines de la voie des MAP kinases. Les MAP kinases ainsi activées effectuent une translocation nucléaire afin de phosphoryler des facteurs de transcription qui modulent, à leur tour, l'expression de protéines liées à la prolifération cellulaire.

Chez la plupart des cellules eucaryotes en croissance, quatre phases se succèdent au cours du cycle cellulaire, selon le type cellulaire et le stade de développement : G1, G2, S et M (Figure 7).

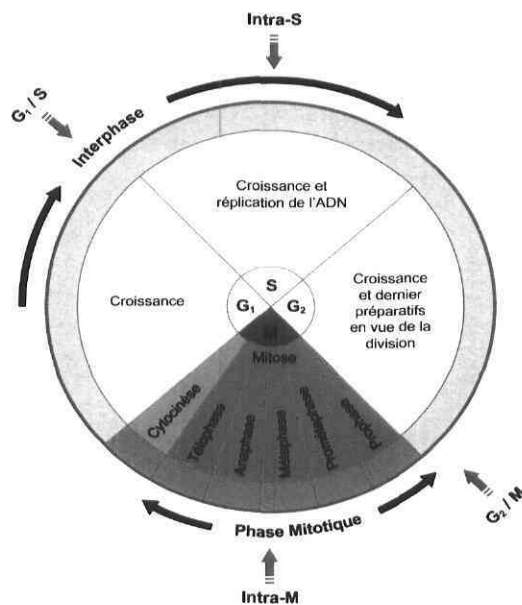


Figure 7 : Le cycle cellulaire. Les différentes étapes de la mitose (M) sont indiquées en bleu. Au cours de l'interphase, se succèdent les phases G1, S et G2. Les points de contrôle G1/S, intra S, G2/M et intra M, sont indiqués par des flèches. Adaptée de www.ustboniface.mb.ca/.../etapedemitose.jpg.

La progression à travers le cycle cellulaire est régulée par des mécanismes de surveillance, c'est-à-dire les points de contrôle ou « checkpoints ». Ces derniers permettent de vérifier que l'ADN n'est pas endommagé et que chaque étape est bien complétée avant d'initier la phase suivante (Lodish *et al.*, 2001). Lorsque les conditions requises sont respectées, le cycle peut progresser à travers les points de contrôles. Dans le cas contraire, il y a arrêt du cycle le temps d'une réparation, ou encore induction de l'apoptose (mort cellulaire). Un mauvais fonctionnement des points de contrôle peut aboutir à des dommages génétiques catastrophiques et à une dérégulation de la prolifération cellulaire (ex. cancer).

Interconnexions des gènes

Chez les organismes multicellulaires, un réseau complexe de sentiers signalétiques et métaboliques régulent l'expression des gènes en protéines ainsi que les interactions entre protéines. Ces différents réseaux permettent d'intégrer les signaux de l'environnement extracellulaire, et d'induire des cascades d'évènements moléculaires intracellulaires qui aboutissent ultimement à l'induction ou à la répression de l'expression de gènes, ainsi qu'à des changements cellulaires structurels et/ou fonctionnels.

Il existe différents types d'interactions gène – gène qui peuvent être illustrés par 6 schémas de base tels que représentés dans la section B de la Figure 8. Dans le cas de l'autorégulation, le produit du gène contrôle sa propre expression, alors que le système à une entrée décrit une situation où un gène est contrôlé par le produit d'un autre gène (un facteur de régulation ou un facteur de transcription). Par contre, dans le système à entrées multiples, l'expression d'un gène est contrôlée par les produits de plusieurs gènes (plusieurs facteurs de régulation et/ou de transcription).

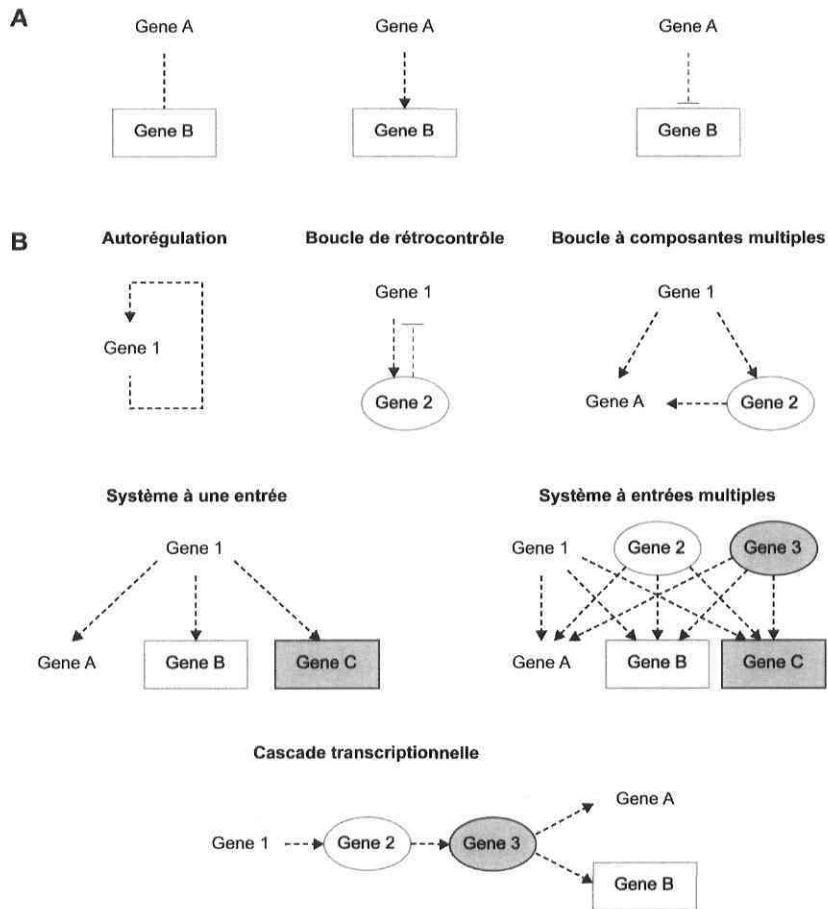


Figure 8 : Interconnexions des gènes. A : Représentation des types d'interaction gène - gène. De façon conventionnelle, les lignes indiquent les effets directs comme les interactions protéine - protéine, et les flèches indiquent l'activation comme la liaison à un récepteur, la phosphorylation du produit d'un gène ou l'induction de la transcription d'un gène subséquent. À l'opposé, les barres indiquent l'inhibition de l'expression d'un gène subséquent. B : les 6 schémas d'interaction de base. Ici, les facteurs de transcription ou de régulation sont représentés dans des cercles, et les gènes de structure dans des rectangles. Adaptée de Lee 2005.

Dans la cascade transcriptionnelle, les gènes sont activés en série. La boucle de rétrocontrôle décrit, quant à elle, un système dans lequel l'expression d'un gène est activée par le produit d'un autre gène dont il contrôle, en retour, la régulation. Ce mécanisme permet de réagir aux changements dans l'environnement, principalement pour maintenir un certain état du système. Dans la boucle à composantes multiples, l'expression d'un gène (A) est contrôlée directement par le produit d'un autre gène (1), et indirectement par le produit d'un troisième gène (2) dont l'expression est également contrôlée par un produit du gène (1).

IV- Étude des profils d'expression géniques

Le transcriptome est l'ensemble des transcrits avec leur niveau relatif d'expression dans un type de cellule ou de tissu, dans des conditions particulières. L'analyse du transcriptome consiste à fournir des données sur l'expression des gènes à l'échelle d'un génome entier (Gibson et Muse, 2004). Ces données permettent ainsi d'établir un profil d'expression des gènes. Ainsi, lorsque le génome d'un organisme est séquencé, il est possible de déterminer les conditions et les modes de régulation des gènes qu'il contient. Cela implique, entre autres, l'identification des gènes spécifiques à certains tissus de cet organisme, la détermination des moments où ces gènes sont exprimés, ou leur variation temporelle. La dernière décennie a vu l'émergence de techniques de génomique permettant l'analyse à haut débit de l'expression des gènes, et la vérification de l'expression différentielle gène par gène (Pevsner, 2003; Gibson et Muse, 2004). L'intégration et l'étude de ces données biologiques nécessitent l'utilisation d'outils informatiques adaptés (Winslow *et al.*, 2003), et facilitent la compréhension des réseaux de régulation qui gouvernent les processus physiologiques.

4.1 Les biopuces

Les biopuces (chip ou microarray) à ADN ou ARN suscitent un intérêt croissant de la part des scientifiques et des industriels du fait du potentiel qu'on leur attribue en génomique, ainsi que pour le diagnostic biologique. La biopuce est l'outil par excellence qui permet d'étudier, simultanément, la variation de l'expression de plusieurs gènes. En effet, elle permet d'analyser, en quelques heures, des dizaines de milliers de séquences d'ARN ou d'ADN. Grâce à elle, on peut également repérer des mutations et identifier rapidement les gènes potentiellement impliqués dans une maladie ou répondant à l'action d'une molécule biologique ou chimique. Cette technique est basée sur l'hybridation de deux brins d'acides nucléiques. Des milliers de séquences connues d'acide nucléique sont greffées sur une petite surface solide (<1 cm²) en silicium, verre ou polymère, ainsi chaque « spot »³ contient une séquence d'acide nucléique bien définie. Avant leur hybridation sélective avec

³ La lame de la biopuce peut être structurée en un certain nombre de lignes et de colonnes, chaque case obtenue à leur croisement contient une zone, où est déposé un seul gène, appelée « spot ».

leur séquence-cible complémentaire sur la surface de la biopuce (Figure 9), les acides nucléiques de l'échantillon biologique sont marqués à l'aide d'une molécule agissant à titre de traceur (nucléotide radioactif, fluorescent ou molécule d'affinité). L'intensité du signal d'hybridation obtenu pour un transcrit donné est proportionnelle à la quantité de transcrit présent dans l'échantillon étudié (Gibson et Muse, 2004).

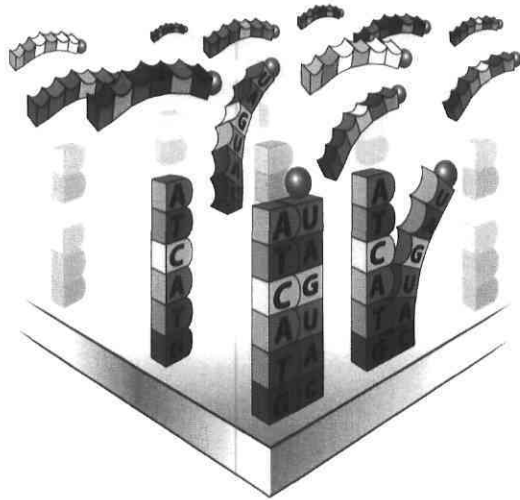


Figure 9 : Hybridation des séquences d'acide nucléique de l'échantillon, sur la biopuce. Les acides nucléiques marqués de l'échantillon (coiffés d'une boule rouge) s'hybrident sélectivement à leur séquence-cible complémentaire sur la biopuce. Tirée de www.well.ox.ac.uk/.../Microarray/Welcome.shtml

On distingue deux types de biopuces : les biopuces à ADN complémentaire (ADNc) et les biopuces d'oligonucléotides. Dans les biopuces à ADNc (Figure 10), des séquences relativement longues de molécules d'acide nucléique pré-synthétisées sont obtenues par transcription inverse à partir d'ARN messager (ARNm), puis amplifiées par réaction PCR et immobilisées sur la surface solide à l'aide de robots à haute vitesse (Schena *et al.*, 1995). Les marquages radioactifs (^{33}P , ^{35}S , ou ^3H) sont incorporés aux nucléotides, et les fluorochromes tels que Cy3 et Cy5 sont également disponibles sous forme de conjugués attachés sur la base d'un nucléotide, ce qui facilite leur incorporation lors de la transcription inverse (Gibson et Muse, 2004). La plupart du temps, un échantillon, souvent marqué au Cy3, sert de contrôle alors que l'échantillon à tester est marqué avec un autre colorant dont

le spectre de fluorescence se distingue du précédent, le Cy5. On peut utiliser de l'ARNm total ou de l'ARNm polyA+ purifié. Ce type de biopuce est généralement utilisé pour un criblage à très large échelle ou pour des études d'expression (Gabig, 2001).

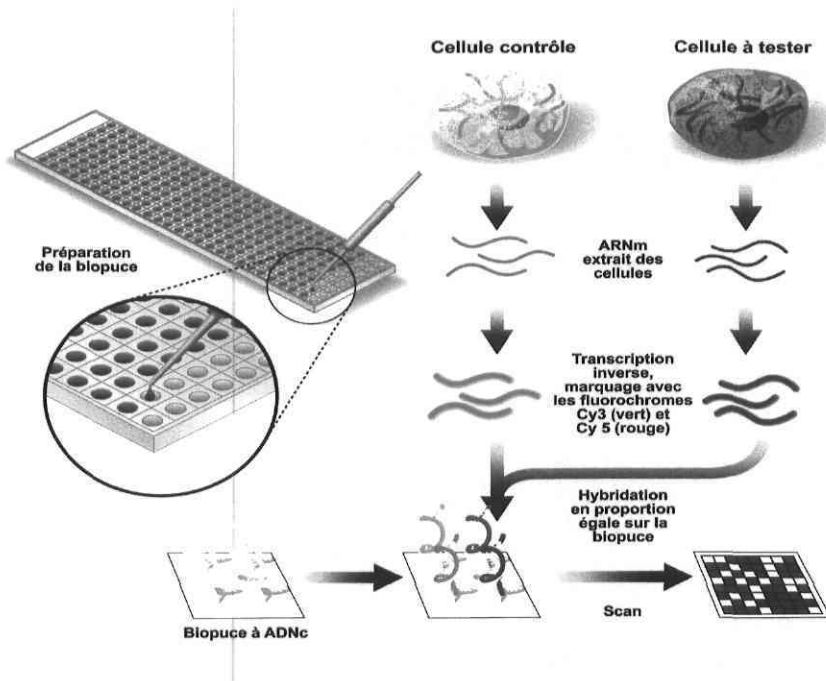


Figure 10 : Biopuce à ADNc. L'ARNm est extrait des 2 échantillons, converti en ADNc, et marqué avec des fluorochromes. Puis, les séquences sont hybridées sur la biopuce. Adapté de www.bioteach.ubc.ca/MolecularBiology/microarray/.

Cette technique est relativement bon marché, mais exige un certain temps pour l'optimisation (type de support, tampons etc...), ainsi qu'un équipement dispendieux. Les premières biopuces à ADNc furent produites « in house » par des groupes académiques. Cependant, l'étape de production des sondes et le haut degré d'hybridation croisée avec cette technique, explique le fait que les biopuces à ADNc aient été supplémentées par les sondes d'oligonucléotides (Elvidge, 2006). Certaines difficultés ont quelque peu été allégées par l'arrivée d'un second type de biopuces à ADNc, avec des « prespotted slides » commercialisées par Agilent (CA, USA) et par Amersham Biosciences (NJ, USA).

Dans les biopuces d'oligonucléotides, des sondes pré-synthétisées d'ARNm peuvent être immobilisées sur le support solide, ou les oligonucléotides sont directement synthétisés sur

la puce (*in situ*: ex. Affymetrix, Figure 11). Les sondes sont fixées au moyen d'un groupement chimique photolabile.

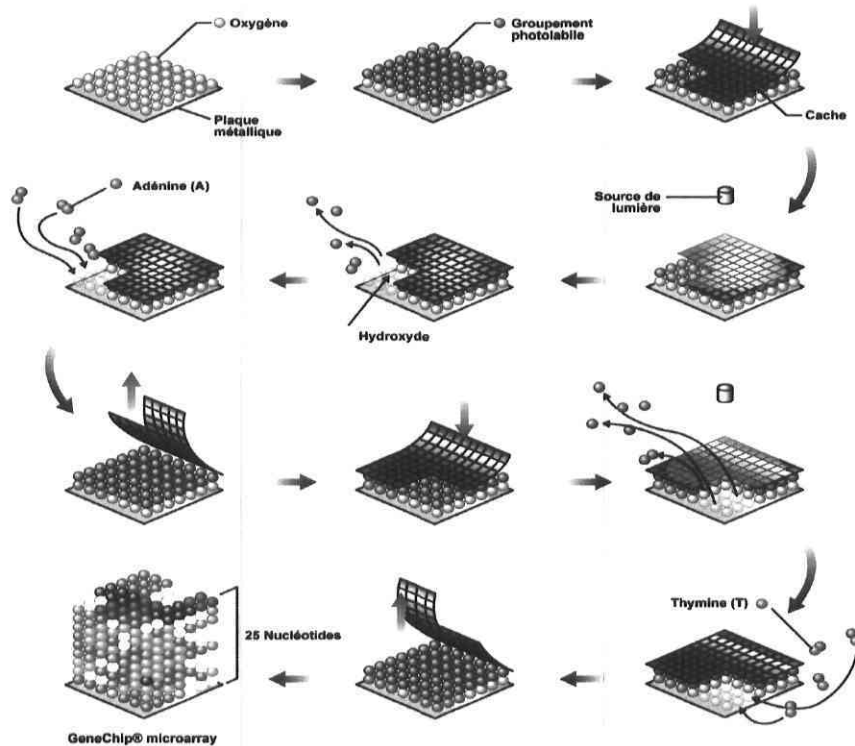


Figure 11 : Biopuce d'oligonucléotides Affymetrix. Les oligonucléotides sont directement synthétisés sur la surface de la biopuce. Adapté de www.bioteach.ubc.ca/MolecularBiology/microarray/

Toutes les approches utilisent la méthode aux phosphoramidites développée par Beaucage et Caruthers pour la synthèse d'oligonucléotides sur support solide (Kronick, 2004). Le principe de cette synthèse consiste à greffer un oligodésoxyribonucléoside protégé sur un support solide par l'intermédiaire d'une liaison 3' ester. La méthode *in situ* diffère par la façon dont les phosphoramidites sont introduits, et par l'étape de déprotection. Les biopuces d'oligonucléotides ont l'avantage d'être facilement produites, d'autant plus qu'une série de génomes sont maintenant commercialisés, et que les sondes peuvent être déterminées par ordinateur afin de cibler une région de transcrite spécifique tout en minimisant l'hybridation croisée potentielle (Elvidge, 2006). Différents types de biopuces d'oligonucléotides sont, aujourd'hui, disponibles sur le marché :

Affymetrix

Ce sont les biopuces les plus répandues. L'unité d'hybridation est constituée d'une série d'oligonucléotides de 25 mers dont la séquence est déterminée par un ordinateur utilisant un algorithme permettant de représenter les cadres de lecture ouverts connus ou potentiels. On effectue 100 cycles d'addition de nucléotides pour la puce entière avec 25 cycles de A, 25 de T, 25 de G et 25 de C. À chaque cycle, un éclair ciblé de lumière « déprotège » les chaînes d'oligonucléotides en cours d'extension, uniquement au site de la puce où le nucléotide suivant doit être ajouté. Le ciblage de l'illumination est réalisé en intercalant un cache entre la source de lumière et la puce selon une technique développée par l'industrie des microprocesseurs (Figure 11). L'ajout de la solution contenant le nucléotide permet l'addition d'un seul nucléotide sur chaque chaîne déprotégée, l'excédant étant lavé avant le début du cycle suivant. Chaque gène est représenté par 10 à 20 oligonucléotides de séquences différentes pour tenir compte de la variation d'efficacité d'hybridation due à des facteurs comme le contenu en GC (Gibson et Muse, 2004).

Agilent

Ici, le dépôt d'oligonucléotides synthétisés par la technique des phosphoramidites (Hughes *et al.*, 2001) ou de produits de PCR, s'effectue par jet d'encre. La puce contient entre 11,000 et 44,000 « spots » avec des millions de copies d'ADNc, ou d'oligonucléotides de 60 mers. Cette technologie est particulièrement flexible et permet de choisir entre l'utilisation de sondes créées « in house » de 25 à 60 bases de long, et de sondes de 60 mers de Agilent (Smeds *et al.*, 2005). Ici, seul un oligonucléotide par transcrit est employé et la déprotection est chimique (Kronick, 2004). En terme de sensibilité, les oligonucléotides de 60 mers sont plus avantageux que ceux de 25 mers de long, bien que les plus courts soient considérés plus spécifiques. Les biopuces Agilent sont plus tolérantes avec les mésappariements, ce qui permet une analyse simplifiée des régions polymorphiques, mais qui d'autre part diminue la spécificité (Smeds *et al.*, 2005).

Illumina

Des séquences d'oligonucléotides sont attachées à de petites billes (3µm) réparties de façon aléatoire dans des puits creusés dans un substrat métallique. Un transcrit est représenté par un oligonucléotide, et peut être présent en moyenne 30 fois sur la puce. De plus, plusieurs échantillons peuvent être analysés simultanément par cette technique (Elvidge, 2006).

Nimblegen

La technologie est similaire à celle d'Affymetrix, cependant elle utilise un réseau de miroirs d'aluminium au lieu des caches, pour contrôler l'illumination des sondes (24-70 mers). Chaque miroir peut être orienté grâce à un courant électrique, et peut refléter la lumière à des positions prédéfinies sur la biopuce. La flexibilité de cette technologie permet d'éviter la fabrication de caches pour chaque biopuce (Elvidge, 2006).

4.2 Les outils bioinformatiques

L'exploration des données générées par une méthode à haut débit, telle que la méthode des biopuces, implique l'utilisation d'un ensemble d'outils informatiques permettant d'extraire de l'information qualitative d'un nombre important de données quantitatives complexes. Les données des biopuces sont, tout d'abord, converties en format exploitable, afin que l'on soit en mesure de dégager des groupes de gènes (ou « clusters ») significatifs, qui pourront ultimement conduire à la formulation d'hypothèses concernant un sujet de recherche. En somme, il s'agit d'une analyse active des données qui utilise la statistique, les banques de données Internet et les logiciels contenant divers algorithmes afin de rassembler les gènes en groupes de fonctions, de profils d'expression, de motifs de régulation ou de tout autre lien qui existerait entre eux.

Statistique

L'analyse des données des biopuces débute par la détermination des gènes les plus significativement modulés, c'est-à-dire stimulés ou inhibés, en réponse au traitement dans l'expérience. Pour se faire, on utilise des statistiques inférentielles qui permettent d'éliminer les variations résultant d'artéfacts expérimentaux. Ainsi, les résultats sont d'abord normalisés et pré-traités afin d'éliminer autant que possible le biais systématique et préserver les variations significatives des gènes (Pevsner, 2003).

La normalisation sert à éliminer les biais et le bruit, et permet l'élimination ou la minimisation de certaines mesures aberrantes. Généralement, une normalisation globale est appliquée aux données brutes de façon à ce que le rapport moyen pour l'expression des gènes soit 1. D'autres choisissent de normaliser les valeurs d'expression par rapport à des gènes domestiques de référence (ex. β -actine, GAPDH). On procède, également, à une normalisation locale qui s'occupe du biais et de la variance dans l'expression des gènes. Cette opération peut s'effectuer de façon automatique en employant des logiciels fournis avec les biopuces disponibles sur le marché (ex. MAS 5.0, RMA, GCRMA ou MBEI).

Il existe une série de calculs qui permettent de transformer les données, et qui peuvent être très utiles pour l'identification des gènes différentiellement exprimés dans une expérience donnée utilisant les biopuces. On peut, par exemple, utiliser un test « t » pour décrire la probabilité de régulation de chaque gène, ou encore un test d'analyse de variance ANOVA si plus de 2 conditions expérimentales sont en jeu (ex. plusieurs substances actives agissant sur l'expression des gènes). En fait, le choix du test statistique dépend des buts de l'expérience. À partir des tests statistiques effectués sur les écarts des valeurs d'intensité entre les sondes de mésappariement et d'appariement parfait pour chaque sonde testant un gène, on peut obtenir une valeur « p ». La valeur « p » représente la probabilité de l'expression d'un gène, et plus elle est petite, plus la probabilité que le gène soit exprimé est grande. D'autre part, le diagramme de corrélation permet de visualiser rapidement la modulation des gènes et d'évaluer la corrélation des valeurs d'expression entre deux conditions expérimentales bien définies (ex. avant et après traitement). Aussi, pour déterminer s'il y a eu variation de l'expression d'un gène suite au traitement, on dispose

du nombre de « fold » ou ratio de la valeur de l'intensité de l'expression d'un gène, après traitement, sur le contrôle. Par convention, la valeur du nombre de « fold » est toujours supérieure ou égale à 1. Un ratio positif révèle une stimulation du gène, tandis qu'un ratio négatif indique une répression.

Les banques de données Internet

Des efforts considérables ont été effectués pour rendre accessible les données récoltées par les chercheurs. Les principaux sites Web, pour le dépôt des séquences, mis à jour quotidiennement sont : GeneBank du National Center for Biotechnology Information (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov/), EMBL au laboratoire européen de biologie moléculaire (www.ebi.ac.uk/embl/) et DDBJ, la base de données d'ADN du Japon (www.ddbj.nig.ac.jp/). Il existe également d'autres sites qui sont d'excellentes sources d'information sur le génome humain tels que le Genome browser (<http://genome.ucsc.edu>), Ensembl (www.ensembl.org) ou le Golden Path server. D'autre part, certains sites comme UniGene et RefSeq sur NCBI soutiennent la découverte de nouveaux gènes (Mount et Pandey, 2005). Le site OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) sur NCBI s'occupe principalement des gènes humains et des désordres génétiques. Le site Gene Ontology, quant à lui, concerne l'annotation. Il s'agit, en fait, d'une compilation dynamique de termes de vocabulaire contrôlés, et reliés aux différents aspects des gènes et des produits des gènes (Pevsner, 2003). D'autres sites, comme KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) ou BioCarta, présentent les gènes dans des réseaux de sentiers métaboliques ou signalétiques connus, et permettent ainsi d'identifier les interconnexions entre gènes. De plus, de nombreux sites sont développés pour permettre entre autres, la prédiction des gènes, l'analyse des séquences, de la structure des protéines, ou de l'expression des gènes (Mount et Pandey, 2005).

Le regroupement des gènes

Il existe différentes façons de regrouper les gènes. Par exemple, il est possible d'employer des logiciels de base, utilisant des feuilles de calcul comme Excel® de Microsoft, qui permettent de trier les séries de nombres selon l'amplitude de la variation de l'expression,

et suivant des conditions expérimentales spécifiques. On peut aussi classer les gènes selon la fonction moléculaire, la localisation cellulaire ou les processus biologiques dans lesquels leurs produits sont impliqués. Cela peut s'effectuer manuellement, en utilisant les informations contenues dans les bases de données Internet et dans la littérature, ou de façon automatique en employant des logiciels principalement basés sur l'information contenue dans Gene Ontology (ex. L2L, EASE).

Les gènes peuvent également être regroupés selon leur profil d'expression. En effet, les paires de gènes ayant des profils d'expression similaires sont en théorie associées aux mêmes fonctions biologiques (Bowers *et al.*, 2005). L'une des approches utilisée consiste à définir, à l'avance, le nombre de groupes désirés et à contraindre les données à se conformer à cette exigence. Ce type de regroupement peut-être réalisé de façon automatique à l'aide de logiciels qui utilisent des cartes d'auto-regroupement (Self-Organizing-Maps, S.O.M) et des regroupements sur la base des valeurs moyennes k . Avec ces méthodes, on répète la procédure jusqu'à l'obtention d'une structure stable (Gibson et Muse, 2004). Une autre approche consiste à utiliser un type de regroupement hiérarchique qui permet aux données de définir elles-mêmes leurs propres schémas d'expression, par le regroupement des gènes dont le profil d'expression est le plus semblable.

