

Université de Montréal

# **Études des rôles physiopathologiques de PTEN dans le tractus reproducteur femelle**

par

Marie-Noëlle Laguë

Biomédecine Vétérinaire

Faculté de médecine vétérinaire

Thèse présentée à la Faculté de médecine vétérinaire  
en vue de l'obtention du grade de *philosophiae doctor* (Ph.D.)  
en Sciences Vétérinaires  
option Reproduction

Mai, 2011

© Marie-Noëlle Laguë, 2011

Université de Montréal  
Faculté de médecine vétérinaire

Cette thèse intitulée:

Études des rôles physiopathologiques de PTEN dans le tractus reproducteur femelle.

Présentée par :  
Marie-Noëlle Laguë

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Christopher A. Price, président-rapporteur

Derek Boerboom, directeur de recherche

Jean Sirois, membre du jury

Daniel Dufort, examinateur externe

Bruce D. Murphy, représentant du doyen

## Résumé

La tumeur des cellules de la granulosa (GCT) représente 5% des cas de cancers ovariens chez la femme. Bien que considérées comme peu malignes, la mort survient dans 80% des cas suite à une recrudescence de la maladie. En dépit de ces statistiques sinistres, peu d'études ont été portées sur ce type de cancer. Le premier objectif de cette étude consistait à élucider les mécanismes moléculaires causant les GCT en démontrant l'implication de la voie de signalisation PI3K/AKT dans leur étiologie. Pour ce faire, nous avons employé la technologie Cre-Lox afin de cibler le gène *Pten* (antagoniste de cette voie) spécifiquement dans les cellules de la granulosa chez la souris. Ces souris (*Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup>) ont occasionnellement développé des GCT, soutenant notre hypothèse de l'importance de la voie PI3K/AKT dans leur étiologie. La voie WNT/CTNNB1 est une autre voie de signalisation qui a récemment été impliquée dans le développement des GCT. Dans le cadre de ce projet, nous avons également testé l'existence possible d'une synergie fonctionnelle entre les voies WNT/CTNNB1 et PI3K/AKT dans le développement de la maladie. Pour ce faire, nous avons créé le modèle transgénique *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Ctnnb1*<sup>flox(ex3)/+</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup>, chez lequel les cellules de la granulosa présentant non seulement une désinhibition de la voie PI3K/AKT, mais aussi une suractivation de la voie WNT/CTNNB1. Tel que prédit, les souris *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Ctnnb1*<sup>flox(ex3)/+</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> ont développé une forme de GCT beaucoup plus agressive que celle observée chez les femelles *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup>. Spécifiquement, le développement des tumeurs se déclenchait plus tôt, leur croissance était beaucoup plus rapide, nous avons pu observer des métastases pulmonaires et la dissémination des cellules tumorales dans la cavité péritonéale, et la maladie était invariablement fatale avant l'âge de 8 semaines. Le modèle *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Ctnnb1*<sup>flox(ex3)/+</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> a donc servi à démontrer l'existence d'une synergie entre les voies WNT/CTNNB1 et PI3K/AKT dans le développement de la GCT.

De façon inattendue, les souris *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> ont aussi présenté un phénotype de sous-fertilité qui n'était pas d'origine ovarienne. Il a récemment été démontré que la souche *Amhr2*<sup>cre</sup> dirige l'expression de *Cre* non seulement aux cellules de la granulosa, mais aussi au stroma utérin et au myomètre. Le second objectif de ce travail était donc de démontrer si et comment le phénotype d'infertilité chez les souris

*Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> pouvait découler d'un défaut utérin. Lors de l'implantation, les cellules du stroma utérin se différencient en cellules déciduelles pour former la décidua maternelle (DM), qui se régresse ensuite par apoptose afin de faciliter l'invasion des cellules trophoblastiques. De plus, la DM, en collaboration avec le tissu fœtal, recrute des uNKs dont le rôle est de remodeler les artères spiralées pour augmenter l'apport sanguin maternel vers le fœtus en développement. Nous avons pu démontrer que l'utérus des femelles gestantes *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> présentait une DM anormalement résistante à l'apoptose, moins de uNKs et des artères spiralées non-remodelées. Par conséquent, l'invasion des cellules du trophoblaste était restreinte, compromettant le développement et la survie de l'embryon. Nous avons donc établi pour la première fois l'importance de *Pten* lors de la décidualisation et de l'invasion du trophoblaste.

Mots clés : *Pten*, Akt, Souris transgéniques, Tumeur des cellules de la granulosa, Modélisation animale, Trophoblaste, Décidua, Myomètre.

## Abstract

The granulosa cell tumor (GCT) represents up to 5% of all ovarian cancer cases in women. Although GCT is characterized as a low-grade malignancy, death occurs in approximately 80% of cases following to the disease's recurrence. Despite these statistics, very few studies have been dedicated to increasing our understanding of the molecular mechanisms responsible for the development of GCT. The first objective of this work was to elucidate some of these molecular mechanisms by proving the involvement of the PI3K/AKT signaling pathway in the etiology of GCT. To this end, we used Cre-LoxP technology to conditionally target *Pten* (a PI3K/AKT signaling antagonist) in granulosa cells. These transgenic mice (*Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup>) occasionally developed GCT, supporting our hypothesis on the importance of the PI3K/AKT pathway in the etiology of this disease. The WNT/CTNNB1 signaling pathway has also recently been implicated in GCT development. We therefore postulated that a functional synergy may exist between the WNT/CTNNB1 and PI3K/AKT pathways in development of GCT. To test this, we created a second transgenic model (*Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Ctnnb1*<sup>flox(ex3)/+</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup>), in which the granulosa cells featured not only a disinhibition of the PI3K/AKT pathway but also a constitutive activation of the WNT/CTNNB1 pathway. As predicted, the *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Ctnnb1*<sup>flox(ex3)/+</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> mice developed a form of GCT that was much more aggressive than the one observed in the *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> model. Specifically, the tumors developed sooner, their growth was faster, pulmonary metastases and the seeding of tumor cells in the abdominal cavity were observed, and the disease was invariably fatal by 8 weeks of age. The *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Ctnnb1*<sup>flox(ex3)/+</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> model therefore served to demonstrate a synergy between the WNT/CTNNB1 and PI3K/AKT pathways in GCT development.

Unexpectedly, the majority of the *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> females presented an infertility phenotype that was not caused by an ovarian defect. Recently, it has been shown that the *Amhr2*<sup>cre</sup> strain can direct the *Cre* activity not only to the granulosa cells but also to the uterine stroma and myometrium. The second objective of this work was therefore to determine if and how the infertility observed in *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> mice could be caused by a uterine defect. During implantation, uterine stromal cells differentiate into decidual cells and form the maternal decidua (MD), which subsequently regresses by apoptosis to

facilitate trophoblast invasion. In collaboration with the fetal tissue, the MD also recruits uNKs, which are responsible for spiral artery remodeling that increases maternal blood flow to the developing fetus. We were able to demonstrate that the uteri of pregnant *Pten*<sup>flox/flox</sup>; *Amhr2*<sup>cre/+</sup> females had a MD that was resistant to apoptosis, less uNKs, and spiral arteries that were not properly remodeled. Consequently, the trophoblast cell invasion was restricted, thereby compromising the development and survival of the embryo. We have therefore established for the first time the importance of *Pten* during the decidualization of the uterine stroma and trophoblast invasion.

Key words: *Pten*, Akt, Transgenic mice, Animal modeling, Granulosa cell tumor, Trophoblast, Decidua, Myometrium.

# Tables des matières

Résumé .....	i
Abstract .....	iii
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des sigles et des abréviations.....	xi
Dédicace.....	xiv
Remerciements.....	xv
Introduction.....	1
Chapitre 1 : Recension littéraire	
1. La voie de signalisation PI3K/AKT .....	3
1.1. Rôles physiologiques généraux de la voie PI3K/AKT .....	3
1.1.1. Métabolisme et homéostasie du glucose.....	3
1.1.2. Survie et prolifération cellulaire.....	5
1.1.3. Autres rôles.....	7
1.2. Fonctionnement de la voie PI3K/AKT.....	8
1.2.1. Agonistes.....	8
1.2.2. PI3K, PTEN et le métabolisme des phosphatidylinositides..	8
1.2.3. AKT.....	10
1.2.4. Effecteurs en aval d'AKT.....	11
1.2.4.1. mTOR.....	11
1.2.4.2. FOXO1A.....	13
1.2.4.3. Autres cibles .....	15
1.3. Implication de la voie PI3K/AKT dans différentes pathologies.....	16
1.3.1. Conséquences du dérèglement de la voie et mécanismes moléculaires en cause.....	16
1.3.1.1. Perte de PTEN.....	16
1.3.1.2. Autres mécanismes.....	17
1.3.1.3. Cibles Thérapeutiques.....	18
2. Rôles de la voie PI3K/AKT dans l'ovaire .....	19
2.1. Rôles physiologiques .....	19

2.1.1.	Déroulement normal du cycle hormonal folliculaire.....	19
2.1.2.	Implication de la voie PI3K/AKT durant le cycle folliculaire .....	24
2.1.2.1.	Insuline/IGF-1 .....	24
2.1.2.2.	FSH.....	24
2.1.2.3.	Médiateurs ovariens de la propagation du signal PI3K/AKT .....	25
2.1.2.3.1.	mTORC1.....	25
2.1.2.3.2.	FOXO1A.....	28
2.2.	Implication de la voie PI3K/AKT dans le cancer de l'épithélium de surface ovarien .....	29
3.	Rôles de la voie PI3K/AKT dans l'utérus .....	31
3.1.	Rôles physiologiques.....	31
3.1.1.	Physiologie utérine de la gestation chez la souris.....	31
3.1.1.1.	Changements cycliques.....	31
3.1.1.2.	Interactions fœto-maternelles : implantation et déidualisation.....	32
3.1.1.3.	Invasion du trophoblaste et placentation hémochoriale .....	35
3.1.2.	Implication de la voie PI3K/AKT dans la physiologie utérine .....	39
3.1.2.1.	Changements cycliques.....	39
3.1.2.2.	Gestation.....	40
3.2.	Implication de la voie PI3K/AKT dans le cancer de l'utérus .....	41
Chapitre 2 : Hypothèses et objectifs.....		43
Chapitre 3 : Première publication		
	Préface.....	44
	Première publication publiée en tant que premier auteur.....	45
Chapitre 4 : Deuxième publication		
	Préface.....	81



Deuxième publication publiée en tant que premier auteur.....	82
Chapitre 5 : Discussion générale.....	114
Chapitre 6 : Conclusions.....	123
Bibliographie.....	124

## Liste des tableaux

Tableau I : Phénotypes des différentes lignées de souris transgéniques créées afin d'établir les rôles physiologiques des trois isoformes d'AKT.....	11
Tableau II : Dérèglements moléculaires de la voie de signalisation PI3K/AKT et leurs conséquences pathologiques.....	17
<b>Deuxième publication</b>	
Tableau 1: Fertility in primiparous <i>Pten</i> <sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup> ; <i>Amhr2</i> <sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> mice.....	105
Tableau 2: Fetal viability at e11.5.....	105
Tableau 3: Serum progesterone measurements (ng/ml).....	106
Tableau 4: Quantitative analyses of immunohistochemistry experiments.....	106

## Liste des figures

FIGURE 1: Synthèse des PI.....	8
FIGURE 2: Fonctionnement de la voie de signalisation PI3K/AKT.....	9
FIGURE 3: Fonctions physiologiques des trois isoformes d'AKT.....	10
FIGURE 4: Régulation de mTOR par AKT.....	12
FIGURE 5: Régulation de FOXO1A par AKT.....	14
FIGURE 6: Autres cibles effectrices d'AKT.....	15
FIGURE 7: Développement folliculaire.....	20
FIGURE 8: Enzymes impliquées dans la stéroïdogénèse.....	22
FIGURE 9: Interactions entre les voies de FSH et IGF1.....	25
FIGURE 10: Régulation de l'activité des cibles effectrices de mTORC1 par FSH..	28
FIGURE 11: Régulation de l'activité de FOXO1A par FSH.....	29
FIGURE 12: L'implantation du blastocyste.....	33
FIGURE 13 : Le site d'implantation du blastocyste au J12.5pc.....	34
FIGURE 14 : Remodelage des artères spirales de la décidua maternelle par les uNKs.....	35
FIGURE 15 : Les cellules péri-endovasculaires au J12.5pc.....	36
FIGURE 16 : Les cellules glycogéniques au J14.5pc.....	37
FIGURE 17 : Les régions du site d'implantation et les canaux vasculaires.....	37
FIGURE 18 : Illustration de l'irrigation de la circulation sanguine maternelle et fœtale dans les zones du site d'implantation durant la gestation chez la souris.....	38

### Première publication

Figure 1: Schematic representation of crosstalk between PKA, PI3K/AKT and WNT/CTNNB1 intracellular signaling pathways.....	73
Figure 2: Lack of ovarian anomalies in most <i>Pten</i> <sup>flox/flox</sup> ; <i>Amhr2</i> <sup>cre/+</sup> mice.....	74
Figure 3: Rare <i>Pten</i> <sup>flox/flox</sup> ; <i>Amhr2</i> <sup>cre/+</sup> mice develop aggressive, metastatic GCT...	75
Figure 4: Altered PI3K/AKT signaling in <i>Pten</i> <sup>flox/flox</sup> ; <i>Amhr2</i> <sup>cre/+</sup> GCT.....	76
Figure 5: Abnormal PI3K/AKT pathway activity occurs in many GCT.....	77
Figure 6: <i>Pten</i> <sup>flox/flox</sup> ; <i>Cttnb1</i> <sup>flox(ex3)/+</sup> ; <i>Amhr2</i> <sup>cre/+</sup> mice develop early-onset GCT with a high penetrance.....	78

Figure supplémentaire 1: Loss of Phospho-AKT expression in <i>Pten</i> <sup>flox/flox</sup> ; <i>Amhr2</i> <sup>cre/+</sup> GCT.....	79
Figure supplémentaire 2: Timeline of <i>Pten</i> <sup>flox/flox</sup> ; <i>Ctnnb1</i> <sup>flox(ex3)/+</sup> ; <i>Amhr2</i> <sup>cre/+</sup> GCT formation and growth.....	80
 <b>Deuxième publication</b>	
Figure 1: <i>Amhr2</i> <sup>tm3(cre)Bhr</sup> mice exhibit Cre activity in myometrial and decidual cells and in the blood vessels.....	107
Figure 2: Loss of PTEN expression in stromal, decidual and myometrial cells in <i>Pten</i> <sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup> ; <i>Amhr2</i> <sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> mice.....	108
Figure 3: Representative immunoblot analyses of <i>Pten</i> <sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup> and <i>Pten</i> <sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup> ; <i>Amhr2</i> <sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> uterine wall samples from non- pregnant mice and at d11 pc.....	109
Figure 4: Defects in trophoblast invasion and maternal decidual regression in <i>Pten</i> <sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup> ; <i>Amhr2</i> <sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> mice.....	110
Figure 5: Decreased uNK infiltration and poorly transformed blood vessels in the maternal decidua of <i>Pten</i> <sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup> ; <i>Amhr2</i> <sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> mice.....	111
Figure 6: Increased myometrial thickness in <i>Pten</i> <sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup> ; <i>Amhr2</i> <sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> mice.....	112
Figure 7: Histopathologic analysis of <i>Pten</i> <sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup> ; <i>Amhr2</i> <sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> uteri during the second pregnancy.....	113

## Liste des sigles et abréviations

$\alpha$ : alpha	$\beta$ : bêta	CEU : cancer endométrial utérin
4EBP1: eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1		CG : gonadotropine chorionique
ACTA2: actin, alpha 2, smooth muscle, aorta		cG: cellules de la granulosa
AKT: protéine kinase B		cGCT : cellules de GCT
: thymoma viral proto-oncogene 1		CJ : corps jaune
AMH: hormone anti-Müllérienne		CK: cytokératine
AMHR2: anti-Mullerian hormone type 2 receptor		cL : cellules lutéales
AMPc: AMP cyclique		cT: cellules de la thèque
APC: adenomatous polyposis coli		CTNNB1: $\beta$ -Catenin
AS160: TBC1 domain family, member 4		CYP11A1: P450 cholesterol side-chain Cleavage
BAD: BCL2-associated agonist of cell death		: cytochrome P450, family 11, subfamily a, polypeptide 1
BCL-2: beta-cell leukemia/lymphoma 2		CYP17: cytochrome P450 17 $\beta$ -hydroxylase/C17–20 lyase
BCL6 : beta-cell leukemia/lymphoma 6		: cytochrome P450, family 17, subfamily a, polypeptide 1
BCL-XL: BCL2-like 1		CYP19A1 : cytochrome P450 aromatase
BrdU: bromodeoxyuridine		: cytochrome P450, family 19, subfamily a, polypeptide 1
CASP : caspase		DBD: DNA-bonding domain
CCND : cyclin D		DHEA: dehydroepiandrosterone
CCNB : cyclin B		: sulfotransferase family 2A, dehydroepiandrosterone (DHEA)-preferring, member 1
CDK : cycline-dependant kinase		DM: décidua maternelle
CDKN1A : cyclin-dependent kinase inhibitor 1A		E <sub>2</sub> : estradiol
CDKN1B : cyclin-dependent kinase inhibitor 1B		ESR : récepteur de l'estradiol
CESO: cancer de l'épithélium de surface ovarien		eIF4E: eukaryotic translation initiation factor 4E
cESO : cellules de l'épithélium de surface ovarien		

eNOS: endothelial nitric-oxide synthase	HSD3B2: 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase
ESO: épithélium de surface ovarien	: hydroxy-delta-5-steroid
FasL: Fas ligand	dehydrogenase, 3 beta- and
FLT1: FMS-like tyrosine kinase 1 soluble	steroid delta-isomerase 2
FLT1/VEGF: récepteur de VEGF	HSD17B1: hydroxysteroid (17-beta)
FOXO1A: forkhead box O1	dehydrogenase 1
FSH: hormone folliculo-stimulante	IGF-1: insulin-like growth factor 1
FSHr: récepteur de FSH	IL : interleukines
FRE: foxO-reconized element	IRE : insulin-response element
FTGC: foetal trophoblast giant cells	Jxpc: x jours post-coïtum
FZD : Frizzled receptor	LH: hormone de lutéinisation
G6Pase: glucose-6-phosphatase	LHCGR: luteinizing hormone/ choriogonadotropin receptor
GCT: tumeur des cellules de la granulosa (granulosa cells tumor)	LRP : lipoprotein receptor-related proteins
GLB1: galactosidase, beta 1	MAD: Minimal activation domain
GLUT: solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter)	MD : maternal decidua
GnRH : hormone gonado-libérine	MDM2 : transformed mouse 3T3 cell double minute 2
GS: glycogen synthase	MEC: matrice extracellulaire
GSK3 $\beta$ : glycogen synthase kinase 3 beta	MMP : matrix metalloproteinases : matrix metallopeptidase
HIF1: hypoxia-inducible factor 1	mTOR : mammalian target of rapamycin : mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase)
HIF1 $\alpha$ : hypoxia inducible factor 1, alpha subunit	mTORC1: mTOR lié à RAPTOR
HIF1 $\beta$ : hypoxia-inducible factor 1 $\beta$ : aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator	mTORC2: mTOR lié à RICTOR
HLGA-G: histocompatibility tissu specific antigen of low polymorphism	My: myomètre
HPS: hematoxylin-phloxin-saffron	NFAT: nuclear factor of activated T cells
HRE: Hypoxia- responsive element	NK: natural killer cells
	NO: oxides nitriques
	P <sub>4</sub> : progesterone

P70S6K : p70 ribosomal protein S6	RAPTOR: rapamycin-associated protein of mTOR
PAKT: AKT phosphorylé	: regulatory associated protein of
PAX : paxillin	MTOR, complex 1
PDK1: phosphatidylinositol-dependant kinase 1	RHEB: ras homologue enriched in the brain
: 3-phosphoinositide dependent	RTK: récepteur tyrosine kinase
protein kinase 1	S6RP: ribosomal protein S6 kinase, polypeptide 1
PEPCK: phosphoenolpyruvate carboxykinase 1, cytosolic	: 40S ribosomal protein S6
PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase	SA: artère spirale
PI: phosphatidylinositol	SFC: SRC family kinase
PIP: phosphatidylinositol 4-phosphate	SKP2: S-phase kinase-associated protein 2 (p45)
PIP2: phosphatidylinositol 4,5-biphosphate	SP: spongiotrophoblaste
PIP3: phosphatidylinositol 3, 4, 5-triphosphate	SRC: Rous sarcoma oncogene
PK2: 6-phospho-fructo-2-kinase	SV40 T-ag : Simian virus 40 early gene encoding the small and large transforming antigens
PKA: protein kinase AMPc-dépendante	TALGN: transgeline
PIP5K: phosphatidylinositol-phosphate 5-kinase	TC : cellules du trophoblaste fœtal
PLF: proliférin	TGC : cellules géantes du trophoblaste (trophoblast giant cells)
PLRP: proliférin-related protein	TRP53: transformation related protein 53
PRL: prolactine	TSC: tuberous sclerosis complex
PtdIns4K: phosphatidylinositol 4-kinase	TUNEL: transferase-mediated nick end labelling
PTEN: phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10	UA: artère utérine
RICTOR: rapamycin-insensitive component of mTOR	uNK: uterine natural killer cells
: RPTOR independent companion of MTOR, complex 2	VEGF: vascular endothelial growth factor
	WNT: wingless-related MMTV integration
	XIAP: X-linked inhibitor of apoptosis

*À mes parents, Lucie et Pierre.*

*À mon amour Alexandre, sans qui cette thèse n'aurait jamais été terminée.*

*À mes deux grand-mères Noëlla et Vivi, qui sont des exemples de force et pour leur aide  
financière.*

*À ma marraine Claire, pour toute son aide technique,  
particulièrement durant un certain congrès à Hawaï.*

*Et finalement, je ME dédie cette thèse, pour avoir écouté ces merveilleuses personnes.*



## **Remerciements**

À mon directeur de Ph.D., Dr Derek Boerboom : merci pour tout le temps que vous m'avez consacré.

## Introduction

Comme tous les organismes du monde vivant, les mammifères se reproduisent afin d'assurer la survie de leur espèce respective. C'est par reproduction sexuée que ces derniers engendrent des descendants au phénotype varié. Ce type de reproduction s'effectue par la fusion de gamètes haploïdes : un mâle et une femelle, phénomène appelé la fécondation. Cette union résulte en un zygote qui se développe en un individu comprenant la moitié du bagage génétique de chacun de ses parents. Ceci favorise la variabilité entre les individus d'une même espèce et favorise la survie des géniteurs face aux changements environnementaux (21).

Le système reproducteur femelle des mammifères comprend des organes internes et externes qui se développent et fonctionnent sous l'influence d'hormones gonadotropes sécrétées par l'hypothalamus et l'adénohypophyse. Parmi ces organes, nous retrouvons les deux plus importants à la reproduction : la gonade femelle, l'ovaire, et l'utérus, où se développe l'embryon durant la gestation (21, 40, 104, 96).

L'ovaire est le réservoir des gamètes femelles, nommés ovocytes, et chacun de ces ovocytes est entouré par des cellules de soutien, les cellules de la granulosa. L'ovocyte et les cellules de la granulosa se développent au sein de structures appelées follicules. Les hormones gonadotropes vont stimuler les follicules ovariens à croître et sécréter eux-mêmes des hormones. Ces sécrétions ovariennes agissent entre autres sur l'utérus afin de le préparer à la gestation. Leur croissance terminée, les follicules et l'épithélium de surface ovarien se perforent et libèrent les ovocytes dans les oviductes. Ce processus est appelé l'ovulation. Les oviductes sont le site de la fécondation et sont aussi des canaux spécialisés à transporter les zygotes vers l'utérus (21, 40, 104, 96).

Lorsque les zygotes atteignent l'utérus, celui-ci est prêt à assurer le bon déroulement de l'embryogenèse et ce, jusqu'à la fin de la gestation. Les zygotes, maintenant appelés embryons, vont donc s'attacher et s'implanter dans la paroi de l'utérus. À ce moment, le stroma utérin se différencie en décidua maternelle pour ensuite entrer dans une vague d'apoptose. Pour assurer le succès de l'implantation, les tissus embryonnaires vont envahir cette décidua en régression afin d'accéder à la circulation sanguine maternelle, laquelle fournira des nutriments, l'oxygène et d'autres éléments essentiels au développement embryonnaire. À ce moment, l'utérus, sous l'effet de signaux

de l'embryon et avec le soutien des hormones ovariennes, va remodeler sa vascularisation afin de faciliter l'accès des embryons au sang maternel (4, 30-33).

Plusieurs cancers peuvent atteindre les organes reproducteurs femelles. Par exemple, le cancer des cellules de l'épithélium de surface ovarien est très fréquent chez la femme, il représente jusqu'à 90% de tous les cas de cancers ovariens. La tumeur des cellules de la granulosa (GCT) est un autre type de cancer ovarien dont l'incidence est moins élevée chez la femme, soit environ 5% des cas (11, 93). Par contre, la GCT demeure la néoplasie ovarienne la plus fréquente chez la majorité des autres espèces. Certaines formes de GCT peuvent être très malignes : leurs cellules peuvent métastaser, aux poumons entre autres, et elles ont la capacité d'ensemencer la cavité et les viscères abdominaux. Les patientes atteintes de GCT décèdent dans 80% des cas où il y a recrudescence de la maladie, ce qui peut survenir des années après le traitement initial. En dépit du sombre pronostic associé aux GCT récurrentes, peu d'études sont portées à mieux comprendre les lésions génétiques et les voies de signalisation impliquées dans la pathogenèse de cette maladie (93).

La voie de signalisation PI3K/AKT est une des cascades de réactions moléculaires activées par l'insuline afin de réguler le métabolisme et l'homéostasie du glucose. Effectivement, c'est via cette voie que l'insuline induit l'importation du glucose dans la cellule et la glycogénèse, l'entreposage de glucose sous forme de glycogène. De plus, l'insuline active la voie PI3K/AKT pour inhiber la néoglucogénèse, qui est la formation de glucose à partir de composés non-glucidiques (42, 56, 96, 104). Cette voie joue aussi un rôle dans la prolifération et la survie cellulaire. Son activation stimule des protéines qui soit prônent la progression dans le cycle cellulaire et/ou inhibent l'arrêt du cycle cellulaire, ou encore qui préviennent l'apoptose. Récemment, des dérèglements moléculaires au niveau de la voie de signalisation PI3K/AKT ont été impliqués dans plusieurs pathologies, dont le cancer (42).

Cette thèse traitera des rôles physiopathologiques de la voie de signalisation PI3K/AKT dans le tractus reproducteur femelle de la souris. Tout d'abord, au niveau de l'ovaire, nous aborderons l'implication de cette voie dans l'étiologie de la tumeur des cellules de la granulosa. Ensuite, nous expliquerons son rôle lors de la décidualisation du stroma utérin au moment de l'implantation embryonnaire.

# Chapitre 1 : Recension littéraire

## 1. La voie de signalisation PI3K/AKT

Tout organisme dépend du bon fonctionnement de sa machinerie cellulaire. Chaque cellule a un travail bien précis à accomplir afin de répondre aux besoins de cet organisme. Pour ce faire, elle établit des interactions avec d'autres types de cellules en leur envoyant des messages via différents types de molécules sécrétées. Ces molécules, par exemple des hormones, se rendent à la cellule visée soit par le système sanguin puis par la matrice extracellulaire (MEC), soit en traversant directement la MEC. Ensuite, les hormones se lient à leurs récepteurs respectifs souvent localisés à la surface cellulaire, qui sont la jonction entre la MEC et le cytoplasme. Cette liaison engendre des cascades de réactions moléculaires agissant en aval du récepteur, appelées voies de signalisation. Ces voies acheminent le message du récepteur jusqu'au noyau grâce à des molécules qui peuvent être translocalisées du cytoplasme vers le milieu nucléaire. Une fois dans le noyau, ces molécules interagissent avec d'autres molécules afin de réguler l'expression de gènes. Ces gènes vont être transcrits en ARN puis traduits en protéines, qui seront alors les effectrices de la réponse cellulaire au signal hormonal. Le bon déroulement de ces interactions moléculaires dans la cellule lui permet ainsi de bien communiquer avec d'autres types de cellules et, en bout de ligne, de répondre aux besoins de l'organisme (8).

Ce qui suit vise à présenter une de ces voies de signalisation, la voie PI3K/AKT, et son implication physiopathologique dans le tractus reproducteur femelle.

### 1.1. Rôles physiologiques généraux de la voie PI3K/AKT

#### 1.1.1. Métabolisme et homéostasie du glucose

L'un des plus importants rôles de la voie de signalisation de PI3K/AKT est de prendre part aux cascades de réactions moléculaires activées par l'insuline. Cette hormone, produite dans le pancréas, a pour but de réguler les fonctions métaboliques afin de préserver l'homéostasie cellulaire (26, 15, 66).

Au niveau moléculaire, l'insuline régule plusieurs voies de signalisation responsables entre autres de la synthèse protéinique, la synthèse et entreposage des lipides et de la glycogénèse (26, 66).

Au niveau physiologique, elle a pour fonction de diminuer le niveau sanguin de glucose et de l'entreposer. Le glucose est stocké sous forme de glycogène dans les hépatocytes et dans les fibres musculaires squelettiques. La glycogénèse peut être déclenchée par l'activation de la voie de signalisation PI3K/AKT (56, 96, 104). En effet, l'AKT, protéine clé de cette voie, agit en phosphorylant plusieurs molécules (voir section 1.2.4), dont « glycogen synthase kinase 3 beta » (GSK3 $\beta$ ). Sans AKT, GSK3 $\beta$  inhibe la formation du glycogène en inactivant « glycogen synthase » (GS). L'AKT activé phosphoryle et inactive GSK3 $\beta$ , ce qui permet à GS d'induire la conversion du glucose en glycogène (15, 42, 66).

Le glucose est transporté par le sang et traverse les parois des capillaires pour se trouver dans la MEC. Ensuite, il pénètre dans la cellule par transport facilité avec l'aide d'une famille de transporteurs membranaires nommés « GLUT », GLUT4 étant le plus répandu des isoformes (15). Le glucose se lie à GLUT et traverse la membrane cellulaire pour être relocalisé dans le cytoplasme de la cellule où il est alors phosphorylé. Puisque les GLUT ne peuvent pas exporter le glucose sous cette forme, ce dernier est donc emprisonné dans la cellule. À partir de ce moment, le glucose peut soit être entreposé, soit être métabolisé (104). Il a été démontré qu'AKT peut influencer l'importation du glucose par le biais de ses cibles effectrices. Effectivement, certaines d'entre elles régulent l'augmentation de l'expression des gènes *Glut 1* et *Glut 3*, tandis que « TBC1 domain family, member 4 » (AS160), une autre cible, est inactivé par AKT, ce qui permet la translocalisation de GLUT 4 vers la membrane cellulaire (26, 42, 66).

Si les besoins énergiques cellulaires augmentent et que les réserves de glycogène hépatiques et musculaires ne fournissent pas assez de glucose, le glucagon active les enzymes responsables de la néoglucogénèse. Ces enzymes vont produire du glucose à partir de molécules non-glucidiques, voire les protéines et les lipides (56, 96, 104). L'expression de deux de ces enzymes, soit « phosphoenolpyruvate carboxykinase 1, cytosolic » (PEPCK) et « glucose-6-phosphatase » (G6Pase), est activée par un membre de la famille de facteurs de transcription « Forkhead box O » (FOXO), soit FOXO1A. Ce facteur est aussi une cible effectrice importante inhibée par AKT, dont les détails de la

régulation seront expliqués ci-bas (section 1.2.4.2). AKT agit en inactivant FOXO1A, les gènes de *Pepck* et *G6Pase* ne sont alors pas transcrits, ce qui inhibe la néoglucogénèse (26, 42). L'insuline agit donc sur la cellule à la fois en stimulant la glycolyse et inhibant la néoglucogénèse via la voie PI3K/AKT.

### 1.1.2. Survie et prolifération cellulaire

Autre grand rôle de la voie de signalisation PI3K/AKT est de stimuler la cellule à progresser dans le cycle cellulaire afin de la préparer à se diviser. En d'autres mots, cette voie favorise la mitose.

Le cycle cellulaire comprend plusieurs phases de durée variable. La mitose (la phase M) est la plus courte du cycle et s'alterne avec l'interphase qui représente 90% de la durée du cycle. Cette interphase se divise en trois périodes (21, 104). Durant la phase G<sub>1</sub>, la cellule croît en synthétisant des protéines et produisant des organites cytoplasmiques, mais l'ADN ne se réplique pas. Pour que cela s'effectue, la cellule doit atteindre le « point de restriction », un seuil décisif pour la poursuite ou l'arrêt du cycle cellulaire. Si la cellule n'atteint pas ce point, elle entre dans la phase de repos, appelé G<sub>0</sub>. La majorité des cellules se trouvent dans cette phase. Par contre, si les conditions du cytoplasme et de la MEC sont favorables, la cellule franchit le point de restriction, entre dans la phase S et débute la réplication de son ADN tout en continuant de croître. Puisque le point de restriction est un point de « non-retour », la cellule qui l'atteint est donc engagée à continuer le cycle et à se diviser. Suivant la phase S est la phase G<sub>2</sub> et c'est durant cette phase que la cellule cesse de croître et termine les derniers préparatifs en vue de la division cellulaire. Ceci lui permet d'entrer finalement dans la phase M (21, 104). Cette phase est divisée en deux, la mitose même et la cytokinèse. La mitose consiste en cinq étapes : pro-, prométa-, méta-, ana- et télophase. Ensuite, la cytokinèse complète la phase M en divisant le cytoplasme et donne naissance à deux cellules filles. À leur tour, ces cellules entament la phase G<sub>1</sub> et le cycle se poursuit (21, 104).

La division cellulaire est régulée par une multitude de facteurs. Par exemple, les protéines « cycline-dépendant kinase » (CDK) et la famille des cyclines D (CCND) vont former un complexe pour induire la progression dans le cycle cellulaire (8, 82). Plusieurs autres molécules connues pour induire l'arrêt du cycle cellulaire sont inactivées par la voie

PI3K/AKT. Par exemple, « cyclin-dependent kinase inhibitor 1A » (CDKN1A), localisé dans le noyau, induit l'arrêt du cycle cellulaire en phase G<sub>1</sub> et « cyclin-dependent kinase inhibitor 1B » (CDKN1B) inactive l'isoforme CDK1 qui induit la progression du cycle (41, 66). L'expression de ces gènes est activée par FOXO1A et, tel que mentionné plus haut, l'activité de FOXO1A est régulé par AKT. De plus, il a été démontré qu'AKT inactive directement CDKN1A et CDKN1B. Ce faisant, CDKN1A est exporté du noyau vers le cytoplasme et la désinhibition de CDK2 par CDKN1B est levée et le cycle cellulaire peut progresser (41, 61, 66).

Si AKT inactive des molécules impliquées dans l'arrêt du cycle, il contribue aussi à activer celles qui induisent la progression du cycle et la prolifération cellulaire. Pour ce faire, AKT va utiliser plusieurs mécanismes moléculaires, dont l'inhibition de FOXO1A. Par exemple, en présence de AKT, FOXO1A est inactivé, ce qui permet l'expression d'isoformes de la famille des cyclines : *Ccnd1* et *Ccnd2* (58, voir section 1.2.4.2). AKT stimule aussi l'activité de CCND1 en inhibant GSK3 $\beta$ , qui est reconnu pour induire la dégradation de cette protéine (41, 61, 66). Une autre cible effectrice importante de la voie PI3K/AKT en aval d'AKT est « mammalian target of rapamycin » (mTOR). Cette molécule régule elle-même l'activité d'autres molécules qui sont impliqués dans la synthèse protéinique nécessaire à la prolifération cellulaire (15, 41, 42, 61). Ces mécanismes seront abordés en détails ci-bas (section 1.2.4.1).

Si certains facteurs favorisent la mitose, d'autres vont l'inhiber et déclencher la mort programmée de la cellule : l'apoptose. Ce processus survient lorsqu'un agent déclencheur, dit pro-apoptotique, présent soit dans la MEC ou dans le cytoplasme de la cellule même, active l'expression de gènes pro-apoptotiques. Ceci amène à la synthèse d'enzymes qui attaquent la cellule de l'intérieur sans toucher à la membrane cellulaire. Une fois le travail terminé, la cellule mourante est absorbée par des cellules du système immunitaire, les macrophages et les granulocytes (21, 104).

L'activation de la voie PI3K/AKT vise à inhiber ce processus d'apoptose en activant « transformed mouse 3T3 cell double minute » (MDM2) via AKT. Une fois activé, MDM2 migre vers le noyau où il se lie à « transformation related protein 53 » (TRP53), un facteur de transcription responsable d'induire l'expression de gènes impliqués dans l'apoptose. Il est aussi connu comme étant un suppresseur tumoral et suite à sa liaison avec MDM2, il est exporté du noyau vers le cytoplasme pour être ubiquitiné et

dégradé par les protéasomes (41, 42, 61, 66, 102). AKT inhibe aussi d'autres facteurs pro-apoptotiques, tel « BCL2-associated agonist of cell death » (BAD) et Caspase-9 (CASP9).

BAD, membre de la famille des « beta-cell leukemia/lymphoma 2 » (BCL-2), se situe dans la membrane externe de la mitochondrie et, en l'absence d'AKT, il se lie à un autre membre de BCL-2, «BCL2-like 1 » (BCL-XL), facteur de survie cellulaire, et le complexe induit l'apoptose. Par contre, lorsqu'AKT est activé, elle phosphoryle BAD ce qui le force à se dissocier de BCL-XL et de la membrane mitochondriale pour ensuite se lier à la protéine chaperonne 14-3-3, ce qui a pour résultat de le séquestrer dans le cytoplasme (42, 66, 91, 102).

AKT inactive aussi CASP9 au stade de pro-caspase. Par sa phosphorylation, pro-CASP9 ne peut être clivé et activé durant l'apoptose, ce qui l'empêche d'entamer la cascade d'activation des CASP3 et CASP7 (66, 102).

### 1.1.3. Autres rôles

Un dérèglement de la voie de signalisation PI3K/AKT par une perte de PTEN, antagoniste de la voie et suppresseur tumoral, peut amener une migration défectueuse des neurones post-mitotiques du cerveau fœtal (28, 66, 80, 91). Alors qu'un des isoformes d'AKT, AKT2 (voir section 1.2.3) stimule la motilité des cellules cancéreuses du sein *in vitro* en activant le facteur de transcription « nuclear factor of activated T cells » (NFAT). Ce facteur augmente l'expression de certains gènes responsables de la dégradation de la MEC, ce qui permet aux cellules de traverser la membrane basale, rejoindre les vaisseaux sanguins ou lymphatiques pour ensuite envahir d'autres tissus (28, 66, 91, 103).

Il a aussi été démontré qu'une suractivation de l'axe de signalisation PI3K/AKT/mTORC1 (voir section 1.2.4.1) peut augmenter la taille des cellules  $\beta$  du pancréas (41). Une perte de PTEN provoque le même résultat chez les cellules de Purkinje, les myofibrilles cardiaques et même l'épithélium de la prostate (28). Cette même perte de PTEN peut aussi augmenter la densité cellulaire des kératinocytes, hépatocytes et de l'épithélium de la glande mammaire (28).

La voie PI3K/AKT peut aussi influencer l'angiogenèse, qui est la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (28, 45, 66, 91). L'angiogenèse est induite via l'axe PI3K/AKT/mTORC1 qui active l'expression de « *vascular endothelial growth factor* »



(*Vegf*), gène-clé de ce processus (voir section 1.2.4.1) (6, 59). AKT peut aussi induire la création de nouveaux vaisseaux en activant « endothelial nitric-oxide synthase » (eNOS). Cette enzyme produit des oxides nitriques (NO) qui stimulent la croissance et la prolifération des cellules endothéliales et induit la vasodilatation ainsi la perméabilité vasculaire (66, 102).

## 1.2. Fonctionnement de la voie PI3K/AKT

### 1.2.1. Agonistes

La voie PI3K/AKT est activée par des récepteurs tyrosines kinases (RTK) transmembranaires. Lorsque ces RTK se lient à leur ligand, des facteurs de croissance, ils déclenchent une cascade de réactions moléculaires qui résultent de l'activation de cette voie. Parmi les ligands pouvant activer la voie, nous notons les plus importants : l'insuline et les facteurs de croissance similaires à l'insuline (« insulin-like growth factor 1 », IGF). D'ailleurs, tel que mentionné plus haut, la voie PI3K/AKT est cruciale aux fonctions de l'insuline (26, 42, 61, 101, 108).

### 1.2.2. PI3K, PTEN et le métabolisme des phosphatidylinositides

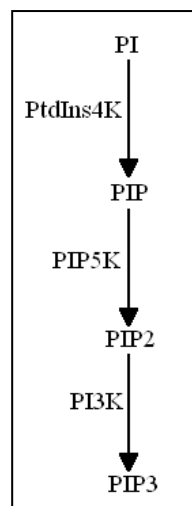


FIGURE 1 : Synthèse des PI. PI est phosphorylé par PtdIns4K pour produire PIP. Celui-ci est ensuite métabolisé en PIP2 par PIP5K. PIP2 est le substrat de PI3K qui le convertit en PIP3.

Lorsque le RTK de la voie PI3K/AKT est lié à son ligand, il recrute « phosphatidylinositol 3-kinase » (PI3K) vers la membrane cellulaire et il l'active. Une fois

activée, PI3K cible « phosphatidylinositol 4,5-biphosphate » (PIP2), phospholipide localisé dans la membrane. PIP2 est synthétisé à partir de « phosphatidylinositol » (PI) (61, 66, 101) (FIGURE 1).

Les PI sont des phospholipides membranaires avec un anneau inositol qui leur permet d'accepter jusqu'à cinq groupes de phosphates transférés par des kinases spécifiques. L'une d'entre elles, « phosphatidylinositol 4-kinase » (PtdIns4K) phosphoryle PI en « phosphatidylinositol 4-phosphate » (PIP) qui est ensuite convertie par « phosphatidylinositol-phosphate 5-kinase » (PIP5K) en PIP2. Finalement, PIP2 est phosphorylé par PI3K en « phosphatidylinositol 3, 4, 5-triphosphate » (PIP3) (34, 46). Cette étape permet ensuite de recruter à son tour « phosphatidylinositol-dépendant kinase 1 » (PDK1) (FIGURE 2). Cette molécule est l'activatrice de la protéine clé de cette voie de signalisation, l'AKT (61, 66, 101).

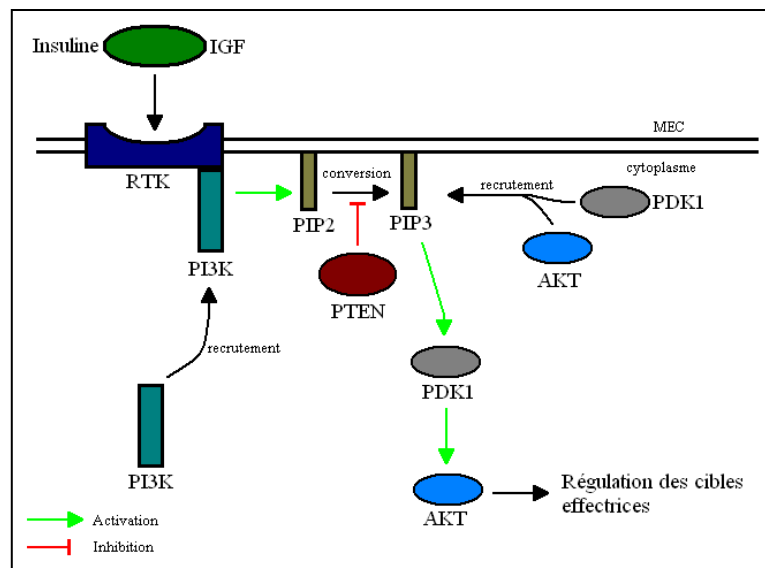


FIGURE 2 : Fonctionnement de la voie de signalisation PI3K/AKT. Après la liaison du ligand au RTK, PI3K est recruté vers la membrane pour être phosphorylé. Ensuite, PI3K convertit PIP2 en PIP3 pour qu'il active PDK1, qui fait de même avec AKT. Le déclenchement de la voie peut être bloqué par l'antagoniste PTEN qui reconvertit PIP3 en PIP2, ce qui l'empêche d'activer PDK1.

Par contre, l'activation de la voie PI3K/AKT peut être bloquée par son antagoniste, « phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 » (PTEN), reconnu comme un suppresseur tumoral (FIGURE 2). Lorsque la voie est enclenchée, PTEN est recruté

vers la membrane cellulaire pour déphosphoryler PIP3 en PIP2. Ce faisant, la cascade de réaction moléculaire en aval de PI3K n'a pas lieu (28, 45). À ce jour, PTEN est le seul régulateur négatif connu de cette voie de signalisation (28).

### 1.2.3. AKT

Une fois PDK1 activé, s'en suit le recrutement de l'AKT, aussi appelée protéine kinase B. Cette kinase est la molécule clé de cette voie de signalisation. Lorsqu'AKT est près de la membrane cellulaire, PDK1 l'active par phosphorylation à trois sites. Ensuite, AKT régule ses différentes cibles effectrices (FIGURE 2) (16, 45, 61, 66). Certaines de ses cibles sont localisées dans le cytoplasme mais d'autres, étant des facteurs de transcription, sont situées dans le noyau. L'AKT peut se localiser tant dans le cytoplasme que dans le noyau afin de phosphoryler ses différents substrats. (45, 58, 74).

La kinase AKT est retrouvée sous trois isoformes : AKT1, AKT2 et AKT3. Bien que leurs séquences sont à 80% identiques, il a été démontré à l'aide de souris transgéniques qu'ils exercent chacun un rôle physiologique différent (74) (FIGURE 3 et TABLEAU 1). Effectivement, AKT1 est impliquée dans l'angiogenèse et la croissance cellulaire, alors qu'AKT2 est responsable de l'homéostasie du glucose. AKT3, tant qu'à lui, serait nécessaire mais non essentiel au développement du cerveau (41, 51, 100) (FIGURE 3).

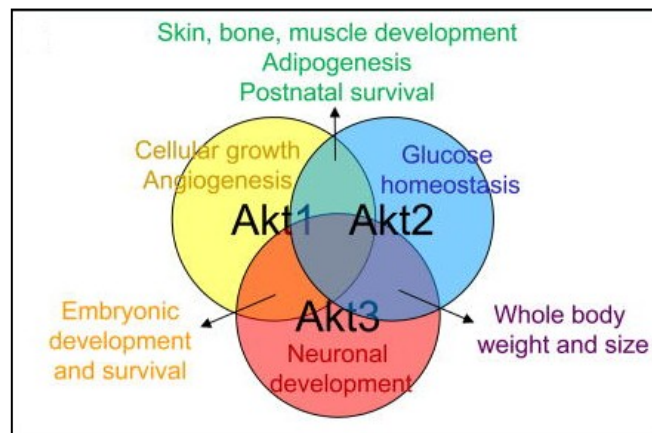


FIGURE 3 : Fonctions physiologiques des trois isoformes d'AKT. Chaque isoforme a un rôle physiologique particulier mais il peut y avoir un chevauchement de fonction entre les trois isoformes (tirée de 51).

Des études avec des souris transgéniques ont été faites afin d'évaluer le chevauchement des fonctions des trois isoformes. Par exemple, la délétion complète de AKT1 et AKT2 provoque une mortalité post-natal peu après la naissance, alors qu'une perte de AKT1 et AKT3 cause une mortalité embryonnaire. Les souris qui expriment seulement AKT1 sont viables mais présentent une taille corporelle plus petite que les souris contrôles et leur métabolisme du glucose est défectueux (TABLEAU 1) (41, 51, 100).

Malgré les distinctions entre les trois isoformes d'AKT, pour fins de simplicité, le terme général AKT sera utilisé dans cette œuvre pour désigner cette kinase.

Génotype	Phénotype
Akt1 <sup>-/-</sup>	Croissance fœtale et post-natale défectueuse, hypertrophie du placenta, diminution du poids corporel et des organes internes
Akt2 <sup>-/-</sup>	Métabolisme du glucose défectueux, résistance à l'insuline dans le foie et les muscles squelettiques, diabète
Akt3 <sup>-/-</sup>	Taille du cerveau réduite
Akt1 <sup>-/-</sup> ; Akt2 <sup>-/-</sup>	Mortalité post-natale
Akt1 <sup>-/-</sup> ; Akt3 <sup>-/-</sup>	Mortalité embryonnaire
Akt1 <sup>+/-</sup> ; Akt2 <sup>-/-</sup> ; Akt3 <sup>-/-</sup>	Viables mais poids corporel réduit, métabolisme du glucose défectueux

TABLEAU I : Phénotypes des différentes lignées de souris transgéniques créées afin d'établir les rôles physiologiques des trois isoformes d'AKT (41, 51, 100).

#### 1.2.4. Effecteurs en aval d'AKT

##### 1.2.4.1. mTOR

Une des cibles importantes d'AKT est mTOR. Cette kinase cytoplasmique promeut entre autres la synthèse protéinique et l'angiogenèse (6, 53, 99). En fait, la relation entre AKT et mTOR est particulière puisque mTOR peut former deux complexes protéiniques : soit avec « rapamycin-insensitive component of mTOR » (RICTOR), soit avec « rapamycin-associated protein of mTOR » (RAPTOR). Les mécanismes moléculaires amenant à un ou l'autre des complexes sont encore inconnus mais il a été démontré que leurs fonctions au sein de la voie PI3K/AKT diffèrent (53, 91, 99).

Un des deux complexes protéiniques que forme mTOR est avec RICTOR (mTORC2) et contrairement au second, ce complexe se retrouve en amont d'AKT. En fait, il a été démontré que mTORC2 agit comme activateur de la voie de PI3K/AKT en phosphorylant directement AKT. Toutefois, les mécanismes moléculaires pouvant activer ce complexe ne sont pas encore bien connus (53, 91, 99) (FIGURE 4).

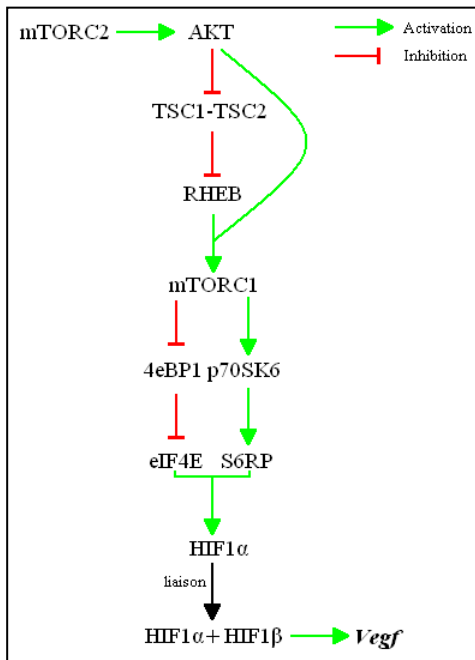


FIGURE 4 : Régulation de mTOR par AKT. Alors que le complexe mTORC2 se situe en amont et active AKT, le complexe mTOR-RAPTOR est une de ses cibles. AKT active directement mTORC1 et inhibe le complexe TSC1-TSC2, inhibiteur en amont de mTORC1. En inactivant TSC1-TSC2, l'enzyme RHEB peut activer mTORC1 et celui-ci peut activer S6RP et eIF4E, via la régulation de 4EBP1 et p70S6K. Ces deux molécules stimulent la synthèse de la protéine HIF1 $\alpha$  qui se lie à HIF1 $\beta$  pour déclencher la transcription du gène *Vegf*.

Le second complexe de mTOR, mTOR-RAPTOR (mTORC1), est une cible effectrice en aval d'AKT. Ce complexe est activé par deux mécanismes : soit en étant phosphorylé directement, soit indirectement en désactivant le complexe « Tuberos sclerosis complex » (TSC1-TSC2). Ce complexe a pour rôle d'inhiber mTORC1 via l'inactivation de l'enzyme « Ras homologue enriched in the brain » (RHEB). Si TSC1 et TSC2 sont phosphorylés par AKT, mTORC1 peut donc être activé pour ensuite réguler ses propres cibles (53, 91, 99) (FIGURE 4). Parmi les cibles de mTORC1 nous connaissons la kinase « p70 ribosomal protein S6 » (P70S6K1) qui, une fois activé par mTORC1, va stimuler l'activité du facteur de traduction protéinique « ribosomal protein S6 kinase, polypeptide 1 » (S6RP) (FIGURE 4) (6, 59).

Une autre cible du complexe mTORC1 est « eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1 » (4EBP1). Cette protéine a pour fonction de se lier et d'inactiver un

autre facteur de traduction, « eukaryotic translation initiation factor 4E » (eIF4E). Donc, en présence de mTORC1 actif, 4EBP1 est phosphorylé, ce qui le force à se dissocier d'eIF4E. Ce dernier est donc activé et peut induire la traduction de ses ARNm cibles (6, 53, 59, 91 99,) (FIGURE 4).

S6RP et eIF4E ont une cible en commun : l'ARNm de la sous-unité alpha du facteur de transcription « Hypoxia inducible factor 1 » (HIF1). Ce facteur est un hétérodimère composé de deux sous-unités : alpha (HIF1 $\alpha$ ) et bêta (HIF1 $\beta$ ). L'unité alpha est sensible au niveau d'oxygène (O<sub>2</sub>) dans la cellule. Si le niveau d'O<sub>2</sub> est supérieur à 6%, elle est normalement rapidement dégradée par des protéasomes. Par contre, si O<sub>2</sub> diminue en deçà de 6%, la cellule est en état d'hypoxie et HIF1 $\alpha$  est stabilisé. Il s'accumule donc dans le noyau où il se lie à HIF1 $\beta$ , qui lui est insensible au niveau d'O<sub>2</sub>. Cette liaison complète le facteur HIF qui induit l'expression de gènes possédant un élément de reconnaissance spécifique à HIF, « Hypoxia- responsive element » (HRE) (68, 95, 109). Parmi ces gènes cibles, certains sont responsables d'induire l'angiogenèse afin d'augmenter l'apport sanguin (et donc d'O<sub>2</sub>) vers la cellule, dont *Vegf*, gène clé dans le processus de l'angiogenèse. Bien qu'il dépend ordinairement des niveaux d'O<sub>2</sub> dans la cellule, la production de HIF1 $\alpha$  peut aussi être induite par la voie PI3K/AKT, via les cibles S6RP et eIF4E de mTORC1 et ce, même en conditions de normoxie (6, 59, 68, 95, 109) (FIGURE 4).

#### 1.2.4.2. FOXO1A

Autre cible importante d'AKT est FOXO1A. Ce facteur de transcription, considéré comme un suppresseur tumoral, régule l'expression de gènes impliqués entre autres dans l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire. Pour ce faire, FOXO1A présente deux domaines qui maximisent l'affinité de sa liaison avec l'ADN : « DNA-bonding domain » (DBD) et « Minimal activation domain » (MAD) (89). Ces deux domaines permettent à FOXO1A de se lier à des séquences particulières retrouvées dans le promoteur de ses gènes cibles appelés soit « FoxO-recognized element » (FRE), « FOXO-binding site », ou « insulin-response element » (IRE) (47, 57, 58, 72, 76, 83, 89). En plus de réguler directement l'expression de gènes en se liant à l'ADN, FOXO1A peut aussi servir de corégulateur en se liant avec d'autres facteurs de transcription (72).

Les gènes ciblés par FOXO1A incluent des gènes inhibiteurs du cycle cellulaire, tel *Cdkn1a* et *Cdkn1b*. Dans ce cas, il augmente leur activité transcriptionnelle afin qu'ils interrompent la transition de la phase G<sub>1</sub> à S du cycle cellulaire. À l'inverse, l'expression d'autres cibles qui induisent la progression du cycle cellulaire, tel *Ccnd1* et *Ccnd2*, est inhibée par FOXO1A soit directement, soit via d'autres suppresseurs tumoraux comme BCL6. FOXO1A induit l'expression de BCL6 qui, à son tour, inhibe la transcription des régulateurs positifs du cycle cellulaire (58, 72, 86, 87, 89).

FOXO1A peut aussi induire la néoglucogénèse en stimulant l'expression d'enzymes impliquées dans ce processus, soit PEPCCK et G6Pase (26, 42).

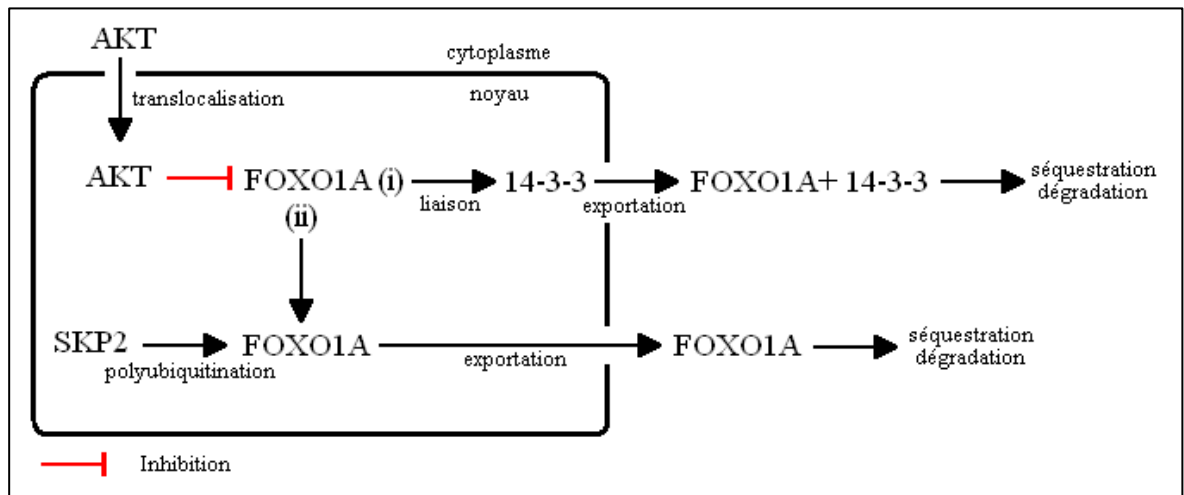


FIGURE 5 : Régulation de FOXO1A par AKT. AKT inactive FOXO1A dans le noyau et FOXO1A peut i) se lier à 14-3-3 pour être exporté du noyau, séquestré dans le cytoplasme et dégradé par les protéasomes. L'autre scénario est ii) que FOXO1A phosphorylé soit polyubiquitiné par SKP2 pour ensuite être exporté et dégradé.

Tel que mentionné plus haut (section 1.2.3.), AKT se retrouve dans le noyau afin de réguler l'activité de certaines de ses cibles effectrices (FIGURE 5). AKT phosphoryle FOXO1A ce qui le déloge du FRE du promoteur du gène cible et ensuite deux scénarios sont possibles. Le premier est qu'une fois phosphorylé, il se lie à la protéine chaperonne 14-3-3 et avec l'aide d'exportines, transporteurs transmembranaires nucléaires, il est exporté du noyau vers le cytoplasme où il est séquestré (47, 58, 59, 72, 76, 83, 89) (FIGURE 5 i). Le second scénario est que FOXO1A est polyubiquitylé par « S-phase

kinase-associated protein 2 » (SKP2), protéine nucléaire, ce qui l'exporte aussi du noyau pour ensuite être dégradé par les protéasomes (47, 59, 89, 72) (FIGURE 5 ii).

#### 1.2.4.3. Autres cibles

L'implication de la voie PI3K/AKT dans le métabolisme du glucose a déjà été démontrée. Par exemple, AKT induit l'expression des gènes des transporteurs de glucose GLUT et stimule leur translocalisation afin d'augmenter son importation dans la cellule. Il peut aussi déclencher la glycolyse en activant une des dix enzymes retrouvées dans ce processus, PK2 (26, 42, 66). De plus, AKT cible une autre molécule impliquée dans l'homéostasie du glucose : GSK3 $\beta$ . Cette kinase, inactivée par AKT, est liée à l'inhibition de la synthèse du glycogène (15, 26, 42, 66, 101) (FIGURE 6).