Les logiciels qui utilisent la méthode de décomposition en valeurs singulières permettent d'évaluer le rapport entre l'expression de chaque gène et les principales sources de variation au sein de l'échantillon. Par exemple, dans une étude comparant les effets du sexe, du type de cancer, et de l'agent chimio-thérapeutique utilisé, la variation de l'expression génique peut être due principalement à une interaction entre le sexe et la nature du cancer, et ensuite au rôle du type d'agent chimio-thérapeutique (Gibson et Muse, 2004).

En fait, l'objectif final de cette méthode est de déterminer la signification biologique des regroupements, en établissant des parallèles entre les groupes de gènes et l'ensemble des informations sur les gènes disponibles sur Internet, et dans la littérature.

4.3 Méthode pour confirmer l'expression différentielle

L'étude de l'expression génique consiste à identifier un groupe de gènes dont l'analyse ultérieure permettra de comprendre les bases biologiques des variations observées dans les échantillons étudiés. En conséquence, l'utilisation d'une méthode expérimentale est nécessaire pour confirmer que l'expression différentielle d'un gène ou d'un groupe de gènes sélectionnés, est bien réelle. Il existe plusieurs méthodes pour étudier l'expression différentielle d'un gène, incluant les transferts de type Northern, la protection à la ribonucléase (RNase) et la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) quantitative. La méthode des transferts de type Northern est semi-quantitative et ne permet de confirmer que des différences d'expression génique d'un facteur deux ou plus, tandis que la méthode à la RNase est plus précise (Gibson et Muse, 2004). Cependant, cette dernière exige un plus grand investissement technique et implique la manipulation d'une grande quantité de radioactivité si on l'applique à de nombreux gènes. En conséquence, la PCR quantitative apparaît comme une méthode de choix pour quantifier l'expression de différents gènes pris individuellement.

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) quantitative en temps en réel

La réaction de polymérisation en chaîne est une technique essentielle en biologie moléculaire et hautement sensible et spécifique pour la détection des acides nucléiques. Cette dernière application a révolutionné l'analyse quantitative des gènes et de leurs ARNms. Le principe de la PCR quantitative en temps réel (RT-PCR) repose sur le suivi cycle par cycle de la réaction enzymatique au moyen d'une molécule rapporteuse fluorescente (Figure 12) pouvant émettre dans des conditions bien définies un rayonnement fluorescent dont l'intensité sera directement mesurée (Tsé et Capeau, 2003).

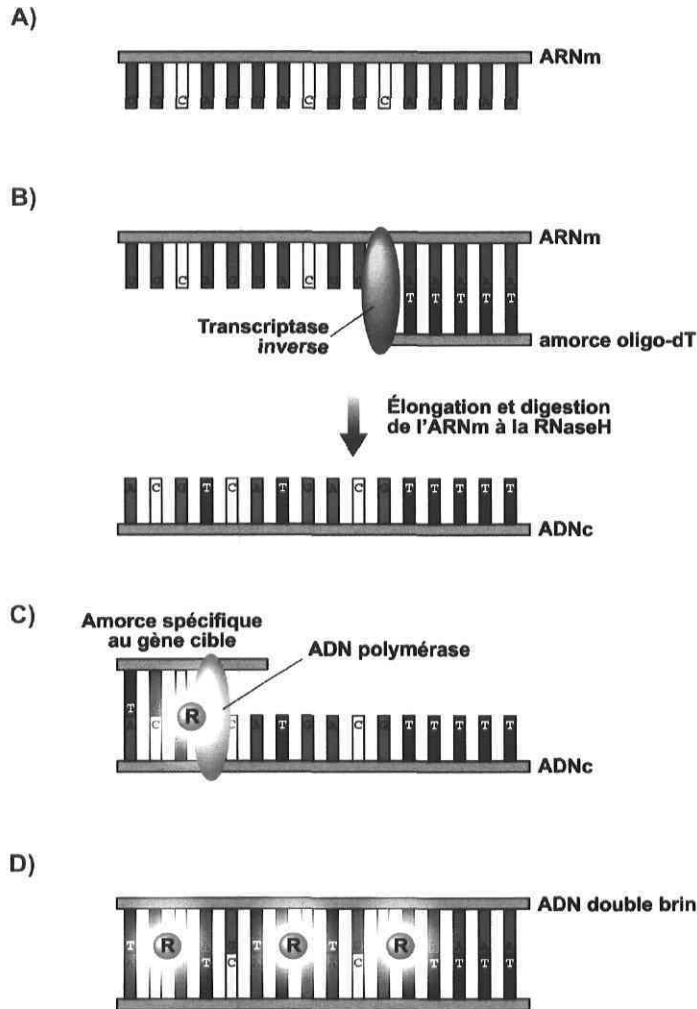


Figure 12 : Schéma simplifié du principe de la PCR quantitative en temps réel. A : l'ARNm polyAdénylé est isolé de l'échantillon. B : les amorces oligo-dT se lient spécifiquement à l'ARNm polyAdénylé, et la transcriptase inverse peut alors amorcer la synthèse du brin d'ADNc à partir des nucléotides triphosphates. C : les amorces spécifiques à la séquence cible se lient à l'ADNc (40°C-65°C), et l'ADN polymérase (Taq) peut ainsi synthétiser le brin complémentaire (72°C). D : ici la molécule rapporteuse R se lie à l'ADN duplexe, et l'intensité de la fluorescence émise est mesurée. Les brins d'ADN sont ensuite dénaturés (95°C) et le cycle d'amplification reprend en C. Adapté de www.ens-lyon.fr/.../rtprcr/rtprcr02.htm.

À chaque cycle de PCR, l'intensité de la fluorescence émise par la molécule rapporteuse augmente, et facilite le traçage d'une courbe qui permet de caractériser les différentes phases de la cinétique PCR et de mesurer la quantité de produit d'amplification généré en

un point de la phase exponentielle. L'intensité de la fluorescence émise est d'abord très faible (ligne de base) dans les premiers cycles, puis augmente de façon exponentielle avant de plafonner (Figure 13). Le point de départ de la phase exponentielle est appelé cycle seuil optique (*Ct threshold* ou *Cp crossing point*). Il correspond au nombre de cycles pour lequel l'intensité de la fluorescence a dépassé le seuil de détection optique, c'est-à-dire une valeur seuil significativement différente du bruit de fond (Tse et Capeau, 2003). Le *Cp* est inversement proportionnel au logarithme de la quantité initiale de molécules d'acide nucléique cible, présentes dans l'échantillon, avant amplification PCR (Heid *et al.*, 1996).

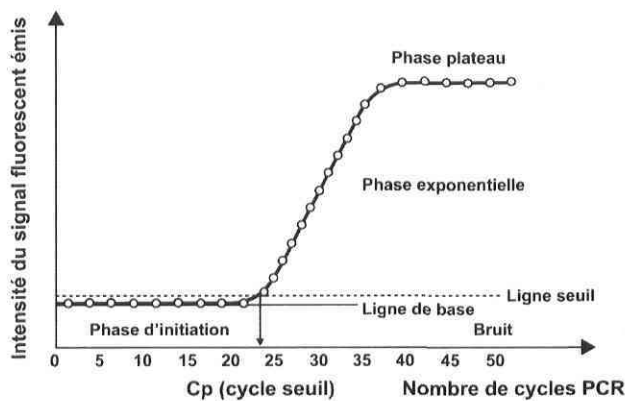


Figure 13 : Cinétique de la réaction PCR. Les trois phases mises en jeu lors de la réaction PCR et le cycle seuil (*Cp*) sont indiqués. La ligne de base reflète l'intensité du bruit de fond de fluorescence. La ligne seuil correspond au seuil de détection optique au-delà duquel la variation en intensité suit une loi exponentielle. Adapté de Tse et Capeau, 2003.

Dans l'approche différentielle de la RT-PCR, un gène de référence sert de standard interne et est coamplifié avec la séquence-cible au cours d'une même réaction PCR (utilisant 2 couples d'amorces spécifiques). La séquence de référence provient d'un gène domestique et présente une transcription constante et indépendante du milieu extracellulaire. Ainsi, cette méthode permet d'évaluer la quantité relative d'un gène cible par rapport à un gène de référence, ce dernier permettant la normalisation de l'acide nucléique extrait de l'échantillon. À l'opposé, dans l'approche compétitive, le standard interne est une séquence exogène d'acide nucléique synthétique construite pour être le plus proche possible de la séquence cible à quantifier. La quantification s'effectue par comparaison du signal PCR

correspondant au gène cible avec les signaux obtenus pour chaque concentration du gène compétiteur. Les systèmes permettant la détection des molécules d'amplicon générées après chaque cycle d'amplification utilisent soit un agent intercalant qui se fixe sur l'ADN double brin, soit une sonde fluorogénique.

L'agent intercalant SYBR Green I

Le système de détection le plus simple repose sur l'inclusion de l'agent intercalant SYBR Green I. SYBR Green I s'intercale entre les bases nucléotidiques de l'ADN double brin nouvellement synthétisé, et peut émettre un signal de fluorescence lorsqu'il est excité par des rayonnements ultraviolets. À la fin de chaque étape d'élongation, la mesure de l'intensité du signal émis permet le suivi cycle par cycle de la réaction PCR (Tse et Capeau, 2003). De plus, le système SYBR Green I permet de tester la spécificité de la réaction par l'établissement d'une courbe de fusion post-PCR et par la détermination de la température de fusion des produits amplifiés (Ririe *et al.*, 1997).

Les sondes d'hydrolyse ou sondes Taqman

Cette méthode utilise comme sonde fluorogénique le Taqman (fluorescence polarisée TaqMan). Il s'agit d'un fragment d'oligonucléotides marqué par deux groupements fluorophores au niveau de ses extrémités : l'extrémité 5' porte le fluorophore donneur, tandis que l'extrémité 3' le fluorophore quencher (Tse et Capeau, 2003). Cette stratégie permet d'exploiter l'activité 5'-3' exonucléase de l'ADN Taq polymérase, permettant l'hydrolyse de la sonde hybridée à la cible spécifique lors de l'élongation des amorces par PCR. À chaque cycle d'amplification, l'hybridation de la sonde spécifique à sa cible est couplée à une mesure de l'intensité de la fluorescence émise par le groupement fluorophore donneur excité (le donneur est libéré de son quencher qui absorbe l'énergie mais n'émet aucune fluorescence). Cette technique permet de quantifier l'expression des gènes. Elle est également très fréquemment utilisée pour détecter des variations de séquence dans un échantillon d'ADN, et cela en une étape.

V- Hypothèses et objectifs du projet

Contexte

Les travaux présentés dans ce mémoire portent sur l'analyse du profil de l'expression génique induit par l'E2, et la DHT dans l'utérus de souris. Ces travaux s'inscrivent dans le projet « Atlas des profils de génomique de l'action des stéroïdes » dirigé par le Dr Fernand Labrie, et retenu au terme du 1^{er} concours de Génome Canada. Le projet Atlas vise à identifier tous les gènes et toutes les protéines régulés par les androgènes, les oestrogènes, la progestérone, les glucocorticoïdes et les minéralocorticoïdes dans tous les tissus de la souris. Il a pour objectifs majeurs l'élucidation des mécanismes d'actions d'hormones jouant un rôle primordial dans la santé des populations, et l'identification des gènes pouvant servir de cibles thérapeutiques. La réalisation de ce projet requiert l'utilisation de techniques avancées en endocrinologie moléculaire, en génomique et bioinformatique, avec la souris comme organisme modèle.

Analyse du profil de l'expression génique par l'E2 et la DHT, dans l'utérus

Si l'E2 et la DHT jouent un rôle important dans la régulation du fonctionnement de l'utérus, plusieurs questions demeurent encore irrésolues. Ainsi, dans l'utérus, un certain nombre de gènes sont modulés de façon temporelle par ces deux hormones. De plus, la DHT et l'E2 sont impliquées dans de nombreuses affections gynécologiques telles que les cancers de l'utérus, l'endométriose ou l'infertilité. En tant que part intégrante du projet Atlas, l'objectif global du présent projet de recherche était de déterminer les profils d'expression des gènes modulés par l'E2 et la DHT dans l'utérus. Plus précisément, l'analyse des modulations temporelles de ces gènes visait la caractérisation ou une meilleure compréhension des sentiers métaboliques et/ou signalétiques impliqués dans la régulation du fonctionnement de l'utérus ou de ses pathologies et, le cas échéant, l'identification de gènes pouvant éventuellement servir de cibles thérapeutiques.

Dans un premier temps, des tableurs (StarOffice 6.0 de Sun Microsystems et Excel de Microsoft), listant tous les gènes représentés sur la biopuce avec leurs valeurs d'expression, ont permis de trier les gènes selon un certain nombre de critères. Ainsi, on a pu séparer les

gènes stimulés des réprimés, et effectuer des courbes de l'intensité de la réponse de chaque gène en fonction du temps. Les gènes ont par la suite été triés selon leur pic d'expression (à chaque heure), leur intensité d'expression et leur nombre de « fold ». Puis, les gènes sélectionnés (intensité > 300 ; fold > |1,9|) ont été classés selon leur profil d'expression avec le logiciel GeneCluster2, en utilisant l'algorithme S.O.M, après que les valeurs aient été normalisées pour obtenir une moyenne de 0 et une déviation standard de 1. Afin de souligner certaines caractéristiques physiologiques de l'utérus, les gènes ont été regroupés par fonction, selon leur profil d'expression, en utilisant les logiciels L2L, EASE, des banques de données Internet et la littérature scientifique. Finalement, grâce aux bases de données Internet (notamment BioCarta) et à la littérature scientifique, on a pu identifier, parmi les gènes sélectionnés, des gènes impliqués dans un même sentier métabolique ou signalétique. L'expression de certains de ces gènes a ensuite été validée par PCR quantitative en temps réel.

L'approche utilisée, ici, est basée sur l'émission d'hypothèses dictées par les résultats tirés de cette analyse (« discovery-driven »). Les études décrites dans ce mémoire sont réalisées sur des souris, en accord avec le guide des soins et de l'utilisation des animaux d'expérience du CCAC (Canadian Council on Animal Care).

VI- MATÉRIEL ET MÉTHODE

La souris comme organisme modèle

La souris possède un génome entièrement séquencé, et de taille similaire à celui du génome humain. C'est la souche pure C57BL/6J, utilisée dans cette expérience, qui fut initialement choisie pour le séquençage du génome de souris dont la séquence quasi-complète a été publiée en 2002 par Waterston *et al.* En effet, C57BL/6 est la souche modèle majoritairement utilisée (Guénet, 2005) pour les études de génétique et de biologie moléculaire chez les mammifères, notamment en ce qui concerne les maladies humaines. De plus, les modèles de souris sont apparus particulièrement utiles pour l'étude des effets des hormones sur le développement et le fonctionnement de l'utérus. La force de

l'utilisation de la souris en tant qu'organisme modèle, réside dans la connaissance que l'on a de son génome et dans notre capacité à l'exploiter, par exemple en induisant la stimulation ou la répression de l'expression de certains de ses gènes. Ainsi, bien qu'il existe des différences substantielles dans les mécanismes qui contrôlent la régulation des utérus murin et humain, la souris s'avère être un outil puissant dans l'élucidation de la fonction des gènes durant le cycle sexuel.

Profils de l'expression génique

La souche C57BL/6J atteint sa puberté entre le 26^{ème} et le 34^{ème} jour (Foster *et al.*, 1991). Ainsi, les souris âgées de 10 semaines, utilisées dans cette étude, étaient post-pubères pour que l'on soit en mesure d'observer les effets des hormones sur leur cycle sexuel. Afin que leurs cycles oestriens soient synchrones, les souris ont été élevées, durant 3 semaines, dans des conditions expérimentales constantes (température, humidité, alternance de lumière et d'obscurité etc...). Puis, on a procédé à l'ovariectomie des souris pour que la synthèse hormonale ovarienne n'affecte pas les doses d'hormone administrées. Chez la plupart des mammifères, les cellules en croissance (en culture) mettent environ 24h à progresser à travers le cycle cellulaire (Lodish *et al.*, 2001). En conséquence, une semaine plus tard, les souris ont été sacrifiées à différents temps sur une durée de 24h (1h, 3h, 12h, 18h et 24h), suivant l'administration de doses physiologiques de DHT ou d'E2, et les utérus ont ensuite été prélevés.

Par la suite, l'ARNm a été extrait, et les données permettant d'établir les profils d'expression des gènes répondant à l'action de l'E2 et de la DHT dans l'utérus, ont été obtenues par l'utilisation de biopuces d'oligonucléotides Affymetrix «Murine Genome-U74 v2 Genechip Set». Tel que mentionné à la section 4.1, la technologie des biopuces Affymetrix (Affymetrix GeneChips) utilise des sondes possédant une très haute spécificité. En effet, ces biopuces sont produites sur la base d'information sur les séquences, et ne nécessitent aucune amplification par PCR. De plus, Affymetrix emploie plusieurs oligonucléotides de 25 bases par transcrit (Kronick, 2004) qui sont synthétisés *in situ* et fixés via une technique de photolithographie (Lockhart *et al.*, 1996), et l'utilisation de cache rend possible la synthèse de centaines de milliers d'oligonucléotides sur des milliers de puces identiques avec une reproductibilité extraordinairement élevée (Gibson et Muse,

2004). Affymetrix utilise également des sondes de mésappariement et d'appariement parfait pour quantifier l'hybridation croisée potentielle (avec des transcrits autres que ceux que l'on veut tester), et développer des algorithmes complexes permettant de discriminer les signaux d'expression spécifiques aux gènes (Lipshutz *et al.*, 1999). Ainsi, un témoin contenant un mésappariement (un nucléotide muté) au centre de sa séquence, est introduit à côté de chaque oligonucléotide-cible. Le niveau d'expression est calculé par la moyenne de la différence entre l'hybridation parfaite et l'hybridation avec le témoin mutant, en utilisant une procédure fournie par Affymetrix avec le logiciel de criblage GeneChip (Gibson et Muse, 2004). Ici, les intensités de signal des gènes β -actine et GAPDH ont été utilisées comme standards internes. Cette méthode, d'appariement et de mésappariement, semble être particulièrement appropriée aux sondes courtes et aux conditions d'hybridation moins stringentes utilisées par Affymetrix (www.affymetrix.com). Les données obtenues ont ensuite été analysées et normalisées avec le logiciel MAS 5.0 (Microarray Suite 5.0) d'Affymetrix.

Dans l'optique d'éliminer toutes variations, dans les données, d'origine biologique ou technique, les gènes différentiellement modulés ont donc été sélectionnés en utilisant la méthode du ratio limite (Mutch *et al.*, 2002), dans laquelle une variable LFC (limit fold change) diminue avec la valeur de l'expression des gènes: $LFC = a + b/x$, où x est l'intensité d'expression minimale du gène. Ici, la courbe est ajustée en fonction de la variabilité du ratio calculé à partir des réplicats de biopuce. La variable limite résultante $LFC = 1.9 + 60.0/x$, permet d'obtenir un pourcentage de faux positifs constant, d'environ 1%. Les gènes au-dessus de ce seuil, dans au moins 2 points de la courbe, sont considérés significatifs. De façon générale, les expressions des gènes analysés par biopuce et sélectionnés par cette méthode, présentent 87,5% de concordance avec l'analyse PCR en temps réel (Mutch *et al.*, 2002).

Puis, les gènes significatifs dont les intensités d'expression étaient supérieures à 300, et les nombres de « fold » supérieurs à 1,9 (en valeur absolue), ont été analysés en utilisant les logiciels GeneCluster, L2L et EASE, ainsi que les banques de données Internet et la littérature scientifique. L'ampleur des listes de gènes générées par les biopuces, nous a

permis d'appliquer une méthode de haute stringence pour la sélection des données et l'analyse des résultats, soutenant ainsi la validité des résultats présentés dans ce mémoire.

La PCR quantitative en temps réel

Afin d'accroître la validité des analyses de cette expérience et des conclusions qui en sont tirées, les expressions de certains gènes impliqués dans des sentiers signalétiques ont donc été confirmées par PCR quantitative inverse en temps réel, effectuée selon le protocole décrit par Luu-The *et al.* (2005) qui utilise le calcul de la dérivée seconde et une correction double. En effet, la RT-PCR inverse permet une estimation du niveau d'expression absolu d'un gène en termes de nombre de copies d'ARNm par microgramme d'ARN total (Luu-The *et al.*, 2005). Pour la détection des molécules d'amplicon générées après chaque cycle d'amplification, le système SYBR Green I utilisé ici, s'avère être très rapide, sensible et spécifique lorsqu'il est employé avec un choix d'amorces appropriées et dans des conditions d'amplification adéquates (Tse et Capeau 2003). Il existe deux méthodes de calcul de la valeur du cycle seuil optique (Cp). Cependant, les résultats obtenus par la méthode la plus répandue (« fit point ») varient fortement selon l'utilisateur, tandis que la méthode de dérivée seconde utilisée par Luu-The *et al.* semble plus précise pour la quantification des gènes à faible expression. Il semblerait que les causes d'erreurs les plus importantes surviendraient lors de la préparation de l'ARNm et de la manipulation de l'échantillon (Souaze *et al.*, 1996). La correction double permet donc de réduire ces erreurs en utilisant, d'une part, les niveaux d'expression d'un gène domestique comme standard interne. D'autre part, l'utilisation, dans le tissu ou les cellules, des niveaux d'expression de ce même gène domestique comme référence, permet aussi d'éviter une variation dans les résultats (variabilité inter-expériences) causée par la variabilité du gène domestique dans chaque tissu (Luu-The *et al.*, 2005).

Chapitre I

**Analyse temporelle de l'activation des phosphatases tyrosine (PTP) et
Map Kinase (MKP), et de la répression d'éléments clefs du sentier IGF-1,
induites par E2 dans l'utérus de souris**

Article en révision à *Physiological Genomics*

Temporal analysis of E2 transcriptional induction of PTP and MKP and down-regulation of IGF-1 pathway key components in the mouse uterus

Mahinè Ivanga, Yvan Labrie, Ezequiel Calvo, Pascal Belleau, Céline Martel, Van Luu-The, Jean Morissette, Fernand Labrie and Francine Durocher.

Oncology and Molecular Endocrinology Research Center, CHUL Research Center, CHUQ, Department of Anatomy and Physiology, Laval University, Québec, CANADA

Abbreviated title: PTP and MKP role in the E2 uterotrophic effect

Correspondence: Francine Durocher

CREMO, CHUL Research Center

2705 Laurier Blvd, T2-53

Québec (Québec) Canada G1V4G2

Francine.Durocher@crchul.ulaval.ca

Phone (418) 654-2296

Fax (418) 654-2761

Résumé

La 17 β -œstradiol (E2) est impliquée dans de nombreuses affections gynécologiques incluant le cancer de l'utérus, l'endométriose, et les léiomyomes utérins. Bien que plusieurs études aient identifié l'« Insulin-like Growth Factor-1» (IGF-1) comme un médiateur de l'effet utérotrophique de l'E2, ce mécanisme d'action n'est pas encore clairement défini. Dans la présente étude, des biopuces d'oligonucléotides Affymetrix ont été utilisées afin d'identifier les gènes modulés, en réponse à une dose physiologique d'E2, dans l'utérus de souris ovariectomisées. Le profil de l'expression génique induit par E2 montre que de nombreux gènes, appartenant au sentier IGF-1, sont régulés par E2. Deux phases de régulation ont été identifiées. Tout d'abord, de 0-6h, les gènes impliqués dans le cycle cellulaire, les facteurs de croissance, les protéines phosphatases tyrosine et MAPK, sont rapidement activés par E2, alors qu' IGF-1R et que de nombreux gènes des sentiers MAPK et PI3 kinase sont inhibés. Plus tard, c.-à-d de 6-24h, les transporteurs et les peptidases/protéases sont stimulés, tandis que les gènes liés à la défense sont différenciellement régulés par E2. Puis, les gènes du cytosquelette sont finalement activés. Nos résultats indiquent qu'une dose physiologique d'E2 induit, en 24h, une série d'évènements transcriptionnels qui activent l'effet utérotrophique, et que l'activation du sentier IGF-1 par E2 semble jouer un rôle essentiel dans ce processus. De plus, les protéines phosphatases tyrosine et MAP kinase seraient impliquées dans le contrôle de l'action utérotrophique d'E2, en ciblant, à différents niveaux, le sentier IGF-1.

Abstract

17 β -estradiol (E2) is well known to be associated with uterine cancer, endometriosis and leiomyomas. Although Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) has been identified as a mediator of the uterotrophic effect of E2 in several studies, this mechanism is still not well understood. In the present study, identification of the genes modulated by a physiological dose of E2, in the uterus, has been done in ovariectomized mice using Affymetrix microarrays. The E2-induced genomic profile shows that multiple genes belonging to the IGF-1 pathway are affected after exposure to E2. Two phases of regulation could be identified. First, from 0-6h, the expression of genes involved in the cell cycle, growth factors, protein tyrosine phosphatases and MAPK phosphatases are quickly up-regulated by E2, while IGF-1R and several genes of the MAPK and PI3 kinase pathways are down-regulated. Later, i.e. from 6-24h, transporters and peptidases/proteases are stimulated, whereas defense-related genes are differentially regulated by E2. Finally, cytoarchitectural genes are modulated later. The present data show that a physiological dose of E2 induces, within 24h, a series of transcriptional events that promote the uterotrophic effect. Among these, the E2-mediated activation of the IGF-1 pathway seems to play a pivotal role in the uterotrophic effect. Furthermore, the protein tyrosine phosphatases and MAP kinase phosphatases are likely to modulate the estrogenic uterotrophic action by targeting, at different steps, the IGF-1 pathway.

Keywords: uterus; ovariectomized mice; E2 modulation; oligonucleotide microarray

Introduction

In mammals, the uterus of a mature female undergoes multiple changes during the menstrual cycle, which reflect the modifications of the uterine endometrium in continuous preparation for embryo implantation. Since the majority of cycles are not associated with conception, they often lead to endometrial degeneration and menstrual bleeding. The endometrium thus exhibits a cyclic pattern of growth, regression, disruption, bleeding, and regeneration throughout reproductive life. These changes are mainly under the control of estrogens, progesterone and androgens. Disregulation of the uterine vasculature has been found to accompany different sex steroid disturbances (27).

17 β -Estradiol (E2) is well known to play the key role in mammalian endometrial physiology, since the proliferation of endometrial cells and the extension of spiral vessels that occur during the proliferative phase of the menstrual cycle are controlled by E2 (19, 45). The estrogen is also frequently associated with endometrial cancer, which comprises two subtypes: endometrioid carcinomas (type I) related to estrogen exposure, and nonendometrioid carcinomas (type II), which are independent of E2 action (15). Type I cancers are characterized by mutation or up-regulation of the expression of genes involved in cell cycle - intracellular trafficking, structural – cytoskeleton and peptidases-proteases. Defects in DNA repair and a near diploid karyotype are also observed.