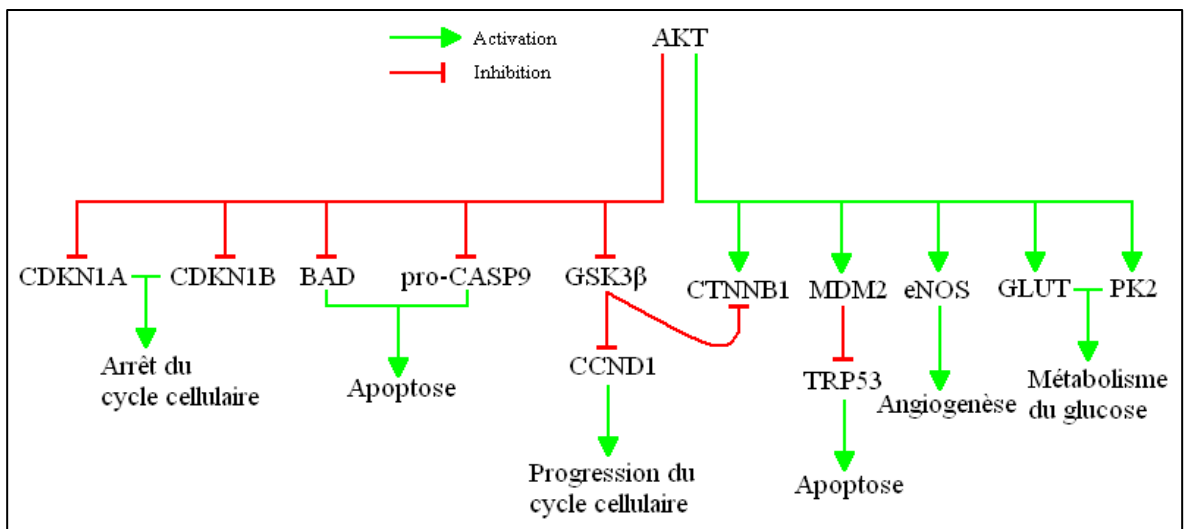


FIGURE 6 : Autres cibles effectrices d'AKT. BAD, pro- CASP9 et GSK3 $\beta$  sont des cibles inhibées par AKT alors qu'il active CTNNB1, MDM2, eNOS et GLUT.

GSK3 $\beta$  prend aussi part à la séquestration et la dégradation de « $\beta$ -catenin » (CTNNB1) en se joignant au complexe « adenomatous polyposis coli » (APC)/ AXIN. CTNNB1 est le facteur de transcription clé de la voie de signalisation canonique des WNTs et il est lui aussi une cible d'AKT (19, 45, 66) (FIGURE 6). En résumé, lorsqu'AKT est activé, d'une part il inhibe l'action de GSK3 $\beta$ , permettant la libération de



CTNNB1 du complexe AXIN/APC/GSK3 $\beta$  et d'éviter sa dégradation. Une fois libéré, il migre dans le noyau pour induire l'expression de ses gènes cibles. D'autre part, AKT phosphoryle directement CTNNB1, ce qui contribue à sa translocation dans le noyau (19).

Autre exemple de cible activée par AKT est l'oncoprotéine MDM2 (FIGURE 6). Cette activation permet son importation du cytoplasme vers le noyau, sa liaison avec la protéine pro-apoptotique TRP53, et l'exportation de cette dernière vers le cytoplasme pour qu'elle soit dégradée (102).

Nous retrouvons parmi les autres cibles effectrices d'AKT des facteurs pro-apoptotiques, par exemple BAD et CASP9. BAD est phosphorylé par AKT activé, ce qui le force à se dissocier de BCL-XL pour ensuite se lier à 14-3-3, être séquestré dans le cytoplasme (66, 91, 102) (FIGURE 6). AKT inactive aussi CASP9 au stade de pro-caspase, ce qui l'empêche de déclencher l'activation d'autres caspases (66, 102) (FIGURE 6).

Finalement, tel que mentionné plus haut (section 1.1.3., 1.2.3. et 1.2.4.1), la voie de signalisation PI3K/AKT est impliquée dans l'angiogenèse non seulement par l'induction de la transcription de *Vegf* par des cibles effectrices de mTORC1 mais aussi par l'activation des eNOS par AKT (66, 102, 100).

### 1.3. Implication de la voie PI3K/AKT dans différentes pathologies

#### 1.3.1. Conséquences du dérèglement de la voie et mécanismes moléculaires en cause

##### 1.3.1.1 Perte de PTEN

Tel que mentionné plus haut (section 1.2.2.), *Pten* étant le seul antagoniste connu de la voie de signalisation PI3K/AKT, une simple mutation le rendant inactif peut provoquer de graves conséquences tant moléculaires que physiologiques (28).

PTEN est connu comme étant un suppresseur tumoral, et ce sont des mutations à *PTEN* qui sont le plus souvent impliquées dans divers cancers chez l'humain par rapport aux autres molécules de la voie PI3K/AKT (91, TABLEAU II). De plus, il a été démontré que des mutations au niveau de *Pten* sont impliquées dans d'autres pathologies, comme les syndromes de Cowden et de Protée (91, 98, 101). Le syndrome de Cowden est caractérisé

par des lésions bénignes muco-cutanées appelées hamartomes. Le syndrome de Protée, tant qu'à lui, provoque aussi des hamartomes mais au niveau du tissu conjonctif et osseux. Bien que ces maladies ne soient pas des cancers, les patients qui en souffrent ont une grande prédisposition à développer des cancers du sein et de la thyroïde (91). La plus grande conséquence moléculaire de la perte de PTEN est la désinhibition de la voie PI3K/AKT. Sans lui, la voie n'a plus de régulateur négatif et se retrouve dans un état d'activation constante (22, 28, 53, 57, 76, 91, 101).

Molécule dérégulée	Exemples de pathologies associées
Perte ou mutation inactivant PTEN	Cancers du cerveau, prostate, sein, côlon et mélanomes Syndromes de Cowden, Protée, Lhermite-Duclos, Peutz-Jeghers et Bannayan-Riley-Ruvalcaba
Amplification d'AKT	Cancers du côlon, pancréas, ovaire, sein, cervical, de l'utérus, prostate
Mutation TSC1 ou TSC2	Sclérose tubéreuse de Bourneville, Lymphangiomeiomatose

TABLEAU II : Dérèglements moléculaires de la voie de signalisation PI3K/AKT et leurs conséquences pathologiques (42, 53, 61, 101)

### 1.3.1.2. Autres mécanismes

Puisqu'AKT inhibe l'apoptose et stimule la survie et la prolifération cellulaire et même la progression des métastases, il est par conséquent souvent impliqué dans le processus de tumorigenèse (66). De façon intéressante, AKT ne présente pas de mutations génétiques au niveau de sa séquence codante dans les cancers humains. En fait, les dérèglements les plus répertoriés concernant AKT seraient soit son amplification, une augmentation de son expression ou de son état de phosphorylation (45).

Si AKT est constamment phosphorylé par un dérèglement de la voie, il peut ensuite inhiber le complexe TSC1-TSC2, ce qui active mTORC1. Celui-ci peut donc réguler ses propres cibles afin d'induire l'expression de gènes responsables de l'angiogenèse et de la croissance cellulaire (53). D'ailleurs, plusieurs types de cancers dont l'expression d'AKT est augmentée démontrent aussi une hyperphosphorylation de mTORC1 (22, 45, 53, 101).

Une autre conséquence du dérèglement de la voie PI3K/AKT est la perte de FOXO1A. Plusieurs mécanismes moléculaires peuvent amener cette perte. Premièrement, tout comme mTOR, une perte de PTEN provoque une augmentation d'AKT actif. Par conséquent, FOXO1A est hyperphosphorylé, exporté du noyau par 14-3-3 et est dégradé après polyubiquitination. Cette perte de FOXO1A peut, à son tour, résulter en un développement de cancer (57, 83). De plus, contrairement à AKT et mTOR, des délétions chromosomiques peuvent provoquer la perte de FOXO1A et certaines mutations génétiques modifient son activité et ses gènes ciblés. Par exemple, il a été démontré que suite à une modification dans la séquence génomique du gène, FOXO1A forme un complexe protéinique de transcription avec l'oncoprotéine nucléaire « paxillin » (PAX) et ce complexe déclenche ensuite l'expression des oncogènes ciblés par PAX (76, 57, 83).

#### 1.3.1.3. Cibles Thérapeutiques

Vu l'importance de la voie PI3K/AKT dans la tumorigenèse, l'industrie pharmaceutique tente de développer différents composés qui cibleraient des molécules impliquées dans cette voie (22, 45, 53, 76, 101).

La suractivation de mTOR retrouvée dans différents types de cancers fait de cette molécule une cible thérapeutique prometteuse afin de réduire la croissance tumorale. À ce jour, de tous les agents pharmacologiques développés qui ciblent de la voie PI3K/AKT, ce sont ceux qui visent à inhiber mTOR qui retiennent le plus l'attention. Malheureusement, pour des raisons inconnues, ces produits affectent seulement le complexe mTORC1 et non le complexe mTORC2, ce qui diminue leur efficacité (22, 45, 53, 101).

D'autres produits ont été développés afin de cibler indirectement les molécules pro-apoptotiques de la voie PI3K/AKT; c'est le cas de FOXO1A. Un mutant actif de FOXO1A peut induire, sur des cellules cancéreuses en culture, une augmentation du taux d'apoptose et une baisse de la croissance cellulaire (47, 57, 76, 83). On vise donc à augmenter indirectement l'expression de FOXO1A dans les cellules cancéreuses en inhibant des oncoprotéines en amont de FOXO1A. Par exemple, en ajoutant un inhibiteur de PI3K *in vitro*, des cellules cancéreuses du sein démontrent une diminution du taux de phosphorylation de FOXO1A, une augmentation de sa localisation nucléaire et une augmentation du taux d'apoptose des cellules (57, 76, 83).

## 2. Rôles de la voie PI3K/AKT dans l'ovaire

### 2.1. Rôles physiologiques

#### 2.1.1. Déroulement normal du cycle hormonal folliculaire

Chez les mammifères mono-ovulatoires, par exemple les primates et l'humain, le développement folliculaire consiste à la croissance et maturation de plusieurs follicules, de l'ovulation du follicule dominant et de la formation d'un corps jaune (CJ). Tout commence avec un follicule primordial, constitué de l'ovocyte entouré d'une couche de cellules de la granulosa (cG) pavimenteuses. Ensuite, le follicule passe au stade primaire où les cG prennent une forme plus cuboïdale. Les cG du stade secondaire vont ensuite proliférer pour former plusieurs couches cellulaires et le tissu conjonctif entourant le follicule se différencie en thèque folliculaire. La thèque se divise en deux couches : la thèque externe, comprenant du tissu conjonctif, et la thèque interne. Cette dernière comprend non seulement des cellules sécrétrices, cellules de la thèque (cT), qui participent à la production des hormones ovariennes mais, de plus, elle a la particularité d'être le nid des capillaires sanguins du follicule. La thèque est la seule composante du follicule qui est perfusée par le sang. Sa seconde fonction, après la sécrétion d'hormones, est de diriger les nutriments, l'oxygène et les hormones adénohypophysaires du système sanguin vers les cG et l'ovocyte, éléments avasculaires (49, 96, 104). À mesure que les cG prolifèrent, elles vont sécréter plusieurs molécules mais aussi du liquide folliculaire qui s'accumule dans la cavité du follicule : l'antra (96, 104). Finalement, sous l'influence d'hormones, le follicule antral mature croît en follicule préovulatoire, dit « de Graaf », avec un antra tapissé de cG et l'ovocyte, lui aussi entouré de cG qui forment le cumulus-oophorus (96, 104) (FIGURE 7).

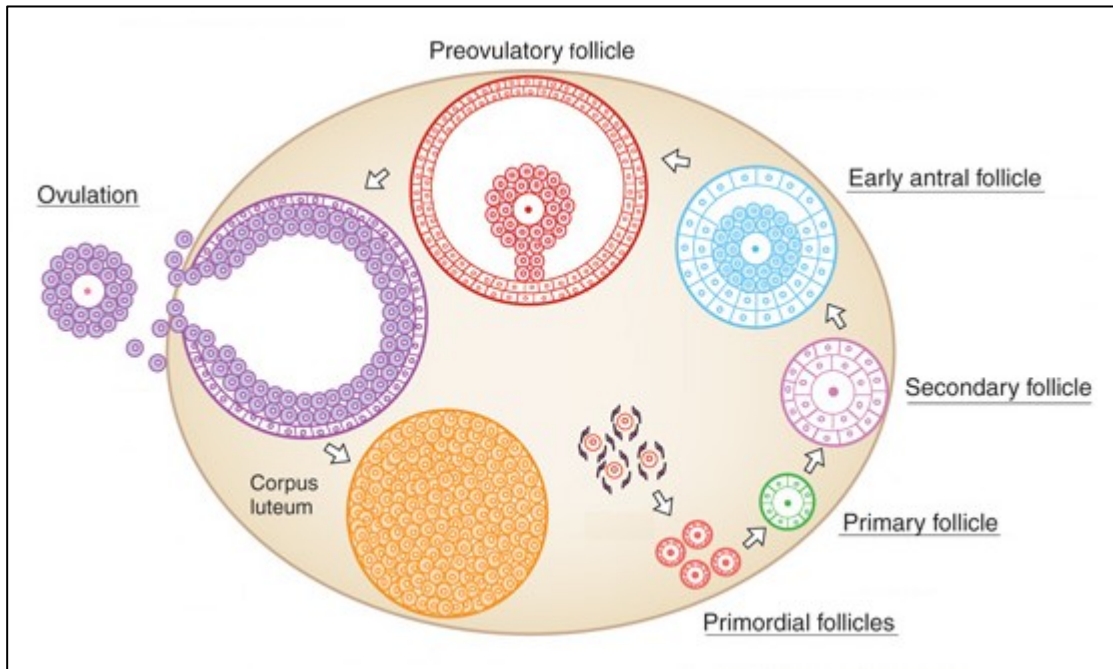


FIGURE 7 : Développement folliculaire. Les follicules primordiaux, avec une monocouche de cG, se développent en follicules primaires avec une monocouche de cG cuboïdales. Ensuite, les cG du stade primaire prolifèrent pour former plusieurs couches et sécréter un liquide dans l'antra folliculaire du stade secondaire. De plus, les cellules entourant le follicule se différencient en thèque. Le follicule secondaire mature en follicule préovulatoire, dit « de Graaf ». Une fois l'ovulation terminée, les cellules résiduelles du follicule se différencient en corps jaune qui dégénère en corps blanc s'il n'y a pas de gestation (tirée de 115).

Ce cycle folliculaire, incluant le développement et l'ovulation d'un follicule et la formation du CJ, dépend d'une hormone sécrétée par l'hypothalamus : la gonado-libérine (GnRH) (96, 104).

Par convention, la première phase du cycle est la phase folliculaire, caractérisée par la maturation des follicules. Au début de cette phase, l'hypothalamus libère de la GnRH qui stimule l'adénohypophyse à produire et sécréter dans le sang deux hormones cruciales au cycle folliculaire : l'hormone folliculo-stimulante (FSH) et l'hormone de lutéinisation (LH). C'est grâce à des mécanismes moléculaires peu compris que les follicules primordiaux sortent de leur dormance pour croître en des follicules primaires puis secondaires. C'est à ce stade que la FSH agit sur son récepteur (FSHR) situé à la surface des cG pour stimuler la croissance du follicule (40, 96, 104). Avant que le follicule n'atteigne le stade secondaire, FSH n'a aucun effet sur les cG puisqu'elles n'expriment pas

FSHR. D'ailleurs, des études avec des souris transgéniques n'exprimant pas le gène codant pour FSHR démontraient un arrêt du développement folliculaire au stade primordial à secondaire préantral (1, 5, 38). Lorsque la FSH se lie à FSHR, elle stimule les cG à proliférer et à produire de l'estradiol ( $E_2$ ) en collaboration avec les cT. Durant la phase folliculaire, la LH se lie à son récepteur, LHCGR, retrouvé dans la membrane des cT et les stimule à transformer le cholestérol sanguin (96, 104) en pregnenolone puis en androgène en activant des enzymes de la stéroïdogénèse tel «P450 cholesterol side-chain cleavage» (CYP11A1) et «cytochrome P450 17 $\beta$ -hydroxylase/C17–20 lyase» (CYP17) (FIGURE 8A). Les androgènes traversent ensuite la membrane basale des cG par diffusion et par jonctions communicantes pour être importés dans les cG. Ils sont alors convertis en  $E_2$  grâce aux enzymes «cytochrome P450 aromatasase» (CYP19A1) et «17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase» (HSD17B1) stimulées par la FSH (49, 70, 84, 85) (FIGURE 8A). Cette collaboration est essentielle durant la phase folliculaire car les cG n'expriment pas toutes les enzymes nécessaires à la production d' $E_2$  (49, 70, 84, 85) (FIGURE 8A).

Les cG sont aussi stimulées à produire d'autres molécules, tel l'hormone inhibine. Lorsque retrouvées dans des concentrations sanguines modérées,  $E_2$  et inhibine font partie d'une rétro-action négative sur l'hypothalamus et l'adénohypophyse pour inhiber la libération de GnRH, FSH et LH. Ceci explique la diminution du taux sanguin de ces deux dernières avec la progression de la phase folliculaire (96, 104).  $E_2$  a aussi un effet paracrin et autocrin sur les cG voisines par rétroaction positive. Sous l'influence de la FSH, chaque cG sécrète de l' $E_2$  qui va alors agir sur elle-même et sur les cellules adjacentes. L' $E_2$  traverse la membrane cellulaire et se lie à son récepteur nucléaire (ESR) pour induire l'expression de gènes cibles de FSH, tel *Lhcgr*, pour préparer les cG à la lutéinisation, ou encore des enzymes impliquées dans la stéroïdogénèse, pour augmenter la production d' $E_2$  (84, 85). La FSH, via  $E_2$ , vise aussi des gènes pro-mitotiques, comme *Ccnd2*, afin de promouvoir la progression du cycle cellulaire des cG de la phase  $G_1$  à S (82). Finalement,  $E_2$  augmente la sécrétion d'IGF1, agoniste de la voie de signalisation PI3K/AKT, pour stimuler la prolifération cellulaire et protéger les cG face à l'apoptose induite par «Fas ligand» (FasL) et la famille des caspases (82).

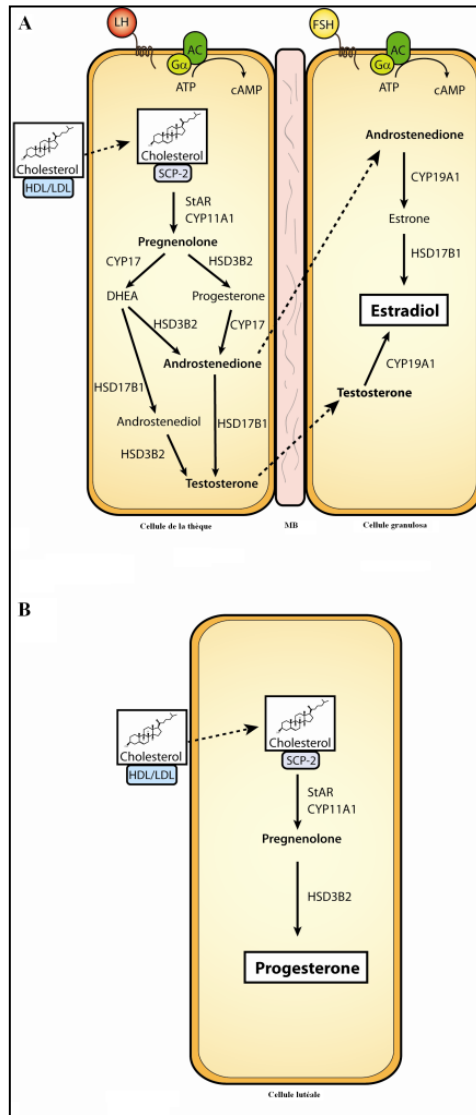


FIGURE 8 : Enzymes impliquées dans la stéroïdogenèse. A) La collaboration entre les cG et les cT est essentielle à la production d'E<sub>2</sub> durant la phase folliculaire. LH stimule les enzymes des cT à produire des androgènes qui traversent la membrane basale des cG pour être converties en E<sub>2</sub> par les enzymes des cG stimulées par FSH. B) Les CJ expriment les enzymes nécessaires à la production de progestérone (P<sub>4</sub>) (tirée de 70).

À un certain moment de la croissance folliculaire, la concentration d'E<sub>2</sub> devient assez élevée pour lever son inhibition sur l'hypothalamus et l'adénohypophyse; elle stimule donc la libération de FSH et LH. À partir de cette étape, chez les grands mammifères mono-ovulatoires (primates, vaches, juments, femmes), un phénomène de sélection folliculaire est enclenché (40). En fait, de tous les follicules matures des deux ovaires, un seul, le follicule dominant, poursuit sa croissance en follicule « de Graaf ». La particularité de ce follicule est qu'il possède tout le bagage moléculaire nécessaire pour répondre à la LH en ovulant et en se différenciant en CJ (112-114). Bien que ce processus de sélection folliculaire ne soit pas très bien compris, plusieurs études y sont dédiées afin de mieux le comprendre et d'identifier les mécanismes moléculaires en cause (40, 96, 104). Par exemple, chez la vache, des expériences *in vitro* et *in vivo* ont démontré que la

sélection du follicule dominant serait associée à une augmentation de la concentration d'E<sub>2</sub> et IGF-1 dans le liquide folliculaire accompagnée d'une augmentation de l'expression de LHCGR à la surface membranaire des cG tapissant l'antra, ainsi qu'une augmentation de leur production d'enzymes stéroïdogéniques (112, 113). Par contre, chez la jument, l'augmentation de la concentration de seulement IGF-1 semble être le facteur important lors de ce phénomène (112). D'autres études ajoutent à ces mécanismes une diminution de l'hormone anti-müllérienne (AMH) dans le liquide folliculaire et une différente formation de nouveaux vaisseaux sanguins dans la thèque du follicule dominant (114). Les autres follicules matures qui n'ont pas été sélectionnés vont dégénérer par apoptose et former du tissu cicatriciel ovarien, processus appelée l'atrésie (96). La concentration d'E<sub>2</sub> continue d'augmenter et elle atteint un seuil critique qui déclenche une brusque et importante libération de LH. Ce pic de LH est aussi accompagné d'une brusque sécrétion de FSH mais de moindre amplitude (40, 96, 104). À ce moment, LHCGR est exprimé à la surface cellulaire des cT et cG du follicule préovulatoire, ce qui leur permet de répondre à ce pic de LH dont la première fonction est de provoquer l'ovulation, deuxième phase du cycle folliculaire (40, 84, 85, 96, 104).

Durant cette phase, la paroi folliculaire se rompt et libère l'ovocyte entouré de son cumulus oophorus dans l'oviducte. Après l'ovulation, LH exerce sa deuxième fonction qui est d'induire la différenciation cellulaire des cellules résiduelles du follicule, soit les cG, qui tapissent l'antra, et les cT, en cellules lutéales (cL), processus appelé la lutéinisation. Celles-ci vont former ainsi le CJ. C'est alors que débute la dernière phase du cycle folliculaire, la phase lutéale (40, 96, 104).

Parmi les processus de lutéinisation, les cG vont commencer à produire deux enzymes importantes à la production de progestérone (P<sub>4</sub>), soit CYP11A1 et « $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase» (HSD3B2). Les cT, tant qu'à elles, diminuent leur expression de CYP17, ce qui permet à l'enzyme HSD3B2 de convertir la majorité de la pregnenolone en P<sub>4</sub> au lieu d'en «dehydroepiandrosterone» (DHEA) (70) (FIGURE 8B). Ces modifications d'expression génique des enzymes impliquées dans la stéroïdogénèse résultent en une importante production et sécrétion de P<sub>4</sub> par le CJ (40, 70, 96, 104). Cette hormone a pour but de supporter l'endomètre en cas d'implantation si l'ovocyte est fécondé (voir chapitre 3, section 3.1.1.1). Il produit et libère aussi de l'E<sub>2</sub>, de la relaxine, qui agit sur l'utérus, et de l'inhibine. Ces hormones vont inhiber la libération de GnRH,



FSH et LH, tout comme pour la phase folliculaire. Durant la phase lutéale, les concentrations de FSH et LH sanguines diminuent radicalement, alors que  $P_4$  est à son summum. Selon l'espèce,  $E_2$  peut augmenter aussi, grâce à son mode d'action paracrine et autocrine, mais moins que lors la première phase (40, 96, 104).

Si l'ovocyte n'est pas fécondé, le CJ ne reçoit pas de signal hormonal de l'utérus indiquant une gestation (voir chapitre 3, section 3.1.1.1) et il dégénère par apoptose pour n'être qu'une cicatrice du cortex ovarien, le corps blanc, qui n'a pas d'activité sécrétrice. Cette dégénérescence provoque une diminution de la production de  $P_4$ ,  $E_2$  et inhibine, ce qui lève leur rétro-inhibition sur l'hypothalamus et l'adénohypophyse. Les concentrations de GnRH augmente, ce qui induit la production et la libération de FSH et LH et le cycle recommence (40, 96, 104).

## 2.1.2. Implication de la voie PI3K/AKT durant le cycle folliculaire

### 2.1.2.1 Insuline/IGF-1

En plus de FSH produite par l'adénohypophyse, IGF1, agoniste de la voie de signalisation PI3K/AKT, fait partie des nombreux facteurs de croissance produits dans l'ovaire qui contrôlent le développement du follicule en agissant par des mécanismes autocrins et paracrins, tout comme  $E_2$ . Des expériences avec des souris transgéniques ont permis d'établir qu'IGF1 induit l'expression de CYP19A1 ainsi que FHSR et LHCGR. Le développement folliculaire des souris n'exprimant pas IGF1 est arrêté au stade secondaire antral (39, 82). De plus, d'autres études ont démontré qu'IGF1 augmentait la sécrétion d' $E_2$  dans les cG bovines et ovines (82). Pour assurer cette collaboration entre les voies FSH et IGF1, plusieurs interactions moléculaires ont lieu en aval de leur récepteur respectif, ce qui assure l'activation de molécules impliquées dans la voie PI3K/AKT (6, 86). Ces mécanismes sont détaillés dans les sections qui suivent.

### 2.1.2.2. FSH

La FSH, une fois liée à son récepteur, active la voie AMPc/PKA en induisant la production du messenger intracellulaire « AMP cyclique » (AMPc) (104) en stimulant

l'adénylyl cyclase. L'AMPc active à son tour la protéine kinase AMPc-dépendante (PKA) qui phosphoryle PI3K, qui active à son tour AKT via PIP3 et PDK1 (78, 59, 110) (FIGURE 9).

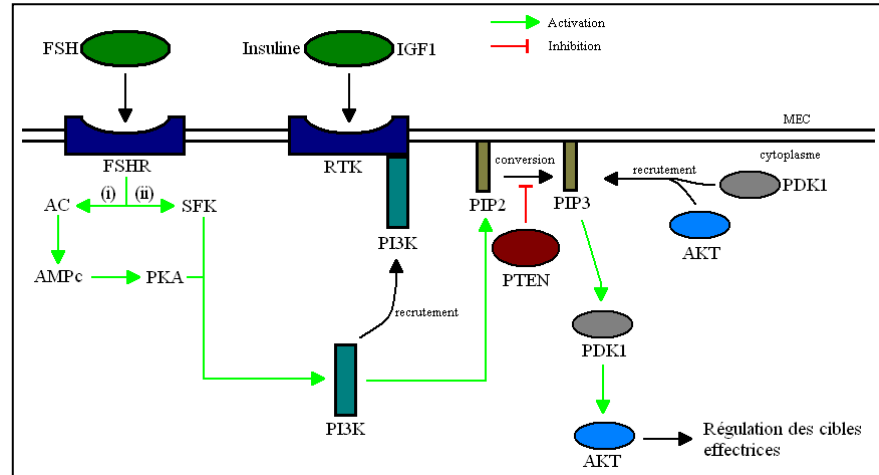


FIGURE 9 : Interactions entre les voies de FSH et IGF1. FSH est reconnue pour stimuler (i) l'AMPc à activer PKA (i) et SFK (ii). Ces deux molécules activent à leur tour PI3K.

FSH peut aussi stimuler la voie PI3K/AKT via les tyrosines kinases de la famille SRC (SFK) (110) (FIGURE 9). Les conséquences de l'activation de PI3K et d'AKT par des cibles effectrices de FSH sont expliquées dans les sections suivantes.

### 2.1.2.3. Médiateurs ovariens de la propagation du signal PI3K/AKT

La convergence entre les voies activées par FSH et IGF1 résulte en la régulation de l'activité de cibles effectrices en aval d'AKT qui ont un impact sur l'expression de gènes nécessaires à la prolifération et la différenciation des cG durant le cycle folliculaire. Ce qui suit explique en détails la régulation de deux de ces cibles d'AKT, soit mTORC1 et FOXO1A. Nous nous attardons sur ces deux molécules car de toutes les cibles effectrices connues d'AKT, ce sont elles qui ont été le plus étudiées dans l'ovaire (59, 86, 87, 110).

#### 2.1.2.3.1. mTORC1

Tel que mentionné plus haut (chapitre 1 section 1.2.4.1), le complexe mTORC1 cible les facteurs de traduction S6RP et eIF4E. En retour, ces facteurs partagent une même cible : l'ARNm de *Hif1 $\alpha$* . Cette sous-unité complète le facteur de transcription HIF en se liant à HIF $\beta$  dans le noyau et, par la suite, induit l'expression de plusieurs gènes qui permettent à la cellule de s'adapter et de survivre en situation d'hypoxie (6, 59, 95). Parmi ces gènes, nous retrouvons *Vegf*, gène-clé de l'angiogenèse et de la survie cellulaire (3, 49, 52, 69, 81, 97).

La complexité vasculaire d'un follicule augmente durant sa croissance. Le follicule primordial dépend entièrement des vaisseaux sanguins du stroma ovarien. D'ailleurs, aucune cellule de ce stade folliculaire n'exprime VEGF. Par la suite, le follicule primaire développe un réseau vasculaire rudimentaire, avec une ou deux artérioles. Au stade secondaire, le follicule présente des vaisseaux sanguins seulement dans la thèque, dont les capillaires aboutissent dans la thèque interne mais ne pénètrent pas la membrane basale des cG. VEGF est alors exprimé dans les cG et les cT et est reconnu pour induire la perméabilité vasculaire, ce qui permet d'augmenter l'apport d'hormones vers le follicule. Un peu avant l'ovulation, la membrane basale des cG se détériore, ce qui permet aux capillaires d'envahir cette couche cellulaire avasculaire du follicule mature (49).

Durant l'ovulation, alors que la paroi du follicule se rupture afin d'expulser l'ovocyte et sa corona radiata, les cellules résiduelles du follicule se différencient en cL et elles continuent d'exprimer VEGF (40, 96, 104). C'est aussi à ce moment que les vaisseaux sanguins vont développer un réseau de capillaires dans le CJ en formation. À mesure que celui-ci mature, le bourgeonnement vasculaire se développe aussi, ce qui permet aux capillaires immatures de gagner en complexité et en ramifications. Dans le CJ mature, les cellules endothéliales représentent environ 50% de la population cellulaire. Ainsi, la vaste majorité des cL sont adjacentes à au moins un capillaire (49). Finalement, s'il n'y a pas de fécondation, le CJ dégénère graduellement et les vaisseaux sanguins se dissocient, et le tout forme le corps blanc (40, 96, 104). Bien naturellement, durant cette régression, l'expression de VEGF par les cL diminue lui aussi jusqu'à ne plus être détectable. Tout ceci, avec l'appui d'un bon nombre d'études, démontre qu'un bon déroulement du cycle folliculaire nécessite VEGF (49).

VEGF est aussi impliqué dans la survie cellulaire des cG face à l'apoptose. Des expériences *in vitro* sur des cG bovines et de rat ont démontré que VEGF inhibait

l'apoptose (69, 81, 97). De plus, lorsque des rates sont traitées avec VEGF, il en résulte une augmentation significative du nombre de follicules antraux par rapport aux contrôles (81). De façon similaire, lorsque l'activité de VEGF est inhibée par un antagoniste pharmaceutique, les ovaires des rates traitées présentent une augmentation du niveau d'apoptose des cG et du nombre de follicules en atresie (3, 52)

Durant le développement folliculaire, FSH est connu pour activer la voie PI3K/AKT/mTORC1 dans les cG en prolifération afin d'induire la traduction de *Hif1 $\alpha$* , qui à son tour régule l'activité transcriptionnel de gènes ciblés par FSH, tel que *Vegf* et *Lhcgr* (6, 59). La voie de signalisation est illustrée dans la FIGURE 10. En bref, FSH se lie à son récepteur sur les cG, ce qui induit la production d'AMPc et l'activation de PKA et SFK. Ces derniers activent PI3K, qui, via PIP3 et PDK1, stimule AKT à lever l'inhibition du complexe TSC1-TSC2 sur mTORC1. Une fois désinhibé, mTORC1 peut donc réguler l'activité de 4eBP1 et p70S6k afin d'activer les facteurs de traduction eIF4E et S6RP. Ces derniers déclenchent la synthèse protéinique de HIF1 $\alpha$ , qui se lie à HIF $\beta$  pour former le complexe HIF et celui-ci induit l'expression de *Vegf* et *Lhcgr* (6, 59, 68, 95, 109). En effet, l'expression de *Vegf* et *Lhcgr* diminuent drastiquement si des cG de rates sont traitées *in vitro* avec des inhibiteurs spécifiques pour mTORC1 ou PI3K, ou encore lors de l'expression d'un mutant inactif d'AKT ou de HIF1 $\alpha$  (6, 59).

La régulation de VEGF par FSH via la voie PI3K/AKT peut emprunter deux autres cascades de réactions moléculaires : soit par l'inhibition de FOXO1A, qui sera expliquée dans la section suivante (section 2.1.2.3.2.), soit par MDM2. Effectivement, des études *in vitro* et *in vivo* sur des cG de rates ont démontré que FSH stimule AKT à phosphoryler MDM2 qui ensuite augmente l'activité de HIF1 $\alpha$  (FIGURE 10). Celui-ci peut donc se lier à HIF $\beta$  puis au site HRE de ses gènes cibles. Par contre, le mécanisme par lequel MDM2 régule l'activité de HIF $\alpha$  est encore inconnu; il peut soit en augmenter le niveau protéinique ou encore en le stabilisant pour le protéger de la dégradation (7).

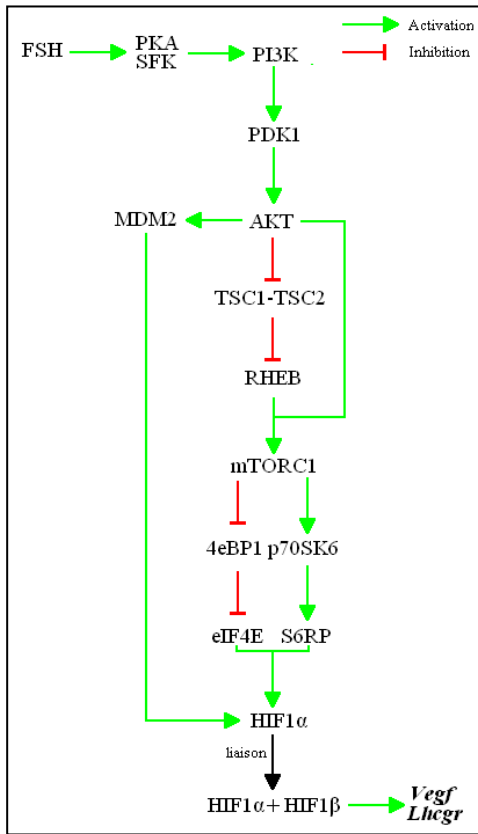


FIGURE 10 : Régulation de l'activité des cibles effectrices de mTORC1 par FSH. FSH stimule l'activation de PKA et SFK, qui activent PI3K. Celui-ci stimule AKT qui libère mTORC1 du complexe TSC1-TSC2. mTORC1 active p70S6K et inhibe 4eBP1 afin d'activer S6RP et eIF4E. Ces derniers activent la traduction de *Hifa* dont la protéine se lie à HIF $\beta$  et le complexe induit l'expression de *Vegf* et *Lhcgr*. AKT peut aussi activer MDM2 qui augmente l'activité de HIF1 $\alpha$ .

#### 2.1.2.3.2. FOXO1A

FSH peut aussi cibler une autre molécule de la voie de signalisation PI3K/AKT : FOXO1A. En effet, il a été démontré que FSH peut réguler non seulement l'inhibition de FOXO1A via AKT mais aussi son niveau d'expression protéinique (86, 87, 110).

FOXO1A est un facteur de transcription pro-apoptotique qui, lorsque phosphorylé, est exporté du noyau vers le cytoplasme puis ensuite dégradé (47, 58, 72, 76, 83, 87, 89). Sinon, il demeure dans le milieu nucléaire afin de maintenir les cG dans la phase G<sub>0</sub> en activant l'expression du gène *Cdkn1b*, inhibiteur du cycle cellulaire, et en inhibant la transcription du gène *Ccnd2* (59) (FIGURE 11). En présence de FSH durant le développement folliculaire, FOXO1a est phosphorylé par AKT, ce qui le déloge du FRE sur le promoteur de *Ccnd2* et celui-ci peut donc être exprimé et induire la progression du cycle cellulaire et la prolifération des cG du follicule en croissance (59).

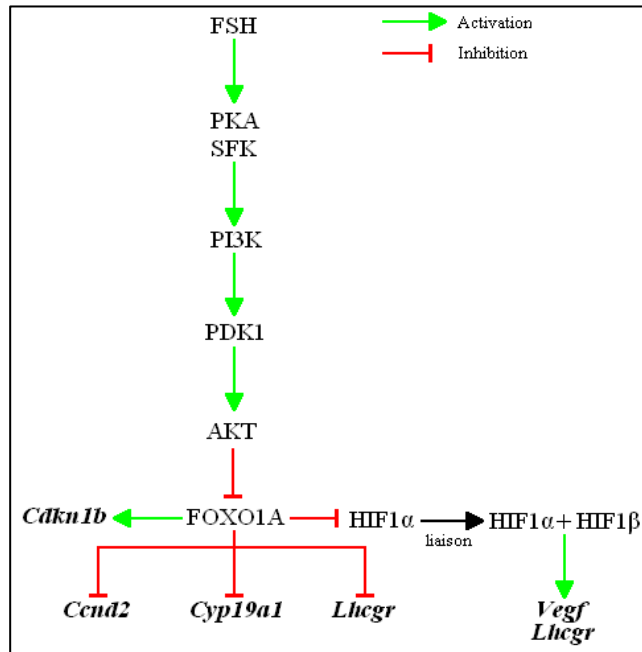


FIGURE 11 : Régulation de l'activité de FOXO1A par FSH. FSH stimule l'activation de PKA et SFK, qui activent PI3K. Celui-ci stimule AKT à inhiber FOXO1A, ce qui résulte en l'arrêt de la transcription de *Cdkn1b* mais l'induction de la transcription de *Cyp19a1*, *Ccnd2* et *Lhcgr*. De plus, l'inhibition de FOXO1A augmente l'activité de HIF1 $\alpha$ .

FOXO1A régule deux autres gènes important ciblés par FSH dans les cG, *Lhcgr* et *Cyp19a1*. FSH stimule la phosphorylation et l'inactivation de FOXO1A afin de lever son inhibition sur l'expression protéinique de ces deux gènes, impliqués dans la différenciation des cG en cL et dans la stéroïdogénèse (7, 59) (FIGURE 8A et FIGURE 11). Il a également été démontré que dans les cG de rates, FSH induit l'inhibition de FOXO1A par AKT afin d'augmenter le niveau protéinique (et par conséquent, de l'activité) de HIF1 $\alpha$ . Des études ont prouvé qu'en l'absence de FSH, FOXO1A déstabilise la protéine HIF1 $\alpha$ , ce qui provoque sa dégradation et une diminution de son activité transcriptionnelle (7) (FIGURE 11).

Finalement, en plus d'induire sa phosphorylation, une étude a démontré que FSH peut réguler l'activité de FOXO1A en diminuant les niveaux de son ARNm dans les cG de rates *in vitro* (87, 110).

## 2.2. Implication de la voie PI3K/AKT dans le cancer de l'épithélium de surface ovarien

Une des conséquences possibles d'un dérèglement de la voie de signalisation PI3K/AKT est le développement de cancer de l'épithélium de surface ovarien (CESO) (11). L'épithélium de surface ovarien (ESO) est constitué d'une monocouche de cellules épithéliales dont l'une des fonctions est d'assurer le transfert d'ovocytes vers les oviductes.

Pour ce faire, peu avant l'ovulation, les cellules de l'ESO (cESO) juxtaposées au follicule dominant vont entrer dans une vague d'apoptose, induite soit par des prostaglandines ou encore par des enzymes protéolytiques produites par les cellules-mêmes (11). Cette vague apoptotique permet à l'ESO de rompre pour expulser l'ovocyte du follicule. Par la suite, l'ESO va participer à la réparation de la plaie ovulatoire et du cortex ovarien en produisant et sécrétant des composantes destinées tant aux cellules épithéliales qu'au tissu conjonctif. D'ailleurs, lorsque les cESO déclenchent la réparation, elles vont développer des caractéristiques fibroblastiques tout conservant leur phénotype épithélial : desmosomes, kératine, membrane basale, etc. Cette transition entre épithélium et fibroblaste permet aux cESO d'augmenter leur contractilité et leur motilité afin de migrer dans la MEC du stroma ovarien et induire des réactions résultant en la prolifération des cellules stromales et la modification du stroma (11). Durant cette réparation, des cellules épithéliales peuvent être incorporées dans le cortex et deviennent des fibroblastes stromaux. Par contre, si ces cESO incluses dans le stroma n'effectuent la transition épithélio-fibroblastique et demeurent des cellules épithéliales, elles forment des agrégats ou encore des kystes d'inclusion. Ce sont ces formations qui sont suspectées de donner naissance au CESO (11). Le CESO peut être divisé en 4 groupes en fonction de sa morphologie cellulaire : sérique, endométrioïde, muqueux ou à cellules claires (11, 14, 94). Par contre, cette œuvre ne fera pas la distinction et utilisera le terme général CESO.

Des mutations au niveau de *Pi3k* qui augmentent son efficacité à convertir PIP2 en PIP3 ont souvent été observées dans le CESO. De plus, des études ont aussi répertorié des mutations de *Pten* le rendant inactif et son activité de suppresseur tumoral est alors perdue (14, 45, 61, 94). Cette perte de la fonction de PTEN peut résulter en une suractivation de la voie PI3K/AKT dans le CESO, qui a souvent été démontrée par une hyperphosphorylation d'AKT et mTORC1 (94, 111). De plus, une surexpression de VEGF, cible effectrice de mTORC1, a aussi été observée dans ce type de cancer (49, 61). Par conséquent, une perte de PTEN peut amener à une suractivation de l'axe PI3K/AKT/mTORC1/VEGF, ce qui augmenterait la vascularisation tumorale. Cependant, d'autres études devront être effectuées afin de mieux comprendre les rôles possibles de la voie PI3K/AKT dans le déclenchement du CESO (61).

### 3. Rôles de la voie PI3K/AKT dans l'utérus

#### 3.1. Rôles physiologiques

##### 3.1.1. Physiologie utérine de la gestation chez la souris

Contrairement aux grandes espèces de mammifères mono-ovulatoires, les rongeurs sont pluri-ovulatoires et portent plus qu'un embryon par gestation. Chez la souris, le nombre de fœtus par portée varie selon la race et l'âge de la femelle, mais en moyenne, elle peut donner naissance à six souriceaux (55, 90).

##### 3.1.1.1. Changements cycliques

En parallèle avec le cycle folliculaire, la GnRH, FSH et LH gèrent indirectement les changements cycliques utérins des rongeurs. Ces derniers se déroulent en deux phases : la phase prolifératrice suivi d'une phase sécrétrice (21, 40). Pendant la phase folliculaire de l'ovaire, la FSH induit la production et la libération d'E<sub>2</sub> par les cG (voir chapitre 2 section 2.1.1.) qui agit sur les cG avoisinantes, l'hypothalamus, l'adénohypophyse et aussi sur l'endomètre utérin, soit l'épithélium et le stroma utérin comprenant les glandes sécrétrices. En fait, E<sub>2</sub> se rend à l'utérus par le sang et stimule les cellules de l'endomètre à proliférer, ce qui provoque son épaissement. L'E<sub>2</sub> induit aussi dans les cellules de l'épithélium la production du récepteur pour la P<sub>4</sub>, afin de les préparer à la phase suivante (96).

La phase sécrétrice de l'utérus débute après l'ovulation, correspondant à la phase lutéale ovarienne. Les CJ sécrètent de la P<sub>4</sub>, l'E<sub>2</sub> et de la relaxine. Cette dernière agit sur le myomètre, couche musculaire de l'utérus, afin d'en diminuer le tonus. Cette action augmente sa flexibilité et pourrait faciliter l'implantation du zygote et éviter que le myomètre restreigne le développement embryonnaire (104). La P<sub>4</sub> et l'E<sub>2</sub>, tant qu'à elles, continuent de supporter le développement de l'endomètre pour le préparer à l'implantation en stimulant le réseau vasculaire qui irrigue l'endomètre à se complexifier afin d'augmenter l'apport sanguin (voir section suivante, 3.1.1.2). De plus, P<sub>4</sub> déclenche la croissance des glandes stromales et les stimulent à sécréter un liquide contenant les



nutriments essentiels (par exemple, du glycogène) pouvant soutenir les embryons jusqu'à leur implantation, (40, 55, 90, 96, 104).

Si les ovocytes ne sont pas fécondés, la production hormonale des CJ diminue et l'endomètre se résorbe sans saignements et le cycle œstral recommence (21, 55, 90). Par contre, si les ovocytes sont fécondés, les CJ maintiennent leur effet sur l'endomètre et l'induction de la sécrétion de nutriments par les glandes stromales pour l'implantation des zygotes. Lors de l'accouplement, le col utérin des rongeurs femelles est stimulé et envoie un signal à l'adénohypophyse afin qu'elle sécrète et libère de la LH, FSH et surtout de la prolactine (PRL). Cette hormone a pour fonction d'induire la production de lait par les glandes mammaires (21, 104) et, chez les rongeurs, d'allonger la durée de vie des CJ jusqu'à J10pc-J12pc. Les cL répondent à PRL via son récepteur qui est présent à leur surface membranaire. La libération de PRL par l'adénohypophyse se poursuit jusqu'environ J8pc à J10pc et, à ce moment, l'embryon sécrète une hormone, « placental lactogen », dont une des fonctions est de prendre la relève de la PRL afin de maintenir les CJ fonctionnels et ce, du J10pc jusqu'à la fin de la gestation (durée totale entre 19 et 21 jours) (55, 77, 90). Le maintien des CJ leur permet de poursuivre leur production et sécrétion de  $P_4$  et  $E_2$  pour soutenir l'endomètre en modification (voir section suivante, 3.1.1.2). De plus, ces deux dernières agissent sur l'hypothalamus et l'adénohypophyse pour d'inhiber la libération de GnRH, FSH et LH, évitant le déclenchement d'un nouveau cycle œstral (voir chapitre 2 section 2.1.1.) (40, 55, 90).

### 3.1.1.2. Interactions feto-maternelles : implantation et décidualisation

Une fois les ovocytes fécondés, le clivage cellulaire embryonnaire est entamé pour former des morulas et ensuite des blastocystes. C'est lors de ce stade de l'embryogenèse que les zygotes s'implantent dans l'endomètre entre 4 à 5 jours post-coïtum (J4pc à J5pc) (55, 90). À mesure que les cellules des blastocystes se divisent, elles se différencient soit en embryoblaste, futur embryon, soit en trophoblaste, structure extra-embryonnaire responsable de l'implantation et d'établir la connexion avec le tissu maternel. Les blastocystes comprennent aussi une cavité remplie de liquide, le blastocèle, destiné à devenir le sac amniotique (FIGURE 12) (96, 104).

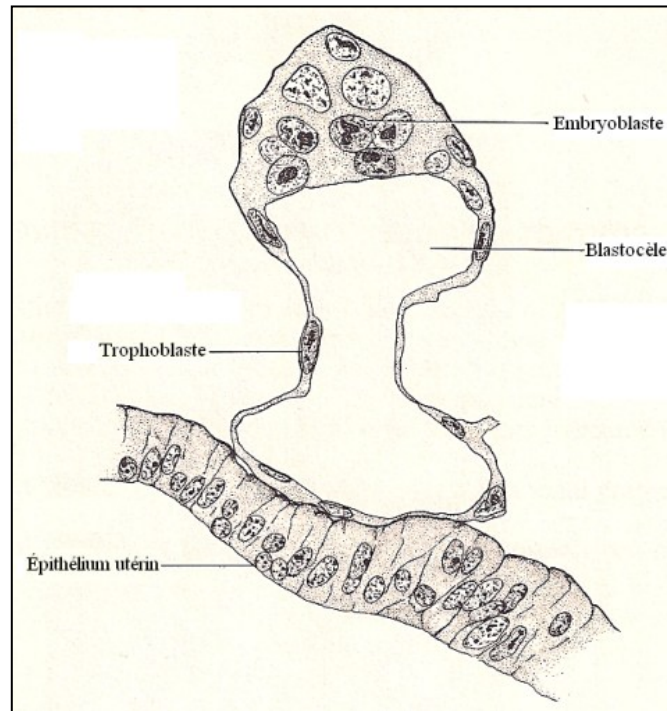


FIGURE 12 : L'implantation du blastocyste. Le blastocyste entre en contact avec l'épithélium utérin au J4.5pc et, à ce moment, il comprend trois régions, l'embryoblaste, le trophoblaste et le blastocèle (tirée de 90).

Le processus d'implantation débute lorsque les cellules du trophoblaste entrent en contact avec le tissu maternel (FIGURE 12) pour envahir l'épithélium utérin et sa membrane basale pour poursuivre leur invasion dans le stroma utérin (voir section suivante, 3.1.1.3) (62). Les cellules épithéliales au niveau du site d'implantation dégèrent par apoptose et sont phagocytées par le trophoblaste (55, 62). À ce même moment,  $P_4$  stimule les cellules stromales et les fibroblastes de l'endomètre à se différencier en cellules déciduelles pour former la décidua maternelle (DM) (55, 62). La taille des cellules déciduelles augmente et elles accumulent des organelles impliquées dans la synthèse de macromolécules, du glycogène et de gouttelettes lipidiques (2). La décidualisation des cellules stromales comprend aussi une augmentation des jonctions intercellulaires adhérentes et communicantes (2). Elle est aussi accompagnée d'une importante prolifération des cellules déciduelles jusqu'au J10pc (29), après quoi elles entrent dans une vague importante d'apoptose synchronisée avec les cellules épithéliales du site de l'implantation (29, 55, 62). Cette apoptose est induite soit par l'augmentation de

l'activité de CASP3 et CASP9 ou encore par des membres de la famille BCL-2 (29, 62). Ceci permet aux cellules trophoblastiques d'envahir la DM et d'assurer un bon développement du placenta (FIGURE 13 et voir section suivante, 3.1.1.3.) (4, 30).

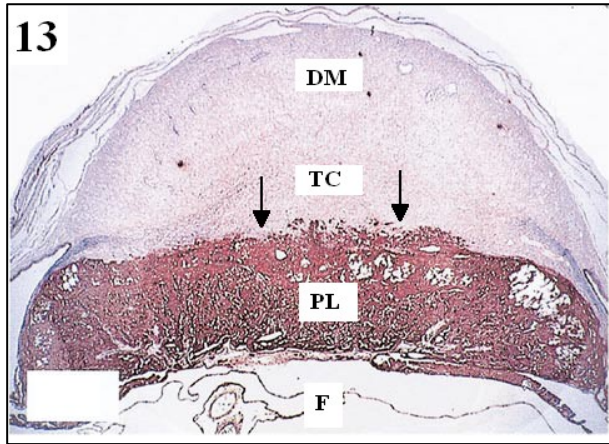


FIGURE 13 : Le site d'implantation du blastocyste au J12.5pc. Les cellules trophoblastiques (TC et flèches) envahissent la décidua maternelle (DM) afin d'assurer un bon développement du placenta (PL) et la survie du fœtus (F) (tirée de 4).

La différenciation du stroma utérin affecte aussi les vaisseaux sanguins qui subissent un important remodelage afin de permettre une placentation dite hémochoriale, où le sang maternel perfuse la portion fœtale du placenta (4, 30, 31). Les artères utérines, localisées dans le myomètre, se subdivisent en plusieurs branches et prennent une forme spiralée à mesure qu'elles s'approchent du tissu fœtal. Ces artères spiralées ont la particularité de ne pas posséder de couche musculaire lisse, contrairement aux autres artères (4, 30, 31). Chez les souris, cette perte de muscles lisses est causée par une lignée de lymphocytes, les « uterine natural killer cells » (uNK) (FIGURE 14) (4, 30, 31, 33). Les cellules prédécesseurs des uNK, les « natural killer cells » (NK), sont retrouvées dans la rate ainsi que dans l'utérus même. La DM et le trophoblaste recrutent les NK vers l'utérus en libérant les interleukines (IL) 12, 15 et 18 (92). IL 15 assure la survie des cellules pré-uNK dans l'utérus alors que IL12 et IL 18 terminent leur différenciation en uNK matures. Ces interleukines sont aussi nécessaires à la production et libération d'interférons par les uNK (32). Les uNK vont aussi sécréter d'autres molécules, des perforines et des protéases, pour réduire par érosion (60) la couche musculaire lisse des artères spiralées, ou encore des facteurs pro-angiogéniques (VEGF, NO) qui ont pour fonction d'induire leur vasodilatation et d'augmenter leur perméabilité (33). La quantité d'uNK augmente graduellement jusqu'à J10pc, où leur nombre atteint son maximum, pour ensuite diminuer lentement jusqu'à la fin de la gestation (4, 30, 32, 33).

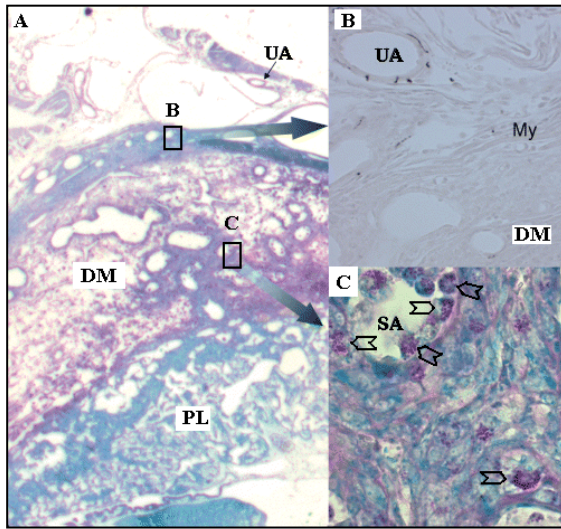


FIGURE 14 : Remodelage des artères spirales de la décidua maternelle par les uNKs. Au site d'implantation au J10pc (A), les artères utérines (UA) sont localisées dans le myomètre (My) et entrent dans la décidua maternelle (DM) (B). (C) Ensuite, elles deviennent des artères spiralées qui sont remodelées par les uNKs (têtes de flèches vides) à mesure qu'elles se rapprochent du placenta (PL) (tirée de 105).

Plus les artères spiralées approchent de la ligne d'invasion des cellules du trophoblaste, plus leur diamètre augmente grâce à leur perte de muscles lisses (4) et au moment où elles traversent cette frontière fœtale, elles convergent en un à quatre vaisseaux. Passés la frontière fœtale, les cellules trophoblastiques prennent la relève du remodelage vasculaire car les uNK qui sont restreints à la DM (voir section suivante, 3.1.1.3.).

Cette modification de la vascularisation de l'endomètre fait partie de la décidualisation du stroma utérin et a pour but d'augmenter l'apport de sang maternel vers le fœtus. Cette augmentation du flux sanguin maximise les échanges foeto-maternels de nutriments, oxygène et hormones nécessaires au développement embryonnaire (4, 30- 33).

### 3.1.1.3. Invasion du trophoblaste et placentation hémochoriale

Au moment du contact entre le blastocyste et l'épithélium utérin, les cellules du trophoblaste envahissent le tissu maternel afin de sécuriser l'implantation et assurer une bonne placentation hémochoriale (FIGURE 13) (30, 50). Suite à l'implantation, le stroma utérin se différencie en DM pour ensuite entrer dans une vague apoptotique (voir section 3.1.1.2.), ce qui permet aux cellules du trophoblaste d'envahir la DM. Elles assurent leur migration en libérant des « matrix metalloproteinases» (MMP) pour dégrader la MEC de la DM, ainsi que des molécules d'adhésion et des intégrines impliquées dans l'induction et le soutien de la migration du trophoblaste (50). De plus, les cellules trophoblastiques

expriment à leur surface cellulaire un antigène spécifique membre de la famille des « histocompatibility tissue specific antigen of low polymorphism », soit HLGA-G. Cet antigène protège les cellules fœtales envahissantes contre les cellules du système immunitaire maternel, dont les NK (50, 73). Chez la souris, trois types de cellules trophoblastiques envahissantes ont été identifiés. Les cellules dites péri-endothéliales sont localisées dans la lumière et adhérentes à l'endothélium des artères spiralées et ce à partir du J10pc (FIGURE 15). Leur fonction est encore inconnue à ce jour mais nous savons qu'elles ne sont pas impliquées dans l'érosion de la couche musculaire lisse des artères spiralées, rôle des uNK (4). Ensuite, les cellules glycolytiques, détectables au J12pc, ne sont pas liées aux vaisseaux sanguins mais plutôt à l'invasion interstitielle et pourraient être responsables de la dégradation de la MEC en libérant des MMP (FIGURE 16) (4, 30, 50). Finalement, les cellules géantes du trophoblaste (TGC), sont des cellules multinucléées détectables au J10pc et très importantes puisqu'elles entament l'invasion fœtale et délimitent la région maternelle et fœtale du placenta (FIGURE 17) (4, 30). Bien qu'elles soient détectables plus tôt, la migration des TGC est lente relative aux autres types cellulaires envahissants. À partir du J12.5pc, les cellules péri-endothéliales et glycolytiques dépassent la ligne d'invasion des TGC et s'infiltrent dans la DM (FIGURE 16) (4, 30). Les TGC envahissent la DM en libérant des facteurs angiogéniques, dont VEGF et « Proliferin » (PLF), et le vasodilatateur NO afin d'augmenter l'apport sanguin maternel vers le fœtus (4, 30).

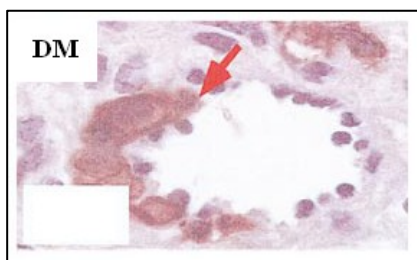


FIGURE 15 : Les cellules péri-endothéliales au J12.5pc. Ces cellules trophoblastiques (flèche rouge) envahissent les vaisseaux sanguins de la décidua maternelle (DM) (tirée de 4).



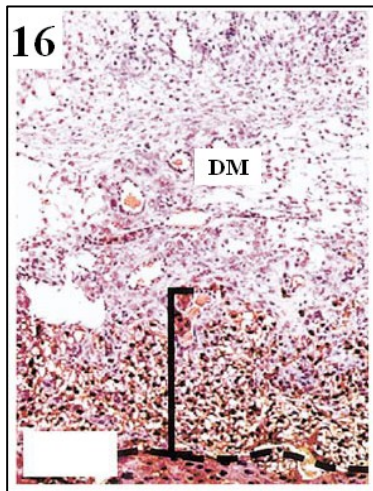


FIGURE 16 : Les cellules glyco-géniques au J14.5pc. La fonction de ces cellules trophoblastiques serait liée à l'invasion et à la dégradation de la matrice extracellulaire de la décidua maternelle (DM) afin d'assurer une bonne migration des cellules géantes de trophoblastes (trait pointillé). Le crochet délimite la progression des cellules glyco-géniques dans la DM (tirée de 4).

Derrière la ligne envahissante des TGCs, nous retrouvons le spongiotrophoblaste (SP) (FIGURE 17). Cette région du placenta est peu différenciée (4, 30). Lorsque les artères spiralées remodelées par les uNK traversent la ligne des TCG pour pénétrer dans le SP, elles convergent en un à quatre canaux artériels. Le terme canal est utilisé puisqu'il n'y a plus de cellules endothéliales tapissant leur paroi interne (FIGURE 17). Cette perte de cellules endothéliales peut être expliquée par la production et la sécrétion de facteurs anti-angiogéniques par les cellules du SP, dont « FMS-like tyrosine kinase 1 » (FLT1) et « Proliferin-related protein » (PLRP), antagonistes respectifs de VEGF et PLF. Le gène *Flt1* code pour le récepteur de VEGF, mais des processus d'épissage peuvent aussi produire la protéine soluble FLT1 qui est sécrétée pour se lier à VEGF, l'empêchant ainsi d'activer son récepteur membranaire. La libération de ces molécules par les cellules du SP empêche les cellules endothéliales maternelles de pénétrer dans le tissu fœtal (4, 30).

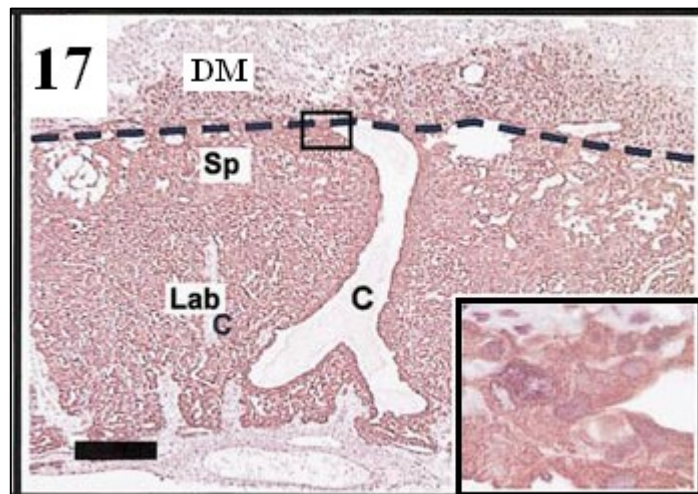


FIGURE 17 : Les régions du site d'implantation et les canaux vasculaires. La décidua maternelle (DM) est envahie par la première zone du placenta hémochorial : les cellules géantes du trophoblaste (trait pointillé). Ensuite, le spongiotrophoblaste (SP) comprend les canaux vasculaires (C) qui se poursuivent dans la dernière zone du placenta, le labyrinthe (Lab). En grossissement, un agrandissement de cellules géantes du trophoblaste (tirée de 4).