Type II cancers often display mutations or amplification of cell cycle - intracellular trafficking-related genes and growth factor related-genes (36, 40, 55). However, the majority of cases of endometrial cancers lack mutations in the family of genes cited above, thus suggesting that the molecular pathogenesis of endometrial cancer is not well understood. Furthermore, disregulation of specific groups of genes leads to numerous

physiological disorders namely endometriosis (31), excessive bleeding (7) and cell aberrant growth (27, 31).

Therefore, in order to identify key genes which could be implicated in uterine cancer susceptibility, this study focused particularly on the E2 modulation of the Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) signal transduction, which involves the action of the Insulin-like Growth Factor Binding Proteins (IGFBPs) and the regulation of the Protein Tyrosine Phosphatases (PTPs) and the MAPK phosphatases (MKPs).

The IGF-1 is defined as an estromedin transcriptionally activated by E2. IGF-1 exerts also a strong influence on cell proliferation and differentiation (58) and is a potent inhibitor of apoptosis in human osteoblasts (32). The action of IGF-1 is mainly mediated through the IGF-1 receptor (IGF-1R), which is found throughout the uterus (myometrium, epithelium and stroma), where cells proliferate in response to added IGF-1 (62). IGF-1 signal transduction involves the activation of several intracellular signaling pathways, including the Ras/Raf/MAP Kinase (MAPK) and the PI3 Kinase (PI3K) pathways (67). Furthermore, IGF-1 is seen as an important mediator of the E2 uterotrophic action in mouse (41), as IGF-1-deficient female mice are infertile and display uterine hypoplasia (2), thus suggesting that the IGF-1 action is an important determinant of uterine function. Interestingly, it has been indicated that, in the uterus, E2 can rapidly stimulate a sustained increase in the tyrosine phosphorylation of IGF-1R and IRS-1 (54).

In contrast, PTPs can modulate protein kinase activity either directly or by controlling the phosphorylation state of protein kinase substrates. Disregulation of PTP functions induces an aberrant tyrosine phosphorylation and contributes to the development of many human diseases (73). For example, it has been shown that PTP1B can inhibit the tyrosine activity

of the full length IGF-1R in mammalian cells (6) and is also able to inhibit hormone-induced phosphorylation of the insulin receptor by specifically targeting the pTyr-1162 residue on its activation segment (57). The MKPs are dual-specificity phosphatases that inactivate MAP kinases by specifically dephosphorylating their pTyr and pThr residues, and whose expression is in turn transcriptionally regulated by MAPKs. It has also been demonstrated that the growth factor-stimulating network containing MAPK1/2 follows a two states model, which is MKP concentration-dependent (4).

Even if several genes are known to be E2-responsive, the mechanisms regulating their temporal modulation remain poorly understood, and previous studies have mainly been performed on cultured cells. Microarray analysis provides a powerful tool for analyzing complex biological systems, allowing the identification of gene expression patterns. However, other studies of the rodent uterine genomic profiles have been performed using supra-physiological doses of E2 and/or less time points following E2-exposure (25, 26, 38, 69). Hence, in this study, in order to better understand the *in vivo* events triggered by a physiological dose of E2 at the transcriptional level in the uterus, time course uterine gene expression profiles were examined using oligonucleotide microarray analysis and further validated by Q-RT-PCR. Our data provide new insights into how E2 finely modulates the IGF-1 signal effect in uterine cells and could potentially lead to the identification of cancer susceptibility genes in uterus or other E2-dependent tissues like breast or ovary.

Materials and Methods

Animals and treatment

Ten week-old female C57BL6 mice were received from Charles River (St-Constant, Canada) and were allowed to acclimate for 3 weeks. The animals were housed individually in an environmentally-controlled room (temperature: $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$; humidity: $50 \pm 20\%$; 12-h light-12-h dark cycles, lights on at 07:15h). The mice had free access to tap water and a certified rodent feed (Lab Diet 5002 (pellet), Ralston Purina, St Louis, MO). The experiment was conducted in an animal facility approved by the Canadian Council on Animal Care (CCAC) and the Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC). The study was performed in accordance with the CCAC Guide for Care and Use of Experimental Animals.

Animals, weighing between 20 to 24g, were randomized according to their body weights and were assigned to 6 groups of 14 animals each as followed: 1) Gonadectomized (GDX) control; 2 to 6) GDX + 17β -estradiol (E2; $0.05 \mu\text{g}/\text{mouse}$). On day 1 of the study, animals were bilaterally ovariectomized (GDX) under isoflurane anesthesia. Prior to the necropsy performed on day 8 of the study, mice received a single subcutaneous injection ($0.2 \text{ ml}/\text{mouse}$) of the vehicle alone (5% ethanol-0.4% methylcellulose; group 1) or E2 (groups 2 to 7). The injection of vehicle was performed 24 h prior to the necropsy for animals into group 1 while E2 was injected 1 h (group 2), 3 h (group 3), 6 h (group 4), 12 h (group 5) or 24 h (group 6) prior to the necropsy.

On day 8 of the study, mice under isoflurane anesthesia were exsanguinated at the abdominal aorta followed by cervical dislocation. The uterus was collected and rapidly frozen in liquid nitrogen. Tissues were pooled and kept at -80°C until RNA extraction. According to the treatment, the temporal mRNA changes of 12 thousand genes were analyzed by Affymetrix oligonucleotide microarray analysis (MG-U74 v2).

RNA Isolation and microarray hybridization and analysis

Total RNA was isolated using Trizol (Invitrogen, Burlington, Ontario) following manufacturer's protocol. Total RNA (20 μg) was converted to cDNA by incubation with 400 U SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen) using a T7-oligo-d(T)24 primer (5'-GGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGGCGG-(dT)24-3') 1X first strand buffer (50 mM Tris-HCl Ph 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT) and 0.5 mM dNTPs at 42 $^{\circ}\text{C}$ for 1h. Second-strand synthesis was performed using 40 U DNA polymerase I, *E.coli* DNA ligase, 2 U RNase H (Invitrogen), 1X reaction buffer (18.8 mM Tris-HCl pH 8.3, 90.6 mM KCl, 4.6 mM MgCl₂, 3.8 mM DTT, 0.15 mM NAD, 10 Mm (NH₄)₂SO₄) and 0.2 mM dNTPs at 16 $^{\circ}\text{C}$ for 2h. cDNAs were blunt-ended with 10 U of T4 polynucleotide kinase (Invitrogen) incubated 5 min at 16 $^{\circ}\text{C}$. cDNA was then extracted with phenol-chloroform using phase lock gels (Brinkman, Mississauga, Ontario) ethanol-precipitated and resuspended in 10 μl of DEPC-treated H₂O. cDNA was *in vitro* transcribed using a T7 BioArray High Yield RNA Transcript Labeling Kit (Enzo Diagnostics, Farmingdale, NY) to produce biotinylated cRNA. The mixture (20 μl final volume) was incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 5 h, with gentle mixing every 30 min. Labeled cRNA was purified

with an RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) according to the manufacturer's protocol. Purified cRNA was then fragmented to 30-200 mer cRNA using a fragmentation buffer (100 mM potassium acetate –30 mM magnesium acetate-40 mM Tris-acetate pH 8.1), for 20 min at 94°C. The quality of total RNA, cDNA synthesis, cRNA amplification and cRNA fragmentation was monitored by micro-capillary electrophoresis (Bioanalyzer 2100, Agilent Technologies, Palo Alto, CA).

cRNA probes were hybridized to MG-U74 v2 Genechip Set (Affymetrix, Santa Clara, CA). Fragmented cRNA (15µg) was incubated with 1X hybridization buffer (0,1mg/ml herring sperm DNA, 0.5 mg/ml acetylated BSA, 5 nM control oligonucleotide B2) and 1X eukaryotic hybridization control solution (1.5 pM *BioB*, 5 pM *BioD*, 25 pM *BioD* and 100 pM *cre*), for 16 h at 45°C with constant rotation (60 rpm). cRNA probe from the control group was hybridized on two microarrays (duplicate) while cRNA probe corresponding to each timepoint (pool of 14 mice) was hybridized on separate microarrays. Microarrays were then processed using an Affymetrix GeneChip Fluidic Station 400 (protocol EukGE-WS2Av4). Staining was performed with streptavidin-conjugated phycoerythrin (SAPE) followed by amplification with a biotinylated anti-streptavidin antibody and by a second round of SAPE solution. Genechips were scanned using Genechip Scanner 3000 (Affymetrix). Signal intensities for β -actin and GAPDH genes were used as internal quality controls. The ratio of fluorescent intensities for 5' and 3' of these housekeeping genes was <2. Scanned images were analyzed and normalized (target intensity equal to 500) with Microarray Suite 5.0 (Affymetrix).

Differential expressed genes are selected using a variable limit fold change (LFC) (43) decreasing with gene expression value ($LFC = a + b/x$ where x is the minimum intensity of gene expression). The curve was estimated based on a ratio distribution calculated from replicated chips. The resulting cut-off point, $LFC = 1.9 + 60.0/x$, produces an approximately constant rate of false positive modulated genes of 0.1%. Genes over this criteria must also be called present at least in 2 points of the experiment using MAS 5 program.

Clustering analysis

The differential expressed genes were clustered using the GeneCluster2 software based on a self-organizing maps algorithm. Genes showing a max/min ratio greater than 1.9 fold in their gene expression levels and above 300 in their expression intensities were selected. Selected genes were then normalized to obtain a mean value of zero and a standard deviation of one. Finally, the normalized data were clustered. The expression patterns of certain protein tyrosine phosphatases and MAP kinase phosphatases, as well as selected genes belonging to the IGF-1 pathway were validated by Q-RT-PCR. The L2L software was used to classify genes from each cluster into biological processes (44). When the genes were not classified by this software, EASE software (28) was used to identify the biological process associated to the gene. Using L2L the fold-enrichment of specific subclasses of general functions was also calculated along with the corresponding p-value derived from a binomial distribution. The genes were classified in more than one major biological process (when applicable) since several proteins can demonstrate many different physiological activities in the cell metabolism, which is more representative of the gene function.

Quantitative Real-Time PCR (Q-RT-PCR)

cDNA corresponding to 20 ng of total RNA coming from samples of a duplicated in vivo protocol was used to perform fluorescent-based Real-Time PCR quantification using the Light Cycler Real-Time PCR apparatus (Roche Inc, Nutley, NJ). Reagents were obtained from the same company and were used as described by the manufacturer. The conditions for PCR reactions were: denaturation at 95°C for 10 sec, annealing at 56 to 66°C for 5 sec and elongation at 72°C for 7 to 13 sec. The reaction was then heated for 3 sec at 2°C lower than the melting temperature of the DNA fragment. Reading of the fluorescence signal was taken at the end of the heating to avoid non-specific signal. A melting curve was performed to assess non-specific signal. Oligoprimers that allow the amplification of approximately 200 bp were designed by GeneTools software (Biotech Inc, Edmonton, Alberta, Canada) and their specificity was verified by blast in the GenBank database. Data calculation and normalization was performed using second derivative and double correction method as described in Luu-The et al, *Biotechniques* 2005 (66) and using the housekeeping gene hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1 (Hprt1). Hprt1 has shown to be a gene having stable expression levels from embryonic life through adulthood in various tissues (68). mRNA expression levels are expressed as number of copies/ μ g total RNA using a standard curve of Cp versus logarithm of the quantity. The standard curve was established using known cDNA amount of 10, 10², 10³, 10⁴, 10⁵ and 10⁶ copies of Hprt1 and a Light Cycler 3.5 program provided by the manufacturer (Roche Inc).

Results

Microarray Analysis: Genomic response of the uterus to estradiol

To study the time course of estradiol action on uterine physiology, we analyzed 1141 genes regulated by E2 in the uterus. Among the selected genes, whose regulation is stimulated or repressed, seven individual profiles (A-G) are represented in Figure 1 (for gene content of each cluster, see supplemental data, Table 1). For the clustering analysis, we used (1 × 4) node numbers for the E2-induced genes, while (1 × 3) node numbers were used for the down-regulated genes. These node numbers are representative of the temporal change of the genes listed for a given clustering, as each of them gave independent clustering patterns. We can see that more than 64% (736) of the E2-modulated genes listed are stimulated. Moreover, among the 736 genes up-regulated by E2, four expression profiles clearly emerge: genes of cluster A (19%, 139 out of 736) are induced within 3h, genes of cluster B (37%, 274 out of 736) within 6h, genes of cluster C (26%, 188 out of 736) within 12h, while genes of cluster D (18%, 135 out of 736) are transiently stimulated within 24 hours. The majority of genes stimulated by E2 are represented in clusters B and C. However, only 3 expression profiles are observed in the 405 genes that are down-regulated by E2. Thus, the genes of cluster E (25%, 101 out of 405) are repressed within 6h, while genes of cluster F (53%, 215 out of 405) show a repression plateau between 6h and 12h, and genes of cluster G (22%, 89 out 405) are gradually repressed within 24h. The majority of E2 down-regulated genes are thus inhibited between 6h and 12h (cluster F).

Following their expression pattern profile, genes from each cluster (A-G) were then categorized into 10 different biological processes using the L2L and EASE softwares. The genes not assigned to a known function were classified as unknown biological process. The gene proportion of each function for a given profile has been calculated and is illustrated in Figure 2. According to the data presented in this Figure, it can be seen that, at specific times, E2 affects similarly genes having associated functions.

Indeed, among the stimulated genes (clusters A, B, C and D), the genes involved in the signal transduction and transcription represent the majority in cluster A, the latter group being also dominant in cluster B with genes associated to protein metabolism. The major gene functions found in cluster C are associated with protein metabolism and transport, while in cluster D, the cell adhesion, the development and the energy metabolism represent the major biological processes.

Among the down-regulated genes represented (clusters E, F and G), the energy metabolism is the main biological process down-regulated in the cluster E, while in cluster F, we assist to a slight decrease of expression of genes implicated in signal transduction, transcription and protein metabolism, compared to the cluster E. In cluster G, the genes related to the defense and inflammation are significantly preponderant.

Specific Early-Modulated Genes: 0h to 6h (clusters A, B and E)

As shown in figure 3, the genes associated to the signal transduction were predominantly observed in cluster A and especially the genes belonging to the protein kinase cascade, the MAPKK cascade and mRNA catabolism demonstrated a fold-enrichment of 3.6, 5.7 and 11.1, respectively. Several transcription regulators like Fos, Junb and Egr1 are well

recognized as E2-responsive genes (11, 13, 35). The genes implicated in translation, ribosome biogenesis and amino acid activation are particularly enriched in cluster B in a range covering 6 to 10.8-fold. The down-regulated genes included in the cluster E belong are involved in the fatty acid and aldehyde metabolisms (33).

Specific Late-Modulated Genes: 6h to 24h (clusters C, D, F and G)

The transport molecules and genes involved in protein metabolism represent the major groups of cluster C, and more particularly the genes associated with the intracellular transport (3.6-fold), the cellular localization (3.5-fold), the protein targeting (5.5-fold) and the actomyosin structure organization and biogenesis (29.9-fold). Finally in the cluster D, we assist to an overexpression of genes involved in the cell adhesion, the development and the energy metabolism, especially for the genes implicated in epidermis and ectoderm development, in tissue development and keratinocyte differentiation and carbohydrate metabolism and cholesterol (33) which display an over-abundance ranging from 7.1- to 41-fold. The processes related to cell growth and apoptosis are also slightly more represented in this cluster compared to clusters A, B and C (see Table 1, supplemental data), which is consistent with the modulation of several cell cycle components described by Tong and Pollard (64).

The cluster F specifically identified down-regulated genes involved in the bone metabolism and cell differentiation which demonstrate a fold enrichment of 14.8 and 7.1, respectively. The cluster G showed a significative lower expression of genes related to immunity and RNA processing, particularly genes associated with the antigen presentation and processing (HLA genes) which show a fold enrichment of 15.5.

Taken together, these observations point towards evidence of rapid induction of transcriptional regulators and signaling component genes, followed by a late induction of cytoarchitectural genes which have been well demonstrated in previous studies (26, 38, 69). Interestingly or Additionnally this study showed a significative time-dependent gradual diminution of specific genes involved in immunity and inflammation.

Estradiol modulates the IGF-1 pathway

In order to confirm the temporal changes of gene expression levels of certain genes involved in the IGF-1 pathway, Q-RT-PCR was performed (Figure 4). Briefly, six insulin-like growth factor-related genes, three Ras/Raf/MAP kinase pathway-related genes, three PI3K pathway-related genes and five tyrosine and map kinase phosphatase genes were analyzed. All genes tested displayed a 82% correlation rate between microarrays and Q-RT-PCR.

Insulin-like growth factor-related genes

In the present study, the IGF-1 gene is induced within 12h (Figure 4, Panel A). Interestingly, its receptor, IGF-1R, is down-regulated within 6h. The expression of IGFBP2 and 6 are increased and decreased, respectively, within 12h. Moreover, the IGFBP3 gene is inhibited within 12h while the IGFBP5 gene is transiently stimulated within 24h. It is noteworthy that these gene products, in particular IGFBP3 and IGFBP5 are known to, respectively, inhibit and potentiate the effect of IGF-1 in fibroblast cells, while others like IGFBP6 consistently inhibit IGF actions (17) and that IGFBP2 has been shown to promote, although moderately, the effect of IGF-1 in vascular endothelial cells (3). Our results are therefore consistent with these previous findings (26, 38, 69), although IGF-1R and

IGFBP6 have not been identified as regulated genes by E2 in the similar study performed by Hewitt et al (26).

Ras/Raf/MAP kinase pathway

Expression of the Cdc25c gene is increased transiently until 24h (Figure 4, Panel B). Furthermore, most Ras genes (Ran, Ras12-9) are also induced within 3h (see Table 1, supplemental data). Then, MAPK1 (ERK2) expression shows a slight repression plateau between 6h and 18h. The expression of the c-Myc gene is increased within 3h and ESTs similar to putative c-Myc-responsive [H.sapiens] are induced within 18h. In fact, c-Myc is an immediate early-gene known to be activated after stimulation of the MAPK signal transduction pathway (10, 23). Following E2 treatment, structural Ornithine Decarboxylase gene (ODC) is also up-regulated within 6h, its protein activity being well known to be induced after exposure to E2 in a tissue such as the uterus (71). Indeed the ERK1/ERK2 activation has been shown to be essential for ODC induction, which is associated with cell proliferation (20, 56).

PI3K pathway

From Panel B (Figure 4), it can be seen that the expression of GAB1 and PI3KR2 genes is decreased within 6h, while the SH3-domain GRB2-like B1 gene (SH3GLB1) which codes for an endophilin cell death promoter is first slightly up-regulated within 3h and then inhibited between 6h and 12h (data not shown). The BCL2-like 11 (apoptosis facilitator) gene is also down-regulated within 12h. The IGF-1 activation of the PI3K pathway is known to promote an antiapoptotic effect (67).

Tyrosine and Map kinase phosphatases

As shown in Figure 4 (Panel C), the protein tyrosine phosphatase genes PTP1B, and PTP4A are early induced by E2, namely within 3h. Similarly, Map kinase phosphatase genes MKP1 and MKP3 are up-regulated within 3h. Then, the STEP gene, whose product is known to deactivate the phosphotyrosine activity of ERK1/2 (associated with mitogenesis) (53), is induced within 6h. The MKP1 gene product is also known to deactivate ERK (MAPK) (59) and the MKP3 gene product dephosphorylates the activated ERK2 (MAPK1) (42). Another gene belonging to this class is PTP1B, whose protein inhibits the activity of the full length IGF-1R in mammals by specifically targeting the pTyr-1162 residue on its activation segment, while the product of PTP4A has been reported to stimulate cell growth and could be involved in tumorigenesis (9).

Taken together, these observations suggest that, as presented in Figure 5, the Protein Tyrosine Phosphatases and MAP Kinase Phosphatases could be potentially closely involved in the extent and duration of the E2 uterotrophic effect in mice by targeting the IGF-1 pathway.

Discussion

In the present study, ovariectomized mice were exposed to an acute physiological dose of E2 up to 24h. Our global data demonstrate that a physiological dose of E2 (2.5 µg/kg) can trigger a similar uterotrophic effects than those observed when using a supraphysiological dose (5-50 µg/kg) (26, 38, 69) but this physiological dose seems to activate groups of genes having similar functions in a more homogenous fashion than that observed in other studies, which will be discussed later in more details (e.g. major IGFbps and keratinization-associated molecules are detected and regulated in an expected manner).

The major cell cycle- intracellular trafficking-related genes involving notably the protein kinase and MAPKK signaling cascades and HSPs genes are up-regulated early, *i.e.* within 0-6h. Indeed, it has been shown that some HSPs would participate in cell proliferation by interacting with proteins needed for the proliferation process (49). Specifically, oncogenes (Fos and Junb) are quickly up-regulated (within 3h), these genes being known to be rapidly induced by E2 (11, 35, 69). In addition, as previously reported for some of these genes (13, 38, 69) we observed that most signal transduction-related genes, transcription factors (Egr1, Egr2, Cebpb and Nr4a1) and ribosomal protein genes are also stimulated during the first phase of the effect of E2 (from 0 to 6h). Taken together, these results are in line with previous observations confirming that among E2-regulated genes in the mouse uterus, early-induced transcription factors may play an important role in subsequent changes in gene expression (69), further suggesting that in response to E2 a transcriptional cascade may operate in the uterus (38). Cardenas *et al.* recently reported that the administration of E2 to ovariectomized gilts increased uterine weight (8). It is well known that pro-estrus in rodents is characterized by proliferation of endometrial cells accompanied by a gradual

increase of estrogen concentrations (61). Interestingly, contrary to former studies, we demonstrated that Gadd45g gene and Gadd45a to a lower level (31.3-fold and 3.6-fold, respectively), are both markedly stimulated very early. Moreover, this regulation has been confirmed by QRT-PCR and given the logical modulation of several known E2-responsive genes in this study, this stimulation has to be considered. Although no estrogen response element (ERE) are found in the proximal region of the promoter of this gene, the presence of many SP1 sites could explain this regulation. Gadd45 proteins are involved in negative growth control rendering this observation to be investigated more extensively. Interestingly, Gadd45g interacts with p21 and especially PCNA (Proliferative cell nuclear antigen), which has been demonstrated to impede its effect on cell cycle arrest (1), as also observed for Gadd45 α and Gadd45 β (65).

According to previous results (26, 38, 69), peptidase and protease genes reach their peak of expression at 12h. It has been shown that peptidases, proteases and their inhibitors could play an important role in balancing the uterine environment for appropriate sperm activity and the periodic remodeling of the uterine endometrium (61). Genes involved in intracellular transport and localization as well as protein targeting are particularly also predominant at 12h. In agreement with the uterotrophic effect of E2, our data show a gradual up-regulation (until 24h) of most structural and cytoskeleton, extracellular matrix and cell adhesion genes required for tissue development, which is also consistent with previous studies (26, 38, 69).

Interestingly, our data revealed a global modulation of many molecules associated with keratinization processes mainly observed in the cluster D, which is consistent with the

cytoarchitectural structure evolution. Especially for the Small proline-rich protein (Sprr) 1A and 2A, described previously by Hewitt et al (26), we reported here the up-regulation of Sprr1B, 2B, 2D, 2F and 2G. Moreover, in addition to the Keratin complex 1 gene 13 (Krt1-13) and 19 and Krt2-6a designed as E2-regulated (26), the data presented here display the up-regulation of Krt1-10, -16, -17, and -18 and Krt2-18 and -7. (Cluster D) (see Table 1, supplemental data). Taken together, these regulations validated the efficacy of the treatment and the reliability of data.

Although the number of down-regulated genes is more limited, we can point out the down-regulation of inflammation genes occurring lately (between 12h and 24 h). Previous findings have demonstrated that E2 has opposing effects on BM lymphoid and myeloid differentiation (48). In concordance with these results, our data show that most of the immune genes early-induced code for myeloid precursors differentiate molecules and the late down-regulated genes code mainly for lymphoid precursors differentiate molecules (see Table 1, supplemental data). Therefore, E2 may serve in promoting the myeloid differentiate molecules action as well as inhibiting the lymphoid differentiate molecules action in the mouse uterus.

Estrogens are known to behave as proadipogenic factors, and IGF-1 has been shown to stimulate both growth and differentiation of preadipocytes (16). In this study, the expression of both lipid transport and metabolism-related genes is decreased, and then later, is increased by E2, which has not been observed in other studies. Interestingly, it has been suggested, although not significantly, that E2 could potentially down-regulate triglycerides

in liver, but significantly induces serum triglycerides while serum high-density lipoproteins seem to be slightly reduced in ovariectomized rats (22, 34, 52).

To further support our observations, we have developed a scheme illustrating how IGF-1 pathway components interact and affect one another (Figure 5). Consistent with the global expression profile revealed by our data, it has been suggested that IGF-1 is a mediator of the E2 uterotrophic effect in the rat uterus (29, 41). The IGFBPs bind specifically to IGF-1 with high affinity (17). As observed previously (39), in this study the expression of IGFBP genes that inhibit the IGF-1 effect (IGFBP3 and 6), appears to be repressed by E2, while the expression of IGFBP genes that potentiate the IGF-1 effect (IGFBP2 and 5), is stimulated by E2.

In fact, these gene products are known to facilitate the interaction with the receptor. Interestingly, IGFBP2 and 3 have been detected respectively in the luminal epithelium and in the stromal cells of the endometrium, while IGFBP5 and 6 are expressed in the myometrium (21). IGF-1 binds to its receptor and induces a transphosphorylation that activates multiple signals which promote cellular proliferation. Indeed, it has been shown that a sustained increase in the tyrosine phosphorylation of IGF-1R and IRS-1 can be caused by E2 in the endometrial epithelial cells of ovariectomized mice (54).

E2 can then induce an IGF-1-activated signal transduction of the PI3K and Ras/Raf/MAP kinase pathways. The E2 activation of the PI3K protein thereafter induces the phosphorylation of AKT in endometrial cells (24) and the inactivation of the pro-apoptotic protein BAD, a member of the Bcl2 family which regulates the apoptotic response. E2 also inhibits SH3GLB1, an endophilin known to interact with the pro-apoptotic protein BAX and to promote cell death in mouse hematopoietic cells following interleukin-3 withdrawal

(12), these genes being well known to contribute to apoptosis protection (51). The activation of the MAP kinase pathway has been shown to induce a transcriptional response associated with mitogenesis (37) and cell motility (5, 14, 63). As a consequence, genes that play important roles in cell proliferation induction, like c-Myc and ODC in this study, are up-regulated following E2 stimulation of the MAPK signal transduction pathway. It has also been shown that the overexpression of ERK2 (MAPK1) activates Myc (10). Consistent with these results Inoue *et al* (30) recently suggested that endometrial IGF-1 stimulates proliferation of mouse endometrial stromal cells, and that the MAPK pathway is involved in DNA replication of endometrial stromal cells. However, our results also show a slight E2 inhibition of the expression of ERK2 (MAPK1) gene involved in the MAPK pathway and whose protein is phosphorylated after E2 exposure (Figure 5). This could be explained by the activation of STEP, MKP3 and MKP1, whose gene products have been reported to inhibit MAPK1 (72). Moreover, it has to be stated that Myc can also be quickly transcriptionally activated by the direct action of E2, through the EREs present in its promoter (18).