Le labyrinthe est la région fœtale placentaire perfusée par le sang maternel, définissant une placentation hémochoriale (FIGURE 18 A). Si la vascularisation du SP est constituée de canaux vasculaires, le labyrinthe présente des simples sinus bordés par des cellules endothéliales fœtales. Le sang maternel voyage jusqu'à la base du labyrinthe et pendant qu'il le traverse, il croise à contre-courant le sang fœtal, permettant ainsi l'échange des nutriments essentiels à la croissance et au développement embryonnaire (FIGURE 18 B et C) (4, 30). Ensuite, le sang maternel remonte vers le SP où convergent des canaux veineux qui mènent vers les veines utérines de la DM (FIGURE 18 B) (4, 30).

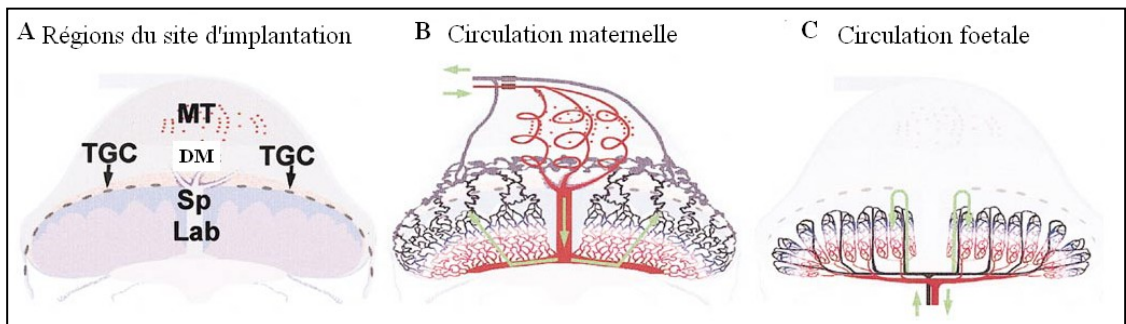


FIGURE 18. Illustration de l'irrigation de la circulation sanguine maternelle et fœtale dans les zones du site d'implantation durant la gestation chez la souris. A) les régions du site d'implantation murin : le triangle métriale (MT), la décidua maternelle (DM), les cellules géantes du trophoblaste en migration dans la DM (TGC), le spongiotrophoblaste (SP) et le labyrinthe (Lab). B) et C) Perfusion du sang maternel (B) et fœtal (C) à contre-courant dans le placenta hémochorial (tirée de 4)

En résumé, chez la souris, la placentation débute avec l'invasion de la DM par le trophoblaste du blastocyste grâce à trois types cellulaires. Les TGC, cruciales à l'envahissement, sécrètent des facteurs angiogéniques et vasodilatateurs afin de réguler l'apport sanguin vers le site d'implantation (4, 30, 92). En collaboration avec la DM, elles

libèrent aussi des cytokines qui pourraient recruter vers la DM des NK et déclencher leur maturation en uNK (32, 33). Ces uNK remodelent les artères spiralées en érodant leur couche musculaire lisse, ce qui augmente leur diamètre, acheminant ainsi un plus grand volume sanguin vers le fœtus (4, 60). Ensuite, les cellules glycogéniques sont impliquées dans l'invasion de la DM, probablement en dégradant la MEC (4, 30, 50). Finalement, le troisième type cellulaire est retrouvé dans la lumière et sur l'endothélium des artères spiralées pour exercer une fonction encore inconnue à ce jour (4, 30).

Le placenta murin est complètement développé à J10pc et comprend trois couches (FIGURE 17 et 18 A) (4, 30, 55, 90). Il débute par la ligne de migration des TGC qui délimite la DM du tissu fœtal. La deuxième région, le SP, suit les TGC. Le labyrinthe représente un réseau de sinus perfusés par le sang maternel où il croise le sang fœtal qui circule à contre-courant et où se fait l'échange des nutriments, oxygène et autres éléments (FIGURE 18 B et C) (4, 30).

### 3.1.2. Implication de la voie PI3K/AKT dans la physiologie utérine

#### 3.1.2.1. Changements cycliques

Malgré l'importance de la voie PI3K/AKT dans l'organisme, peu d'études sont dédiées à élucider son rôle lors du cycle œstral.

Au niveau utérin, l'E<sub>2</sub> sécrété par les cG et les CJ induit la prolifération du stroma et de l'épithélium de l'endomètre via la voie de signalisation PI3K/AKT (71). En effet, il a été démontré qu'E<sub>2</sub> induit la transcription d'*Igf1*, qui déclenche l'activation d'AKT et ensuite des molécules effectrices impliquées dans la prolifération cellulaire (65, 67, 71, 107). Des études sur des endomètres de rates ont démontré qu'E<sub>2</sub> induit l'activation d'AKT en stimulant non seulement son recrutement membranaire et sa phosphorylation via PI3K, mais aussi son expression protéinique dans les cellules épithéliales et glandulaires de l'endomètre en prolifération (37, 71). Cette activation d'AKT peut être inhibée si les endomètres de rates sont traités avec un inhibiteur de PI3K (71). L'activation d'AKT par E<sub>2</sub> vise entre autres à inhiber et exporter FOXO1A du noyau, facteur de transcription qui promeut l'arrêt du cycle cellulaire (58, 65, 71, 107). Effectivement, lorsque les rates sont traitées avec E<sub>2</sub> puis avec un inhibiteur de PI3K, le niveau de phosphorylation et



d'inactivation de FOXO1A utérin est grandement diminué comparé aux rates ayant reçu seulement un traitement avec E<sub>2</sub> (71). E<sub>2</sub> induit l'activation d'autres cibles d'AKT, tel MDM2 et GSK3β (65), mais les conséquences de cette régulation sont encore inconnues à ce jour. En dépit les changements cycliques utérins, le niveau d'expression de *Pten* dans l'endomètre de rate est constant tout le long du cycle œstral (37), suggérant que PTEN représente un niveau de régulation basal (plutôt que dynamique) de la voie PI3K/AKT dans ce tissu.

E<sub>2</sub> stimule aussi l'activation de mTORC1 via AKT dans l'épithélium utérin mais la régulation des cibles effectrices de mTORC1 est inconnue puisque même si mTORC1 est augmenté avec E<sub>2</sub>, le niveau de phosphorylation de p70S6K n'est pas modifié (65). De plus, il a été démontré que cette hormone stimule l'expression de *Vegf* en augmentant la traduction de *Hif1α* dans l'épithélium endométrial, mais cela semble s'effectuer indépendamment de l'axe PI3K/AKT/mTORC1. En effet, si les cellules épithéliales in vitro sont traitées avec E<sub>2</sub> et ensuite avec un inhibiteur de mTORC1, elles expriment tout de même *Vegf* (65).

Finalement, dans les cellules épithéliales de l'utérus de souris, E<sub>2</sub> cible, via la voie IGF1/PI3K/AKT, deux protéines impliquées dans la progression du cycle cellulaire de la phase G2 à M : CDK1 et CCNB. E<sub>2</sub> stimulerait la liaison entre les deux molécules et la progression du cycle cellulaire est alors enclenchée (107). Par contre, il n'est pas possible de savoir pour l'instant si cette induction d'AKT et de CDK/Cycline sont reliées comme dans l'ovaire (voir section 2.1.2.3.2.) (107).

### 3.1.2.2. Gestation

Tout comme pour le cycle œstral, peu d'études sont portées sur le rôle physiologique de la voie PI3K/AKT durant la gestation. Les quelques études qui s'y attardent se concentrent sur l'implication de cette voie lors de l'implantation.

Du côté fœtal, PI3K et AKT ont été localisés dans les cellules trophoblastiques durant l'implantation et impliqués dans la différenciation et la maturation des TGC (63). Au niveau maternel, PTEN a été localisé dans le cytoplasme de cellules épithéliales et stromales murines au J3pc et à partir de ce jour, son expression protéinique augmente graduellement dans la DM jusqu'au J7pc. Cette augmentation serait liée à l'importante

vague apoptotique de la DM après l'implantation qui survient au J5pc (25, 55, 90). D'autres études ont démontré que mTOR est aussi présent dans l'endomètre murin. Plus précisément, son expression est restreinte aux cellules stromales et détectable à partir du J3pc. Son expression augmente alors jusqu'au J5pc, ce qui correspond à la fenêtre de prolifération et de décidualisation qui prépare l'endomètre à l'implantation. Par la suite, les niveaux de mTOR (ARNm et protéine) dans les cellules déciduelles diminuent alors qu'elles entrent en apoptose. Par contre, il est important de mentionner que ces études ne font pas la distinction entre mTORC1 et mTORC2 (24).

### 3.2. Implication de la voie PI3K/AKT dans le cancer de l'utérus

Le cancer endométrial utérin (CEU) est le cancer gynécologique le plus prévalent chez la femme en Occident. Il est caractérisé par une néoplasie des cellules glandulaires de l'endomètre et est divisé en deux classes histopathologiques. Le type I, dit endométrioïde ou adénocarcinome, est très similaire à l'endomètre au niveau histologique. La majorité de ce type est déclenchée par une hyperestrogénémie qui provoque une hyperplasie endométriale qui se développe ensuite en cancer (20, 23). Le second type est moins commun mais plus agressif et n'est pas relié à l'E<sub>2</sub> ou à l'hyperplasie. Il est subdivisé en cinq groupes : sérique, muqueux, cellules claires, squameux et carcinome adénosquameux (20, 23).

Tout comme pour le cancer de l'épithélium de surface ovarien (chapitre 2 section 2.2.), l'implication de la voie PI3K/AKT dans le CEU a été établie par la détection d'une perte fonctionnelle de *Pten* (12, 35). En effet, chez la femme, des mutations de *PTEN* sont observés dans 30% à 80% des cas de CEU type I, contrairement au type II qui n'en démontre pas (13, 27, 28), et serait liée au déclenchement de l'hyperplasie endométriale (28). Des mutations au niveau de *PI3K* ont aussi été inventoriées dans environ 35% des CEU chez la femme et sont souvent accompagnées d'une perte de *PTEN*. Par contre, peu d'études ont démontré une importance fonctionnelle de ces mutations de *Pi3k* dans la pathogenèse de ce cancer. En fait, la majorité des études concentrées sur l'implication de cette voie de signalisation dans le CEU sont portées à mieux comprendre les mécanismes moléculaires et biologiques des mutations de *Pten* (13, 54).

Des souris transgéniques qui n'exprimaient pas PTEN spécifiquement dans les cellules de l'endomètre ont permis d'évaluer le rôle de la voie PI3K/AKT dans le développement du CEU. Ces souris présentaient une hyperplasie de l'épithélium et du stroma utérin très tôt, à 10 jours d'âge, qui ensuite a progressé au stade de cancer à 1 mois d'âge et à trois mois, le cancer avait la capacité d'envahir le myomètre (12, 35). Des analyses immunohistochimiques sur les utérus de ces souris transgéniques ont démontré une importante augmentation du niveau de phosphorylation d'AKT (35, 79). Ceci indique qu'une perte de *Pten* peut amener à une suractivation de la voie et une hyperphosphorylation d'AKT dans le CEU (35). Une seconde lignée de souris transgéniques possédant seulement un allèle fonctionnel de *Pten* ont aussi développé une hyperplasie de l'épithélium utérin. De plus, une augmentation de la phosphorylation d'AKT était détectable dans les cellules épithéliales de ces utérus ainsi qu'une augmentation de l'activité de p70S6K. Ce dérèglement de l'activité de cette molécule a pu être inhibé en traitant les souris avec un inhibiteur de mTORC1, établissant un rôle potentiel de l'axe PI3K/AKT/mTORC1 dans le phénotype de ces souris (79). Bien que l'expression ou le niveau d'activité de mTORC1 n'ait pas été investigué dans ce dernier modèle de souris, d'autres études sur des échantillons de CEU humain ont décelé une augmentation de 80% du niveau de mTORC1 phosphorylé cytoplasmique dans les cellules de CEU versus les contrôles. De plus, ces cellules démontraient aussi, en parallèle, une augmentation de la phosphorylation d'AKT (27, 106). Même si ce patron d'expression de mTORC1 dans les CEU humain n'ait pu être mis en lien avec des paramètres cliniques particuliers (27, 106), il permet quand même de soutenir l'importance potentielle de l'axe PI3K/AKT/mTORC1 dans les CEU.

## Chapitre 2 : Hypothèses et Objectifs

Compte tenu des rôles établis de la voie PI3K/AKT dans la prolifération et la survie des cellules de la granulosa, nous avons émis l'hypothèse qu'une suractivation de la voie PI3K/AKT pourrait être une cause du développement de la tumeur des cellules de la granulosa, une forme peu étudiée de cancer de l'ovaire.

Compte tenu des rôles potentiels pour la voie PI3K/AKT dans les cellules utérines stromales et dans la décidua maternelle, nous avons émis l'hypothèse qu'une suractivation de la voie PI3K/AKT pourrait mener à un dérèglement de la prolifération, l'apoptose, la différenciation et/ou la fonction de ces tissus.

Afin de tester ces hypothèses, les objectifs de ce travail étaient de:

1. Étudier les conséquences de l'inactivation conditionnelle de *Pten* au niveau des cellules de la granulosa sur la fonction et la tumorigénèse ovarienne dans un modèle de souris transgénique.
2. Étudier les conséquences de l'inactivation conditionnelle de *Pten* au niveau du stroma utérin et de la décidua maternelle sur la fonction utérine et la gestation dans un modèle de souris transgénique.

## Chapitre 3 : Première publication

### Préface

La GCT est un type de cancer ovarien très rare chez la femme et bien que la mort survienne dans 80% des cas suite à une recrudescence de la maladie, peu d'études y sont dédiées. Cette première publication avait pour but d'élucider les mécanismes moléculaires causant les GCT en démontrant l'implication de la voie de signalisation PI3K/AKT dans leur étiologie. Pour ce faire, nous avons créé la lignée de souris transgéniques *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> grâce à la technologie Cre-Lox. La voie WNT/CTNNB1 est une autre voie de signalisation qui a récemment été impliquée dans le développement des GCT. Dans le cadre de ce projet, nous avons également testé l'existence possible d'une synergie fonctionnelle entre les voies WNT/CTNNB1 et PI3K/AKT dans le développement de la maladie. Pour ce faire, nous avons créé le modèle transgénique *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Ctnnb1*<sup>flox(ex3)/+</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup>, chez lequel les cellules de la granulosa présentant non seulement une désinhibition de la voie PI3K/AKT, mais aussi une suractivation de la voie WNT/CTNNB1.


Mes degrés de contribution au design scientifique, au travail en laboratoire, à la synthèse des résultats et à la rédaction de cette première publication sont respectivement de 50%, 90%, 85% et 70%.

## **Première publication publiée en tant que premier auteur**

Synergistic effects of *Pten* loss and WNT/CTNNB1 signaling pathway activation in ovarian granulosa cell tumor development and progression

**Marie-Noëlle Laguë**<sup>1</sup>, Marilène Paquet<sup>2</sup>, Heng-Yu Fan<sup>3</sup>, M. Johanna Kaartinen<sup>4</sup>, Simon Chu<sup>5</sup>, Soazik P. Jamin<sup>6</sup>, Richard R. Behringer<sup>6</sup>, Peter J. Fuller<sup>5</sup>, Andrew Mitchell<sup>7</sup>, Monique Doré<sup>8</sup>, Louis M. Huneault<sup>4</sup>, JoAnne S. Richards<sup>3</sup> and Derek Boerboom<sup>1,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Centre de Recherche en Reproduction Animale, <sup>4</sup>Département des Sciences Cliniques and <sup>8</sup>Département de Pathologie et Microbiologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec J2S 7C6, Canada; <sup>2</sup>McGill Cancer Centre and Animal Resources Centre, McGill University, Montréal, Québec H3G 1Y6, Canada; <sup>3</sup>Department of Molecular and Cellular Biology, Baylor College of Medicine, One Baylor Plaza, Houston, Texas 77030, USA; <sup>5</sup>Prince Henry's Institute of Medical Research and the Department of Medicine, Monash University, Clayton, Victoria 3168, Australia; <sup>6</sup>Department of Molecular Genetics, University of Texas M.D. Anderson Cancer Center, Houston, Texas 77030, USA; and <sup>7</sup>Département de Pathologie, Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Montréal, Québec HIT 2M4, Canada.

\*To whom correspondence should be addressed. Tel: 450-773-8521; Fax: 450 778 8103; Email: 

**Publiée dans le journal *Carcinogenesis* en novembre 2008, volume 29, numéro 11, pages 2062-72.**

## Abstract

The mechanisms of granulosa cell tumor (GCT) development may involve the dysregulation of signaling pathways downstream of FSH, including the PI3K/AKT pathway. To test this hypothesis, a genetically engineered mouse model was created to derepress the PI3K/AKT pathway in granulosa cells by conditional targeting of the PI3K antagonist gene *Pten* (*Pten*<sup>flox/flox</sup>; *Amhr2*<sup>cre/+</sup>). The majority of *Pten*<sup>flox/flox</sup>; *Amhr2*<sup>cre/+</sup> mice featured no ovarian anomalies, but occasionally (~7%) developed aggressive, anaplastic GCT with pulmonary metastases. The expression of the PI3K/AKT downstream effector FOXO1 was abrogated in *Pten*<sup>flox/flox</sup>; *Amhr2*<sup>cre/+</sup> GCT, indicating a mechanism by which GCT cells may increase proliferation and evade apoptosis. To relate these findings to spontaneously-occurring GCT, analyses of PTEN and phospho-AKT expression were performed on human and equine tumors. Although PTEN loss was not detected, many GCT (2/5 human, 7/17 equine) featured abnormal nuclear or perinuclear localization of phospho-AKT, suggestive of altered PI3K/AKT activity. As inappropriate activation of WNT/CTNNB1 signaling causes late-onset GCT development and crosstalk between the PI3K/AKT and WNT/CTNNB1 pathways has been reported, we tested whether these pathways could synergize in GCT. Activation of both the PI3K/AKT and WNT/CTNNB1 pathways in the granulosa cells of a mouse model (*Pten*<sup>flox/flox</sup>; *Ctnnb1*<sup>flox(ex3)/+</sup>; *Amhr2*<sup>cre/+</sup>) resulted in the development of GCT similar to those observed in *Pten*<sup>flox/flox</sup>; *Amhr2*<sup>cre/+</sup> mice, but with 100% penetrance, perinatal onset, extremely rapid growth, and the ability to spread by seeding into the abdominal cavity. These data indicate a synergistic effect of dysregulated PI3K/AKT and WNT/CTNNB1 signaling in the development and progression of GCT, and provide the first animal models for metastatic GCT.

## Introduction

The granulosa cell tumor (GCT) is the most common neoplastic disease of the ovary in most domestic species (1). In women, GCT is the most prevalent of the sex cord/stromal tumors, and is thought to represent up to 5% of all ovarian cancers (2). Although GCT is often characterized as a low-grade malignancy, a large proportion of patients develop recurrences as late as 40 years after the initial diagnosis and treatment, and therefore fastidious long-term follow-up is required (3, 4).

Despite the importance and insidiousness of GCT, very little is known of its molecular etiology. Only a handful of reports have identified genetic or molecular lesions in GCT, and have generally provided little insight into the mechanisms of GCT development (5-8). Transgenic mouse models that overexpress luteinizing hormone (9), that express SV40 T-antigen in their granulosa cells (10, 11) and *Inha* knockout mice (12) all develop GCT, however it remains unclear if the molecular mechanisms of tumorigenesis in these animal models are related to those involved in GCT development in women and other species. Recently we have reported evidence that the WNT/CTNNB1 signaling pathway is dysregulated in many GCT, and that transgenic mice featuring constitutive activation of the WNT/CTNNB1 pathway in their granulosa cells (*Cttnb1*<sup>flox(ex3)/+</sup>; *Amhr2*<sup>cre/+</sup>) developed GCT with many histological similarities to the human disease (5). Interestingly, peripubertal *Cttnb1*<sup>flox(ex3)/+</sup>; *Amhr2*<sup>cre/+</sup> mice developed multiple pretumoral ovarian lesions consisting of follicle-like nests of granulosa cells whose growth was self-limiting (5, 13). Progression of these pretumoral lesions into GCT occurred in a stochastic manner after the age of 5 months, suggesting that while the activation of the WNT/CTNNB1 pathway in granulosa cells induces a premalignant state, it is rarely (if ever) sufficient by itself to cause GCT. Therefore, while these data represented a significant advance in our understanding of the molecular etiology of GCT, it is clear that additional factors and pathways must be involved.

A logical and frequently taken approach to identify genes involved in the etiology of GCT has been to search for mutations in genes normally involved in granulosa cell proliferation (6). As follicle-stimulating hormone (FSH) is a major growth factor of granulosa cells, several groups have sought to identify activating mutations in *Fshr* (14-16, 18) or in G protein subunits involved in transducing the FSH signal (19-21), but to little



avail. FSH signal transduction is thought to be mediated mainly via the protein kinase A (PKA) pathway (22), but a recent series of reports have revealed that FSH signaling is much more complex than previously suspected, and involves the activation of several signaling pathways (23). Notably, FSH can activate the phosphoinositide-3 kinase (PI3K)/AKT pathway through a mechanism which involves SRC family protein kinases, and may or may not involve PKA (Figure 1)(17, 23-25). Some of the molecular events downstream of PI3K/AKT activation by FSH in granulosa cells have been elucidated, and include the phosphorylation and nuclear export of the Forkhead family transcription factor FOXO1, and the activation of the protein kinase mammalian target of rapamycin (mTOR)(Figure 1) (23, 24). These events lead in turn to the modulation of the expression of FSH target genes, including *Ccnd2* and *Hif1a* (23). In addition to transducing a variety of physiological signals, the PI3K/AKT pathway is also known to contribute to the development of a large number of cancers when dysregulated, and many components of this pathway function either as tumor suppressor genes or proto-oncogenes (6, 26-28). Perhaps most notably, the tumor suppressor gene *PTEN* attenuates PI3K/AKT pathway activity by acting as a lipid phosphatase on phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate, and is frequently inactivated in several forms of cancer (28). Although the aforementioned data clearly indicate the potential involvement of the PI3K/AKT pathway in GCT development, no study of PI3K/AKT signaling in GCT has been reported thus far.

Another well-known downstream effector of the PI3K/AKT pathway is the protein kinase glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ )(29, 30). Activated AKT inhibits GSK3 $\beta$  by phosphorylation of an amino-terminal serine residue, thereby modulating various cellular processes including glycogen metabolism (31). One substrate of GSK3 $\beta$  is CTNNB1, a multifunctional protein that is both a structural component of cell-cell adhesion structures and an important signal transduction effector that is activated by the WNT family of signaling molecules (32). GSK3 $\beta$  is a negative regulator of CTNNB1, and acts by phosphorylating a series of amino-terminal serine and threonine residues, resulting in the later ubiquitination and degradation of CTNNB1 by the cellular proteosomal machinery (32). Phosphorylation of GSK3 $\beta$  by AKT therefore results in the hypophosphorylation, stabilization and accumulation of CTNNB1, which subsequently translocates to the cell nucleus and associates with various transcription factors to modulate the transcriptional activity of specific target genes (Figure 1). In addition to this indirect activation

mechanism, AKT has recently been shown to directly phosphorylate CTNNB1 at a distinct site, resulting in an increase in its transcriptional activity (33). Importantly, the transduction of WNT signaling also involves hypophosphorylation and stabilization of CTNNB1 (32). GSK3 $\beta$ /CTNNB1 therefore represents an important point of convergence and crosstalk between the PI3K/AKT and WNT/CTNNB1 pathways (Figure 1). Indeed, PI3K/AKT signaling is believed to employ the WNT/CTNNB1 pathway in this manner in several physiological and developmental contexts (34-38), as well as in the development and progression of several forms of cancer, including those of the mammary gland, prostate, liver and skin (30, 39-44). Although dysregulated WNT/CTNNB1 signaling is clearly involved in the pathogenesis of GCT (5, 13), whether the PI3K/AKT and WNT/CTNNB1 pathways can interact or synergize in GCT development or in normal physiological contexts in ovarian granulosa cells remains unknown.

The objective of this study was to investigate whether dysregulated PI3K/AKT signaling could be involved in GCT development. Transgenic *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> mice were created to constitutively derepress PI3K/AKT signaling in granulosa cells *in vivo*. *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> mice occasionally developed aggressive and metastatic GCT, demonstrating the importance of *Pten* loss in GCT development. Furthermore, concurrent *Pten* loss and activation of the WNT/CTNNB1 pathway in the granulosa cells of a second mouse model, *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Ctnnb1*<sup>flox(ex3)/+</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup>, resulted in the development of an even more aggressive GCT phenotype with 100% penetrance, demonstrating a synergistic effect of the genetic lesions. This study therefore offers important new insights into the etiology of GCT, and provides the first model systems for metastatic GCT.

## Materials and Methods

*Animals and genotype analyses.* Genetically modified animals were derived by selective breeding of the previously-described *Pten*<sup>fllox</sup>, *Ctnnb1*<sup>fllox(ex3)</sup> and *Amhr2*<sup>cre</sup> parental strains (45-47). Genotyping analyses for the *Amhr2*<sup>cre</sup> and *Ctnnb1*<sup>fllox(ex3)</sup> alleles were performed by PCR on DNA obtained from tail biopsies as previously described (47, 48). Mice bearing the *Pten*<sup>fllox</sup> allele were obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME), and DNA samples from tail biopsies, tumor samples or isolated whole ovaries were analyzed for *Pten* genotype by PCR as directed by the animal provider, except the following oligonucleotide primers were used: 5'-GATACTAGTAAGATAAAAACCAGTAGT-3', 5'-GTCACCCAGGCCTCTTGTCAAGT-3' and 5'-GCTTGATATCGAATTCCTGCAGC-3'. These primers produce PCR products of approximately 400bp for the wild-type *Pten* allele, 572bp for the floxed allele, and 290bp for the Cre-recombined allele. All animal procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee and were conform to the USPHS Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals.

*Immunohistochemistry.* Immunohistochemistry was performed on formalin-fixed, paraffin-embedded, 7µm tissue sections using VectaStain Elite avidin-biotin complex methods kits (Vector Labs, Burlingame, CA) as directed by the manufacturer, except incubation with primary antibodies was performed overnight at 4°C. The Vector M.O.M. Basic Kit was used whenever a mouse-derived primary antibody was applied to mouse tissues. Sections were probed with primary antibodies against PTEN or phospho(Ser473)-AKT (Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, catalog numbers 9559 and 4051, respectively) using the manufacturers suggested conditions. Staining was performed using the 3,3'-diaminobenzidine peroxidase substrate kit (Vector Labs) as directed, and slides were lightly counterstained with hematoxylin prior to mounting. Human and equine GCT samples consisted of archived, paraffin-embedded tumor fragments obtained during surgical resections at the University of Texas M.D. Anderson Cancer Center (Houston, TX), Hôpital Maisonneuve-Rosemont (Montréal, Québec, Canada), and the Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire de l'Université de Montréal (St. Hyacinthe, Québec, Canada). Normal human ovary samples (n = 4) were obtained from the same establishments as the GCT and were removed from premenopausal women undergoing

surgery for non-ovarian gynecologic conditions. Preovulatory equine follicular samples (n = 3) were obtained as previously described (49).

*Semi-quantitative RT-PCR.* Tissue samples used for RT-PCR analyses were distinct from those used for immunohistochemistry, and were obtained as previously described (50, 51). Reverse transcription was performed on 1µg RNA samples derived from human GCT or normal ovary as previously described (50, 51). PCR was then performed on 1% of the resulting cDNA samples using the oligonucleotide primers 5'-CATTTCAGTATAGAGCGTGCAGA -3' and 5'-TGTATGCTGATCTTCATCAAAAGGT -3' for *PTEN*, and 5'-GGAAGGTGAAGGTCGGAGTCAA -3' and 5'-CCAGCCTTCTCCATGGTGGTGA -3' for *GAPDH*. Cycling conditions were 94°C for 1 minute followed by 25 (*GAPDH*) or 30 cycles (*PTEN*) of 94°C for 30 seconds, 60°C for 1 minute, 72°C for 1 minute. Preliminary experiments were performed for *PTEN* and *GAPDH* to ensure that the cycle numbers selected fell within the linear range of PCR amplification (data not shown). A cDNA sample produced from luteinizing human granulosa cells isolated from patients undergoing *in vitro* fertilization procedures (a kind gift from Dr Bruce Murphy, Université de Montréal, Québec, Canada) was analyzed as for the GCT and ovarian samples described above. PCR products were separated by electrophoresis on 2% TAE-agarose gels containing ethidium bromide and photographed under UV light.

*Immunoblotting.* Granulosa cells were obtained for immunoblotting analysis from 20-26 day-old *Pten*<sup>flx/flx</sup> or *Pten*<sup>flx/flx</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> animals that had been given eCG (Folligon, Intervet, Whitby, Canada, 5 IU, i.p.) 48h prior to sacrifice, and cells were isolated using the needle puncture method as previously described (52). Granulosa cells from 3 mice were pooled to create samples of sufficient size for analyses, and protein extracts were obtained using M-PER mammalian protein extraction reagent (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) according to the manufacturer's instructions. *Pten*<sup>flx/flx</sup> ; *Amhr2*<sup>cre/+</sup> GCT protein samples were prepared as previously described (53), and all protein samples concentrations were quantified using the Bradford method. Samples (50µg) were resolved on 7.5-15% SDS-polyacrylamide gels and transferred to Hybond-P PVDF membrane (GE Amersham, Piscataway, NJ). Blots were then probed with antibodies against AKT, FOXO1, phospho(Ser256)-FOXO1, mTOR, phospho(Ser2448)-mTOR, GSK3β and phospho(Ser9)-GSK3β (Cell Signaling catalog

numbers 9272, 9462, 9461, 2972, 2971, 9315 and 9323 respectively), b-ACTIN (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, catalog number sc-47778), PTEN or phospho-AKT (described above) as directed by the manufacturer. Following incubation with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (GE Amersham), the protein bands were visualized by chemiluminescence using the ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (GE Amersham) and High Performance Chemiluminescence film (GE Amersham).