In addition, IGF-1R overexpression and/or its constitutive activation have been associated with malignant transformation and have been linked to the metastatic properties of tumor cells. Particularly, endometrial tumors are more likely to overexpress IGF-1R (47). In the present data, IGF-1R is down-regulated by E2, consistent with a cancer-free state. This could be explained by the activation of PTP1B, whose gene product has been shown to inhibit the tyrosine activity of the full length IGF-1R in mammalian cells (6). Obviously, at the same time E2 induces an uterotrophic action in mice, it controls its amplitude by attenuating the initial signaling events.

In analogy with what is seen in cardiac cells where E2 increases MKP1 expression (60), we show that in the uterus, E2 promotes the early-induction of the protein tyrosine and MAP kinase phosphatase genes such as PTP1B, MKP1, MKP3 and STEP, whose proteins target certain activated components of the IGF-1 pathway suggesting that these phosphatases may act as a negative control on IGF-1 signalling, in the mouse uterus. In the present study, E2 also down-regulates some IGF-1 pathway key components such as IGF-1R and MAPK1 (ERK2). However, the IGF-1R signaling pathways exhibit redundancy because of considerable cross-talks between them (46). There is also evidence of an E2-regulation of IGF-1 via Androgen Receptor (AR) production (50, 70) and of cross-talks in IGF-1R and estrogen receptor signaling (25, 41, 67), thus illustrating the complexity of this process.

Our data supports previous findings that E2 activates a transcriptional cascade resulting in an uterotrophic effect in the mouse. To control this process, E2 induces concomitantly genomic (gene modulation) and non-genomic (phosphorylation / dephosphorylation) mechanisms, although the changes observed in this study are all genomic since they seem to result from altered gene expression. A comprehensive knowledge of these mechanisms would be extremely useful for understanding the evolution and progression of uterine cancers as well as gynecological diseases and infertility. The role of the IGF-1 pathway appears to be pivotal in this process and therefore more work is definitely needed to further progress in this field.

Acknowledgments

This work was supported by Genome Canada and Genome Québec for the ATLAS project. M.I. is a recipient of a CIHR (Canadian Institutes of Health Research) studentship as part of a training program in genomics (“Génomique fonctionnelle des maladies endocriniennes”) and of a studentship of the gabonese government. F.D. is a recipient of a Research Career Award in Health Sciences by CIHR/Rx&D HRF (Health Research Foundation).

References

1. **Azam N, Azam N, Vairapandi M, Zhang W, Hoffman B, Liebermann DA.** Interaction of CR6 (GADD45gamma) with proliferating cell nuclear antigen impedes negative growth control. *J Biol Chem* 276:2766-2774, 2001.
2. **Baker J, Hardy MP, Zhou J, Bondy C, Lupu F, Bellve AR, and Efstratiadis A.** Effects of an Igf1 gene null mutation on mouse reproduction. *Mol Endocrinol* 10:903-918, 1996.
3. **Bar RS, Booth BA, Boes M, and Dake BL.** Insulin-like growth factor-binding proteins from vascular endothelial cells: purification, characterization, and intrinsic biological activities. *Endocrinology* 125:1910-1920, 1989.
4. **Bhalla US, Ram PT, and Iyengar R.** MAP Kinase Phosphatase As a Locus of Flexibility in a Mitogen-Activated Protein Kinase Network. *Science* 297:1018-1023, 2002.
5. **Bonacchi A, Romagnani P, Romanelli RG, Efsen E, Annunziato F, Lasagni L, Francalanci M, Serio M, Laffi G, Pinzani M, Gentilini P, and Marra F.** Signal transduction by the chemokine receptor CXCR3: activation of Ras/ERK, Src, and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt controls cell migration and proliferation in human vascular pericytes. *Biol Chem* 276:9945-9954, 2001.
6. **Buckley DA, Loughran G, Murphy G, Fennelly C, and O'Connor R.** Identification of an IGF-1R kinase regulatory phosphatase using the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* and a GFP tagged IGF-1R in mammalian cells. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 55:46-54, 2001.

7. **Buttram VC Jr and Reiter RC.** Uterine leiomyomata: etiology, symptomatology, and management. *Fertil Steril* 36:433-445, 1981.
8. **Cárdenas H and Pope WF.** Attenuation of Estrogenic Effects by Dihydrotestosterone in Pig Uterus Is Associated with Downregulation of the Estrogen Receptors. *Biol Reprod* 70:297-302, 2004.
9. **Cates CA, Michael RL, Stayrook KR, Harvey KA, Burke YD, Randall SK, Crowell PL, and Crowell DN.** Prenylation of oncogenic human PTP(CAAX) protein tyrosine phosphatases. *Cancer Lett* 110:49-55, 1996.
10. **Chuang CF and Ng SY.** Functional divergence of the MAP kinase pathway ERK1 and ERK2 activate specific transcription factors. *FEBS Lett* 346:229-234, 1994.
11. **Cicatiello L, Sica V, Bresciani F, Weisz A.** Identification of a specific pattern of "immediate-early" gene activation induced by estrogen during mitogenic stimulation of rat uterine cells Receptor. *Receptor* 3:17-30, 1993.
12. **Cuddeback SM, Yamaguchi H, Komatsu K, Miyashita T, Yamada M, Wu C, Singh S, and Wang H-G.** Molecular cloning and characterization of Bif-1: a novel Src homology 3 domain-containing protein that associates with Bax. *J Biol Chem* 276:20559-20565, 2001.
13. **de Jager T, Pelzer T, Muller-Botz S, Imam A, Muck J, Neyses L.** Rapid gene activation via the ERK1/2 pathway and serum response elements. *J Biol Chem* 276:27873-80, 2001.
14. **Delehedde M, Sergeant N, Lyon M, Rudland PS, and Fernig DG.** Hepatocyte growth factor/scatter factor stimulates migration of rat mammary fibroblasts through

- both mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathways. *Eur J Biochem* 268:4423-4429, 2001.
15. **Deligdisch L and Holinka CF.** Endometrial carcinoma: two diseases? *Cancer Detect Prev* 10:237-246, 1987.
 16. **Dieudonne MN, Pecquery R, Leneuve MC, and Giudicelli Y.** Opposite Effects of Androgens and Estrogens on Adipogenesis in Rat Preadipocytes: Evidence for Sex and Site-Related Specificities and Possible Involvement of Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α 2. *Endocrinology* 141:649-656, 2000.
 17. **Duan C and Xu Q.** Roles of insulin-like growth factor (IGF) binding proteins in regulating IGF actions. *Gen Comp Endocrinol* 142:44-52, 2005.
 18. **Dubik D and Shiu RP.** Mechanism of estrogen activation of c-myc oncogene expression *Oncogene* 7:1587-1594, 1992.
 19. **Farquhar CM.** Extracts from the "clinical evidence". Endometriosis. *BMJ* 320:1449-1452, 2000.
 20. **Flamigni F, Facchini A, Giordano E, Tantini B, and Stefanelli C.** Signaling pathways leading to the induction of ornithine decarboxylase: opposite effects of p44/42 mitogen-activated protein kinase (MAPK) and p38 MAPK inhibitors. *Biochem Pharmacol* 61:25-32, 2001.
 21. **Girvigian MR, Nakatani A, Ling N, Shimasaki S, and Erickson GF.** Insulin-like growth factor binding proteins show distinct patterns of expression in the rat uterus. *Biol Reprod* 51:296-302, 1994.

22. **Goss PE, Qi S, Cheung AM, Hu H, Mendes M, and Pritzker KPH.** The selective estrogen receptor modulator SCH 57068 prevents bone loss, reduces serum cholesterol and blocks estrogen-induced uterine hypertrophy in ovariectomized rats. *J. Steroid Biochem* 92:79-87, 2004.
23. **Gupta S and Davis RJ.** MAP kinase binds to the NH₂-terminal activation domain of c-Myc. *FEBS Lett* 353:281-285, 1994.
24. **Guzeloglu-Kayisli O, Kayisli UA, Luceli G, and Arici A.** In Vivo and In Vitro Regulation of AKT Activation in Human Endometrial Cells is Estrogen Dependent. *Biol Reprod* 71:714-721, 2004.
25. **Hewitt SC, Collins J, Grissom S, Deroo B, and Korach KS.** Global uterine genomics in vivo: Microarray evaluation of the estrogen receptor α -growth factor cross talk mechanism. *Mol Endocrinol* 19:657-668, 2005.
26. **Hewitt SC, Deroo BJ, Hansen K, Collins J, Grissom S, Afshari CA, and Korach KS.** Estrogen receptor-dependent genomic responses in the uterus mirror the biphasic physiological response to estrogen. *Mol Endocrinol* 17:2070-2083, 2003.
27. **Hickey M and Fraser I.** Human Uterine Vascular Structures in Normal and Diseased States. *Microsc Res Tech* 60:377-389, 2003.
28. **Hosack DA, Dennis G Jr, Sherman BT, Lane HC, Lempicki RA.** Identifying biological themes within lists of genes with EASE. *Genome Biol* 4:R70, 2003.
29. **Huynh H.** Suppression of uterine insulin-like growth factor binding protein 5 by estrogen is mediated in part by insulin-like growth factor I. *Int J Oncol* 12:427-432, 1998.

30. **Inoue A, Takeuchi S, and Takahashi S.** Insulin-like growth factor-I stimulated DNA replication in mouse endometrial stromal cells. *J Reprod Dev* 51:305-313, 2005.
31. **Kao LC, Germeyer A, Tulac S, Lobo S, Yang JP, Taylor RN, Osteen K, Lessey BA, and Giudice LC.** Expression Profiling of Endometrium from Women with Endometriosis Reveals Candidate Genes for Disease-Based Implantation Failure and Infertility. *Endocrinology* 144:2870-2881, 2003.
32. **Kawakami A, Nakashima T, Tsuboi M, Urayama S, Matsuoka N, Ida H, Kawabe Y, Sakai H, Migita K, Aoyagi T, Nakashima M, Maeda K, and Eguchi K.** Insulin-like growth factor I stimulates proliferation and Fas-mediated apoptosis of human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 247:46-51, 1998.
33. **Liang CP, Tall AR.** Transcriptional profiling reveals global defects in energy metabolism, lipoprotein, and bile acid synthesis and transport with reversal by leptin treatment in ob/ob mouse liver. *J Biol Chem* 276:49066-49076, 2001.
34. **Liu ML, Xu X, Rang WQ, Li YJ, and Song HP.** Influence of ovariectomy and 17beta-estradiol treatment on insulin sensitivity, lipid metabolism and post-ischemic cardiac function. *Int J Cardiol* 97:485-93, 2004.
35. **Loose-Mitchell DS, Chiappetta C, Stancel GM.** Estrogen regulation of c-fos messenger ribonucleic acid. *Mol Endocrinol* 2:946-51, 1988.
36. **Matias-Guiu X, Catasus L, Bussaglia E, Lagarda H, Garcia A, Pons C, Munoz J, Arguelles R, Machin P, and Prat J.** Molecular pathology of endometrial hyperplasia and carcinoma. *Hum Pathol* 32:569-577, 2001.

37. **Mii S, Khalil RA, Morgan KG, Ware JA, and Kent KC.** Mitogen-activated protein kinase and proliferation of human vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 270:H142-H150, 1996.
38. **Moggs JG, Tinwell H, Spurway T, Chang H-S, Pate I, Lim FL, Moore DJ, Soames A, Stuckey R, Currie R, Zhu T, Kimber I, Ashby J, and Orphanides G.** Phenotypic Anchoring of Gene Expression Changes during Estrogen-Induced Uterine Growth. *Environ Health Perspect* 112:1589–1606, 2004.
39. **Molnar P, Murphy LJ.** Effects of oestrogen on rat uterine expression of insulin-like growth factor-binding proteins. *J Mol Endocrinol* 13:59-67, 1994.
40. **Moreno-Bueno G, Sánchez-Estévez C, Cassia R, Rodriguez-Perales S, Diaz-Uriarte R, Dominguez O, Hardisson D, Andujar M, Prat J, Matias-Guiu X, Cigudosa JC, and Palacios J.** Differential Gene Expression Profile in Endometrioid and Nonendometrioid Carcinoma: STK15 Is Frequently Overexpressed and Amplified in Nonendometrioid Carcinomas. *Cancer Res* 63:697-5702, 2004.
41. **Moyano P and Rotwein P.** Mini-review: estrogen action in the uterus and insulin-like growth factor-I. *Growth Horm IGF Res* 14:431-435, 2004.
42. **Muda M, Boschert U, Dickinson R, Martinou JC, Martinou I, Camps M, Schlegel W, and Arkinstall S.** MKP-3, a novel cytosolic protein-tyrosine phosphatase that exemplifies a new class of mitogen-activated protein kinase phosphatase. *J Biol Chem* 271:4319-4326, 1996.
43. **Mutch DM, Berger A, Mansourian R, Rytz A, and Roberts MA.** The limit fold change model: a practical approach for selecting differentially expressed genes from microarray data. *BMC Bioinformatics* 3:17, 2002.

44. **Newman JC, Weiner AM.** L2L: a simple tool for discovering the hidden significance in microarray expression data. *Genome Biol* 6:R81, 2005.
45. **Niklaus AL, Aberdeen GW, Babischkin JS, Pepe GJ, and Albrecht ED.** Effect of estrogen on vascular endothelial growth/permeability factor expression by glandular epithelial and stromal cells in the baboon endometrium. *Biol Reprod* 68:1997-2004, 2003.
46. **O'Connor R.** Regulation of IGF-1 Receptor Signaling in Tumor Cells. *Horm Metab Res* 35:771-777, 2003.
47. **Ouban A, Muraca P, Yeatman T, and Coppola D.** Expression and Distribution of Insulin-Like Growth Factor-1 Receptor in Human Carcinomas. *Hum Pathol* 34:803-808, 2003.
48. **Paharkova-Vatchkova V, Maldonado R, and Kovats S.** Estrogen Preferentially Promotes the Differentiation of CD11c⁺ CD11b intermediate Dendritic Cells from Bone Marrow Precursors. *J Immunol* 172:1426-1436, 2004.
49. **Parcellier A, Gurbuxani S, Schmitt E, Solary E, and Garrido C.** Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 304:505-512, 2003.
50. **Pelletier G, Luu-The V, Li S, and Labrie F.** Localization and estrogenic regulation of androgen receptor mRNA expression in the mouse uterus and vagina. *J Endocrinol* 180:77-85, 2004.
51. **Perillo B, Sasso A, Abbondanza C, Palumbo G.** 17beta-estradiol inhibits apoptosis in MCF-7 cells, inducing bcl-2 expression via two estrogen-responsive elements present in the coding sequence. *Mol Cell Biol* 20:2890-901, 2000.

52. **Picard F, Deshaies Y, Lalonde J, Samson P, Labrie C, Belanger A, Labrie F, and Richard D.** Effects of the estrogen antagonist EM-652.HCl on energy balance and lipid metabolism in ovariectomized rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24:830-840, 2000.
53. **Pulido R, Zuniga A, and Ullrich A.** PTP-SL and STEP protein tyrosine phosphatases regulate the activation of the extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 by association through a kinase interaction motif. *EMBO J* 17:7337-7350, 1998.
54. **Richards RG, Diaugustine RP, Petrusz P, Clark GC, and Sebastian J.** Estradiol stimulates tyrosine phosphorylation of the insulin-like growth factor-1 receptor and insulin receptor substrate-1 in the uterus. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:12002-12007, 1996.
55. **Risinger JI, Maxwell GL, Chandramouli GVR, Jazaeri A, Aprelikova O, Patterson T, Berchuck A, and Barrett JC.** Microarray analysis reveals distinct gene expression profiles among histologic types of endometrial cancer. *Cancer Res* 63:6-11, 2003.
56. **Russell DH and Taylor RL.** Polyamine synthesis and accumulation in the castrated rat uterus after estradiol-17-beta stimulation. *Endocrinology* 88:1397-1403, 1971.
57. **Salmeen A, Anderson JN, Myers MP, Tonks NK, and Bradford D.** Molecular Basis for the Dephosphorylation of the Activation Segment of the Insulin Receptor by Protein Tyrosine Phosphatase 1B. *Molecular Cell* 6:1401-1412, 2000.

58. **Sato T, Wang G, Hardy MP, Kurita T, Cunha GR, and Cooke PS.** Role of systemic and local IGF-1 in the effects of estrogen on growth and epithelial proliferation of mouse uterus. *Endocrinology* 143:2673-2679, 2002.
59. **Sun H, Charles CH, Lau LF, and Tonks NK.** MKP-1 (3CH134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase in vivo. *Cell* 75:487-493, 1993.
60. **Takeda-Matsubara Y, Nakagami H, Iwai M, Cui T-X, Shiuchi T, Akishita M, Nahmias C, Ito M, and Horiuchi M.** Estrogen Activates Phosphatases and Antagonizes Growth-Promoting Effect of Angiotensin II. *Hypertension* 39:41-45, 2002.
61. **Tan YF, Li FX, Piao YS, Sun XY, and Wang YL.** Global gene profiling analysis of mouse uterus during the oestrus cycle. *Reproduction* 126:171-182, 2003.
62. **Tang XM, Rossi MJ, Masterson BJ, and Chegini N.** Insulin-like growth factor I (IGF-1), IGF-1 receptors, and IGF binding proteins 1-4 in human uterine tissue: tissue localization and IGF-1 action in endometrial stromal and myometrial smooth muscle cells in vitro. *Biol Reprod* 50:1113-1125, 1994.
63. **Tanimura S, Nomura K, Ozaki K, Tsujimoto M, Kondo T, and Kohno M.** Prolonged nuclear retention of activated extracellular signal-regulated kinase 1/2 is required for hepatocyte growth factor-induced cell motility. *J Biol Chem* 277:28256-28264, 2002.
64. **Tong W, Pollard JW.** Progesterone inhibits estrogen-induced cyclin D1 and cdk4 nuclear translocation, cyclin E- and cyclin A-cdk2 kinase activation, and cell proliferation in uterine epithelial cells in mice. *Mol Cell Biol* 19:2251-64, 1999.

65. **Vairapandi M, Azam N, Balliet AG, Hoffman B, Liebermann DA.** Characterization of MyD118, Gadd45, and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) interacting domains. PCNA impedes MyD118 AND Gadd45-mediated negative growth control. *J Biol Chem* 275:16810-16819, 2000.
66. **Van Luu-The, Paquet N, Calvo E, and Cumps J.** Improved Real-Time RT-PCR method for high-throughput measurements using second derivative calculation and double correction. *Biotechniques* 8:287-293, 2005.
67. **Vincent AM and Feldman EL.** Control of cell survival by IGF signaling pathways. *Growth Horm IGF Res* 12:193-197, 2002.
68. **Warrington JA, Nair A, Mahadevappa M, and Tsyganskaya M.** Comparison of human adult and fetal expression and identification of 535 housekeeping/maintenance genes. *Physiol Genomics* 2:143-147, 2000.
69. **Watanabe H, Suzuki A, Kobashi M, Takahashi E, Itamoto M, Lubahn DB, Handa H, and Iguchi T,** Analysis of temporal changes in the expression of ESTROGEN-regulated genes in the uterus. *J Mol Endocrinol* 30:347-358, 2003.
70. **Weihua Z, Ekman J, Almkvist A, Saji S, Wang L, Warner M, and Gustafsson JA.** Involvement of androgen receptor in 17beta-estradiol-induced cell proliferation in rat uterus. *Biol Reprod* 67:616-623, 2002.
71. **Wing LY.** Effect of estradiol on the activities of ornithine decarboxylase and S-adenosyl-methionine decarboxylase in tissues of ovariectomized rats. *Chin J Physiol* 31:95-103, 1988.
72. **Zhang Z-Y, Zhou B, and Xie L.** Modulation of protein kinase signaling by protein phosphatases and inhibitors. *Pharmacol Ther* 93:307-317, 2002.

73. **Zhang ZY.** Protein tyrosine phosphatases: prospects for therapeutics. *Curr Opin Chem Biol* 5:416-423, 2001.

Figure Legends

Figure 1: Clustering of gene expression patterns

Among 1141 genes that passed the variation filter, the 736 up-regulated genes and the 405 down-regulated genes were normalized to obtain a mean=0 and a S.D=1 across time points, separately. After the normalization, using a self-organizing map (GeneCluster 2), they were grouped into 4 clusters (A-D) and 3 clusters (E-G) of activated and inhibited genes, respectively. Each cluster is represented by the centroid of normalized values on the Y-axis and time points on the X-axis. The number of genes belonging to each cluster is displayed. These patterns indicate the representative temporal gene expression changes of the selected genes. Error bars indicate the maximal and minimal fold value for the Panels A-D and the S.D of the average expression levels for the Panels E-G.

Figure 2: Functional classification of clustered genes

Different functions of the clustered genes were grouped into 10 categories using L2L and EASE softwares and the percentage representation of each function is indicated. Each corresponding cluster along with the number of genes with a known function, are indicated on the left.

Figure 3: Relevant list of up- and down-regulated genes in each cluster

The gene names and Affymetrix probe set numbers in each cluster are indicated. Changes in expression levels are also indicated by color based on normalized values (green and red for low and high values, respectively) with the time points (in hours) indicated above.

Major subclasses of gene functions with their corresponding fold enrichment (FE) and p-value (P) are also displayed for each cluster.

Figure 4: Temporal changes of gene expression levels performed by quantitative Real-Time PCR

Evidence for transcriptional regulatory network during the uterotrophic response of Insulin-like Growth Factor-related genes (Panel A), of genes involved in the MAPK and PI3K pathways (Panel B) and of Tyrosine and Map kinase phosphatases-related genes (Panel C). The number of copies by μg / RNA is indicated on the Y axis and the time points on the X axis.

Figure 5: Schematic representation of the transcriptional cascade triggered by E2 following activation of IGF-1 pathway

E2 activates a transcriptional cascade resulting in an uterotrophic effect in mouse. Genes confirmed by Q-RT-PCR are highlighted in bold and their E2 modulation, stimulation or repression, is indicated into circles by + or -, respectively.

Figure 1

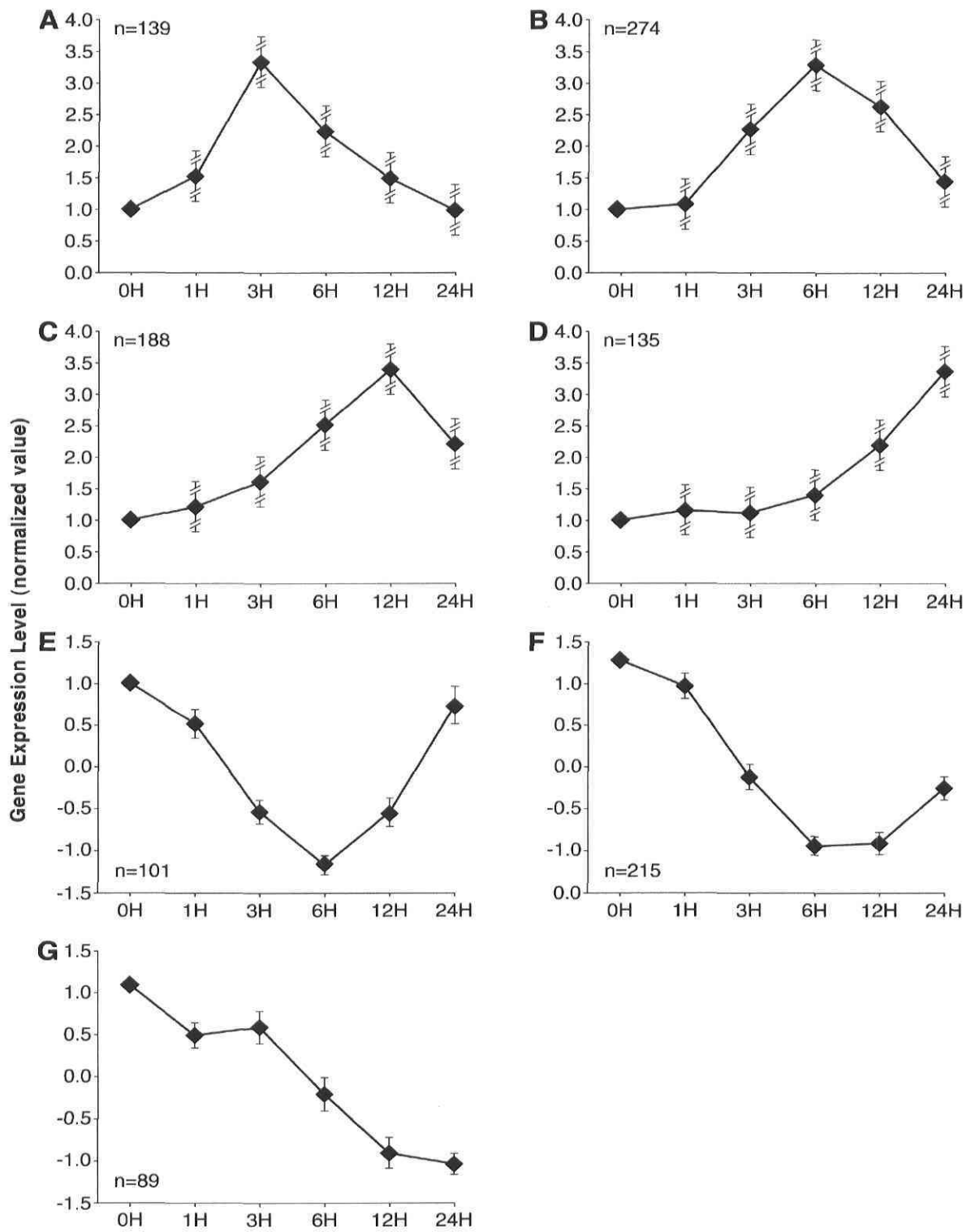


Figure 2

Stimulated :