*Statistical methods.* Effects of genotype on number of concepti were analyzed by unpaired, two-tailed T-test. *P* values lower than 0.05 were considered statistically significant. Analyses were performed using Prism 4.0a software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

## Results

*Lack of ovarian anomalies in most  $Pten^{flox/flox};Amhr2^{cre/+}$  mice.* To study the potential role of dysregulated PI3K/AKT signaling in GCT development, a conditional gene targeting strategy was devised to constitutively derepress the PI3K/AKT pathway in the granulosa cells of mice. Mice bearing a floxed *Pten* allele (45) were mated to a strain in which the *Cre* transgene had been knocked-in to the *Amhr2* locus (46). The resulting  $Pten^{flox/flox};Amhr2^{cre/+}$  mice would therefore be predicted to bear null mutations of *Pten* in their granulosa cells, resulting in derepression of PI3K/AKT pathway activity. Unexpectedly, the vast majority of female  $Pten^{flox/flox};Amhr2^{cre/+}$  mice showed no morphological or functional ovarian anomalies. Histopathological examination of ovaries between the time of birth and 1 year of age revealed no differences between  $Pten^{flox/flox};Amhr2^{cre/+}$  and  $Pten^{flox/flox}$  controls (Figure 2A and data not shown). Furthermore,  $Pten^{flox/flox};Amhr2^{cre/+}$  females could establish pregnancies, and no significant differences in numbers of concepti were noted by day 9.5 pc relative to controls ( $7.0 \pm 0.58$  in  $Pten^{flox/flox};Amhr2^{cre/+}$  vs  $7.5 \pm 0.65$   $Pten^{flox/flox}$ ,  $n = 4$ , mean  $\pm$  SEM,  $P > 0.05$ ), suggesting that follicle development and growth, ovulation, and formation and function of the corpus luteum were all normal in  $Pten^{flox/flox};Amhr2^{cre/+}$  mice. However, many  $Pten^{flox/flox};Amhr2^{cre/+}$  mice failed to carry pregnancies to term or had small litters due to fetal death after day 9.5 pc. Serum progesterone measurements throughout pregnancy failed to show differences between  $Pten^{flox/flox};Amhr2^{cre/+}$  mice and controls (M.N. Laguë, J.S. Richards and D. Boerboom, unpublished observations), suggesting that fetal loss was most likely due to an extra-ovarian defect.

To explain the lack of an ovarian phenotype in  $Pten^{flox/flox};Amhr2^{cre/+}$  mice, the efficiency of the *Cre*-mediated genetic recombination process was assessed by PCR genotyping analyses performed on DNA isolated from whole ovaries. Results showed the presence of low but detectable levels of the recombined *Pten* allele in ovarian DNA from  $Pten^{flox/flox};Amhr2^{cre/+}$  mice, but not from  $Pten^{flox/flox}$  controls (Figure 2B). This low efficiency of genetic recombination resulted in no appreciable changes in PTEN or phospho-AKT protein levels in  $Pten^{flox/flox};Amhr2^{cre/+}$  granulosa cells, as determined by immunoblotting (Figure 2C and data not shown). However, immunohistochemical analyses revealed the presence of rare granulosa cells that expressed elevated levels of

phospho-AKT, which were not observed in the ovaries of *Pten*<sup>flx/flx</sup> controls (Figure 2D). Together, these results indicated that recombination of the floxed *Pten* allele was inefficient in *Pten*<sup>flx/flx</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> granulosa cells, and was not sufficient to induce ovarian granulosa cell tumorigenesis in most cases.

*Rare Pten*<sup>flx/flx</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> mice develop aggressive GCT. Despite the apparent lack of consequence of the loss of *Pten* expression in most *Pten*<sup>flx/flx</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> mice, 5 of the 70 (~7%) female *Pten*<sup>flx/flx</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> mice that we generated in the context of this study developed ovarian tumors (Figure 3A). Of the five animals, two were diagnosed postmortem, having presumably died from the effects of the tumors. Tumors were bilateral in four of the five mice, ages at diagnosis varied from 7 weeks to 7 months, and all but one mouse were virginal. Histopathological examination of the tumors revealed them to be GCT. The cells within the GCT were arranged in either a solid or trabecular pattern, and both patterns were found in most tumors (Figure 3B, C). Interestingly, two distinct tumor cell populations were found within the tumors, one being characterized by a higher degree of anaplasia than the other, and the GCT apparently consisted of clonal expansions of both cell types (Figure 3D). Numerous areas of osseous metaplasia and cystic structures were also found in all tumors (Figure 3E and data not shown). Histopathological analyses of all tissues from *Pten*<sup>flx/flx</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> mice bearing GCT revealed the presence of nests of tumor cells in the lungs of all affected animals. Although most of these consisted of tumor cell embolisms (i.e., still contained within a distended vascular structure), some were metastases, with clear invasion of the pulmonary parenchyma (Figure 3F, G). All emboli and metastases consisted exclusively of the more highly anaplastic cell type identified in the ovarian tumors, further indicating the more malignant phenotype of this cell type (Figure 3H). Occasional cystic areas, necrosis and osseous metaplasia were also observed within the emboli and metastases (data not shown). No tumor cells were detected in the lungs of *Pten*<sup>flx/flx</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> control mice that had not developed ovarian tumors. These data demonstrate that *Pten* loss can lead to metastatic granulosa cell tumor development, and therefore plays a central role in the pathogenesis of GCT.

*Altered PI3K/AKT signaling in Pten*<sup>flx/flx</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> GCT. To study the signaling mechanisms underlying GCT development *Pten*<sup>flx/flx</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> in mice, immunoblotting was performed comparing the expression of PTEN and various PI3K/AKT pathway

effectors in  $Pten^{flx/flx};Amhr2^{cre/+}$  GCT to control granulosa cells from antral follicles. Unexpectedly, AKT phosphorylation in GCT was not increased, but rather was lower relative to granulosa cell controls, in spite of efficient recombination of the floxed  $Pten$  alleles (Figure 2B) and drastically decreased PTEN expression (Figure 4). Decreased phospho-AKT expression in  $Pten^{flx/flx};Amhr2^{cre/+}$  GCT was confirmed by immunohistochemistry (Supplemental Figure 1), and phospho-AKT levels were comparable in the low and high anaplasia tumor cell types. Phosphorylation of the PI3K/AKT effector mTOR was detected at low levels in  $Pten^{flx/flx};Amhr2^{cre/+}$  GCT samples but not in granulosa cells (Figure 4), suggestive of increased signaling via the PI3K/AKT/mTOR pathway. In addition, levels of the mTOR protein itself were also greatly increased in  $Pten^{flx/flx};Amhr2^{cre/+}$  GCT. Conversely, phosphorylation of GSK3 $\beta$  was essentially undetectable in either  $Pten^{flx/flx};Amhr2^{cre/+}$  GCT samples or in granulosa cells (Figure 4), suggesting that GSK3 $\beta$  is not a target of AKT in either cell type and that crosstalk with the WNT/CTNNB1 pathway is not involved in tumorigenesis in the  $Pten^{flx/flx};Amhr2^{cre/+}$  model. Indeed, levels of GSK3 $\beta$  expression were considerably higher in  $Pten^{flx/flx};Amhr2^{cre/+}$  GCT than in granulosa cells, potentially resulting in greater repression of WNT/CTNNB1 signaling. No increase in phospho-FOXO1 levels was found in  $Pten^{flx/flx};Amhr2^{cre/+}$  GCT relative to normal granulosa cells, and in fact phospho-FOXO1 was virtually undetectable by western blotting in all tumor samples analyzed (Figure 4). This was attributed to a dramatic loss of FOXO1 expression in GCT (Figure 4). The proteosomal degradation of FOXO1 has been previously shown to occur in response to chronic activation of the PI3K/AKT pathway in transformed cells (54). Our results therefore suggest that loss of PTEN expression in  $Pten^{flx/flx};Amhr2^{cre/+}$  GCT alters PI3K/AKT pathway activity, and that its signal may be transduced via both mTOR and FOXO1.

*Abnormal subcellular localization of phospho-AKT occurs in many human and equine GCT.* To assess whether dysregulated PI3K/AKT pathway activity occurs in spontaneously-occurring GCT, a panel of human and equine GCT were analyzed for PTEN expression by immunohistochemistry. While PTEN abundance was very low in all GCT samples examined, similar results were also obtained in normal granulosa cells at all stages of follicular development (Figure 5B and data not shown), precluding any meaningful comparisons. It was therefore decided to evaluate *PTEN* expression by a more sensitive



RT-PCR approach. *PTEN* mRNA was readily detectable in all human GCT samples examined (n = 6), and at levels comparable to those found in normal ovarian samples (n = 5) or isolated luteinizing granulosa cells (Figure 5C). We were thus unable to detect a gross loss of *PTEN* expression in our tumor samples. Immunohistochemical analyses of phospho-AKT expression in our GCT panel showed levels of phospho-AKT in all GCT samples to be qualitatively comparable to the levels found in granulosa cells in normal human and equine ovarian follicles (Figure 5A). However, the subcellular localization of phospho-AKT was often abnormal in the tumor samples. Specifically, 2 of 5 human GCT samples showed a striking perinuclear localization of phospho-AKT, while 7 of 17 equine GCT samples showed markedly elevated levels of nuclear phospho-AKT expression (Figure 5A). Although the biological significance of nuclear localization of phospho-AKT remains unclear, it has been reported in a variety of human cancers, and may correlate in some cases with disease progression (27). These data therefore suggest that abnormal PI3K/AKT signaling occurs in many spontaneously-occurring GCT, and may be an important factor in human and equine GCT development.

*Pten<sup>flox/flox</sup>;Ctnnb1<sup>flox(ex3)/+</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* mice develop early-onset metastatic GCT.

Interactions between the PI3K/AKT and WNT/CTNNB1 pathways have been reported in several forms of cancer (30, 39-44). In addition, we have previously reported that WNT/CTNNB1 signaling is dysregulated in many GCT, and that genetically engineered mice that feature constitutive activation of the WNT/CTNNB1 pathway in their granulosa cells (*Ctnnb1<sup>flox(ex3)/+</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>*) develop premalignant ovarian lesions that often evolve into GCT after the age of 5 months (5). We therefore decided to determine if the PI3K/AKT and WNT/CTNNB1 pathways could interact in GCT development. To this end, a mouse model (*Pten<sup>flox/flox</sup>;Ctnnb1<sup>flox(ex3)/+</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>*) was designed to obtain concurrent constitutive activation of both pathways in granulosa cells. These mice developed GCT similar to those observed in *Pten<sup>flox/flox</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* mice at the gross and histological levels, including solid and trabecular histological patterns, variable degrees of anaplasia, and foci of ossification (Figure 6A, B and data not shown). However, *Pten<sup>flox/flox</sup>;Ctnnb1<sup>flox(ex3)/+</sup>;Amhr2<sup>cre/+</sup>* mice developed bilateral tumors with 100% penetrance from a very early age. Histopathological analyses revealed the presence of nests of dysplastic cells in the ovaries of newborn mice (Figure 6C) and e20.5 embryos, but not in those from mice on e18.5 (not shown), indicating that tumor growth began

perinatally in *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Ctnnb1*<sup>flox(ex3)/+</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> mice. The disease then followed a very regular and predictable course (Supplemental Figure 2), with abdominal distension becoming evident by 5 wks of age and severe by 7wks, with tumor diameters surpassing 2cm. Death occurred before 9wks of age (n=3), possibly due to severe anemia (as evidenced by low hematocrit and extensive extramedullary hematopoiesis), complicated by pressure from the tumors on the diaphragm and digestive tract and causing impaired venous return. *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Ctnnb1*<sup>flox(ex3)/+</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> mice also had pulmonary tumor cell embolisms (Figure 6D), but metastases were not observed, possibly due to insufficient time for the metastases to form due to the rapid and fatal course of the disease. To test this hypothesis, the GCT were surgically removed from five 6 week-old *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Ctnnb1*<sup>flox(ex3)/+</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> mice, and their lungs submitted for histopathological analysis 6 to 16 weeks postoperatively. All of these mice showed development of large lung metastases (Fig 6E), confirming the metastatic properties of *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Ctnnb1*<sup>flox(ex3)/+</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> tumor cells. In addition to forming pulmonary metastases, the more aggressive forms of human GCT also frequently spread by seeding of exfoliated tumor cells into the peritoneal cavity (2). To test if *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Ctnnb1*<sup>flox(ex3)/+</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> tumor cells could also behave in this manner, the GCT of 5 additional 6 week-old mice were removed, and cells (~1mm<sup>3</sup>) were scraped from the surface of the excised tumors, suspended in saline and injected into the peritoneal cavity following the closure of the abdominal wall. *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Ctnnb1*<sup>flox(ex3)/+</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> mice with injected tumor cells were then sacrificed 6 to 9 weeks postoperatively and their tissues submitted for histopathological analyses. In addition to lung tumor cell emboli and metastases, these mice had multiple abdominal tumors invading the mesentery, peritoneum and abdominal muscles (Fig 6F and data not shown). The invasion and replacement of pancreatic tissue by tumor cells was also observed in one case, as were adrenal and liver metastases (Fig 6G, H and data not shown). These data therefore indicate that *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Ctnnb1*<sup>flox(ex3)/+</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> GCT cells are able to directly seed and colonize the pelvis and upper abdomen, in addition to forming pulmonary metastases.

## Discussion

Meaningful insight into the molecular etiology of GCT have been frustratingly elusive. Not only are genes that are commonly mutated in many neoplasia apparently not

involved in the pathogenesis of GCT (such as *TP53* and *WT1*), little evidence has been obtained of hyperactivation in GCT of signaling pathways normally involved in granulosa cell proliferation, despite many attempts (6-8). However, ongoing advances in our understanding of granulosa cell biology and the molecular mechanisms underlying their growth and differentiation are providing new avenues for the investigation of GCT development. For instance, the recent findings that WNT signaling is crucial for the normal embryonic development of the ovary (55, 56) prompted our discovery that the WNT/CTNNB1 signaling pathway is dysregulated in many GCT, and that constitutive activation of the WNT/CTNNB1 pathway in granulosa cells causes GCT development in *Ctnnb1*<sup>flox(ex3)/+</sup>; *Amhr2*<sup>cre/+</sup> mice (5, 13). In a similar manner, the present study of the PI3K/AKT pathway in GCT was inspired by recent reports indicating that FSH signals via this pathway (23, 57). Our finding that *Pten*<sup>flox/flox</sup>; *Amhr2*<sup>cre/+</sup> mice develop GCT provides novel and powerful evidence that dysregulation of the PI3K/AKT pathway plays a major role in the pathogenesis of GCT. Furthermore, the metastatic phenotype observed in the *Pten*<sup>flox/flox</sup>; *Amhr2*<sup>cre/+</sup> model is unique among the previously reported transgenic mouse models of GCT (5-8). Human GCT can metastasize to the lung and to bone (2), but the genetic and molecular mechanisms underlying the acquisition of the metastatic phenotype in these tumors has not been studied. The *Pten*<sup>flox/flox</sup>; *Amhr2*<sup>cre/+</sup> model therefore provides the first insights into the signaling pathways involved in GCT progression.

Another important finding of this study is the synergistic interaction of the PI3K and WNT/CTNNB1 pathways in GCT development. Constitutive activation of the WNT/CTNNB1 pathway in the granulosa cells of *Ctnnb1*<sup>flox(ex3)/+</sup>; *Amhr2*<sup>cre/+</sup> mice results in a premalignant phenotype wherein follicle-like nests of disorganized granulosa cells appear in the ovaries of peripubertal mice, grow to the size of small antral follicles and then persist for the rest of the life of the animal (5, 13). These premalignant lesions often develop into GCT, but only later in life, indicating that activation of the WNT/CTNNB1 pathway is a powerful initiator of granulosa cell tumorigenesis, but may be insufficient in and of itself to cause GCT to form. Conversely, the rarity of GCT formation in *Pten*<sup>flox/flox</sup>; *Amhr2*<sup>cre/+</sup> mice, in addition to the aggressive nature of their GCT phenotype, suggest that activation of the PI3K/AKT pathway may be more involved in the progression of the GCT disease, but is rarely able to initiate it. The synergy between the PI3K/AKT and WNT/CTNNB1 pathways observed in the *Pten*<sup>flox/flox</sup>; *Ctnnb1*<sup>flox(ex3)/+</sup>; *Amhr2*<sup>cre/+</sup> model

could therefore be understood as a complementarity between pathways involved in tumor initiation (i.e. WNT/CTNNB1) and progression (i.e. PI3K/AKT). Importantly, the *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Ctnnb1*<sup>flox(ex3)/+</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> model features many of the morphological and functional characteristics of the most aggressive forms of human GCT disease, including lung metastasis tropism and the ability to spread by seeding into the peritoneal cavity. This suggests that the molecular mechanisms underlying *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Ctnnb1*<sup>flox(ex3)/+</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> tumorigenesis may be very similar to those involved in the advanced human disease. Particularly considering the predictable and repeatable nature of tumor development in *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Ctnnb1*<sup>flox(ex3)/+</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> mice, we therefore propose that they could serve as an important preclinical model for advanced GCT, and could notably aid in the development of therapeutic interventions.

Loss of PTEN expression normally relieves an inhibition of PI3K activity, resulting in a sustained hyperphosphorylation of AKT in response to various stimuli. Our finding of decreased levels of AKT phosphorylation in *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> GCT relative to normal granulosa cells is therefore paradoxical. We propose that this may be due to the chronic nature of the activation of the PI3K/AKT pathway in our model, which could eventually lead to a cellular adaptive response that downregulates AKT phosphorylation, such as by increasing phosphatase activity. Indeed, the finding that FOXO1 expression is lost in *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> GCT supports this notion, as this is known to occur as a result of sustained PI3K/AKT pathway activation (54). FOXO1 is thought to act as a tumor suppressor in certain contexts, and loss of FOXO1 function may play a significant role in certain cancers such as alveolar rhabdomyosarcoma (58). FOXO1 has been implicated in many physiological processes, including the regulation of cell cycle progression and apoptosis (58). It therefore seems reasonable to propose that the loss of FOXO1 protein that we observed in *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> GCT could be a major mechanism by which GCT cells acquire an increased rate of proliferation and evade apoptosis. In addition to FOXO1, a large number of AKT substrates have been identified in several cell types, including BAD, caspase-9 and Mdm2 (59). Additional work will be required in order to determine if these or other effectors are involved in the pathogenesis of GCT in *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> mice.

The molecular mechanisms explaining the synergy between the PI3K and WNT/CTNNB1 pathways in *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Ctnnb1*<sup>flox(ex3)/+</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> mice remain

unresolved. Activated AKT is well known to enhance WNT/CTNNB1 pathway activity by inhibiting GSK3 $\beta$  activity, resulting in the hypophosphorylation, stabilization and nuclear translocation of CTNNB1 (30, 34-44)(Figure 1). However, in the *Ctnnb1*<sup>lox(ex3)</sup> model, WNT/CTNNB1 pathway activation is achieved by excision of the third exon of *Ctnnb1* by *Cre* recombinase (47). The recombined *Ctnnb1*<sup>lox(ex3)</sup> allele expresses a mutant CTNNB1 protein that, while still fully functional, lacks the N-terminal sites that are normally phosphorylated by GSK3 $\beta$  and that are required for its degradation (47). Therefore, in *Pten*<sup>lox/lox</sup>;*Ctnnb1*<sup>lox(ex3)/+</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> mice, mutant CTNNB1 cannot be further activated by inhibition of GSK3 $\beta$  by AKT, indicating that a different mechanism must mediate the putative interaction between the PI3K and WNT/CTNNB1 pathways. One possibility is that AKT has recently been shown to directly enhance CTNNB1 transcriptional activity by phosphorylation at a distinct site (Ser552), which is still present in the mutant CTNNB1 protein produced by the recombined *Ctnnb1*<sup>lox(ex3)</sup> allele (33). It is also possible that no direct crosstalk exists between the PI3K and WNT/CTNNB1 pathways in *Pten*<sup>lox/lox</sup>;*Ctnnb1*<sup>lox(ex3)/+</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> GCT, and that the observed synergy in GCT development is simply the cumulative effect of each pathway's activation on its own discrete set of downstream effectors. Further experiments will be required to explore these non-mutually exclusive theories.

Our preliminary finding of abnormal subcellular localization of phospho-AKT in a subset of human and equine GCT suggests that dysregulation of PI3K/AKT signaling occurs in spontaneous-occurring GCT. It remains to be determined if this dysregulation is a cause or a consequence of tumor development, what the causative genetic lesion(s) might be, and what its relatedness may be to what occurs in the *Pten*<sup>lox/lox</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> model. We were unable to demonstrate loss of *PTEEN* expression in human GCT, however our analyses were limited by the relatively small sample size available, and that the technique that we employed could only detect gross loss of *PTEEN* mRNA expression, providing no information on protein levels or function. Additional analyses will therefore be required to rule out *PTEEN* loss as a mechanism for PI3K/AKT dysregulation in GCT. It should however be noted that other components of the PI3K/AKT pathway, including *AKT2* and both the regulatory and catalytic subunits of PI3K, are also frequently mutated or amplified in many human cancers (60). Furthermore, a growing number of oncogenic signaling processes are now known to activate the PI3K/AKT pathway, including mechanisms

involving Ras, p53 and DJ1 (61, 62), any or all of which could also contribute to dysregulation of PI3K/AKT activity in GCT. It therefore seems unlikely that simple loss of *PTEN* expression will explain all cases of dysregulated PI3K/AKT signaling in GCT, and considerable effort will be required to properly investigate this process.

The infertility phenotype observed in *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> mice remains an area of ongoing investigation. Although pregnancy loss could be attributable to a primary ovarian defect, our preliminary serum progesterone measurements suggest that corpus luteum function is unaffected in *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> mice. Furthermore, we have mated *Pten*<sup>flox/flox</sup> mice to a transgenic strain in which the *Cre* gene is fused to the FSH receptor promoter (*Fshr-Cre*), and that is thought to express Cre in granulosa cells exclusively (63). The resulting *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*TgFshr-Cre* mice have normal fertility and are apparently devoid of uterine defects (M.N. Laguë, L. Dubeau and D. Boerboom, unpublished observations), further suggesting that the fertility issues of *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> mice can be attributed to an extra-ovarian defect. Importantly, the *Amhr2*<sup>cre</sup> allele has recently been shown to target Cre-mediated recombination to the developing myometrium (64, 65), indicating that loss of myometrial *Pten* expression could be the primary cause of pregnancy loss in *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup>. If true, the *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> model could therefore help define novel roles for *Pten* and PI3K/AKT signaling in uterine physiology and pregnancy.

In summary, this study reports for the first time the role of dysregulated PI3K/AKT signaling in GCT development, as well as evidence that the PI3K/AKT and WNT/CTNNB1 pathways can interact in a synergistic manner to cause granulosa cell tumorigenesis. The two novel animal models described herein, *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> and *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Ctnnb1*<sup>flox(ex3)/+</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup>, represent the first models for metastatic GCT, and provide the first true insights into the molecular mechanisms of GCT progression.

## Funding

Canadian Institutes of Health Research operating grant and the Canada Research chair in Ovarian Molecular Biology and Functional Genomics (D. Boerboom); NIH grants HD16272 (J.S. Richards), HD07495 (J.S. Richards), and HD30284 (R.R. Behringer); and Lalor Foundation Fellowship (S.P. Jamin).

## **Acknowledgements**

We thank Céline Forget for technical assistance with mouse colony management and genotyping assays, Dr Jinsong Liu (University of Texas M.D. Anderson Cancer Center, Houston, Texas) for providing several of the fixed human GCT and ovary samples used in this study, Dr Jean Sirois (Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada) for providing the fixed equine ovary samples and for generous sharing of laboratory space and reagents, and Dr Danila Campos (Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada) for assistance in obtaining the human granulosa cell sample.

## References

1. Jubb, K.V.F., Kennedy, P.C. and Palmer N. (1993) *Pathology of domestic animals (4th ed.)*. American Press, San Diego, CA.
2. Schumer, S.T. and Cannistra S.A. (2003) Granulosa cell tumor of the ovary. *J. Clin. Oncol.*, **21**, 1180–1189.
3. VILLELLA, J., Herrmann, F.R., Kaul, S. *et al.* (2007) Clinical and pathological predictive factors in women with adult-type granulosa cell tumor of the ovary. *Int. J. Gynecol. Pathol.*, **26**, 154-159.
4. East, N., Alobaid, A., Goffin, F., Ouallouche, K., Gauthier, P. (2005) Granulosa cell tumour: a recurrence 40 years after initial diagnosis. *J. Obstet. Gynaecol. Can.*, **27**, 363-364.
5. Boerboom, D., Paquet, M., Hsieh, M. *et al.* (2005) Misregulated Wnt/beta-catenin signaling leads to ovarian granulosa cell tumor development. *Cancer. Res.*, **65**, 9206-9215.
6. Fuller, P.J., Chu, S. (2004) Signalling pathways in the molecular pathogenesis of ovarian granulosa cell tumours. *Trends Endocrinol. Metab.*, **15**, 122–128.
7. Alexiadis, M., Mamers, P., Chu, S. and Fuller, P.J. (2006) Insulin-like growth factor, insulin-like growth factor-binding protein-4, and pregnancy-associated plasma protein-A gene expression in human granulosa cell tumors. *Int. J. Gynecol. Cancer*, **16**, 1973-1979.
8. Jamieson, S., Alexiadis, M. and Fuller, P.J. (2004) Expression status and mutational analysis of the ras and B-raf genes in ovarian granulosa cell and epithelial tumors. *Gynecol. Oncol.*, **95**, 603-609.
9. Risma, K.A., Clay, C.M., Nett, T.M., Wagner, T., Yun, J. and Nilson, J.H. (1995) Targeted overexpression of luteinizing hormone in transgenic mice leads to infertility, polycystic ovaries, and ovarian tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 1322-1326.
10. Kananen, K., Markkula, M., Rainio, E., Su, J.G., Hsueh, A.J. and Huhtaniemi, I.T. (1995) Gonadal tumorigenesis in transgenic mice bearing the mouse inhibin alpha-subunit promoter/simian virus T-antigen fusion gene: characterization of ovarian tumors and establishment of gonadotropin-responsive granulosa cell lines. *Mol. Endocrinol.*, **9**, 616-627.



11. Garson, K., Macdonald, E., Dube, M., Bao, R., Hamilton, T.C. and Vanderhyden, B.C. (2003) Generation of tumors in transgenic mice expressing the SV40 T antigen under the control of ovarian-specific promoter 1. *J. Soc. Gynecol. Investig.*, **10**, 244-250.
12. Matzuk, M.M., Finegold, M.J., Su, J.G., Hsueh, A.J. and Bradley, A. (1992) Alpha-inhibin is a tumour-suppressor gene with gonadal specificity in mice. *Nature*, **360**, 313-319.
13. Boerboom, D., White, L.D., Dalle, S., Courty, J. and Richards, J.S. (2006) Dominant-stable beta-catenin expression causes cell fate alterations and Wnt signaling antagonist expression in a murine granulosa cell tumor model. *Cancer Res.*, **66**, 1964-1973.
14. Fuller, P.J., Verity, K., Shen, Y., Mamers, P., Jobling, T. and Burger, H.G. (1998) No evidence of a role for mutations or polymorphisms of the follicle-stimulating hormone receptor in ovarian granulosa cell tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **83**, 274-279.
15. Hussein, S., Chu, S. and Fuller, P.J. (1999) Comment on analysis of mutations in genes of the follicle-stimulating hormone receptor in ovarian granulosa cell tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **84**, 3852.
16. Kotlar, T.J., Young, R.H., Albanese, C., Crowley, W.F. Jr., Scully, R.E. and Jameson, J.L. (1997) A mutation in the follicle-stimulating hormone receptor occurs frequently in human ovarian sex cord tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **82**, 1020-1026.
17. Wayne, C.M., Fan, H.Y., Cheng, X. and Richards, J.S. (2007) Follicle-stimulating hormone induces multiple signaling cascades: evidence that activation of Rous sarcoma oncogene, RAS, and the epidermal growth factor receptor are critical for granulosa cell differentiation. *Mol. Endocrinol.*, **21**, 1940-1957.
18. Giacaglia, L.R., Kohek, M.B. da F., Carvalho, F.M., Fragoso, M.C., Mendonca, B. and Latronico, A.C. (2000) No evidence of somatic activating mutations on gonadotropin receptor genes in sex cord stromal tumors. *Fertil. Steril.*, **74**, 992-995.
19. Shen, Y., Mamers, P., Jobling, T., Burger, H.G. and Fuller, P.J. (1996) Absence of the previously reported G protein oncogene (gip2) in ovarian granulosa cell tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **81**, 4159-4161.
20. Fragoso, M.C., Latronico, A.C., Carvalho, F.M. *et al.* (1998) Activating mutation of the stimulatory G protein (gsp) as a putative cause of ovarian and testicular human stromal Leydig cell tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **83**, 2074-2078.

21. Ligtenberg, M.J., Siers, M., Themmen, A.P. *et al.* (1999) Analysis of mutations in genes of the follicle-stimulating hormone receptor signaling pathway in ovarian granulosa cell tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **84**, 2233-2234.
22. Richards, J.S. (1994) Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocr. Rev.*, **15**, 725-751.
23. Hunzicker-Dunn, M. and Maizels, E.T. (2006) FSH signaling pathways in immature granulosa cells that regulate target gene expression: branching out from protein kinase A. *Cell. Signal.*, **18**, 1351-1359.
24. Richards, J.S., Sharma, S.C., Falender, A.E. and Lo, Y.H. (2002) Expression of FKHR, FKHRL1, and AFX genes in the rodent ovary: evidence for regulation by IGF-I, estrogen, and the gonadotropins. *Mol. Endocrinol.*, **16**, 580-599.
25. Ongeri, E.M., Verderame, M.F. and Hammond, J.M. (2005) Follicle-stimulating hormone induction of ovarian insulin-like growth factor-binding protein-3 transcription requires a TATA box-binding protein and the protein kinase A and phosphatidylinositol-3 kinase pathways. *Mol. Endocrinol.* **19**, 1837-1848.
26. Dillon, R.L., White, D.E. and Muller, W.J. (2007) The phosphatidyl inositol 3-kinase signaling network: implications for human breast cancer. *Oncogene*, **26**, 1338-1345.
27. Martelli, A.M., Faenza, I., Billi, A.M. *et al.* (2006) Intranuclear 3'-phosphoinositide metabolism and Akt signaling: new mechanisms for tumorigenesis and protection against apoptosis? *Cell. Signal.*, **18**, 1101-1107.
28. Chow, L.M. and Baker, S.J. (2006) PTEN function in normal and neoplastic growth. *Cancer. Lett.*, **241**, 184-196.
29. Cross, D.A., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovich, M. and Hemmings, B.A. (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*, **378**, 785-789.
30. Desbois-Mouthon, C., Cadoret, A., Blivet-Van Eggelpoel, M.J. *et al.* (2001) Insulin and IGF-1 stimulate the beta-catenin pathway through two signalling cascades involving GSK-3beta inhibition and Ras activation. *Oncogene*, **20**, 252-259.
31. Weston, C.R. and Davis, R.J. Signal transduction: signaling specificity- a complex affair. *Science*, **292**, 2439-2440.
32. Nusse, R. (2005) Wnt signaling in disease and in development. *Cell. Res.*, **15**, 28-32.