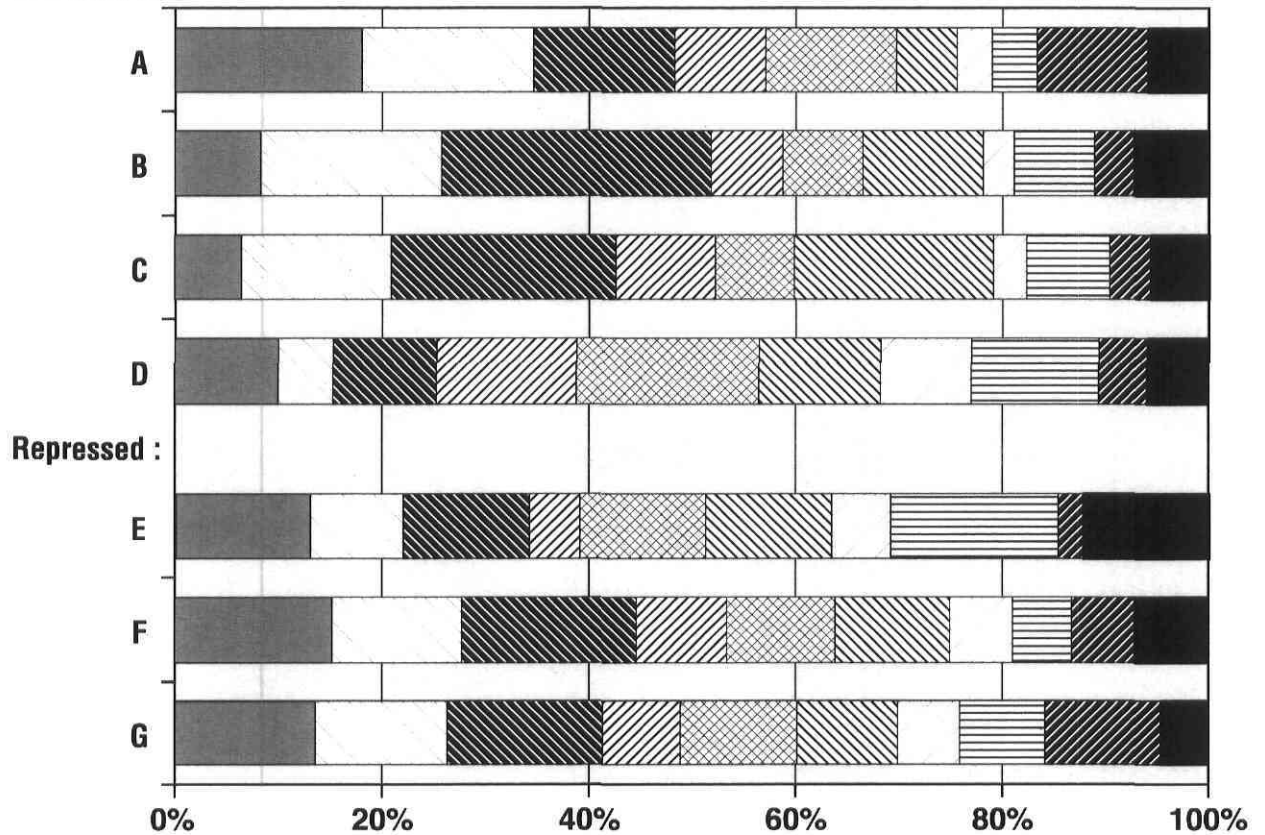


Figure 3

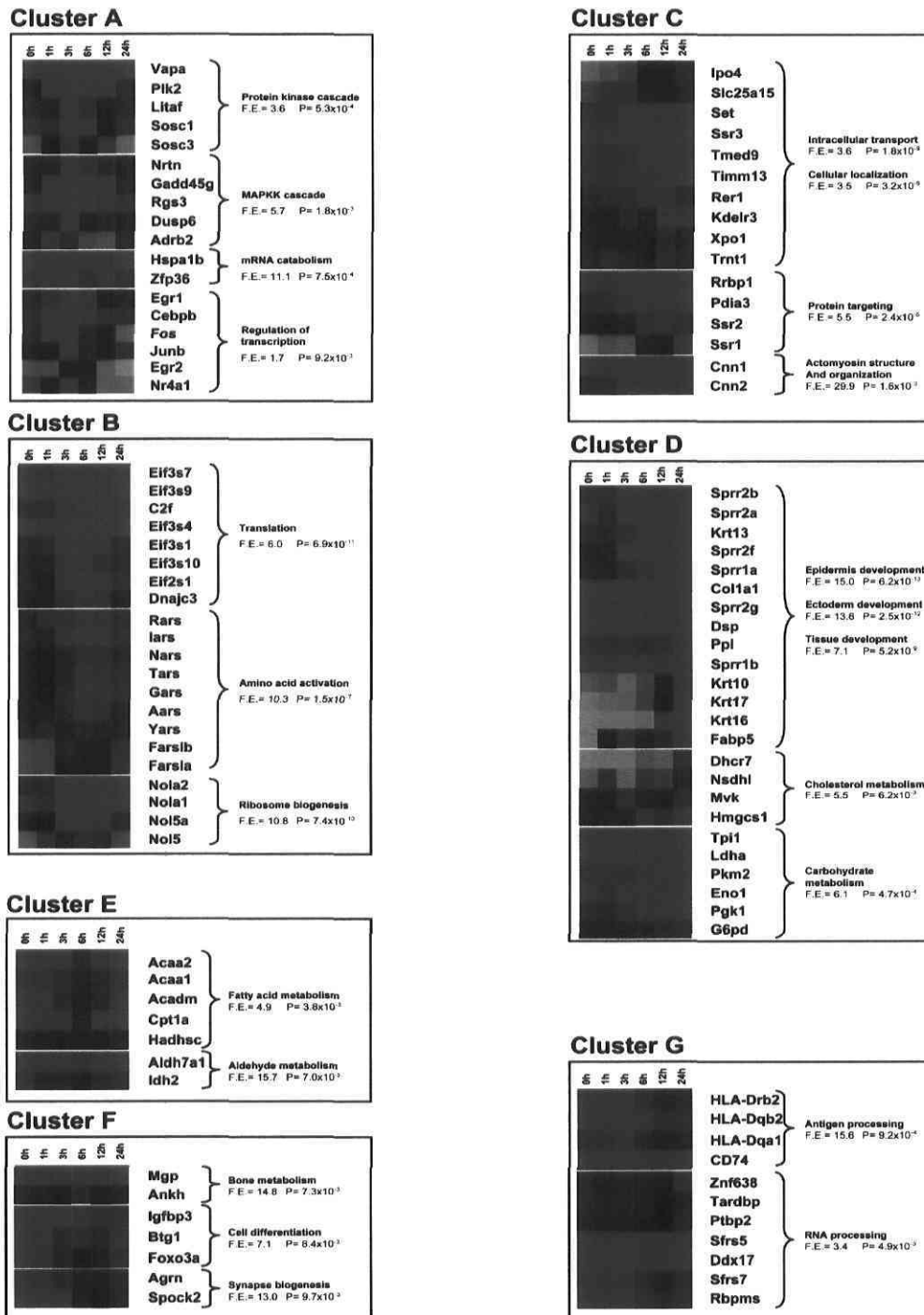


Figure 4

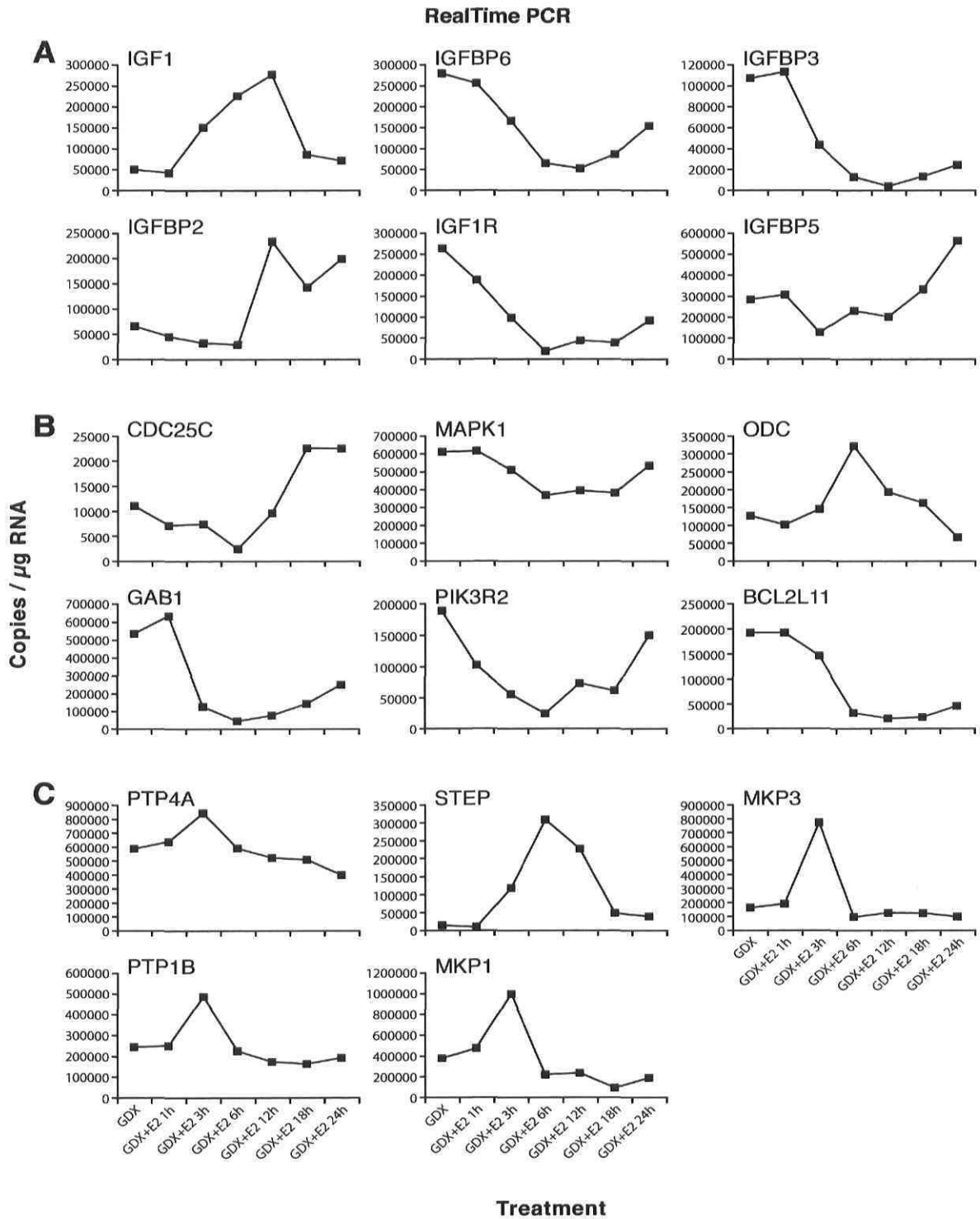
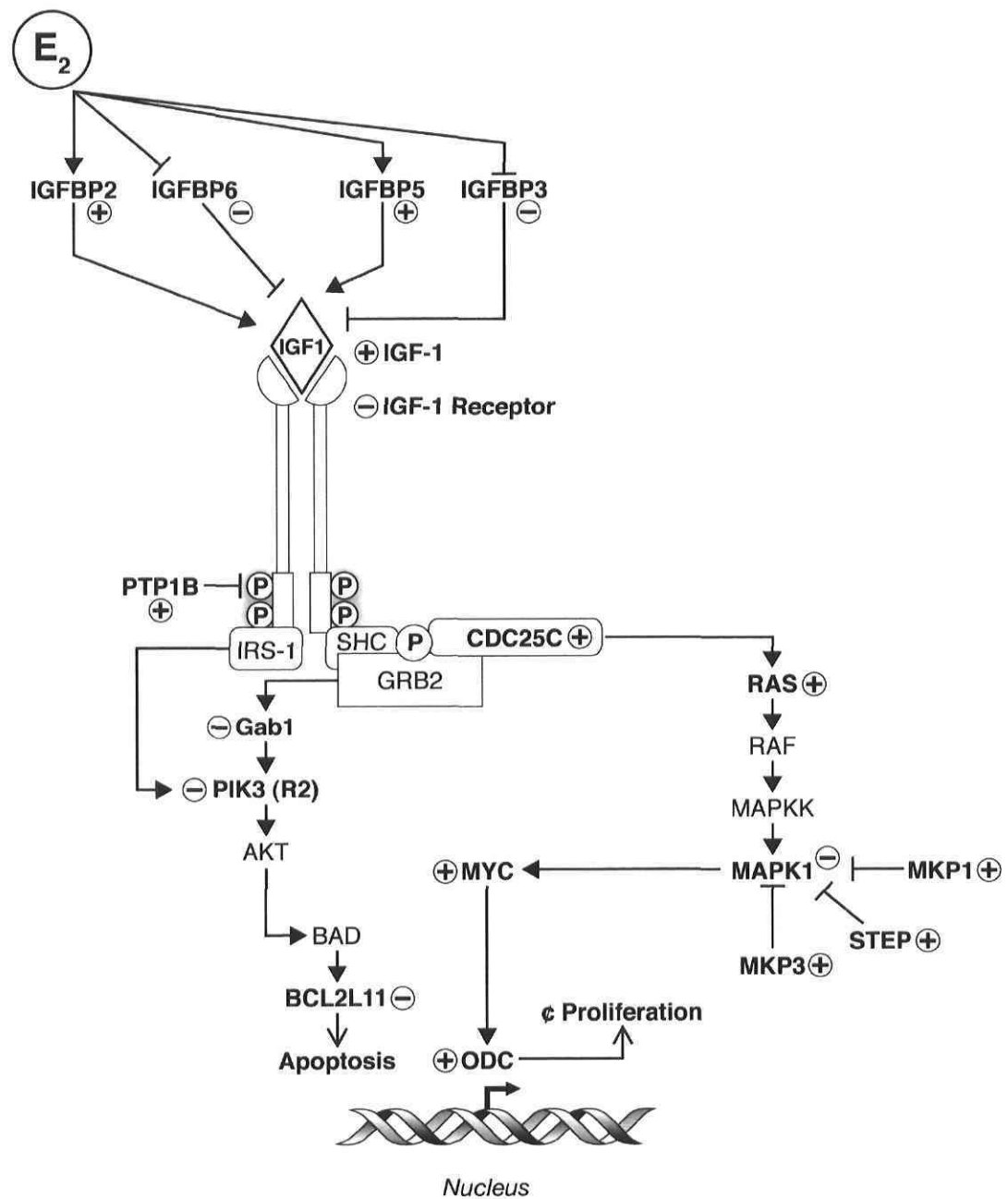


Figure 5



Chapitre II

Analyse temporelle de la modulation transcriptionnelle du sentier de signalisation ATM/Gadd45, par la DHT, dans l'utérus de souris.

Article soumis au Journal of Molecular Endocrinology.

Temporal analysis of DHT transcriptional modulation of the ATM/Gadd45g signaling pathways in the mouse uterus.

M Ivanga, Y Labrie, E Calvo, P Belleau, C Martel, V Luu-The, J Morissette, F Labrie and F Durocher.

Oncology and Molecular Endocrinology Research Center, CHUL Research Center, CHUQ, Department of Anatomy and Physiology, Laval University, Québec, Canada

Abbreviated title: DHT modulation of the ATM/Gadd45g pathways in mouse uterus

Keywords: uterus; ovariectomized mice; DHT modulation; oligonucleotide microarray

Correspondence: Francine Durocher

CREMO, CHUL Research Center

2705 Laurier Blvd T2-53

Québec (Québec) G1V4G2

Francine.Durocher@crchul.ulaval.ca

Phone 418 656-4141, ext. 48508

Fax 418 654-2761

Résumé

Chez les mammifères, l'utérus des femelles matures subit, à chaque cycle sexuel, des changements caractéristiques pour l'implantation de l'œuf fécondé. Il est aussi généralement admis que la 5 α -dihydrotestostérone (DHT) joue un rôle important dans la régulation de l'action des androgènes dans l'utérus humain normal ou cancéreux. Ainsi, l'analyse des gènes répondant à l'action de la DHT, grâce à l'utilisation de biopuces d'oligonucléotides Affymetrix, nous a permis d'observer que de nombreux gènes du sentier ATM/Gadd45g sont régulés par la DHT, dans l'utérus de souris ovariectomisées. Deux phases de régulation ont été identifiées. Lors de la première phase, la transcription des gènes impliqués dans l'arrêt en G2/M est rapidement stimulée, suivie par la répression des gènes impliqués dans le point de contrôle G1/S, et par l'induction de régulateurs transcriptionnels. Ensuite, c.-à-d de 12-24h, les gènes impliqués dans la transition G2/M, les gènes du cytosquelette ou reliés aux lipides, sont stimulés par la DHT, alors que les gènes reliés à l'immunité apparaissent différemment modulés par la DHT. Ces résultats montrent qu'une dose physiologique de DHT stimule la transcription de gènes activant une action utéro-trophique, chez les souris. La détermination des profils de l'expression génique temporelle, nous permet de suggérer que la modulation par la DHT de gènes du sentier ATM/Gadd45g, pourrait jouer un rôle important dans les changements cycliques observés dans l'utérus de souris.

Abstract

In mammals, the uterus of a mature female undergoes multiple changes during the menstrual cycle, which reflect the modifications of the uterine endometrium in continuous preparation for embryo implantation. 5α -dihydrotestosterone (DHT) is recognized to play an important role in the regulation of androgen action in normal human endometrium and endometrial cancer.

Using microarray technology, a screening analysis of genes responding to DHT in the uterus of ovariectomized mice, has allowed us to underlie that multiple genes of the *ATM/Gadd45g* pathway are modulated following exposure to DHT. Two phases of regulation were identified. In the early phase, the expression of genes involved in the G2/M arrest is rapidly increased, followed by the repression of genes of the G1/S checkpoint, and by the induction of transcriptional regulators. Later, *i.e.* from 12-24h, genes involved in G2/M transition, cytoarchitectural and lipid-related genes are stimulated by DHT while immunity-related genes appear to be differentially regulated by DHT.

These results show that a physiological dose of DHT induces the transcription of genes promoting an uterotrophic action in mice. Profile determination of temporal uterine gene expression enables us to suggest that the DHT modulation of genes involved in the *ATM/Gadd45g* signaling, could play an important role in the cyclical changes of endometrial cells in the mouse uterus.

Introduction

In the normal mammalian menstrual cycle, endometrium undergoes a dramatic growth, followed by disruption, remodeling and repair process throughout the reproductive life. The cyclical changes of the endometrium are under the control of steroid hormones including estrogens, progesterone and androgens. While the estrogenic effect is well documented, the androgen action on uterus physiology is poorly defined.

Actions of active androgens (testosterone and dihydrotestosterone) are mediated by the androgen receptor (AR), a transcription factor member of the nuclear receptor family. The enzyme 5α -reductase catalyses the conversion of testosterone (T) to the more potent agonist dihydrotestosterone (DHT). Considering that during the secretory phase in which both AR and 5α -reductase are present in endometrial epithelial cells (Pelletier *et al.* 2004, Ito *et al.* 2002) and given its higher binding affinity for AR (Martel *et al.* 1998), DHT might play a more important role than T in the androgen action on normal human endometrium and endometrial cancer.

Androgens are known to exert both estrogenic and anti-estrogenic effects in human and mice. Administration of T or DHT has been shown to increase uterine weight of immature hypophysectomized rats (Armstrong & Papkoff 1976) and DHT alone has also been reported to induce proliferation of endometrial epithelial and myometrial smooth muscle cells, as well as mammary ductal and stromal cells in mice. A more important effect on proliferation of these cell types is observed when a combined treatment of DHT with estradiol is administered (Zhang *et al.* 2004), suggesting a synergistic effect of both

hormones. On the other hand, opposite observations have shown that androgens demonstrate an antiestrogenic activity in mammary epithelial cells of human and Rhesus monkeys (MacIndoe & Etre 1981, Zhou *et al.* 2000) as well as in rat uterus (Hung & Gibbons 1983). Moreover, it has been proven that DHT inhibits ovary granulosa cell proliferation through a decrease in cyclin D2 mRNA expression, which leads to cell cycle arrest at G1 phase, in immature female rats (Pradeep *et al.* 2002). Interestingly, there is evidence of an existing dose-related antagonistic effect of DHT on estrogenic effects in the pig uterus (Càrdenas & Pope 2004). High levels of endometrial androgen are also associated with miscarriage and infertility (Okon *et al.* 1998, Tuckerman *et al.* 2000).

In the life span of a cell, DNA damage is a common event, which may lead to mutation and ultimately to cancer growth or cellular death. In mammals, DNA repair, checkpoint activity and apoptotic processes are the major cellular responses induced by DNA damage (Niida & Nakanishi 2006). ATM is one of the sensor proteins employed by the DNA damage checkpoints, to detect DNA damage, and to initiate signal transduction cascades involving several kinases and phosphatases. ATM, as signal transducer, can activate p53 and inactivate cyclin-dependent kinases (CdKs) to inhibit the G1/S checkpoint, the intra-S checkpoint or the G2/M checkpoint which will allow DNA repair processes (Sancar *et al.* 2004). *Gadd45* is one of the transcriptional target of *TP53* implicated in the regulation of the G2/M transition (Taylor & Stark 2001).

The aim of the present study was to analyze the impact of DHT on uterus gene expression of ovariectomized mice using microarray technology in establishing an exhaustive temporal

gene expression profile based on 24 hours to evaluate the potential role of DHT in the cell cycle regulation in an estrogen-dependent tissue like uterus. As expected, DHT appears to induce during this period, the transcription of genes whose products are involved in the uterotrophic effect promotion. There is also evidence of an early DHT activation (direct or indirect) of *Gadd45g* and *Wee1* genes, which are specific of G2/M arrest, as well as the down-regulation of genes of the *ATM* signaling pathway involved in G1/S checkpoint followed by the induction of genes promoting the G2/M transition. We show that this mechanism could play a pivotal role in the cyclical changes of endometrial cells in the mouse uterus.

Materials and Methods

Animals and treatment

Ten to eleven week-old female C57BL6 mice were received from Charles River (St-Constant, Canada) and were allowed to acclimate for 4 weeks. The animals were housed individually in an environmentally-controlled room (temperature: $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$; humidity: $50 \pm 20\%$; 12-h light-12-h dark cycles, lights on at 07:15h). The mice had free access to tap water and a certified rodent feed (Lab Diet 5002 (pellet), Ralston Purina, St Louis, MO). The experiment was conducted in an animal facility approved by the Canadian Council on Animal Care (CCAC) and the Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC). The study was performed in accordance with the CCAC Guide for Care and Use of Experimental Animals.

Animals, weighing between 20 to 27g (mean 23.3g), were randomized according to their body weights and were assigned to 7 groups of 14 animals each as followed: 1) Gonadectomized (GDX) control; 2 to 7) GDX + dihydrotestosterone (DHT, 0.1 mg/mouse). On day 1 of the study, animals were bilaterally ovariectomized (GDX) under isoflurane anesthesia. Prior to the necropsy performed on day 8 of the study, mice received a single subcutaneous injection (0.2 ml/mouse) of the vehicle alone (5% ethanol-0.4% methylcellulose; group 1) or DHT (groups 2 to 7). The injection of vehicle was performed 24 h prior to the necropsy for animals into group 1 while DHT was injected 1 h (group 2), 3 h (group 3), 6 h (group 4), 12 h (group 5), 18 h (group 6) or 24 h (group 7) prior to the necropsy.

On day 8 of the study, mice under isoflurane anesthesia were exsanguinated at the abdominal aorta followed by cervical dislocation. The uterus was collected and rapidly

frozen in liquid nitrogen. For each group, the 14 uteri collected were pooled in the same tube. Tissues were kept at -80°C until RNA extraction.

RNA isolation and microarray hybridization and analysis

Total RNA was isolated using Trizol (Invitrogen, Burlington, Ontario) following manufacturer's protocol. Total RNA (20 μg) was converted to cDNA by incubation with 400 U SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen) using a T7-oligo-d(T)24 primer [5'-GGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGGCGG-(dT)₂₄-3'], 1X first strand buffer (50 mM Tris-HCl Ph 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT) and 0.5 mM dNTPs at 42 $^{\circ}\text{C}$ for 1h. Second-strand synthesis was performed using 40 U DNA polymerase I (Invitrogen), *E.coli* DNA ligase (Invitrogen), 2 U RNase H (Invitrogen), 1X reaction buffer [18.8 mM Tris-HCl pH 8.3, 90.6 mM KCl, 4.6 mM MgCl₂, 3.8 mM DTT, 0.15 mM NAD, 10 Mm (NH₄)₂SO₄] and 0.2 mM dNTPs at 16 $^{\circ}\text{C}$ for 2h. cDNAs were blunt-ended with 10 U of T4 polynucleotide kinase (Invitrogen) incubated 5 min at 16 $^{\circ}\text{C}$. cDNA was then extracted with phenol-chloroform using phase lock gels (Brinkman, Mississauga, Ontario), ethanol-precipitated and resuspended in 10 μl of DEPC-treated H₂O. cDNA was *in vitro* transcribed using a T7 BioArray High Yield RNA Transcript Labeling Kit (Enzo Diagnostics, Farmingdale, NY) to produce biotinylated cRNA. The mixture (20 μl final volume) was incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 5 h, with gentle mixing every 30 min. Labeled cRNA was purified with an RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) according to the manufacturer's protocol. Purified cRNA was then fragmented to 30-200 mer cRNA using a fragmentation buffer (100 mM potassium acetate -30 mM magnesium acetate -40 mM Tris-acetate pH 8.1), for 20 min at 94 $^{\circ}\text{C}$. The quality of total RNA, cDNA synthesis,

cRNA amplification and cRNA fragmentation was monitored by micro-capillary electrophoresis (Bioanalyzer 2100, Agilent Technologies, Palo Alto, CA).

cRNA probes were hybridized to MG-U74v2 Genechip Set (Affymetrix, Santa Clara, CA). Fragmented cRNA (15 μ g) was incubated with 1X hybridization buffer (0,1mg/ml herring sperm DNA, 0.5 mg/ml acetylated BSA, 5 nM control oligonucleotide B2) and 1X eukaryotic hybridization control solution (1.5 pM *BioB*, 5 pM *BioD*, 25 pM *BioD* and 100 pM *cre*), for 16 h at 45°C with constant rotation (60 rpm). cRNA probe from the control group was hybridized on two microarrays (duplicate) while cRNA probe corresponding to each timepoint (pool of 14 mice) was hybridized on separate microarrays. Microarrays were then processed using an Affymetrix GeneChip Fluidic Station 400 (protocol EukGE-WS2Av4). Staining was performed with streptavidin-conjugated phycoerythrin (SAPE) followed by amplification with a biotinylated anti-streptavidin antibody and by a second round of SAPE solution. Genechips were scanned using Genechip Scanner 3000 (Affymetrix). Signal intensities for *β -actin* and *GAPDH* genes were used as internal quality controls. The ratio of fluorescent intensities for 5' and 3' of these housekeeping genes was <2. Scanned images were analyzed and normalized (target intensity equal to 500) with Microarray Suite 5.0 (Affymetrix).

Differential expressed genes are selected using a variable limit fold change (LFC) (Mutch *et al.* 2002) decreasing with gene expression value ($LFC=a+b/x$ where x is the minimum intensity of gene expression). The curve was estimated based on a ratio distribution calculated from replicated chips. The resulting cut-off point, $LFC=1.9+60.0/x$, produces an approximately constant rate of false positive modulated genes of 0.1%. Genes over this

criteria must also be called present at least in 2 points of the experiment using MAS 5 program.

Clustering analysis

The differential expressed genes were clustered using the GeneCluster2 software based on a self-organizing map algorithm. Genes showing a max/min ratio greater than 1.9 fold in their gene expression levels and above 300 in their expression intensities were selected. Selected genes were then normalized to obtain a mean value of zero and a standard deviation of one. Finally, the normalized data were clustered. The expression patterns of certain selected genes belonging to the ATM and p53 pathways were validated by Q-RT-PCR. The L2L software was used to classify genes from each cluster into biological processes (Newman & Weiner 2005). When the genes were not classified by this software, EASE software (Hosack *et al.* 2003) was used to identify the biological process associated to the gene. Using L2L, the fold-enrichment of specific subclasses of general functions was also calculated along with the corresponding p-value derived from a binomial distribution. The genes were classified in more than one major biological process (when applicable) since several proteins can demonstrate many different physiological activities in the cell metabolism, which is more representative of the gene function.

Quantitative Real-Time PCR (Q-RT-PCR)

cDNA corresponding to 20 ng of total RNA was used to perform fluorescent-based Realtime PCR quantification using the LightCycler Realtime PCR apparatus (Roche Inc., Nutley, NJ). Reagents were obtained from the same company and were used as described by the manufacturer. The conditions for PCR reactions were: denaturation at 95°C for 10 sec, annealing at 60 to 64°C for 5 sec and elongation at 72°C for 7 to 13 sec. The reaction

was then heated for 3 sec at 2°C lower than the melting temperature of the DNA fragment. Reading of the fluorescence signal was taken at the end of the heating to avoid non-specific signal. A melting curve was performed to assess non-specific signal. Oligoprimers that allow the amplification of approximately 200 bp were designed by GeneTools software (Biotools Inc., Edmonton, Alberta, Canada) and their specificity was verified using BLAST in the GenBank database. Data calculation and normalization were performed using second derivative and double correction method as previously described (Luu-The *et al.* 2005) and using the housekeeping gene hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1 (*Hprt1*). *Hprt1* has shown to be a gene having stable expression levels from embryonic life through adulthood in various tissues (Warrington *et al.* 2000). mRNA expression levels are expressed as number of copies/μg total RNA using a standard curve of Cp versus logarithm of the quantity. The standard curve was established using known cDNA amounts of 10, 10², 10³, 10⁴, 10⁵ and 10⁶ copies of *Hprt1* and a LightCycler 3.5 program provided by the manufacturer (Roche Inc).

Results

Microarray Analysis: Genomic response of the uterus to dihydrotestosterone

To study the time course impact of DHT on uterus physiology, we analyzed 239 DHT-regulated uterine genes. These selected genes whose regulation is stimulated or repressed upon 6 different profiles (A-F), are represented in Figure 1. For the clustering analysis we used (1 × 3) node numbers for the DHT-induced and down-regulated genes. These node numbers are representative of the temporal change of the genes listed for the clustering, because they give independent clustering patterns. Most of the DHT-modulated genes are stimulated (73%, 174 out of 239). We found 3 expression profiles among these 174 increased genes: genes of cluster A (25%, 44 out of 174) were induced within 3h, genes of cluster B (44%, 77 out of 174) are up-regulated within 12h and genes of cluster C (31%, 53 out of 174) within 18h. The majority of genes stimulated by DHT are represented in the cluster B. Similarly, 3 expression profiles appear in the 65 genes that are down-regulated by the hormone. Genes of cluster D (22%, 14 out of 65) were repressed within 3h, genes of cluster E (29%, 19 out of 65) showed a repression plateau between 6h and 12h, while genes of cluster F (49%, 32 out of 65) were down-regulated within 18h. The majority of DHT-decreased genes are found in cluster F.

Following their expression pattern profile, genes from each cluster (A-F) were then categorized into 10 different biological processes using the L2L and EASE softwares. The genes not assigned to a known function were classified as unknown biological process. The gene proportion of each function for a given profile has been calculated and is illustrated in

Figure 2. According to the data presented on this Figure, it can be seen that, among the stimulated genes (clusters A, B, C), those genes involved in the signal transduction and transcription, as well as in stress and immunity are mainly represented in cluster A. The genes involved in the energy and protein metabolism are mainly represented in cluster B, the latter group being clearly dominant in this cluster. The major gene function found in cluster C is associated with transport and development, and the genes involved in growth and apoptosis are also mainly over-represented in this cluster.

Among the down-regulated genes represented here (clusters D, E and F), we found the genes related to stress and immunity dominant in cluster D, along with the genes involved in the protein metabolism. The stress/immunity group is also dominant in cluster E, with genes related to the transcription, transport and energy. In cluster F, over-representation of some genes related to growth/apoptosis, development protein metabolism and transcription is observed.

Specific up-regulated Genes: 0h - 24h (Clusters A, B and C)

Some of the major biological processes are illustrated in Figure 3 but the whole dataset can be found in supplemental Table 1. The genes associated to the signal transduction and transcription were predominantly up-regulated in cluster A, especially the genes belonging to mRNA catabolism and ribosome biogenesis, which demonstrate a Fold Enrichment (FE) of 30.7 and 13.3, respectively. Most oncogenes, such as *FBJ osteosarcoma oncogene*, *surfeit gene2* or *homeo box A11*, also appear to be also increased during this phase (cluster A and B), whereas some are repressed, such as *c-Jun* (cluster E). Furthermore, genes involved in the response to stress and pregnancy, display a FE of 3.1 and 14.0, respectively.

Among them, *Gadd45g* is involved in the cellular defense program and in the G2/M arrest. Similarly, other genes related to the G2/M checkpoint such as *Wee1* and *stratifin*, are found induced within 3h by DHT (cluster A). Genes associated to protein folding or response to unfold protein (cluster B), show a FE of 6.4 and 13.1, and protein transport-related genes are also over-represented in this cluster, presenting a FE of 14.6.

At a later stage, the genes implicated in the cell division are principally induced (cluster C), demonstrate a FE of 13.4, and include specific genes involved in the G1 phase (FE=20.5), control point of mitotic cell cycle (FE=52.8) and mitosis (FE=10.6). For instance, *Rad51*, a gene involved in DNA repair, is up-regulated, as well as *Cyclin A2* and *Cdk4*, two genes associated with the G1/S transition, and certain genes of the G2/M transition such as *Cdc2a*, *Cyclin B2* and *Cdc25c*, which are all induced within 18h. The genes involved in cell organization and biogenesis (FE=2.1), and organ development related-genes (FE=3.7) are also principally induced during this phase (cluster C), along with the tissue development (FE=5.2) and the tissue morphogenesis-related genes (FE=16.8). Many genes implicated in transport processes are also slightly over-represented in this phase (FE= 2.0). Similarly, the sterol metabolism and biosynthesis-related genes are induced and display, respectively, a FE of 8.3 and 13.7.

Specific down-regulated genes: 0h - 24h (Clusters D, E and F)

Although no biological process could be clearly identified in cluster D, due mainly to the limited number of genes, the gene *SCPEP1*, whose product is involved in proteolysis (serine carboxypeptidase activity), is one member of this cluster.

In cluster E, we found inhibition of genes involved in the positive regulation of cell differentiation, which showed a FE of 41.5, and particularly myeloid cell differentiation-related genes presenting a FE of 24.4. Some genes involved in protein targeting (FE=10.8), namely *Uhmk1*, which phosphorylates p27, and *Rhoa* involved in local signaling cascade during early embryo implantation, are both members of this group of genes. The cluster F comprised genes implicated in a positive regulation of apoptosis (FE=6.4), and particularly *Ifi16*, which is also involved in immune response. Repression of both *Igfbp3* and *Foxo3a* genes is also consistent with the fact that these genes normally allow the progression of the cell cycle.

Taken together, these observations point towards evidence of rapid induction of transcriptional regulators and signaling components genes, followed by a late induction of genes potentially involved in the uterine cell proliferation. However, considering the limited number of down-regulated genes, no clear biological processes seem to emerge from these clusters.

DHT modulates genes involved in the ATM/Gadd45g signaling

As our GeneChips analyses highlighted genes related to the **ATM/Gadd45g signaling** and in order to confirm the temporal changes of gene expression levels of certain genes involved in the cell cycle regulation, we performed Q-RT-PCR, as illustrated in figure 4. Briefly, four genes involved in the ATM signaling and four genes involved in the Gadd45g signaling pathways were analyzed by Q-RT-PCR.

The ATM signaling (Figure 4, Panel A)

At first, the *ATM* gene is gradually down-regulated within 6h, followed by the *c-Abl* oncogene which is inhibited within 12h. Then, the oncogene *c-Jun*, following an early induction, shows an inhibition plateau between 12h and 18h, while the *Rad51* gene is up-regulated within 18h. Rad51 is involved in the recombination repair of Double Strand-Breaks (DSB) and is known to be phosphorylated and inactivated by c-Abl in response to DNA damage (Yuan *et al.* 1998). c-Jun is an activator of transcription also known to be a downstream target of c-Abl (Kharas & Fruman 2005). The *ATM* gene encodes a protein kinase which, when activated, stimulates DNA repair and blocks progression through the cell cycle. To achieve this goal, ATM interacts with several proteins including c-Abl and the tumor suppressor p53 (Kurtz & Lees-Miller 2004).

The Gadd45g signaling (Figure 4, Panel B)

At first, the *Gadd45g* gene, which can be transcriptionally activated by p53, is clearly and strongly induced within 3h, like Wee1 which is slightly up-regulated within the same timeframe. Then, both *Cdc2a* and *Cyclin B1* (performed only by Genechips hybridization) genes are up-regulated within 18h. Finally, the *Cdc25c* gene is gradually and strongly induced within 24h. The Cdc2/Cyclin B kinase complex activity, which is crucial for the G2/M transition (Sancar *et al.* 2004), is inhibited by Gadd45 (Taylor & Stark 2001), while Cdc2 is activated by Cdc25c and phosphorylated by Wee1, leading to the Cdc2 inactivation (Lee *et al.* 1992, Parker *et al.* 1992).

Taken together, these observations suggest that early-modulated genes may be involved in the modulation of late-modulated genes. Thus, as presented in Figure 5, DHT early induces the transcriptional activation of *Gadd45g* and *Wee1*, that both play a critical role in G2/M arrest and induction of apoptosis signaling. On the other hand, DHT lately promotes the inhibition of genes of the ATM signaling involved in the G1/S checkpoint and triggers transcriptional increases of *Rad51*, which plays an important role in DSB recombination repair, as well as genes whose products are crucial for the G2/M transition and cell cycle progression.

Discussion

In the present study, ovariectomized mice were exposed to DHT for up to 24h. According to our data, there is evidence of rapid induction of transcriptional regulator genes and signaling components followed by the late stimulation of cytoarchitectural genes by DHT. These results are in agreement with the estrogenic effect of androgens, further suggesting that a 0.1 mg dose of DHT can induce, in 24h, an uterotrophic effect in mice. It is likely that DHT regulates the trophic environment and architecture of the rodent uterus through a gene expression program, which is overlapping but distinct from the estrogen response, as well the magnitude of these DHT-induced changes appear to be less important than those caused by the E2 action (Nantermet *et al.* 2005).

Two main processes seem to emerge from DHT treatment in uterine mouse physiology, namely the uterotrophic effect triggered by proliferation genes shared by the estradiol treatment but to a less extent and the effect of DHT on an early ATM-dependent down-regulation of the cell cycle progress followed by the late activation of genes closely involved in the G2/M phase transition allowing mitosis progression process.

During the first phase (from 0h to 12h), the data indicate that DHT induces chaperonins (Hsp105, Hspa1a and 1b) and ribosomal proteins genes. Indeed, some chaperonins would participate in cell proliferation by interacting with proteins needed for the proliferation process (Parcellier *et al.* 2003), and it has been shown that decreasing Hsp70 expression levels in tumor cells could induce apoptosis and cell growth inhibition (Kaur *et al.* 2000, Wei *et al.* 1995). Androgens are also recognized to stimulate ribosomal RNA synthesis in

LNCaP cells and rat prostate (Kabler *et al.*, 1996). Moreover, at this step, DHT also up-regulates transcription factor genes such as *Atf4*, whose product in human osteoblasts has been found to post-transcriptionally regulate the synthesis of Type I collagen (Yang *et al.* 2004), which is a constituent of the extracellular matrix of uterus and also up-regulated in a late window of treatment. Among the growth/apoptosis-related genes early-modulated by DHT, most of oncogenes are induced, while others, such as c-Jun, are repressed. It has to be stated that proto-oncoproteins are involved in the transcription of downstream proteins, and their expression deregulation can result in oncogenic transformation or inhibition of apoptosis (Tsatsanis & Spandidos 2004).

Furthermore, some stress and immunity-related genes (e.g. *Gadd45g*) are increased during this first phase. Interestingly, DHT has been shown to have proatherogenic effects on vascular cells, and to induce proinflammatory events in male endothelial cells (Death *et al.* 2004). However, other immunity-related genes and especially myeloid cell differentiation related genes, such as *Foxo3a* and *Ifi16*, appear to be down-regulated by DHT. Particularly T-cell and B-cell functions have been demonstrated to be decreased by androgens (Slater & Schreck 1993, Ahmed *et al.* 1987).

Interestingly, administration of physiological levels of androgen in female mice resulted in depressed splenic and peritoneal macrophage immune response following trauma-hemorrhage (Angele *et al.* 1998a, 1998b), further suggesting that DHT might be involved in the endometrium disruption and bleeding at the end of the secretory phase. Therefore, during the second phase of the process (from 12h to 24h), and consistent with the uterotrophic effect, DHT stimulates the expression of cytoarchitectural (tissue and organ development) and lipid (sterol metabolism and biosynthesis) related-genes. Indeed, the

extracellular matrix-cell adhesion molecules genes (e.g. Type I procollagens) and the structural and cytoskeleton factors genes (e.g. keratin complexes) are principally laterally increased by DHT, along with most lipid transport and metabolism-related genes. These results are consistent with previous observations showing that DHT induces proliferation of endometrial epithelial and myometrial smooth muscle cells in mice (Zhang *et al.* 2004), as well as an increase in uterine weight of immature hypophysectomized rats (Armstrong & Papkoff 1976). Among the cell cycle -related genes, DHT induces several cyclin genes, whose products are involved in the G1/S or G2/M transition, such as the cyclin A2 which is involved in the G1/S transition.

Considering the ATM-mediated regulation of the cell cycle, the present data reveal that DHT modulates, up to 24h, several genes, whose products appear to have fundamental roles in the control of the G1/S and G2/M checkpoints. Hence, DHT could trigger transcriptional cascades, which regulate cell growth in the mouse uterus and especially affecting the ATM signaling pathway. To further support our observations, we have developed a scheme illustrating how these genes interact and affect one another (Figure 5).

The *ATM* gene is early inhibited, within 6h, and its product, which is involved in DNA damage response signal transduction resulting in induction of apoptosis or growth arrest, interacts with c-Abl (Baskaran *et al.* 1997) and may drive its down-regulation within 12h. The late down-regulation of c-Jun (within 12h and 18h), which has been demonstrated to be a downstream target of c-Abl tyrosine kinase (BarilaD *et al.* 2000), could inhibit the G1/S phase progression as a stimulator of cell proliferation (Schreiber *et al.* 1999). However, c-Jun has also been associated with apoptosis due to its homeostatic function, which is

dependent of the cell environment (Shaulian and Karin 2001). It should be noted that c-Jun is also a direct downstream target of ATM (Foray *et al.* 2003) and is a negative regulator of p53 expression (Schreiber *et al.* 1999, Shaulian and Karin 2001).

On the other hand, Rad51 activity, which is stimulated by down-regulation of c-Abl (Yuan *et al.* 1998), displays a late stimulation (18h). In this case, since c-Abl, given its late and slight down-regulation, does not seem to explain the activation of *Rad51*, it appears that other known and unknown kinases could be involved in this stimulation. Besides, the expression of the mouse *Rad51* has been previously examined and appears to be detected during cell proliferation from late G1 phase through to M phase (Yamamoto *et al.* 1996). Allelic knockout of *Rad51B*, a member of this recombinational repair gene family, may be involved in the development of uterine leiomyomas (Schoenmakers *et al.* 1999).

ATM also interacts with the tumor suppressor p53 (Kurtz & Lees-Miller 2004), which is known to transcriptionally activate *Gadd45g*. Indeed, later, *i.e.* from 12-24h, the expression of the *Gadd45g* gene is low. Consequently, at this late step, our results show that the genes *CyclinB1* and *Cdc2a*, whose complex activity is repressed by *Gadd45g*, are induced by DHT. Moreover, the *Cdc2/CyclinB* kinase complex activity is crucial for the G2/M transition (Sancar *et al.* 2004). More important, *Cdc2* is activated by *Cdc25c* (Lee *et al.* 1992) which is consistently induced by DHT from 12-24h. In short, these results suggest that the G2/M arrest is abrogated during the second phase of regulation, enabling the proliferation of mice uterine cells.

Moreover, DHT quickly induced (within 3h) *Wee1* and strongly *Gadd45g* genes, whose products are known to play pivotal roles in G2/M arrest and induction of apoptosis signaling, through the dissociation of the cyclinB/*Cdc2* complex (Taylor & Stark 2001, Lee

et al. 1992, Parker *et al.* 1992). In agreement with these results, previous observations have shown that *Gadd45g* is an up-regulated androgen-responsive gene with growth inhibitory activity in human prostate cancer cells (Jiang & Wang 2004), and that *Wee1* is involved in the G2/M phase arrest and the growth inhibition of human prostate cancer cells (Kumar *et al.* 2001). It should be noted that no androgen-response element (ARE) could be identified in the proximal promoter of *Gadd45g*, while one ARE is located 1400 bp upstream of the coding region of the *Wee1* gene. Upstream activators of *Gadd45g* and *Wee1* remain to be identified.

These findings show that a physiological dose of DHT promotes, relatively early, the activation or deactivation of genes involved in the G1/S and G2/M phase, and then the inhibition of the ATM signaling, thus suggesting that DHT can promote arrest in G2 and the abrogation of the G1/S arrest, in the mouse uterine cells. Consistent with these results, loss of ATM resulting in bypass of G1 checkpoint and arrest in G2, or inhibition of ATM signaling in normal cells relieving cell cycle arrest, have been previously described (Herbig *et al.* 2004). In the late phase, activation of genes like *Cdc25c* and *Cdc2* stimulate the entry in mitosis of the cell cycle.

In this study, we have shown that physiological level of DHT causes, within 24h, the modulation of genes involved in ATM-dependent pathways, as well as the transcriptional modulation of genes whose products can promote an uterotrophic effect in mice. It is reasonable to assume that, in the mouse, DHT could trigger transcriptional cascades, which regulate uterine cell growth, probably via a tightly concentration-dependent control of the G1/S and G2/M cellular checkpoints. Thus, this mechanism may be of importance in the

cyclical changes of endometrial cells in the mouse uterus, in which DHT modulation of the ATM/Gadd45g pathway seems to play a crucial role in the process. The exact role of DHT-dependent down-regulation of ATM remains to be elucidated by performing exhaustive expression analyses of major downstream targets of ATM which could be, to some extent, involved in uterine tumorigenesis.

Acknowledgments

We would like to thank all the research assistants involved in animal care and treatments for their skillful technical assistance. The authors declare that there is no conflict of interest that would prejudice the impartiality of this scientific work.

Funding

This work was supported by Genome Canada and Genome Québec for the ATLAS project. M.I. is a recipient of a CIHR (Canadian Institutes of Health Research) studentship as part of a training program in genomics (“Génomique fonctionnelle des maladies endocriniennes”) and of a studentship of the gabonese government. F.D. is a recipient of a Research Career Award in Health Sciences by CIHR/Rx&D HRF (Health Research Foundation).

References

- Ahmed SA, Talal N & Christadoss P 1987 Genetic regulation of testosterone-induced immune suppression. *Cellular Immunology* **104** 91-98.
- Angele MK, Ayala A, Cioffi WG, Bland KI & Chaudry IH 1998 Testosterone: the culprit for producing splenocyte immune depression after trauma hemorrhage. *American Journal of Physiology* **274** C1530-1536.
- Angele MK, Ayala A, Monfils BA, Cioffi WG, Bland KI & Chaudry IH 1998 Testosterone and/or low estradiol: normally required but harmful immunologically for males after trauma-hemorrhage. *Journal of Trauma* **44** 78-85.
- Armstrong DT & Papkoff H 1976 Stimulation of aromatization of exogenous and endogenous androgens in ovaries of hypophysectomized rats in vivo by follicle-stimulating hormone. *Endocrinology* **99** 1144-1151.
- Barila D, Mangano R, Gonfloni S, Kretzschmar J, Moro M, Bohmann D & Superti-Furga G 2000 A nuclear tyrosine phosphorylation circuit: c-Jun as an activator and substrate of c-Abl and JNK. *EMBO Journal* **19** 273-281.
- Baskaran R, Wood LD, Whitaker LL, Canman CE, Morgan SE, Xu Y, Barlow C, Baltimore D, Wynshaw-Boris A, Kastan MB *et al.* 1997 Ataxia telangiectasia mutant protein activates c-Abl tyrosine kinase in response to ionizing radiation. *Nature* **387** 516-519.
- Cárdenas P & Pope W 2004 Attenuation of estrogenic effects by dihydrotestosterone in the pig uterus is associated with downregulation of the estrogen receptors. *Biology of Reproduction* **70** 297-302.

- Death AK, McGrath KC, Sader MA, Nakhla S, Jessup W, Handelsman DJ & Celermajer DS 2004 Dihydrotestosterone promotes vascular cell adhesion molecule-1 expression in male human endothelial cells via a nuclear factor-kappaB-dependent pathway. *Endocrinology* **145** 1889-1897.
- Foray N, Marot D, Gabriel A, Randrianarison V, Carr AM, Perricaudet M, Ashworth A & Jeggo P 2003 A subset of ATM- and ATR-dependent phosphorylation events requires the BRCA1 protein. *EMBO Journal* **22** 2860-2871.
- Herbig U, Jobling WA, Chen BP, Chen DJ & Sedivy JM 2004 Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Molecular Cell* **14** 501-513.
- Hosack DA, Dennis G Jr, Sherman BT, Lane HC & Lempicki RA 2003 Identifying biological themes within lists of genes with EASE. *Genome Biology* **4** R70.
- Hung TT & Gibbons WE. 1983 Evaluation of androgen antagonism of estrogen effect by dihydrotestosterone. *Journal of Steroid Biochemistry* **19** 1513-1520.
- Ito K, Suzuki T, Akahira J-I, Moriya T, Kaneko C, Utsunomiya H, Yaegashi N, Okamura K & Sasano H 2002 Expression of androgen receptor and 5 α -reductases in the human normal endometrium and its disorders. *International Journal of Cancer* **99** 652-657
- Jiang F & Wang Z 2004 Gadd45gamma is androgen-responsive and growth-inhibitory in prostate cancer cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* **213** 121-129.
- Kabler RL, Srinivasan A, Taylor LJ, Mowad J, Rothblum LI & Cavanaugh AH 1996 Androgen regulation of ribosomal RNA synthesis in LNCaP cells and rat prostate. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **59** 431-439

- Kaur J, Kaur J & Ralhan R 2000 Induction of apoptosis by abrogation of HSP70 expression in human oral cancer cells. *International Journal of Cancer* **85** 1-5.
- Kharas MG & Fruman DA 2005 ABL oncogenes and phosphoinositide 3-kinase: mechanism of activation and downstream effectors. *Cancer Research* **65** 2047-2053.
- Kumar AP, Garcia GE & Slaga TJ 2001 2-methoxyestradiol blocks cell-cycle progression at G(2)/M phase and inhibits growth of human prostate cancer cells. *Molecular Carcinogenesis* **31** 111-124.
- Kurz EU & Lees-Miller SP 2004 DNA damage-induced activation of ATM and ATM-dependent signaling pathways. *DNA Repair (Amst)* **3** 889-900.
- Lee MS, Ogg S, Xu M, Parker LL, Donoghue DJ, Maller JL & Piwnicka-Worms H 1992 cdc25+ encodes a protein phosphatase that dephosphorylates p34cdc2. *Molecular Biology of the Cell* **3** 73-84.
- Luu-The V, Paquet N, Calvo E & Cumps J. 2005 Improved Real-Time RT-PCR method for high-throughput measurements using second derivative calculation and double correction. *Biotechniques* **8** 287-293.
- MacIndoe JH & Etre LA. 1981 An antiestrogenic action of androgens in human breast cancer cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **53** 836-842.
- Martel C, Provencher L, Li X, St Pierre A, Leblanc G, Gauthier S, Merand Y & Labrie F 1998 Binding characteristics of novel nonsteroidal antiestrogens to the rat uterine estrogen receptors. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **64** 199-205.

- Mutch DM, Berger A, Mansourian R, Rytz A & Roberts MA 2002 The limit fold change model: a practical approach for selecting differentially expressed genes from microarray data. *BMC Bioinformatics* **3** 17.
- Nantermet PV, Masarachia P, Gentile MA, Pennypacker B, Xu J, Holder D, Gerhold D, Towler D, Schmidt A, Kimmel DB, Freedman LP *et al.* 2005 Androgenic induction of growth and differentiation in the rodent uterus involves the modulation of estrogen-regulated genetic pathways. *Endocrinology* **146** 564-578.
- Newman JC & Weiner AM 2005 L2L: a simple tool for discovering the hidden significance in microarray expression data. *Genome Biology* **6** R81.
- Niida H & Nakanishi M 2006 DNA damage checkpoints in mammals. *Mutagenesis* **21** 3-9.
- Okon MA, Laird SM, Tuckerman EM & Li T-C 1998 Serum androgen levels in women who have recurrent miscarriages and their correlation with markers of endometrial function. *Fertility and Sterility* **69** 682-690.
- Parcellier A, Gurbuxani S, Schmitt E, Solary E & Garrido C 2003 Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **304** 505-512.
- Parker LL & Piwnicka-Worms H 1992 Inactivation of the p34cdc2-cyclin B complex by the human WEE1 tyrosine kinase. *Science* **257** 1955-1957.
- Pelletier G, Luu-The V, Li S & Labrie F 2004 Localization and estrogenic regulation of androgen receptor mRNA expression in the mouse uterus and vagina. *Journal of Endocrinology* **180** 77-85

- Pradeep PK, Li X, Peegel H & Menon KMJ 2002 Dihydrotestosterone inhibits granulosa cell proliferation by decreasing the cyclin D2 mRNA expression and cell cycle arrest at G1 phase. *Endocrinology* **143** 2930-2935.
- Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kacmaz K & Linn S 2004 Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual Review of Biochemistry* **73** 39-85.
- Schoenmakers EF, Huysmans C & Van de Ven WJ 1999 Allelic knockout of novel splice variants of human recombination repair gene RAD51B in t(12;14) uterine leiomyomas. *Cancer Research* **59** 19-23.
- Schreiber M, Kolbus A, Piu F, Szabowski A, Mohle-Steinlein U, Tian J, Karin M, Angel P & Wagner EF 1999 Control of cell cycle progression by c-Jun is p53 dependent. *Genes and Development* **13** 607-619.
- Shaulian E & Karin M 2001 AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* **20** 2390-2400.
- Slater CH & Schreck CB 1993 Testosterone alters the immune response of chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. *General and Comparative Endocrinology* **89** 291-298.
- Taylor WR & Stark GR 2001 Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* **20** 1803-1815.
- Tsatsanis C & Spandidos DA 2004 Oncogenic kinase signaling in human neoplasms. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1028** 168-175.
- Tuckerman EM, Okon MA, Li T & Laird SM 2000 Do androgens have a direct effect on endometrial function? An in vitro study. *Fertility and Sterility* **74** 771-779.

- Warrington JA, Nair A, Mahadevappa M & Tsyganskaya M 2000 Comparison of human adult and fetal expression and identification of 535 housekeeping/maintenance genes. *Physiological Genomics* **2** 143-147.
- Wei YQ, Zhao X, Kariya Y, Teshigawara K & Uchida A 1995 Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by abrogation of heat-shock protein (HSP) 70 expression in tumor cells. *Cancer Immunology Immunotherapy* **40** 73-78.
- Yamamoto A, Taki T, Yagi H, Habu T, Yoshida K, Yoshimura Y, Yamamoto K, Matsushiro A, Nishimune Y & Morita T 1996 Cell cycle-dependent expression of the mouse Rad51 gene in proliferating cells. *Molecular & General Genetics* **251** 1-12.
- Yang X, Matsuda K, Bialek P, Jacquot S, Masuoka HC, Schinke T, Li L, Brancorsini S, Sassone-Corsi P, Townes TM *et al.* 2004 ATF4 is a substrate of RSK2 and an essential regulator of osteoblast biology; implication for Coffin-Lowry Syndrome. *Cell* **117** 387-398.
- Yuan ZM, Huang Y, Ishiko T, Nakada S, Utsugisawa T, Kharbanda S, Wang R, Sung P, Shinohara A, Weichselbaum R *et al.* 1998 Regulation of Rad51 function by c-Abl in response to DNA damage. *Journal of Biological Chemistry* **273** 3799-3802.
- Zhang J, Sun Y, Liu Y, Sun Y & Liao DJ 2004 Synergistic effects of androgen and estrogen on the mouse uterus and mammary gland. *Oncology Reports* **12** 709-716.
- Zhou J, Ng S, Adesanya-Famuiya O, Anderson K & Bondy CA 2000 Testosterone inhibits estrogen-induced mammary epithelial proliferation and suppresses estrogen receptor expression. *FASEB Journal* **14** 1725-1730.