33. Fang, D., Hawke, D., Zheng, Y. *et al.* (2007) Phosphorylation of beta-catenin by AKT promotes beta-catenin transcriptional activity. *J. Biol. Chem.*, **282**, 11221-11229.
34. Naito, A.T., Akazawa, H., Takano, H., *et al.* Phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway plays a critical role in early cardiomyogenesis by regulating canonical Wnt signaling. *Circ. Res.*, **97**, 144-151.
35. Dash, P.R., Whitley, G.S., Ayling, L.J., Johnstone, A.P. and Cartwright, J.E. (2005) Trophoblast apoptosis is inhibited by hepatocyte growth factor through the Akt and beta-catenin mediated up-regulation of inducible nitric oxide synthase. *Cell. Signal.*, **17**, 571-580.
36. Tian, Q., He, X.C., Hood, L. and Li, L. (2005) Bridging the BMP and Wnt pathways by PI3 kinase/Akt and 14-3-3zeta. *Cell. Cycle*, **4**, 215-216.
37. Rochat, A., Fernandez, A., Vandromme, M. *et al.* (2004) Insulin and wnt1 pathways cooperate to induce reserve cell activation in differentiation and myotube hypertrophy. *Mol. Biol. Cell.*, **15**, 4544-4555.
38. Haq, S., Michael, A., Andreucci, M. *et al.* (2003) Stabilization of beta-catenin by a Wnt-independent mechanism regulates cardiomyocyte growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**, 4610-4615.
39. Larue, L. and Bellacosa, A. (2005) Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. *Oncogene*, **24**, 7443-7454.
40. Katoh, M. and Katoh, M. (2006) Cross-talk of WNT and FGF signaling pathways at GSK3beta to regulate beta-catenin and SNAIL signaling cascades. *Cancer Biol. Ther.*, **5**, 1059-1064.
41. Mulholland, D.J., Dedhar, S., Wu, H. and Nelson, C.C. (2006) PTEN and GSK3beta: key regulators of progression to androgen-independent prostate cancer. *Oncogene*, **25**, 329-337.
42. Satyamoorthy, K., Li, G., Vaidya, B., Patel, D. and Herlyn, M. (2001) Insulin-like growth factor-1 induces survival and growth of biologically early melanoma cells through both the mitogen-activated protein kinase and beta-catenin pathways. *Cancer Res.*, **61**, 7318-7324.

43. Wang, Y., Lam, J.B., Lam, K.S. *et al.* (2006) Adiponectin modulates the glycogen synthase kinase-3 $\beta$ /beta-catenin signaling pathway and attenuates mammary tumorigenesis of MDA-MB-231 cells in nude mice. *Cancer Res.*, **66**, 11462-11470.
44. Zhao, H., Cui, Y., Dupont, J., Sun, H., Hennighausen, L. and Yakar, S. (2005) Overexpression of the tumor suppressor gene phosphatase and tensin homologue partially inhibits wnt-1-induced mammary tumorigenesis. *Cancer Res.*, **65**, 6864-6873.
45. Groszer, M., Erickson, R., Scripture-Adams, D.D. *et al.* (2001) Negative regulation of neural stem/progenitor cell proliferation by the Pten tumor suppressor gene in vivo. *Science*, **294**, 2186-2189.
46. Jamin, S.P., Arango, N.A., Mishina, Y., Hanks, M.C. and Behringer, R.R. (2002) Requirement of Bmpr1a for Mullerian duct regression during male sexual development. *Nat. Genet.*, **32**, 408-410.
47. Harada, N., Tamai, Y., Ishikawa, T. *et al.* (1999) Intestinal polyposis in mice with a dominant stable mutation of the beta-catenin gene. *EMBO. J.*, **18**, 5931-5942.
48. Jorgez, C.J., Klysik, M., Jamin, S.P., Behringer, R.R. and Matzuk, M.M. (2004) Granulosa cell-specific inactivation of follistatin causes female fertility defects. *Mol. Endocrinol.*, **18**, 953-967.
49. Boerboom, D. and Sirois, J. (1998) Molecular characterization of equine prostaglandin G/H synthase-2 and regulation of its messenger ribonucleic acid in preovulatory follicles. *Endocrinology*, **139**, 1662-1670.
50. Chu, S., Nishi, Y., Yanase, T., Nawata, H. and Fuller, P.J. (2004) Transrepression of estrogen receptor beta signaling by nuclear factor-kappaB in ovarian granulosa cells. *Mol. Endocrinol.*, **18**, 1919-1928.
51. Chu, S., Mamers, P., Burger, H.G. and Fuller, P.J. (2000) Estrogen receptor isoform gene expression in ovarian stromal and epithelial tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **85**, 1200-1205.
52. Zeleznik, A.J., Midgley Jr, A.R. and Reichert Jr, L.E. (1974) Granulosa cell maturation in the rat: increased binding of human chorionic gonadotropin following treatment with follicle-stimulating hormone in vivo. *Endocrinology*, **95**, 818-825.
53. Sirois, J. (1994) Induction of prostaglandin endoperoxide synthase-2 by human chorionic gonadotropin in bovine preovulatory follicles in vivo. *Endocrinology*, **135**, 841-848.

54. Aoki, M., Jiang, H. and Vogt, P.K. (2004) Proteasomal degradation of the FoxO1 transcriptional regulator in cells transformed by the P3k and Akt oncoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**, 13613-13617.
55. Vainio, S., Heikkila, M., Kispert, A., Chin, N. and McMahon, A.P. (1999) Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature*, **397**, 405-409.
56. Jeays-Ward, K., Hoyle, C., Brennan, J. *et al.* Endothelial and steroidogenic cell migration are regulated by WNT4 in the developing mammalian gonad. *Development*, **130**, 3663-3670.
57. Gonzalez-Robayna, I.J., Firestone, G.L., and Richards, J.S. (2000) FSH stimulates PKB and Sgk phosphorylation by mechanisms independent of cAMP-dependent protein kinase: alternate pathways for cAMP action in granulosa cells. *Mol. Endocrinol.*, **14**, 1283-1300
58. Arden, K.C. (2006) Multiple roles of FOXO transcription factors in mammalian cells point to multiple roles in cancer. *Exp. Gerontol.* **41**, 709-717.
59. Kim, D. and Chung, J. (2002) Akt: versatile mediator of cell survival and beyond. *J. Biochem. Mol. Biol.*, **35**, 106-115.
60. Vivanco, I. and Sawyers, C.L. (2002) The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat. Rev. Cancer*, **2**, 489-501.
61. Cully, M., You, H., Levine, A.J. and Mak, T.W. (2006) Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer*, **6**, 184-192.
62. Fan, H.-Y., Shimada, M., Liu, Z., Cahill, N., Noma, N., Wu, Y., Gossen, J., and Richards, J.S. (2008) Selective expression of *KrasG12D* in granulosa cells of the mouse ovary causes defects in follicular development and ovulation. *Development*, **135**, 2127-2137.
63. Chodankar, R., Kwang, S., Sangiorgi, F. *et al.* (2005) Cell-nonautonomous induction of ovarian and uterine serous cystadenomas in mice lacking a functional *Bra1* in ovarian granulosa cells. *Curr. Biol.*, **15**, 561-565.
64. Arango, N.A., Szotek, P.P., Manganaro, T.F. *et al.* (2005) Conditional deletion of beta-catenin in the mesenchyme of the developing mouse uterus results in a switch to adipogenesis in the myometrium. *Dev. Biol.*, **288**, 276-283.

65. Szotek, P.P., Chang, H.L., Zhang, L. *et al.* (2007) Adult mouse myometrial label-retaining cells divide in response to gonadotropin stimulation. *Stem Cells*, **25**, 1317-1325.

## Figure legends

**Fig. 1.** Schematic representation of crosstalk between PKA, PI3K/AKT and WNT/CTNNB1 intracellular signaling pathways. AC=Adenylyl Cyclase, APC=Adenomatosis Polyposis Coli, CREB=cAMP Response Element-Binding, DSH=Disheveled, FOXO1=Forkhead Box O1, FSH(R)=Follicle Stimulating Hormone (Receptor), FZD=Frizzled, GSK3 $\beta$ =Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$ , IGF1(R)=Insulin-like Growth Factor-1 (Receptor), LRP=Low-density Lipoprotein Receptor-related Protein, mTOR=Mammalian Target of Rapamycin, PDK=3-Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase, PI3K=Phosphoinositide 3-Kinase, PKA=Protein Kinase A, PTEN=Phosphatase and Tensin Homolog, SFK=SRC family protein kinases, TCF/LEF=Transcription Factor, T-cell Specific/ Lymphoid Enhancer Factor 1, CTNNB1=b-catenin.

**Fig. 2.** Lack of ovarian anomalies in most *Pten*<sup>flox/flox</sup>; *Amhr2*<sup>cre/+</sup> mice. **(A)** Histological sections of ovaries from 5 month-old *Pten*<sup>flox/flox</sup> and *Pten*<sup>flox/flox</sup>; *Amhr2*<sup>cre/+</sup> mice. Original magnification, 50X. **(B)** PCR analysis of Cre-mediated recombination of the floxed *Pten* allele. Ovarian DNA was isolated from 1 month-old *Pten*<sup>flox/flox</sup> and *Pten*<sup>flox/flox</sup>; *Amhr2*<sup>cre/+</sup> mice (2<sup>nd</sup> through 7<sup>th</sup> lanes, inclusively). Positive controls for the floxed allele (Floxed CTRL) and wild-type allele (WT CTRL) were DNA from tail biopsies taken from a *Pten*<sup>flox/flox</sup> and a wild-type mouse, respectively. Granulosa cells tumor DNA was isolated from 10 week-old *Pten*<sup>flox/flox</sup>; *Amhr2*<sup>cre/+</sup> females (last 2 lanes). Expected PCR product sizes for the floxed, wild-type (WT) and cre-recombined (KO) alleles are indicated on the left. An additional ~500bp PCR product was commonly observed in samples of all genotypes, and presumed to be an artefact unrelated to *Pten*. MW=molecular weight standards. **(C)** Immunoblot analyses of PTEN expression in isolated *Pten*<sup>flox/flox</sup> and *Pten*<sup>flox/flox</sup>; *Amhr2*<sup>cre/+</sup> granulosa cells. Each lane represents a distinct protein sample derived from the pooled granulosa cells from three non-tumor bearing mice. Actin was used as a loading control. **(D)** Immunohistochemical analysis of phospho-AKT expression in *Pten*<sup>flox/flox</sup> and *Pten*<sup>flox/flox</sup>; *Amhr2*<sup>cre/+</sup> ovaries. O=oocyte. Original magnification, 1000X.

**Fig. 3.** Rare *Pten*<sup>flox/flox</sup>; *Amhr2*<sup>cre/+</sup> mice develop aggressive, metastatic GCT. (A) Abdominal cavity of a 10 week old *Pten*<sup>flox/flox</sup>; *Amhr2*<sup>cre/+</sup> mouse bearing two large GCT. (B) and (C), microscopic views of solid (B) and trabecular (C) GCT histological patterns. Original magnifications, 100X (B) or 200X (C). (D) Photomicrograph showing distinct cell populations within *Pten*<sup>flox/flox</sup>; *Amhr2*<sup>cre/+</sup> GCT, characterized by higher (HA) or lesser (LA) degrees of anaplasia. Original magnification, 400X. (E) Microscopic view of a focus of ossification (O) within a *Pten*<sup>flox/flox</sup>; *Amhr2*<sup>cre/+</sup> GCT. Original magnification, 200X. (F) Photomicrograph showing the presence of tumor cell embolisms in the lungs of the animal shown in A. The arrow indicates an example of an embolism (i.e., the tumor cells are entirely contained within a vascular structure). Original magnification, 200X. (G) Photomicrograph showing the presence of GCT metastases (arrows) in the lungs of the animal shown in A. Original magnification, 400X. (H) Photomicrographs comparing the highly anaplastic cells from the tumors (GCT) to those in the pulmonary metastases (PM). Original magnifications, 1000X.

**Fig. 4.** Altered PI3K/AKT signaling in *Pten*<sup>flox/flox</sup>; *Amhr2*<sup>cre/+</sup> GCT. Immunoblot analyses of the indicated PI3K/AKT pathway signaling effectors in *Pten*<sup>flox/flox</sup> granulosa cells (first 2 lanes) and *Pten*<sup>flox/flox</sup>; *Amhr2*<sup>cre/+</sup> granulosa cells tumors (final 4 lanes). Actin was used as a loading control.

**Fig. 5.** Abnormal PI3K/AKT pathway activity occurs in many GCT. (A) Immunohistochemical analysis of phospho-AKT expression in human and equine normal ovaries and granulosa cells tumors. Arrows indicate examples of cells showing perinuclear (image c) or nuclear (image d) staining. Original magnification, 1000X. (B) Immunohistochemical analysis of PTEN expression in human normal ovaries and granulosa cells tumors. Original magnification, 200X. Arrows indicate staining in nontumoral stromal cells, little or no staining was found in the tumor cells. (C) Semiquantitative RT-PCR analysis of *PTEN* expression in human normal ovaries, granulosa cells tumors and isolated luteinizing granulosa cells (GC). *GAPDH* was used as a control gene.



**Fig. 6.** *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Cttnb1*<sup>flox(ex3)/+</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> mice develop early-onset GCT with a high penetrance. **(A)** A 6 week-old *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Cttnb1*<sup>flox(ex3)/+</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> mouse bearing two large GCT. **(B)** Photomicrographs showing distinct cell populations within *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Cttnb1*<sup>flox(ex3)/+</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> GCT, characterized by higher (HA) or lesser (LA) degrees of anaplasia. **(C)** Photomicrograph of a newborn *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Cttnb1*<sup>flox(ex3)/+</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> ovary. Growing nests of dysplastic cells are circumscribed with dotted lines. Original magnification, 400X. **(D)** Photomicrograph of a pulmonary tumor cell embolism (arrow) from a six week-old female *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Cttnb1*<sup>flox(ex3)/+</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> mouse. Original magnification, 400X. **(E-H)** Photomicrographs depicting GCT pulmonary metastases (panel E, arrows), GCT cell invasion of the abdominal wall (panel F, M=muscular layer of the abdominal wall, arrows indicate invading GCT cells), a liver GCT metastasis (panel G, L=liver) and an adrenal GCT metastasis (panel H, M=adrenal medulla, C=adrenal cortex) from *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Cttnb1*<sup>flox(ex3)/+</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> mice sacrificed several weeks after surgical removal of the primary ovarian tumors. Original magnifications, 40X (E) or 200X (F-H).