Figure Legends**Figure 1:** Clustering of gene expression patterns

Among 239 genes that passed the variation filter, the 174 up-regulated genes and the 65 down-regulated genes were normalized to obtain a mean=0 and a S.D=1 across time points, separately. After the normalization, using a self-organizing map (GeneCluster 2), they were grouped into 3 clusters (A-C) and 3 clusters (D-F) of activated and inhibited genes, respectively. Each cluster is represented by the centroid of normalized values on the Y-axis and time points on the X-axis. The number of genes belonging to each cluster is displayed. These patterns indicate the representative temporal gene expression changes of the selected genes. Error bars indicate the maximal and minimal fold value for the Panels A-C and the S.D of the average expression levels for the Panels D-F.

Figure 2: Functional classification of clustered genes

Different functions of the clustered genes were grouped into 10 categories using L2L and EASE softwares and the percentage representation of each function is indicated. Each corresponding cluster, are indicated on the left.

Figure 3: Relevant list of up- and down-regulated genes in each cluster

Relevant gene names in each cluster are indicated. Changes in expression levels are also indicated by color based on normalized values (green and red for low and high values, respectively) with the time points (in hours) indicated above. Major subclasses of gene functions with their corresponding fold enrichment (FE) and p-value (P) are also displayed for each cluster.

Figure 4: Temporal changes of gene expression levels performed by quantitative real-time PCR

Evidence for transcriptional regulatory network during the uterotrophic response of ATM signaling-related genes (Panel A) and selected genes involved in the G2/M checkpoint (Panel B). The number of copies by μg / RNA is indicated on the Y axis and the time points on the X axis.

Figure 5: Schematic and simplified representation of the ATM/Gadd45g transcriptional cascade triggered by DHT, in the mouse uterus

DHT activates a transcriptional cascade resulting in the modulation of genes involved in the cellular checkpoints control. Genes confirmed by Q-RT-PCR are highlighted in bold and their DHT-modulation, stimulation or repression, is indicated into circles by + or - , respectively. Time points of the modulations of analyzed genes by Q-RT-PCR are also indicated. Other genes include known and unknown upstream targets on the corresponding genes while dashed line suggests a direct or indirect regulation.

Figure 1

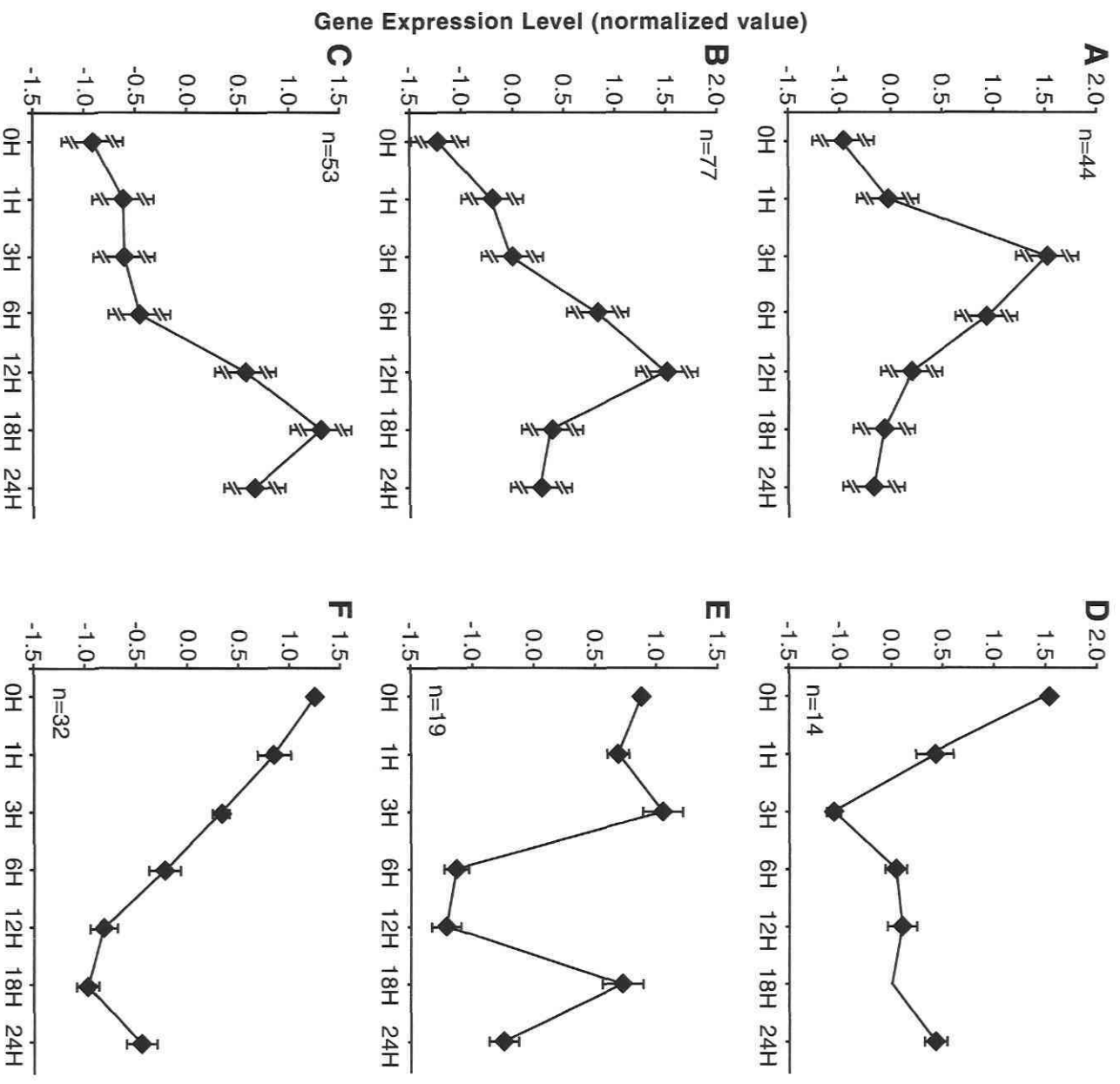


Figure 2

Stimulated :

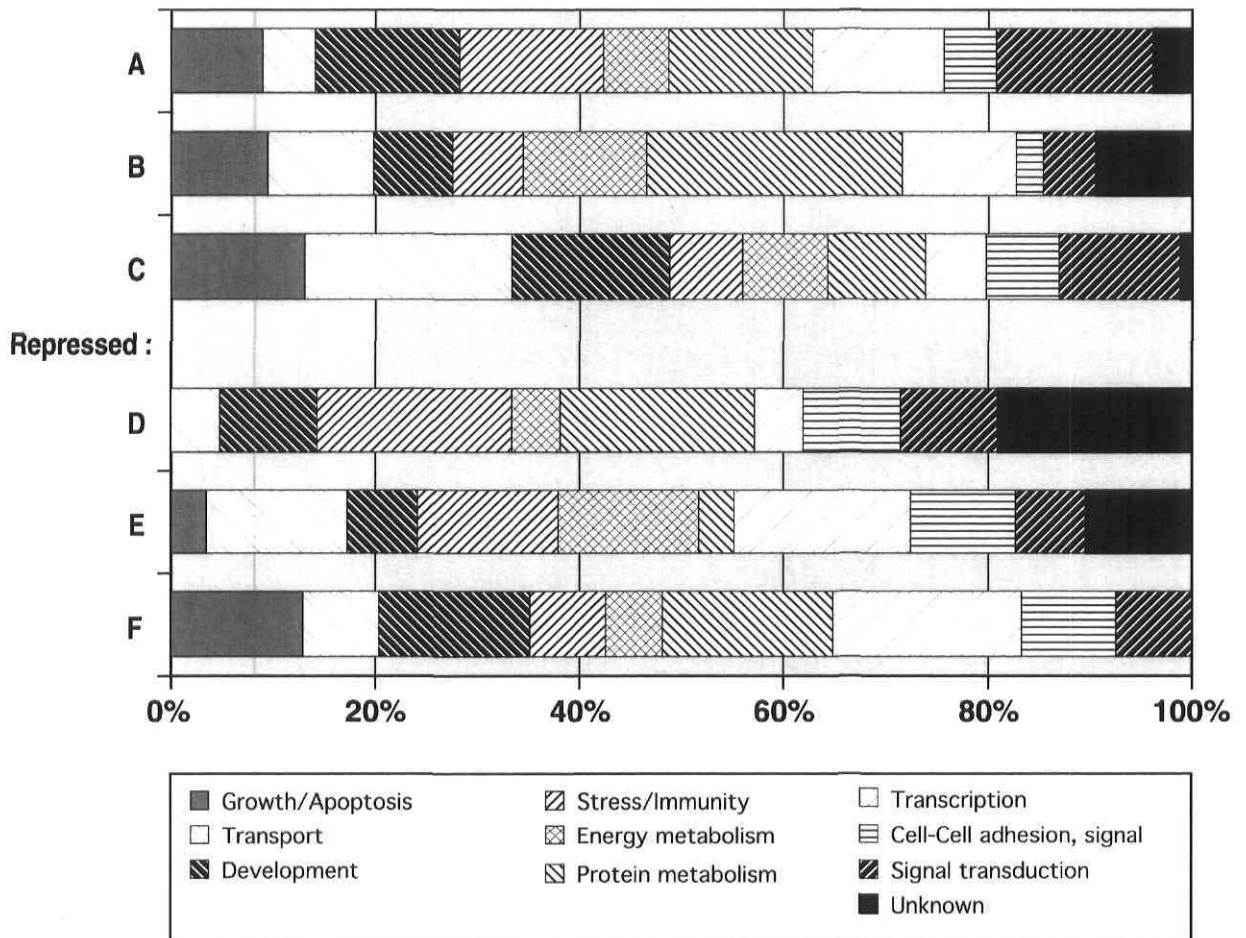
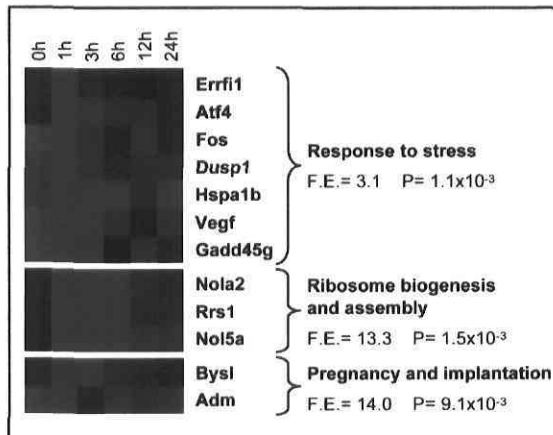


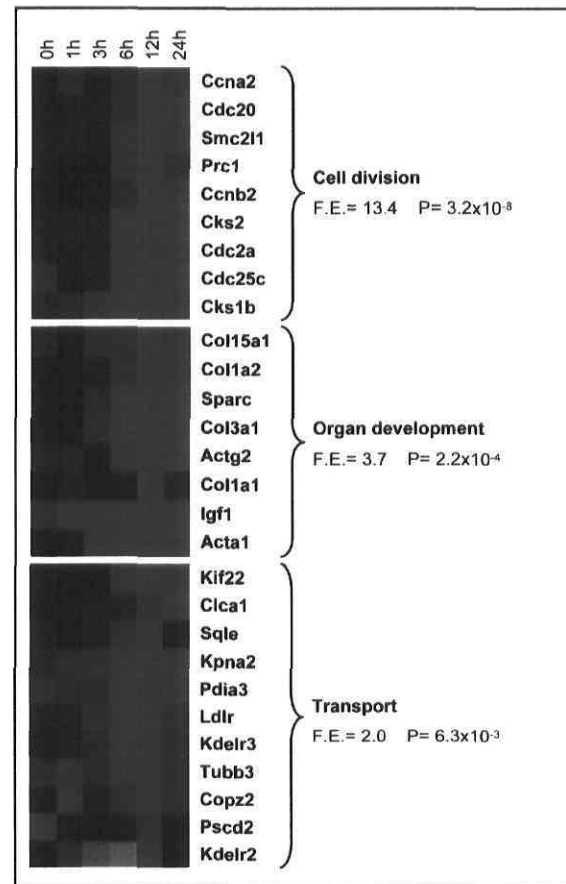
Figure 3

Up-regulated genes

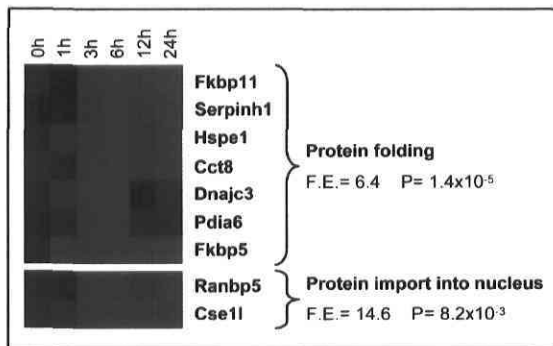
Cluster A



Cluster C

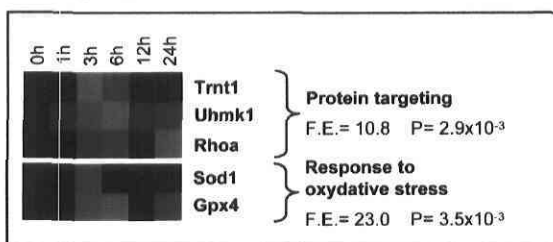


Cluster B



Down-regulated genes

Cluster E



Cluster F

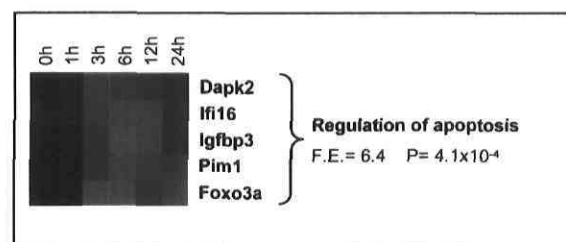


Figure 4

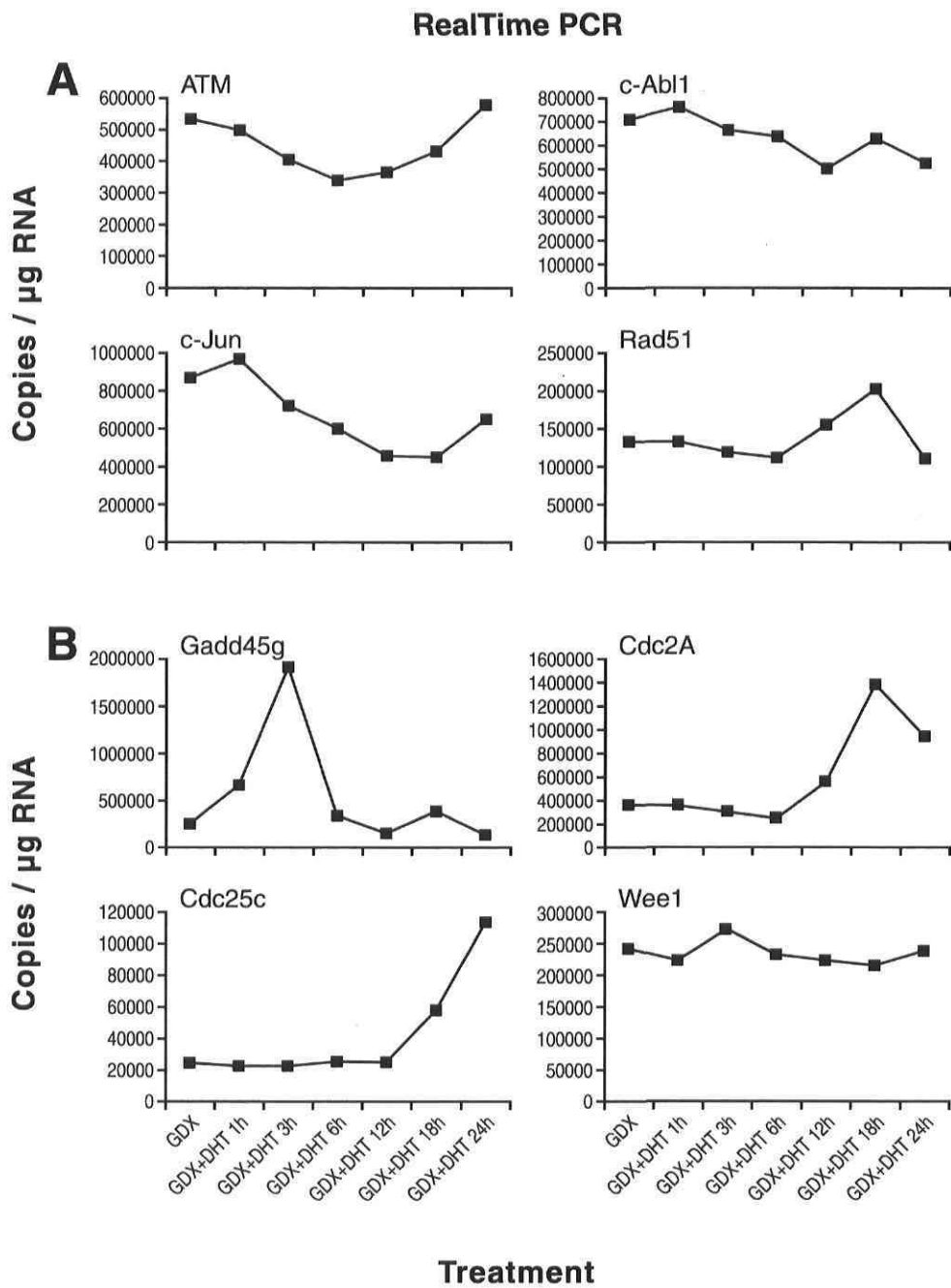
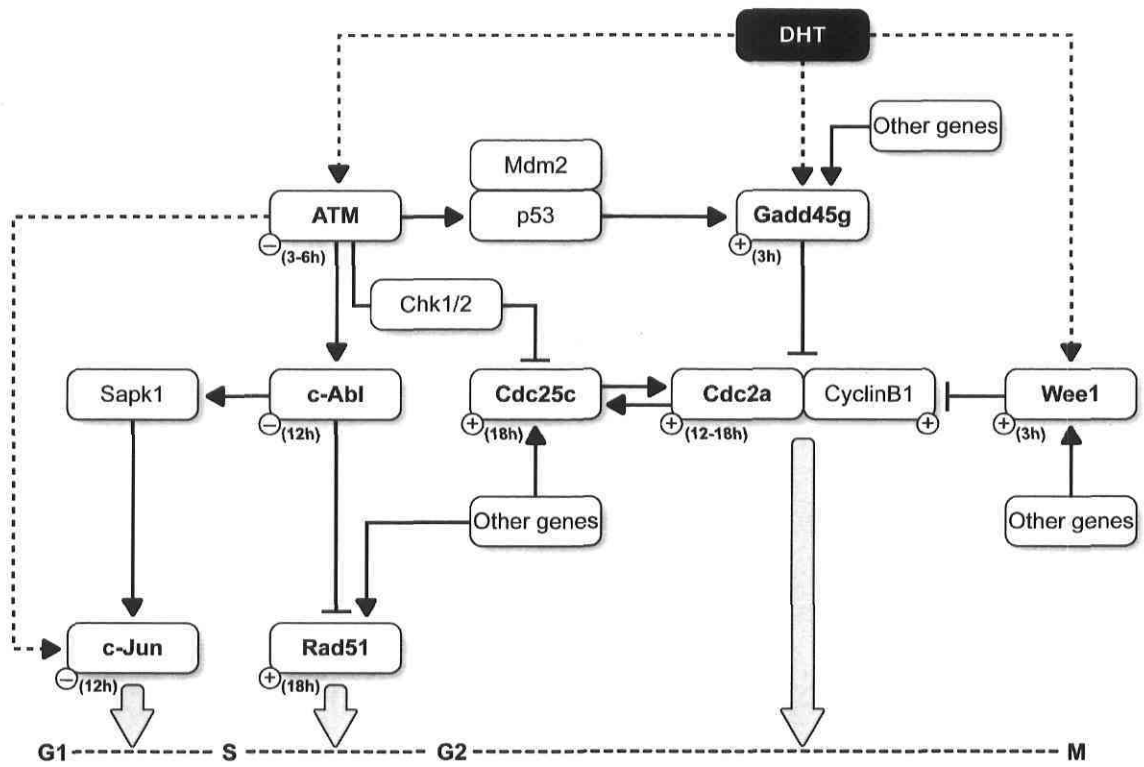


Figure 5



Discussion

Tel que mentionné en introduction à la section 1.3, l'œstradiol et la dihydrotestostérone sont toutes deux impliquées dans le développement de nombreuses affections gynécologiques incluant les cancers de l'endomètre, les fibromes utérins, l'endométriose, et l'infertilité. Ainsi, afin de mieux comprendre l'impact de ces deux hormones sur la régulation du fonctionnement de l'utérus, nous avons entrepris l'étude détaillée du profil de l'expression génique induit par l'E2 et la DHT, dans l'utérus de souris ovariectomisées.

Analyse temporelle de l'activation des Phosphatases Tyrosine (PTP) et Map Kinase (MKP), et de la répression de gènes clefs du sentier IGF-1, induites par E2 dans l'utérus de souris.

Les facteurs de croissance jouent un rôle important au niveau de la prolifération et de la différenciation des cellules épithéliales de l'utérus (Spencer *et al.*, 2005). Les IGFs (« Insulin Like Growth Factors »), notamment, sont impliqués, chez la femme, dans la prolifération des cellules endométriales induite par l'œstradiol (Giudice *et al.*, 1994). De plus, les souris transgéniques dont l'expression du gène *IGF-1* est abolie, sont infertiles (Baker *et al.*, 1996). IGF-1 apparaît donc comme un médiateur important de l'effet utéro-trophique de E2, et un élément essentiel au bon fonctionnement de l'utérus. En fait, l'action de IGF-1 implique l'activation de nombreux sentiers de signalisation intracellulaire, incluant les sentiers Ras/Raf/MAPK et PI3K. En effet, E2 induit, *via* IGF-1, l'autophosphorylation des portions cytosoliques de IGF-1R et entraîne ainsi la phosphorylation en série des protéines des sentiers Ras/Raf/MAPK et PI3K. L'activation du sentier Ras/Raf/MAPK par E2 est associée à une prolifération cellulaire, alors que la phosphorylation du sentier PI3K, par E2, conduit à l'inhibition des réponses apoptotiques.

La modulation du sentier de signalisation IGF-1 implique également l'action de protéines de liaison à IGF (IGFBPs), et des phosphatases tyrosines (PTPs) et MAPKs (MKPs). Ainsi, les travaux portant sur l'analyse du profil de l'expression génique induit par E2 dans

l'utérus de souris, présentés dans ce mémoire, ont révélé que les gènes *IGFBP2* et *IGFBP5*, encodant des protéines qui facilitent la liaison de IGF-1 à son récepteur, sont stimulés respectivement dans les 12h et 24h suivant l'exposition à E2, tandis que les gènes de *IGFBP6* et *IGFBP3*, dont les protéines inhibent la liaison de IGF-1 à IGF1-R, sont réprimés dans les 12h en réponse à E2. De plus, il apparaît que des gènes-clefs du sentier de signalisation IGF-1 (*MAPK1* et *IGF1-R*) sont réprimés en réponse à E2, alors que des gènes encodant des MKPs (*MKP1* et *MKP3*) et des PTPs (*STEP* et *PTP1B*) sont stimulés. En effet, nos travaux montrent que le gène *MAPK1* (*ERK2*) est réprimé entre 6h et 18h, en réponse à E2. Cette inhibition pourrait être la conséquence de l'action des phosphatases MKP1/3 et STEP ciblant MAPK1, et dont les transcriptions sont stimulées respectivement dans les 3h et 6h suivant l'exposition à E2. Le gène *IGF-1R* est également inhibé dans les 6h, en réponse à E2. Cette répression pourrait être due à l'action de la phosphatase PTP1B ciblant IGF-1R, et dont la transcription est maximale dans les 3h suivant l'exposition à E2. Nos travaux nous ont également permis d'observer que la transcription de plusieurs gènes du sentier PI3K (*Gab1*, *PI3K(R2)* et *BCL2L11*) est inhibée, en réponse à E2.

D'autre part, et en accord avec l'effet utéro-trophique de l'œstradiol, nos résultats ont permis de démontrer une induction rapide (c.-à-d de 0h à 6h) de la transcription de gènes codant pour des régulateurs transcriptionnels et des transducteurs de signal (*HSPs*, *facteurs de transcription*, *ribosomes* etc...), dont les produits seraient impliqués dans la régulation subséquente d'autres gènes. On retrouve par exemple, durant cette phase, des gènes jouant un rôle important dans l'induction de la prolifération cellulaire, comme *c-Myc* et *ODC*, et connus pour être activés par E2 directement ou indirectement *via* l'activation du sentier Ras/Raf/MAPK. On observe ensuite (c.-à-d entre 6h et 24), une nette augmentation de la transcription des gènes de structure (*kératines*, *procollagènes*, *mucin1*, etc...).

Nos investigations confirment donc que des doses physiologiques d'œstradiol induisent une série d'événements transcriptionnels conduisant potentiellement à la prolifération des cellules utérines de souris. D'autre part, s'il est clairement établi que l'activation par IGF-1 des sentiers Ras/Raf/MAPK et PI3K, joue un rôle central dans la promotion de l'effet utéro-trophique de l'œstradiol, les résultats obtenus ici nous permettent d'envisager qu'E2

contrôlerait l'amplitude de cet effet utéro-trophique grâce à la modulation transcriptionnelle de gènes de ce sentier, par une action directe, ou encore indirectement, *via* la modulation de l'expression de protéines ciblant ce sentier. Ainsi, E2 induirait l'expression de phosphatases qui ciblent des éléments clefs du sentier IGF-1, et qui agiraient alors comme des rétrocontrôles de l'effet utéro-trophique. D'autre part, E2 induirait ou inhiberait l'expression d'IGFBPs capables de renforcer ou d'atténuer cet effet utéro-trophique. Finalement, E2 serait également en mesure de renforcer son effet anti-apoptotique initialement induit, par la répression des gènes du sentier PI3K.

Analyse temporelle de la modulation transcriptionnelle du sentier de signalisation ATM/Gadd45, par la DHT, dans l'utérus de souris.

Les androgènes exercent à la fois un effet œstrogénique et anti-œstrogénique sur les sujets normaux. Ainsi, chez la souris, il a été démontré que la DHT peut avoir un effet utéro-trophique (Armstrong *et al.*, 1976; Zhang *et al.*, 2004). La DHT possède également des effets anti-prolifératifs, en inhibant, par exemple, des gènes encodant des protéines impliquées dans la transition G1/S (Pradeep *et al.*, 2002). Tel que mentionné à la section 3.2 de l'introduction, chez les eucaryotes, la progression à travers les différentes phases du cycle cellulaire (G1, S, G2 et M) est étroitement régulée par des points de contrôles. Ces derniers englobent l'ensemble des réponses cellulaires à l'endommagement de l'ADN, incluant l'arrêt de la progression du cycle cellulaire, l'induction de la réparation de l'ADN et l'apoptose (Sancar *et al.*, 2004). La protéine ATM est notamment impliquée dans la détection de l'endommagement de l'ADN, et l'induction de cascades transductionnelles conduisant à l'inhibition des transitions G1/S et G2/M. La protéine Gadd45g, quant à elle, est impliquée dans le contrôle de la transition G2/M.

Bien que les effets directs de la DHT sur la physiologie de l'utérus ne soient pas clairement définis, il a été suggéré que la DHT affecterait la prolifération des cellules endométriales (Fujimoto *et al.*, 1994 et 1995). De plus, Zhang J *et al.* (2004) ont montré que la DHT induit, chez les souris, la prolifération des cellules du myomètre et des cellules épithéliales de l'endomètre. Ainsi, nos résultats indiquent que durant la première phase de transcription,

c'est-à-dire entre 0h et 12h, on observe l'induction de gènes spécifiques au stress cellulaire (*Gadd45g*). Puis, des gènes impliqués dans la promotion de l'apoptose sont réprimés (*IFII6*), alors que les gènes reliés à la transcription et à la transduction de signal sont induits. Ces derniers codent principalement pour des protéines chaperones (HSP70, 105), ribosomiques (Rps19) ou des facteurs de transcription (ATF-4). La plupart des oncogènes (*Fos*, *Hoxa11*, *Armet*) sont également activés durant cette phase, bien que certains apparaissent inhibés (*c-jun*). En effet, les produits des gènes, cités précédemment, participent à la modulation subséquente d'autres gènes. Aussi, plus tardivement, c'est-à-dire entre 12h et 24h, on observe une augmentation de la transcription de gènes impliqués dans les transitions G1/S (*cycline A2*) et G2/M (*cycline B1*). De plus, les gènes de structure comme *Ckap2* et les *procollagènes* ou les gènes se rapportant au développement des tissus comme les *sprrr*, sont principalement induits durant cette phase. Il en est de même pour les gènes reliés aux lipides (*LDLR*).

Nos résultats ont également révélé que la transcription de gènes impliqués dans le sentier ATM/*Gadd45g*, est modulée en réponse à la DHT. Ainsi, la DHT stimule rapidement, c'est-à-dire dans les 3h, la transcription de *Gadd45g* et *Wee1*, qui codent pour des protéines jouant un rôle essentiel dans l'arrêt du cycle cellulaire en G2/M et l'induction de l'apoptose, *via* l'inhibition du complexe cycline B1/cdc2. Puis, le gène *ATM* est réprimé dans les 6h, suivant l'exposition à la DHT. En effet, il est établi qu'*ATM* stimule *c-jun* et inhibe *Rad51*, *via* *c-Abl* dont le gène est ici réprimé dans les 12h, en réponse à la DHT. En fait, le produit de *c-jun*, qui présente ici un plateau de répression entre 12h et 18h, est impliqué dans la transition G1/S, alors que la protéine de *Rad51*, dont la transcription est maximale à 18h, est impliquée dans la réparation par recombinaison homologue des cassures de l'ADN double brin. D'autre part, *ATM* stimule également, *via* p53, la transcription de *Gadd45g*, qui apparaît ici très basse, 6 heures après l'administration de DHT. De plus, *Cdc25c*, dont le produit active le complexe cycline B1/cdc2a, est graduellement stimulé, 12 heures après l'exposition à la DHT. En conséquence, les gènes *cdc2a* et *cyclin B1*, dont les produits forment des complexes impliqués dans la transition G2/M, présentent une transcription maximale, 18h après l'injection de DHT.

En définitive, et en accord avec l'effet œstrogénique des androgènes, les travaux, portant sur l'analyse du profil de l'expression génique induit par la DHT, présentés dans ce mémoire, démontrent qu'une dose physiologique de cette hormone induit une série d'évènements transcriptionnels conduisant potentiellement à la prolifération des cellules utérines. D'autre part, on observe également que la DHT stimule d'abord la transcription de gènes impliqués dans l'arrêt du cycle en G2/M et l'induction de l'apoptose, puis inhibe des gènes impliqués dans la stimulation de l'apoptose, avant d'activer la transcription de gènes essentiels aux transitions G1/S et G2/M. Ainsi, les résultats obtenus lors de cette étude, nous permettent de suggérer que la DHT régulerait la prolifération des cellules utérines, en agissant principalement sur les points de contrôle G1/S et G2/M du cycle cellulaire. Ce mécanisme pourrait jouer un rôle important dans les modifications périodiques de l'utérus, et le sentier ATM/Gadd45g occuperait une place essentielle, dans ce processus.

Conclusion

La connaissance des différents mécanismes de régulation et d'interaction génique est nécessaire et essentielle afin d'expliquer et prédire les fonctions cellulaires et la physiologie des tissus. Ainsi, l'analyse des profils de l'expression génique, induits par la DHT et l'E2, visait principalement la caractérisation, ou une meilleure compréhension des sentiers métaboliques et/ou signalétiques régulés par ces 2 hormones, dans l'utérus de souris.

Les travaux portant sur l'analyse du profil de l'expression génique induit par l'oestradiol, ont confirmé qu'E2 initie une série d'évènements transcriptionnels, conduisant potentiellement à un effet utérothrophique. Nos investigations nous ont également permis de suggérer que la modulation, par l'oestradiol, de la transcription de gènes clefs du sentier IGF-1, participerait au contrôle de l'amplitude de cet effet utérothrophique. Ainsi, E2 induit des gènes d'IGFBPs (*IGFBP2* et *IGFBP5*) impliquées dans l'activation du sentier IGF-1, et inhibe des gènes d'IGFBPs (*IGFBP6* et *IGFBP3*) impliquées dans la répression du sentier IGF-1. E2 serait aussi en mesure de renforcer son action antiapoptotique initialement induite, par la répression des gènes de la signalisation PI3K. De plus, E2 active des gènes de phosphatases (*MKP1*, *MKP3*, *STEP* et *PTP1B*) qui ciblent des éléments clefs du sentier IGF-1, et qui agiraient donc comme des rétrocontrôles de l'effet utérothrophique.

Conformément à l'action oestrogénique des androgènes, les travaux portant sur l'analyse du profil de l'expression génique induit par la dihydrotestostérone, ont confirmé que la DHT initie une série d'évènements transcriptionnels, conduisant potentiellement à un effet utérothrophique. D'autre part, les résultats obtenus lors de cette étude, nous permettent de suggérer que la DHT régulerait la prolifération des cellules utérines, en agissant principalement sur les points de contrôle G1/S et G2/M du cycle cellulaire, et que le sentier ATM/Gadd45g jouerait un rôle important dans ce processus. Ainsi, la DHT induit rapidement la transcription de gènes (*Gadd45g* et *Wee1*) encodant des protéines impliquées dans l'arrêt du cycle en G2 et l'induction de l'apoptose, puis inhibe des gènes (*ATM*, *c-Abl*, *c-Jun*) dont les protéines sont impliquées dans la répression de la transition

G1/S, et finalement active des gènes codant pour des protéines essentielles aux transitions G1/S (*cycline A2*) et G2/M (*Cycline B1*, *cdca*, *cdc25c*). Ce mécanisme pourrait jouer un rôle important dans les modifications périodiques de l'utérus. De plus, l'induction rapide de gènes encodant des protéines impliquées dans la promotion de l'apoptose, laisse penser que l'effet anti-prolifératif de la DHT s'effectuerait à hautes doses. En effet, Cárdenas et Pope (2004) suggèrent que l'action anti-œstrogénique de la DHT sur l'utérus, serait dépendante de la dose.

En somme, la DHT et l'E2 induisent toutes deux une série d'événements transcriptionnels conduisant potentiellement à un effet utérotrophique, chez la souris. Cependant, les changements induits par la DHT, seraient moins importants que ceux qui sont causés par E2 (Nantermet PV *et al.*, 2005). En effet, dans nos études, il apparaît que 1141 gènes sont significativement modulés par E2, tandis que seuls 250 gènes sont significativement régulés par la DHT. De plus, la première phase de la transcription dure 6h avec E2, alors qu'elle s'étend jusqu'à 12h avec la DHT. D'autre part, et en concordance avec l'action anti-œstrogénique des androgènes, nos résultats suggèrent que la DHT présente également des effets anti-prolifératifs sur l'utérus, qui s'effectueraient probablement à hautes doses.

En définitive, nos investigations n'ont pas encore permis de caractériser de nouveaux sentiers métaboliques ou signalétiques. Cependant, les résultats présentés dans ce mémoire ont permis de préciser les profils d'expression génique induits par l'E2 ou la DHT, dans l'utérus de souris. Nous avons également été en mesure de mettre en exergue la régulation du sentier IGF-1 par E2, et la régulation du sentier ATM/Gadd45g par la DHT. Ainsi, des défaillances dans le fonctionnement de ces sentiers signalétiques, et des mutations dans les gènes qu'ils comprennent, pourraient être impliquées dans le développement d'affections gynécologiques comme les cancers de l'utérus, l'endométriose, les fibromes utérins ou l'infertilité. Il apparaît donc important de tester les hypothèses émises dans ce mémoire, par des approches de biologie moléculaire classique.

Perspectives

Dans le présent projet de recherche, nous avons utilisé des biopuces d'oligonucléotides Affymetrix et la PCR quantitative en temps réel, afin d'identifier des sentiers de signalisation cellulaire significativement régulés, à l'échelle transcriptionnelle, par l'E2 ou la DHT, dans l'utérus de souris. Les hypothèses, qui découlent des analyses présentées dans ce mémoire, nécessitent des vérifications expérimentales supplémentaires, notamment au niveau post-transcriptionnel.

Nos investigations ont montré que la DHT module la transcription de gènes liés au contrôle du cycle cellulaire. Cela a d'autant plus d'intérêt que des défauts, dans le fonctionnement des points de contrôle, causent souvent une instabilité génomique conduisant principalement au développement des maladies et des tumeurs. Aussi, il semble que le contrôle de la prolifération des cellules utérines, par la DHT, serait dépendant de la dose en présence. En effet, du fait de la stéroïdogénèse ovarienne et comme expliqué à la section 2.1.2 de l'introduction, les taux plasmatiques des androgènes varient de façon cyclique, chez la femme en période reproductive. Il reste donc à confirmer que la DHT joue un rôle dans les modifications périodiques de la couche endométriale de l'utérus, en testant, par exemple, l'effet de différentes doses de DHT sur la prolifération des cellules utérines non-cancéreuses, en culture. L'approche de l'interférence ARN (RNAi) pourrait également nous permettre d'évaluer l'importance de certaines protéines impliquées dans le sentier ATM/Gadd45g, et dont les gènes sont modulés par la DHT, sur le fonctionnement de l'utérus. De la même manière, on pourrait évaluer, grâce à la RNAi, l'impact de certaines protéines impliquées dans le contrôle du sentier IGF-1, et dont les gènes sont modulés par E2, sur la physiologie de l'utérus. D'autre part, l'utilisation de techniques d'immunohistochimie pourrait nous permettre de localiser les couches utérines sur lesquelles la DHT et l'E2 exercent leur action. Alors que l'immunoprécipitation à la chromatine (ChIP) nous permettrait d'identifier des facteurs de transcriptions impliqués dans les sentiers décrits plus haut.

Bibliographie

Aarnio, M., Sankila, R., Pukkala, E., Salovaara, R., Aaltonen, L.A., de la Chapelle, A., Peltomaki, P., Mecklin, J.P., Jarvinen, H.J. (1999) *Cancer risk in mutation carriers of DNA-mismatch-repair genes*. Int J Cancer. **81** : 214-218.

Aaro, L.A., Symmonds, R.E., Dockerty, M.B. (1966) *Sarcoma of the uterus. A clinical and pathologic study of 177 cases*. Am J Obstet Gynecol. **94** : 101-109.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. (1994) *Molecular Biology of the cell*. 3^e ed. Garland Publishing Inc., New-York; 403.

Amar-Costesec, A. et Heinen, E. (1992) *Atlas d'Histologie*. De Boeck-Wesmael, s.a. Bruxelles; 257, 266-269.

Anisimov, V.N., Ukraintseva, S.V., Yashin, A.I. (2005) *Cancer in rodents: does it tell us about cancer in humans?* Nat Rev Cancer. **5** : 807-819.

Armstrong, D.T., Papkoff, H. (1976) *Stimulation of aromatization of exogenous and endogenous androgens in ovaries of hypophysectomized rats in vivo by follicle-stimulating hormone*. Endocrinology **99**:1144-1151.

Baker, J., Hardy, M.P., Zhou, J., Bondy, C., Lupu, F., Bellve, A.R., Efstratiadis, A. (1996) *Effects of an Igf1 gene null mutation on mouse reproduction*. Mol Endocrinol. **10** : 903-918.

Bardin, C.W. et Catterall, J. F. (1981) *Testosterone : a major determinant of extra-genital sexual dimorphism*. Science **211** : 1279-1294.

Bodner, K., Bodner-Adler, B., Kimberger, O., Czerwenka, K., Leodolter, S., Mayerhofer, K. (2003) *Estrogen and progesterone receptor expression in patients with uterine leiomyosarcoma and correlation with different clinicopathological parameters*. Anticancer Res. **23** : 729-732.

Bokhman, J.V. (1983) *Two pathogenetic types of endometrial carcinoma*. Gynecol Oncol. **15** : 10-17.

Bowers, P.M., O'Connor, B.D., Cokus, S.J., Sprinzak, E., Yeates, T.O., Eisenberg, D. (2005) *Utilizing logical relationships in genomic data to decipher cellular processes*. FEBS J. **272** : 5110-5118. Review.

Càrdenas, P. et Pope, W., (2004) *Attenuation of estrogenic effects by dihydrotestosterone in the pig uterus is associated with downregulation of the estrogen receptors*. Biology of Reproduction **70** : 297-302.

Der, S.D., Zhou, A., Williams, B.R., Silverman, R.H. (1998) *Identification of genes*

differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. Proc Natl Acad Sci U S A. **95** : 15623-15628.

Dunlop, M.G., Farrington, S.M., Carothers, A.D., Wyllie, A.H., Sharp, L., Burn, J., Liu, B., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. (1997) *Cancer risk associated with germline DNA mismatch repair gene mutations.* Hum Mol Genet. **6** : 105-110.

Ellenson, L.H., Wu, T.C. (2004) *Focus on endometrial and cervical cancer.* Cancer Cell. **5** : 533-538. Review.

Elson, D.A., Riley, R.R., Lacey, A., Thordarson, G., Talamantes, F.J., Arbeit, J.M. (2000) *Sensitivity of the cervical transformation zone to estrogen-induced squamous carcinogenesis.* Cancer Res. **60** :1267-1275.

Elvidge, G. (2006) *Microarray expression technology: from start to finish.* Pharmacogenomics. **7** : 123-134. Review.

Farhi, J., Ashkenazi, J., Feldberg, D., Dicker, D., Orvieto, R., Ben Rafael, Z. (1995) *Effect of uterine leiomyomata on the results of in-vitro fertilization treatment.* Hum Reprod. **10** : 2576-2578.

Foster, H.L., Small, J.D., Fox, J.G. (1991) *The mouse in biomedical research. Normative Biology, Immunology, and Husbandry.* Vol 3. Academic Press Inc. ; 144-146, 154-155.

Fujimoto, J., Nishigaki, M., Hori, M., Ichigo, S., Itoh, T., Tamaya, T. (1994) *The effect of estrogen and androgen on androgen receptors and mRNA levels in uterine leiomyoma, myometrium and endometrium of human subjects.* J Steroid Biochem Mol Biol. **50** : 137-143.

Fujimoto, J., Nishigaki, M., Hori, M., Ichigo, S., Itoh, T., Tamaya, T. (1995) *Biological implications of estrogen and androgen effects on androgen receptor and its mRNA levels in human uterine endometrium.* Gynecol Endocrinol. **9** : 149-155.

Gabig, M. et Wegrzyn, G. (2001) *An introduction to DNA chips: principles, technology, applications and analysis.* Acta Biochim Pol. **48** : 615-622.

Gautheret, D. (2004) *Initiation à la Génomique.* ESIL, Université de la Méditerranée (V.2004.3) <http://www.esil.univ-mrs.fr/~dgaut/Cours>.

Gerchenson, L.E., Conner, E., Murai, J.T. (1977) *Regulation of cell cycle by diethylstilbestrol and progesterone in cultured endometrial cells.* Endocrinology **100** : 1468-1471.

Gibson, G., Muse, S.V. (2004) *Précis de génomique.* De Boeck & Larcier s.a. 1^{ère} ed. Bruxelles; 123-148.

Giroud, J.-P., Mathé, G., *et al* (1988) *Pharmacologie clinique. Bases de la thérapeutique*. Expansion scientifique française. 2nd ed, Paris; 2145, 2093.

Giudice, L.C. (1994) *Growth factors and growth modulators in human uterine endometrium: their potential relevance to reproductive medicine*. *Fertil Steril*. **61**:1-17. Review.

Gluckman, P.D. et Hanson, M.A. (2005) *Evolution, development and timing of puberty*. *Trends Endocrinol Metab*. **7** : 7-12.

Guénet, J.L. (2005) *The mouse genome*. *Genome Res*. **15** : 1729-1740.

Hart, R. (2003) *Unexplained infertility, endometriosis, and fibroids*. *BMJ*. **327** : 721-724.

Hart, R., Khalaf, Y., Yeong, C.T., Seed, P., Taylor, A., Braude, P. (2001) *A prospective controlled study of the effect of intramural uterine fibroids on the outcome of assisted conception*. *Hum Reprod*. **16** : 2411-2417.

Heid, C.A, Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P.M. (1996) *Real time quantitative PCR*. *Genome Res*. **6** : 986-994.

Howdeshell, K.L., Hotchkiss, A.K., Thayer, K.A., Vandenberg, J.G., Vom Saal, F.S. (1999) *Exposure to bisphenol A advances puberty*. *Nature*. **401** : 763-764.

Hughes, T.R., Mao, M., Jones, A.R., Burchard, J., Marton, M.J., Shannon, K.W., Lefkowitz, S.M., Ziman, M., Schelter, J.M., Meyer, M.R., Kobayashi, S., Davis, C., Dai, H., He, Y.D., Stephanian, S.B., Cavet, G., Walker, W.L., West, A., Coffey, E., Shoemaker, D.D., Stoughton, R., Blanchard, A.P., Friend, S.H., Linsley, P.S. (2001) *Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer*. *Nat. Biotechnol*. **19** : 342-347.

Iguchi, T., Watanabe, H., Katsu, Y. (2001) *Developmental effects of estrogenic agents on mice, fish, and frogs: a mini-review*. *Horm Behav*. **40** : 248-251.

Kitawaki J, Kado N, Ishihara H, Koshihara H, Kitaoka Y, Honjo H. (2002) *Endometriosis: the pathophysiology as an estrogen-dependent disease*. *J ster Biochem & Molec Bio*. **83** : 149-155.

Kronick, M.N. (2004) *Creation of the whole human genome microarray*. *Expert Rev Proteomics*. **1** : 19-28.

Labrie, F., Bélanger A., Simard, J., Luu-The, V., Labrie, C. (1995) *Intracrinologie. Autonomie et liberté des tissus périphériques*. *Ann Endocrinol (Paris)* **56** : 23-29.

Larsen, P.R. (2003) *Williams Textbook of Endocrinology*, 10th ed. Saunders, An Imprint of Elsevier; 606.

- Lecce, G., Meduri, G., Ancelin, M., Bergeron, C., Perrot-Applanat, M. (2001) *Presence of estrogen receptor beta in the human endometrium through the cycle: expression in glandular, stromal, and vascular cells*. J Clin Endocrinol Metab. **86** : 1379-1386.
- Lee, N.H. (2005) *Genomic approaches for reconstructing gene networks*. Pharmacogenomics. **6** : 245-58.
- Lipshutz, R.J., Fodor, S.P., Gingeras, T.R., Lockhart, D.J. (1999) *High density synthetic oligonucleotide arrays*. Nat Genet. **21**(1 Suppl) : 20-24.
- Lockhart, D.J., Dong, H., Byrne, M.C., Follettie, M.T., Gallo, M.V., Chee, M.S., Mittmann, M., Wang, C., Kobayashi, M., Horton, H., Brown, E.L. (1996) *Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays*. Nat Biotechnol. **14** : 1675-1680.
- Lodish, H. *et al* (2001) *Molecular Cell Biology*. 4^e ed. W.H. Freeman and company, New York ; 100-101, 396, 900-901, 526, 496, 524.
- Luu-The, V., Paquet, N., Calvo, E., Cumps, J. (2005) *Improved real-time RT-PCR method for high-throughput measurements using second derivative calculation and double correction*. Biotechniques **38** : 287-293.
- Mauvais-Jarvis, P. et Sitruk-Ware, R. (1986) *Médecine de la reproduction, gynécologie endocrinienne*. 2nd ed. Flammarion Médecine-Sciences, Paris; 167, 58-59, 96, 557, 94, 348, 95.
- Medina, M. (2005) *Genomes, phylogeny, and evolutionary systems biology*. Review. Proc Natl Acad Sci U S A. **102** Suppl 1 : 6630-6635.
- Mount, D.W. et Pandey, R. (2005) *Using bioinformatics and genome analysis for new therapeutic interventions*. Mol Cancer Ther. **4** : 1636-1643.
- Mutch, D.M., Berger, A., Mansourian, R., Rytz, A., Roberts, M.A. (2002) *The limit fold change model: a practical approach for selecting differentially expressed genes from microarray data*. BMC Bioinformatics **3**: 17.
- Pevsner, J. (2003) *Bioinformatics and functional genomics*, Wiley-Liss A John Wileys & Sons, Inc., USA; 398, 158-159, 191.
- Politi K, Szabolcs M, Fisher P, Kljuic A, Ludwig T, Efstratiadis A. (2004) *A mouse model of uterine leiomyosarcoma*. Am J Pathol. **164** : 325-336.
- Pradeep, P.K., Li, X., Peegel, H., Menon, K.M.J. (2002) *Dihydrotestosterone inhibits granulosa cell proliferation by decreasing the cyclin D2 mRNA expression and cell cycle arrest at G1 phase*. Endocrinology **143**: 2930-2935.
- Ririe, KM., Rasmussen, R.P., Wittwer, C.T. (1997) *Product differentiation by analysis of*

DNA melting curves during the polymerase chain reaction. Anal Biochem. **245** : 154-160.

Romagnolo, B., Molina, T., Leroy, G., Blin, C., Porteux, A., Thomasset, M., Vandewalle, A., Kahn, A., Perret, C. (1996) *Estradiol-dependent uterine leiomyomas in transgenic mice.* J Clin Invest. **98** : 777-784.

Rothwell, C.E., McGuire, E.J., Martin, R.A., De la Iglesia, F.A. (1992) *Chronic toxicity and carcinogenicity studies with the beta-adrenoceptor antagonist levobunolol.* Fundam Appl Toxicol. **18** : 353-359.

Sancar, A., Lindsey-Boltz, L.A., Unsal-Kacmaz, K., Linn, S. (2004) *Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints.* Annu Rev Biochem. **73** : 39-85

Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W., Brown, P.O. (1995) *Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray.* Science **270** : 467-470.

Scott, J.R., Gibbs, R.S., Karlan, B.Y., Haney, A.F. (2003) *Danforth's obstetric and gynecology* 9^e ed. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia; 964-965, 669-671, 871-872.

Smeds, J., Miller, L.D., Bjohle, J., Hall, P., Klaar, S., Liu, E.T., Pawitan, Y., Ploner, A., Bergh, J. (2005) *Gene profile and response to treatment.* Ann Oncol. **16** Suppl 2: ii195-202. Review.

Somigliana, E., Vigano, P., Rossi, G., Carinelli, S., Vignali, M., Panina-Bordignon, P. (1999) *Endometrial ability to implant in ectopic sites can be prevented by interleukin-12 in a murine model of endometriosis.* Hum Reprod. **14** : 2944-2950.

Souaze, F., Ntodou-Thome, A., Tran, C.Y., Rostene, W., Forgez, P. (1996) *Quantitative RT-PCR : limits and accuracy.* BioTechniques **21** : 280-285.

Spencer, T.E., Hayashi, K., Hu, J., Carpenter, K.D. (2005) *Comparative developmental biology of the mammalian uterus.* Curr Top Dev Biol **68** : 85-122. Review.

Story, L. et Kennedy, S. (2004) *Animal studies in endometriosis: a review.* ILAR J. **45** : 132-138.

Tortora, G.J. et Reynolds Grabowski, S. (2001) *Principes d'Anatomie et de Physiology.* 9^e ed. Adaptation française, Éditions du Renouveau Pédagogique, Inc. Québec; 1057-1059, 1080.

Tse, C. et Capeau, J. (2003) *Quantification des acides nucléiques par PCR quantitative en temps réel.* Ann Biol Clin. **61** : 279-293

Tuckerman, E.M., Okon, M.A., Li, T., Laird, S.M. (2000) *Do androgens have a direct*

effect on endometrial function? An in vitro study. Fertil Steril. **74** : 771-779.

Van Nie, R. (1964) *Biological aspects of the genesis of uterine tumours induced in mice by testosterone.* Jaarb Kankeronderz Kankerbestrijd Ned.**14**:247-252.

Walker, C.L., Stewart, E.A. (2005) *Uterine fibroids: the elephant in the room.* Science. **308** : 1589-1592. Review.

Wallach, E.E et Vu, K.K. (1995) *Myomata uteri and infertility.* Obstet Gynecol Clin North Am. **22** :791-799.

Waterston, R.H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J.F., Agarwal, P., Agarwala, R., Ainscough, R., Alexandersson, M., An, P. *et al* (2002) *Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome.* Nature **420** : 520-562.

Wilson, R.D.; Genetics Committee of the SOGC (2005) *Genomics: new technology for obstetrics.* J Obstet Gynaecol Can. **27** : 63-75.

Winslow, R.L., Boguski, M.S. (2003) *Genome informatics: current status and future prospects.* Circ Res. **92** : 953-961.

Wu, T-I., Chang, T.C., Hsueh, S., Hsu, K.H., Chou, H.H., Huang, H.J., Lai, C.H. (2005) *Prognostic factors and impact of adjuvant chemotherapy for uterine leiomyosarcoma.* gynecologic oncology. **100** : 166-172.

Wu, L., Einstein, M., Geissler, W.M., Chan, H.K., Elliston, K.O., Andersson, S. (1993) *Expression cloning and characterization of human 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2, a microsomal enzyme possessing 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase activity.* J Biol Chem. **268** : 12964-12969.

Zhang, J., Sun, Y., Liu, Y., Sun, Y., Liao, D.J. (2004) *Synergistic effects of androgen and estrogen on the mouse uterus and mammary gland.* Oncol Rep. **12** : 709-716.