Figure 1

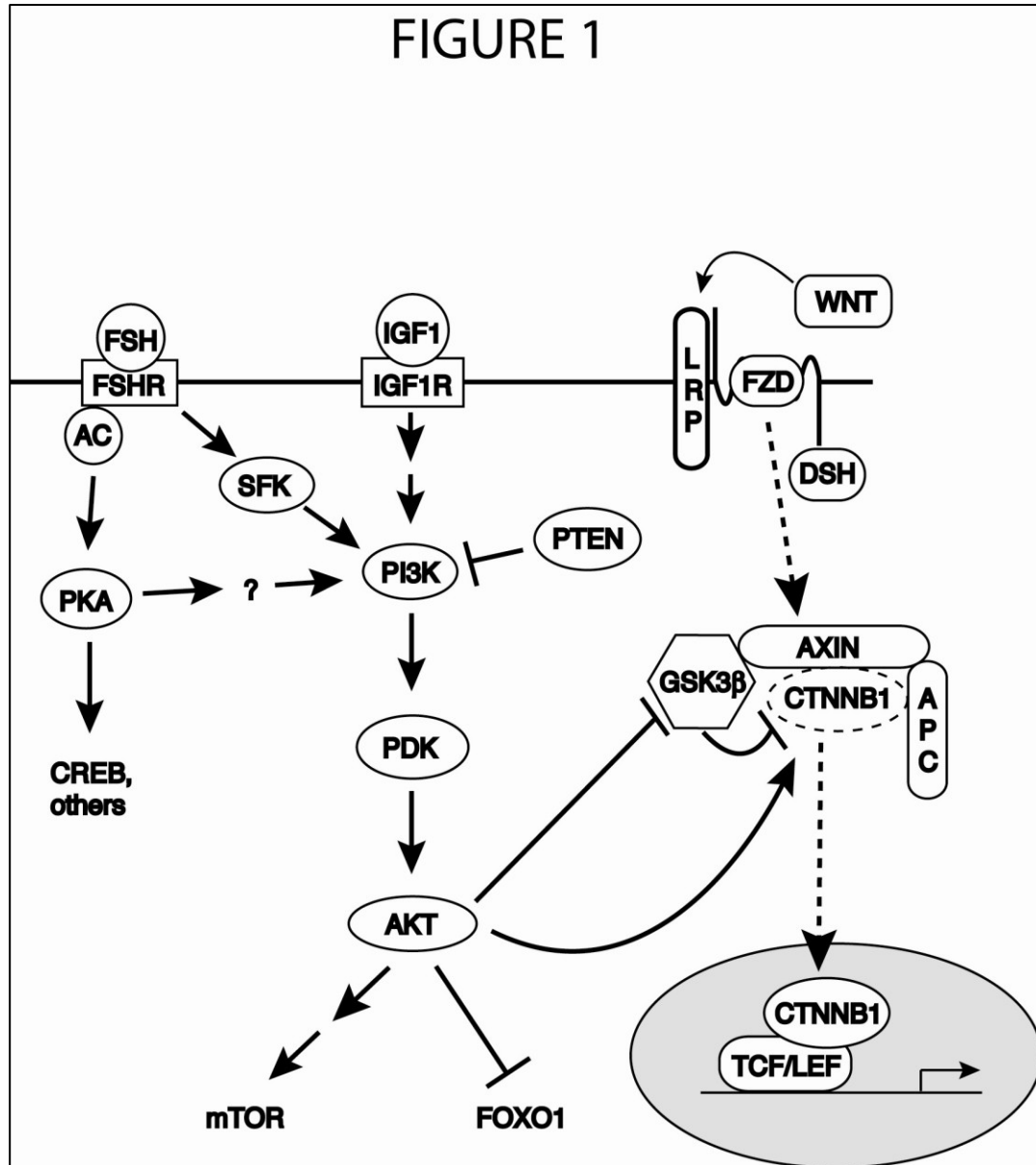


Figure 2

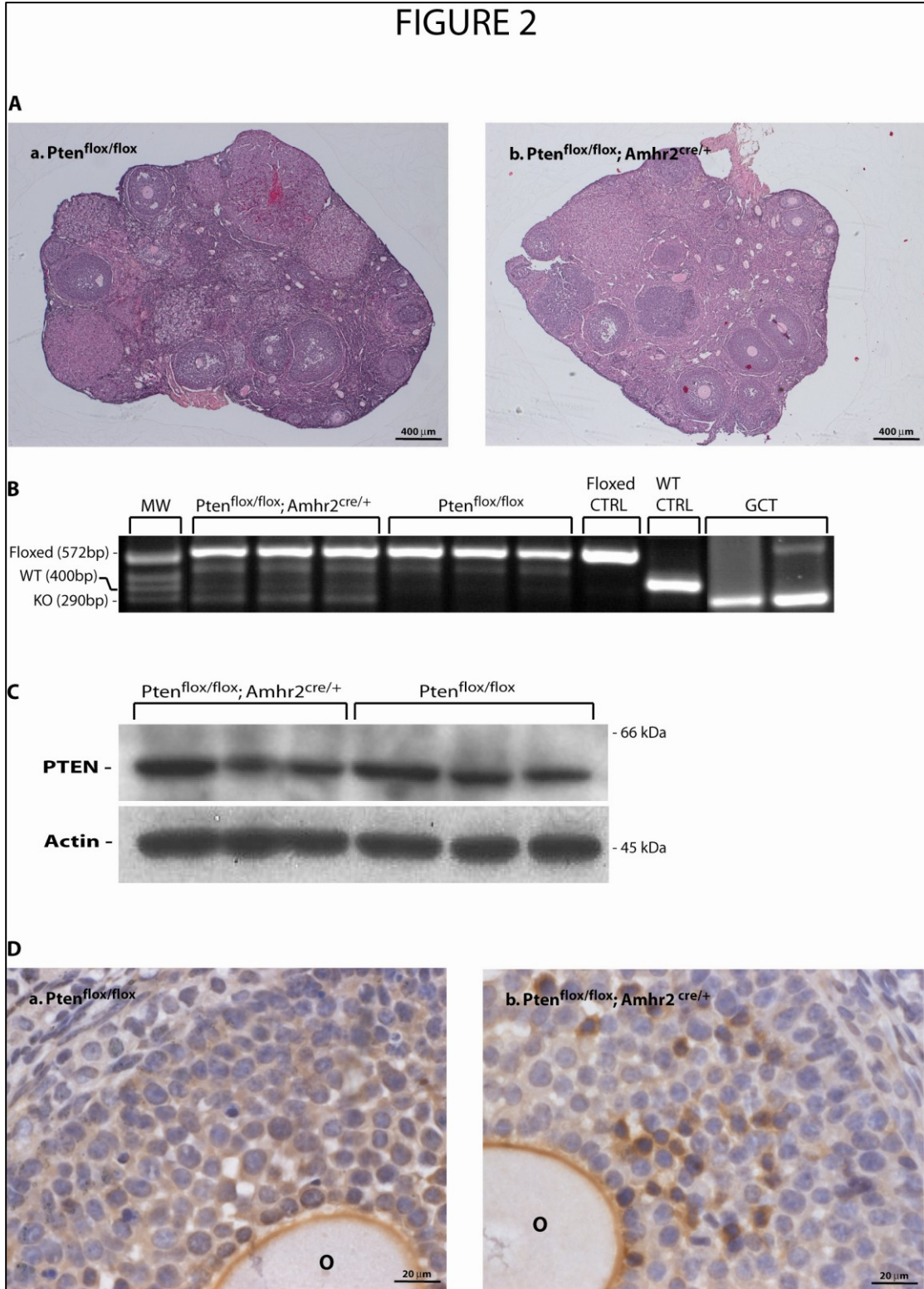




Figure 3

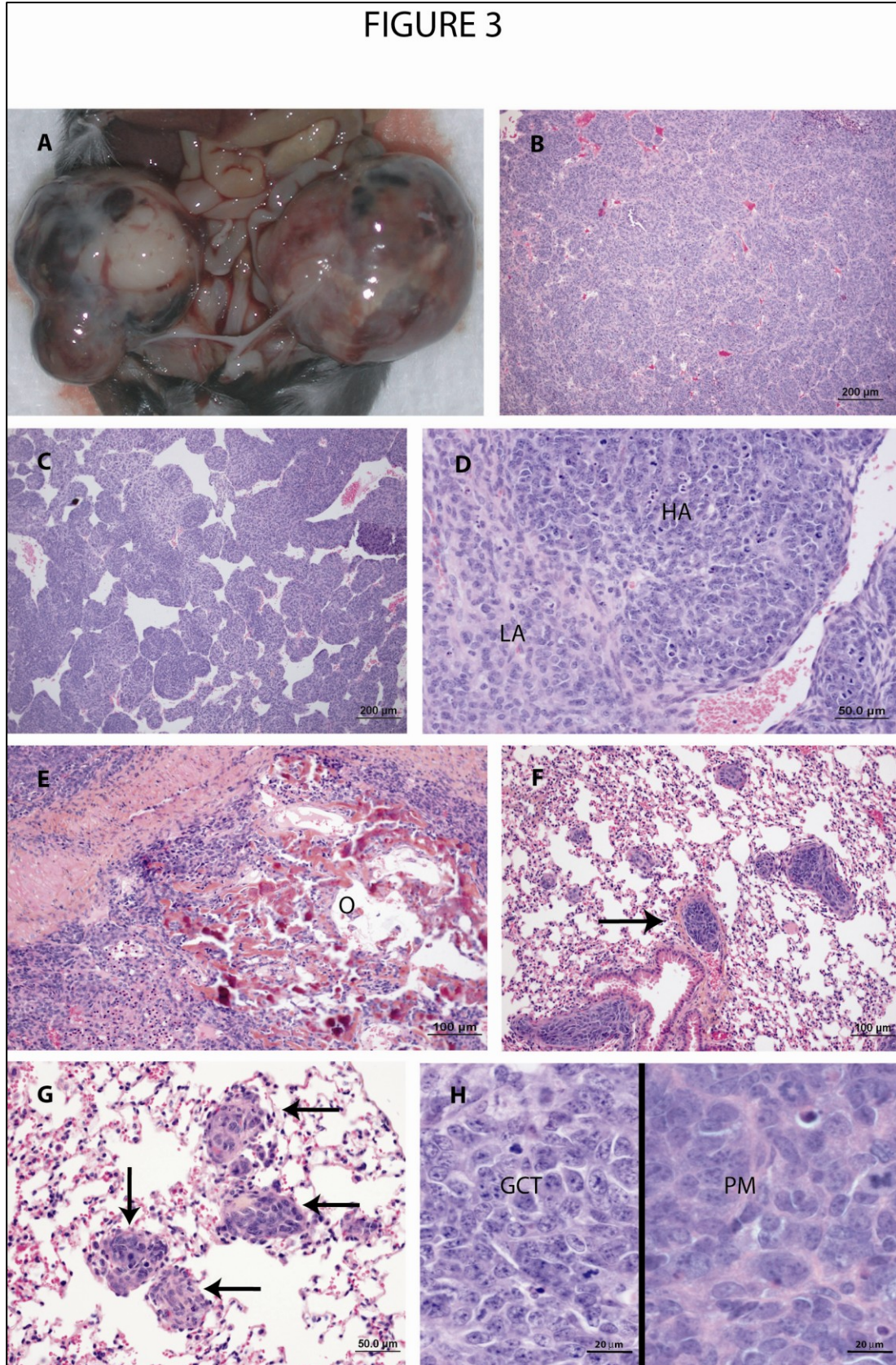


Figure 4

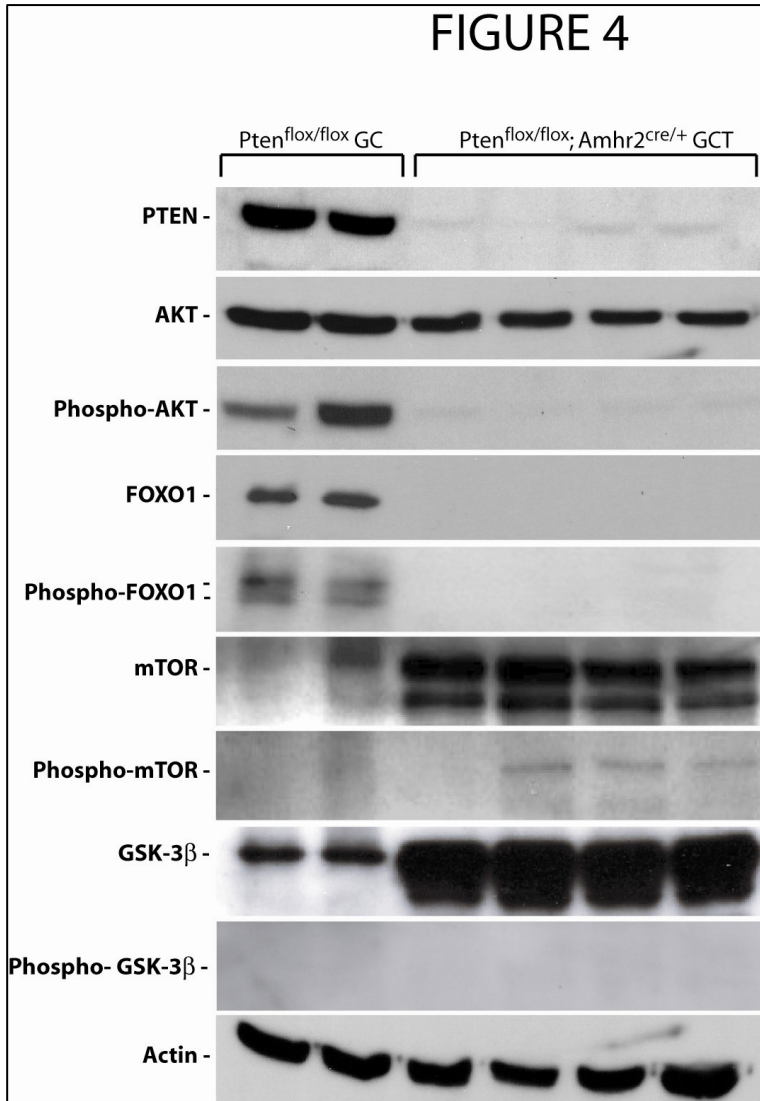




Figure 5

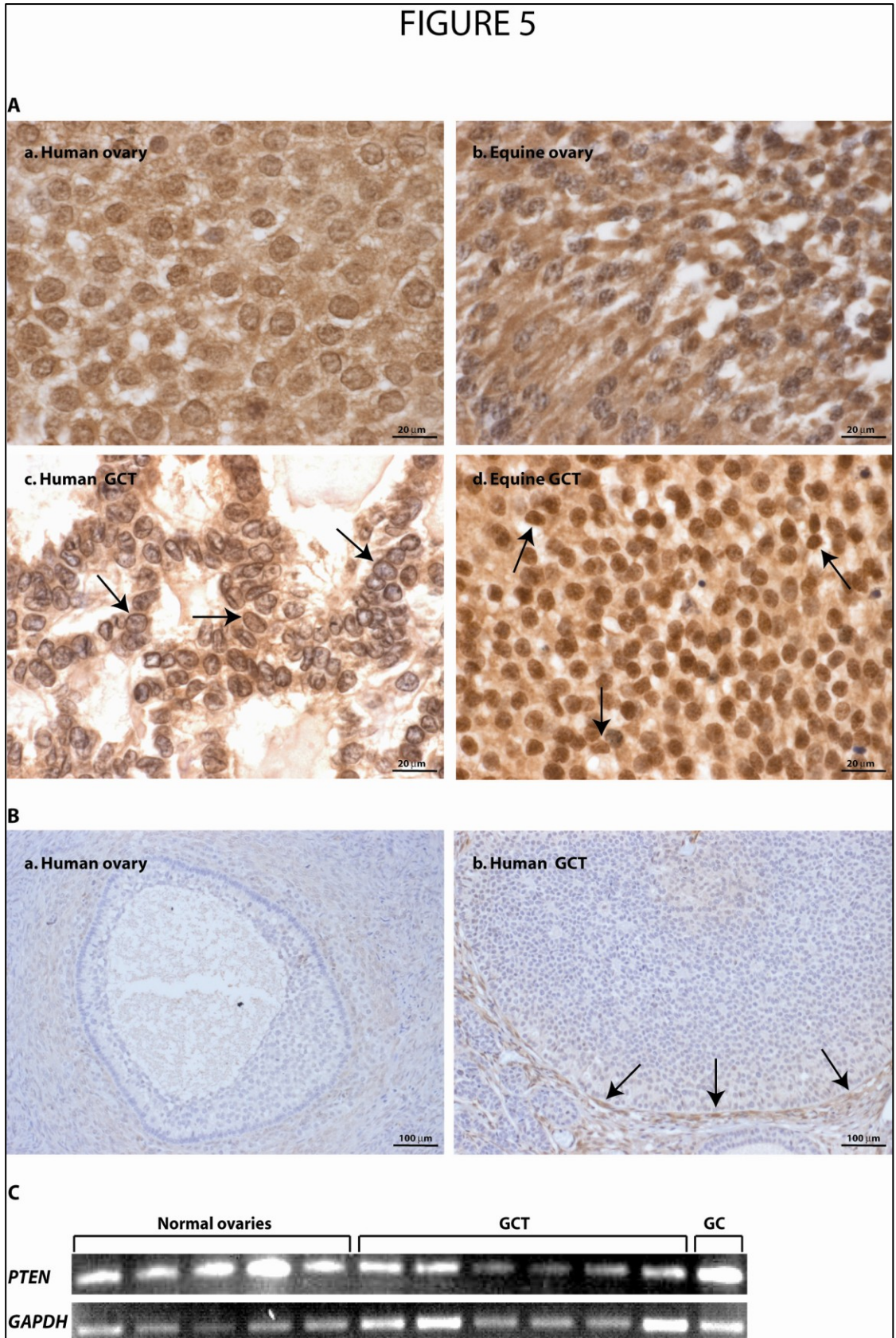




Figure 6

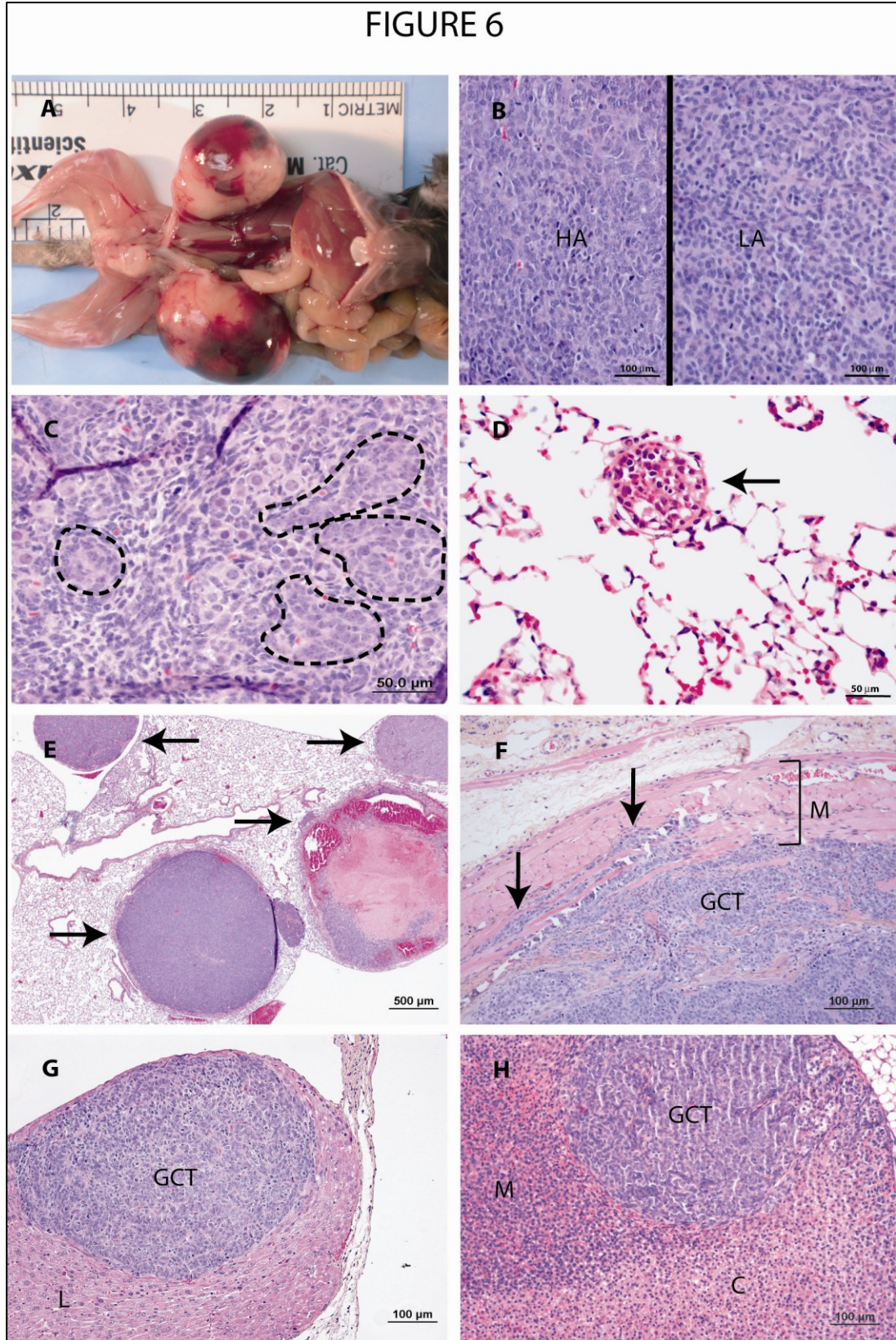


Figure supplémentaire 1

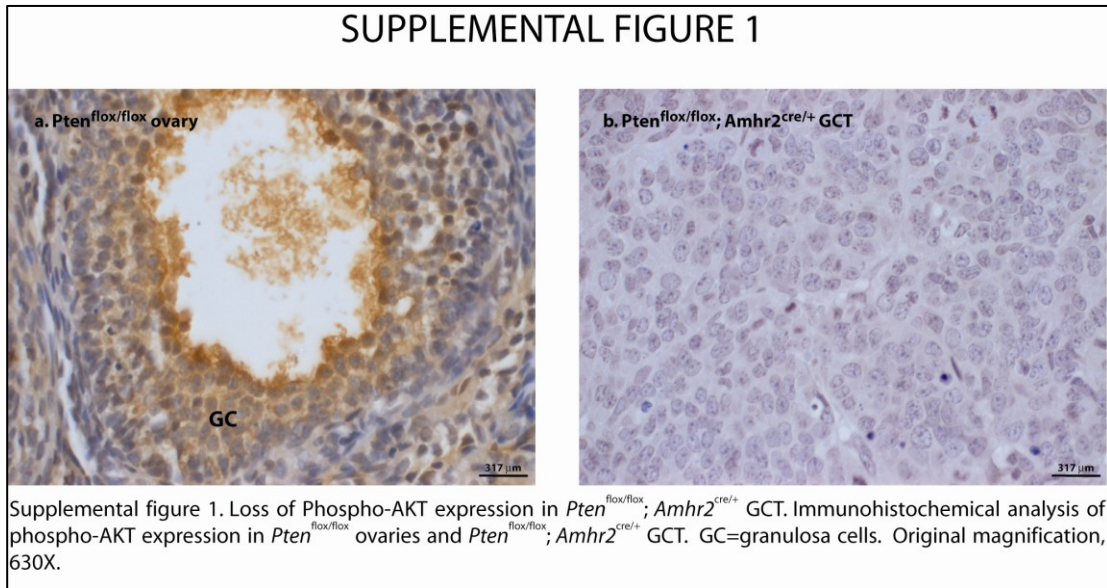
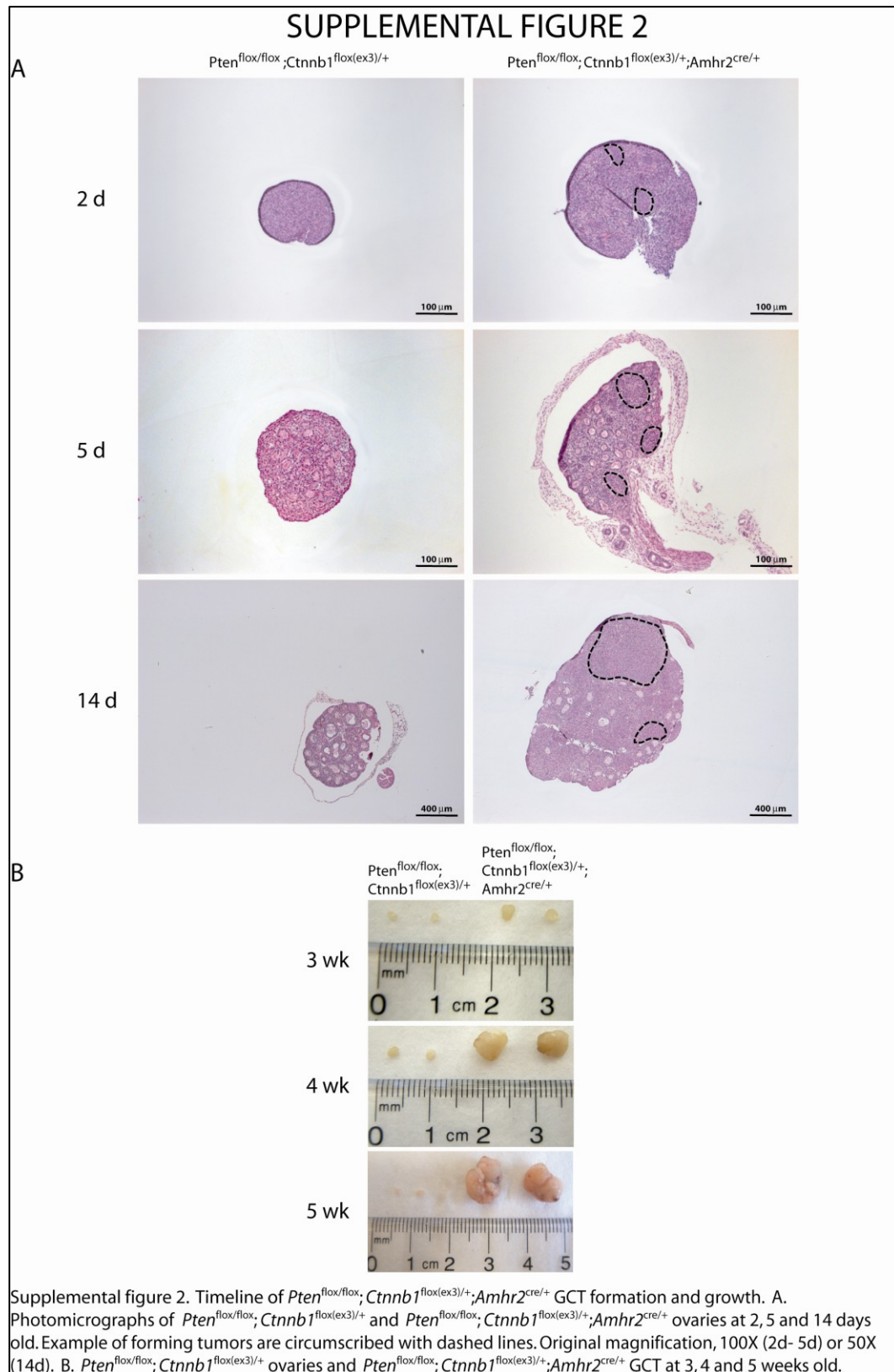




Figure supplémentaire 2



## Chapitre 4 : Deuxième publication

### Préface

Pour la première publication, nous avons créé la lignée de souris  $Pten^{flox/flox};Amhr2^{cre/+}$  afin d'évaluer l'implication de la voie de signalisation PI3K/AKT dans l'étiologie des GCT. Ces souris présentaient un phénotype de sous-fertilité qui n'était pas d'origine ovarienne. Il a récemment été démontré que la souche  $Amhr2^{cre}$  dirige l'expression de *Cre* non seulement aux cellules de la granulosa, mais aussi au stroma utérin et au myomètre. Le but de cette seconde publication était donc de démontrer si et comment le phénotype d'infertilité chez les souris  $Pten^{flox/flox};Amhr2^{cre/+}$  pouvait découler d'un défaut utérin.

Mes degrés de contribution au design scientifique, au travail en laboratoire, à la synthèse des résultats et à la rédaction de cette deuxième publication sont respectivement de 50%, 85%, 90% et 80%.

## **Deuxième publication publiée en tant que premier auteur**

Decidual PTEN expression is required for trophoblast invasion in the mouse

**Marie-Noëlle Laguë**, Jacqui Detmar, Marilène Paquet, Alexandre Boyer, JoAnne S. Richards, S. Lee Adamson, and Derek Boerboom

Centre de Recherche en Reproduction Animale (M.N.L., A.B., D.B.), Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6; Samuel Lunenfeld Research Institute (J.D., S.L.A.), Mount Sinai Hospital, Toronto, Ontario, Canada, M5T 3H7; McGill Cancer Centre and Animal Resources Centre (M.P.), McGill University, Montréal, Québec, Canada, H3G 1Y6; and Department of Molecular and Cellular Biology (J.S.R., D.B.), Baylor College of Medicine, Houston, Texas 77030

Key words: Pten, Akt, Trophoblast, Decidua, Myometrium, Conditional gene targeting

Abbreviated title: PTEN and trophoblast invasion

Address all correspondence and requests for reprints to: Derek Boerboom D.V.M, Ph.D., Centre de Recherche en Reproduction Animale, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6. Tel: 450-773-8521. Fax: 450-778-8103. E-mail:

████████████████████

This work was supported by an operating grant from the Canadian Institutes of Health Research and the Canada Research Chair in Ovarian Molecular Biology and Functional Genomics. The University of Virginia Center for Research in Reproduction Ligand Assay and Analysis Core is supported by the National Institutes of Health NICHD (SCCPRR) Grant U54-HD28934. Disclosure summary: The authors have nothing to disclose.

**Publiée dans le journal *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism* en décembre 2010, volume 299, numéro 6, pages 936-46.**

N.B. Cette publication est jointe à cette thèse avec la permission du journal «American Journal of Physiology». This publication is included with the APS permission.

## Abstract

Trophoblast invasion likely depends on complex crosstalk between the fetal and maternal tissues and may involve the modulation of PI3K/AKT signaling activity in maternal decidual cells. In this report, we studied implantation in *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> mice, which lack the PI3K signaling antagonist gene *Pten* in myometrial and stromal/decidual cells. Primiparous *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> mice were found to be subfertile due to increased fetal mortality at e11.5. Histopathologic analyses revealed a failure of decidual regression in these mice, accompanied by reduced or absent invasion of fetal trophoblast glycogen cells and giant cells, abnormal development of the placental labyrinth, and frequent apparent intrauterine fetal growth restriction. Unexpectedly, the loss of PTEN expression in *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> decidual cells was not accompanied by a detectable increase in AKT phosphorylation or altered expression or activation of PI3K/AKT downstream effectors such as mTOR or GSK3 $\beta$ . TUNEL and BrdU incorporation analyses attributed the lack of decidual regression mainly to decreased apoptosis in *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> decidual cells, rather than to increased proliferation. Remodeling of the maternal vasculature was delayed in *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> uteri at e11.5, as evidenced by persistence of vascular smooth muscle and decreased infiltration of uterine natural killer cells. In addition, thickening of the myometrium and disorganization of the muscle fibers was observed before and throughout gestation. Almost all *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> mice failed to carry a second litter to term, apparently due to endometrial hyperplasia and uterine infections. Together, these data demonstrate novel roles of PTEN in the mammalian uterus, and its requirement for proper trophoblast invasion and decidual regression.

## Introduction

The invasion of the maternal decidua by placental trophoblast cells is a defining step in the implantation process. After mediating the attachment of the placenta to the uterus, invading trophoblast cells participate in a variety of physiological processes that are critical for the maintenance of pregnancy, including the regulation of maternal vascular development and the secretion of several cytokines and hormones that modulate maternal immune, metabolic and endocrine functions (1). Indeed, defects in trophoblast invasion are involved in the etiology of a number of important gestational pathologies, such as spontaneous miscarriage (2, 3), intra-uterine growth restriction (4, 5) and pre-eclampsia (6). In humans, one of the most important functions of trophoblast cells is the mediation of the transformation or “conversion” of the maternal spiral arteries. By this process, the endovascular cytotrophoblast cells invade the spiral arteries, displacing and replacing endothelial cells and degrading the muscular and elastic tissue of the vessel wall (6-8). This results in the formation of dilated vessels that are required for adequate uteroplacental circulation and fetal development. An analogous arterial transformation process occurs in the rodent placenta (which is also hemochorial), although available evidence indicates that uterine natural killer cells (uNKs) may be its principal mediator, rather than trophoblast cells (9, 10). Nonetheless, trophoblast cells are thought to play important roles in regulating maternal vascular development and function in rodents, notably by producing factors that regulate maternal blood flow and angiogenesis, and they are capable of endovascular invasion of spiral arteries as well (11).

Much research has been devoted to identifying the mechanisms by which invading trophoblast cells degrade maternal tissues (6). However, comparatively little attention has been paid to the role of the maternal decidua which, particularly in rodents, must regress in concert with the advancing trophoblast during the invasion process, and this is widely believed to depend on a complex interplay between the trophoblast and decidual cell types (6, 8). Although the signaling mechanisms and pathways involved in decidual regression remain poorly defined, several lines of evidence indicate that the PI3K/AKT pathway is a major regulator of decidual cell proliferation and survival. For example, endothelin-1 of endometrial epithelial origin is thought to regulate the proliferation of uterine stromal cells in a paracrine manner via the PI3K/AKT pathway (12). Additionally, prolactin and IGF-1

can mediate decidual cell survival, and act by activating PI3K/AKT signaling (13, 14). Conversely, TGF $\beta$ 1 has been shown to promote apoptosis in cultured decidual cells, and its mechanism of action involves the inhibition of AKT phosphorylation (15). Thus, downregulation of PI3K/AKT signaling may be necessary for decidual regression, acting as a permissive factor for subsequent trophoblast invasion.

The *Pten* gene encodes a lipid phosphatase that acts as an antagonist of the PI3K/AKT signaling pathway by dephosphorylating phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate, and thereby inhibiting phosphoinositide-dependent kinase activity (16). To study the role of the PI3K/AKT pathway in ovarian granulosa cells, we recently devised a conditional gene targeting strategy to constitutively derepress the pathway by inactivation of *Pten*. Mice bearing a floxed *Pten* allele (*Pten*<sup>tm1Hwu</sup>)(17) were mated to the *Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr</sup> strain (in which the *Cre* transgene is knocked-in to the *Amhr2* locus)(18), and the resulting offspring were analyzed for ovarian phenotypic anomalies. Surprisingly, the vast majority of *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> mice had morphologically and physiologically normal ovaries, which was ultimately attributed to inefficient recombination of the *Pten*<sup>tm1Hwu</sup> alleles, resulting in the loss of *Pten* only in rare granulosa cells (19). Despite this, *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> mice were infertile, and either failed to carry pregnancies to term or had small litters due to increased fetal mortality after e9.5. Recent studies have indicated that the *Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr</sup> allele drives *Cre* expression in a wider array of tissues than originally thought, including the developing uterine myometrium (20-22). We therefore proposed that infertility in *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> mice could be of extra-ovarian origin, and that this model could be used to define novel roles for PTEN and PI3K/AKT signaling in uterine physiology and pregnancy (19). In this study, we sought to demonstrate that infertility in *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> mice is due to a uterine defect, as well as to define the cellular and molecular processes that are disrupted by the loss of uterine PTEN expression.

## Materials and methods

### *Animals, genotype analyses, treatments and progesterone measurements*

Genetically modified animals were derived by selective breeding of previously-described  $Pten^{tm1Hwu/tm1Hwu}$  and  $Amhr2^{tm3(cre)Bhr/+}$  parental strains (17, 18) and maintained on a mixed C57/Bl(6) X 129Sv genetic background. Genotyping analyses were performed by PCR on DNA obtained from tail biopsies as previously described (19). Timed matings were done by breeding either  $Pten^{tm1Hwu/tm1Hwu};Amhr2^{tm3(cre)Bhr/+}$  or  $Pten^{tm1Hwu/tm1Hwu}$  females with C57/Bl(6) males, and the morning of the detection of a vaginal plug was designated d0.5 pc (post-coitum). Cell proliferation in uteri of  $Pten^{tm1Hwu/tm1Hwu};Amhr2^{tm3(cre)Bhr/+}$  and  $Pten^{tm1Hwu/tm1Hwu}$  mice was assessed by bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation analyses. Mice were injected intraperitoneally with 150 mg/kg body weight BrdU (Sigma, St. Louis, MO) and euthanized 3 hrs after injection. For serum progesterone measurements, blood samples were collected by cardiac puncture under anesthesia prior to euthanasia. Progesterone radioimmunoassays were done on serum samples at the Ligand Assay and Analysis Core within the Center for Research in Reproduction at the University of Virginia. Intra- and inter-assay coefficients of variability were 4.4% and 7.4%, respectively. All animal procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee and were conform to the USPHS Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals.

### *Histochemistry and immunohistochemistry*

Immunohistochemistry was performed on formalin-fixed, paraffin-embedded, 7 $\mu$ m tissue sections using VectaStain Elite avidin-biotin complex methods kits (Vector Labs, Burlingame, CA) as directed by the manufacturer, except incubation with primary antibodies was performed overnight at 4°C. The Vector M.O.M. Basic Kit was used whenever a mouse-derived primary antibody was applied to mouse tissues. For detection of smooth muscle actin binding protein, transgelin (TAGLN), the slides were further treated with 20  $\mu$ g/ml of proteinase K (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) in PBS for 5 minutes at room temperature following heat-induced antigen retrieval in 10mM citrate buffer. Sections were probed with primary antibodies against PTEN, phospho-(Ser473)-AKT, phospho-(Ser2448)-mTOR (Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, catalog

# 9559, 4051 and 2976, respectively), TAGLN/SM 22 alpha (Abcam, Cambridge, MA, catalog # ab10135), pan cytokeratin (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, catalog # sc-15367), S100A4, ACTA2 (Sigma Aldrich, Oakridge, ON, catalog # HPA007973 and A-2547, respectively) or BrdU (Dako Corp., Carpinteria, CA, clone Bu20a) using the manufacturers suggested conditions. For all experiments, control sections were probed with non-specific IgG from the relevant species (10 µg/ml final concentration), which failed to generate signal in all cases. Staining was performed using the 3,3'-diaminobenzidine (DAB) peroxidase substrate kit (Vector Labs) as directed, and slides were lightly counterstained with hematoxylin prior to mounting.

*Dolichos biflorus* agglutinin lectin histochemistry methods for the detection of uNKs were similar to those described above for immunohistochemistry, except antigen retrieval was omitted and secondary antibody was not needed. Instead, sections were quenched for endogenous peroxidase activity using 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS, washed and blocked for 1 hour with 10% horse serum + 10% BSA in PBS with 0.1% Tween 20. Tissues were subsequently probed with 50 µg/mL biotinylated *Dolichos biflorus* agglutinin (Sigma) in 2% horse serum + 2 % BSA in PBS for 1 hour at room temperature. Detection was performed using the streptavidin-horseradish peroxidase complex as described above. Sections were stained with hematoxylin prior to mounting.

#### *GLB1 and alkaline phosphatase assays*

Uteri from d11.5 pc pregnant *Gt(ROSA)26Sor<sup>tm1Sho/+</sup>* and *Gt(ROSA)26Sor<sup>tm1Sho/+</sup>;Amhr2<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup>* mice were stained for GLB1 (β-galactosidase) activity using the Chemicon International Stain for Beta-Galactosidase Expression in Tissue kit as directed by the manufacturer (Bioscience Research Reagents, Temecula, CA). Stained uteri were postfixed in formalin overnight, embedded in paraffin, sectioned, and counterstained with eosin.

For alkaline phosphatase detection, tissues were frozen in O.C.T. compound (Sakura Finetek, Torrance, CA) at -80°C, 5µm sections were prepared and the slides were postfixed in 0.2% glutaraldehyde in cold PBS for 10 min, followed by three washes in PBS of five minutes each. Slides were then washed twice in alkaline phosphatase buffer (100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>) for five minutes. The slides were overlaid with NBT/BCIP stain (100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 50 mM



MgCl<sub>2</sub>, 0.01% sodium deoxycholate, 0.02% NP-40, 337 µg/mL NBT, 175 µg/mL BCIP) at 37°C for 4 minutes, washed in PBS three times for five minutes, and counterstained with nuclear fast red prior to mounting.

#### *Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick end labeling (TUNEL)*

Sections were deparaffinized and treated with 10 µg/ml proteinase K in PBS for 10 minutes, followed by brief washes with deionized water and PBS. Endogenous peroxidase was quenched in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in methanol for 30 minutes, slides were washed in PBS and pre-equilibrated for 10 minutes at room temperature in a solution of 1x One-Phor-All *PLUS* buffer (GE Healthcare, Baie d'Urfe, QC, Canada) supplemented with 0.1% Triton X-100 (Sigma, Oakville, Ontario, Canada). TUNEL reaction mixture was prepared with the following final concentrations, diluted in 0.1% Triton X-100: 1 x One-Phor-All *PLUS* buffer, 10 µM biotin-16-dUTP (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA), 1 µM dATP (Fermentas, Burlington, ON, Canada) and 20 IU of terminal deoxynucleotidyl transferase, FPLC™*pure* enzyme (GE Healthcare). Sections were incubated with the TUNEL reaction mixture in a humidified chamber for 90 minutes at 37°C and subsequently washed with PBS. Streptavidin-horseradish peroxidase reagent (Vector Laboratories) was used for detection of incorporated biotinylated nucleotides and the color reaction was developed using DAB substrate. Sections were counterstained with hematoxylin prior to mounting.

#### *Immunoblotting*

Proteins were extracted from uterine tissues using T-PER tissue protein extraction reagent (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) according to the manufacturer's instructions, and all protein sample concentrations were quantified using the Bradford method. Samples (25µg) were resolved on 7-12% SDS-polyacrylamide gels and transferred to Hybond-P PVDF membrane (GE Amersham, Piscataway, NJ). Blots were probed with antibodies against AKT, FOXO1, XIAP, BAD, mTOR, phospho-(Ser2448)-mTOR, GSK3β, phospho-(Ser9)- GSK3β (Cell Signaling catalog # 9272, 2880, 2042, 9292, 2983, 2971, 9315 and 9323, respectively), PTEN, phospho-(Ser473)-AKT (described above), or ACTB (β-actin)(Santa Cruz Biotechnology Inc., catalog # sc-47778) as directed by the manufacturer. Following incubation with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (GE Amersham), the protein bands were visualized by

chemiluminescence using ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (GE Amersham) and High Performance Chemiluminescence film (GE Amersham). Relative signal intensities were quantified using a Kodak Image Station 440CF and Kodak 1D v.3.6.5 software (Eastman Kodak, Rochester, NY).

#### *Stereomicroscopic measurements*

Myometrial thickness was measured in non-pregnant, d9.5, d11.5 and d14.5 pc *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup> (n= 3, 4, 5 and 4 respectively) and *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>; *Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/</sup> (n= 3, 4, 4 and 4 respectively) mice. Transverse sections were cut from random locations in both uterine horns in nonpregnant uteri, and through the thickest part of concepti in pregnant animals. Briefly, 3-20 hematoxylin and eosin-stained sections per uterus were examined at low magnification. To ensure randomness of sampling, sections were overlaid with a circular grid, and myometrial thickness measurements taken at the four cardinal points (N, S, E, W). The thickness of the longitudinal and circular muscle layers were measured separately, and the measurements added to obtain the total thickness of the myometrium. The final myometrial thickness value for a given animal was the average of all measurements taken from all sections (i.e., 12-80 measurements/animal). Measurements and photomicrographs were taken using a Zeiss Imager M.1 microscope, using AxioVision 4.6 software (Carl Zeiss, Germany). The same instruments were used to measure maternal decidual surface area for comparisons between genotypes, as well as to permit the calculation of relative densities of uNK, TUNEL-positive and BrDU-positive cells.

#### *Statistical methods*

Effects of genotype on litter size, progesterone concentrations, myometrial thickness, uNK cells/surface, TUNEL-positive cells/surface, BrDU-positive cells/surface, maternal decidua surface and immunoblot band intensities were analyzed by unpaired, two-tailed Student's t-tests. *P* values lower than 0.05 were considered statistically significant. Data are presented as MEAN $\pm$  SEM. Analyses were performed using Prism 4.0a software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

## Results

### *Infertility in $Pten^{tm1Hwu/tm1Hwu};Amhr2^{tm3(cre)Bhr/+}$ mice is of non-ovarian origin*

To test the fertility of virgin  $Pten^{tm1Hwu/tm1Hwu};Amhr2^{tm3(cre)Bhr/+}$  female mice, 12 eight week-old females were placed in cages with adult males until copulatory plugs were observed.  $Pten^{tm1Hwu/tm1Hwu};Amhr2^{tm3(cre)Bhr/+}$  mice produced ~44% fewer pups per mating compared to  $Pten^{tm1Hwu/tm1Hwu}$  controls ( $P < 0.05$ ), due to smaller litter sizes and failure to bring some pregnancies to term (Table 1). We previously reported that pregnant  $Pten^{tm1Hwu/tm1Hwu};Amhr2^{tm3(cre)Bhr/+}$  and  $Pten^{tm1Hwu/tm1Hwu}$  females had comparable numbers of concepti at d9.5 pc (19), suggesting that ovulation and implantation were normal, and that infertility could be due to fetal loss after e9.5. We therefore examined  $Pten^{tm1Hwu/tm1Hwu};Amhr2^{tm3(cre)Bhr/+}$  and control pregnancies at d11.5 pc and found comparable numbers of fetuses; however fetal viability was ~30% lower in the  $Pten^{tm1Hwu/tm1Hwu};Amhr2^{tm3(cre)Bhr/+}$  group (Table 2). Although histological analyses of the corpora lutea of  $Pten^{tm1Hwu/tm1Hwu};Amhr2^{tm3(cre)Bhr/+}$  mice revealed no anomalies at d11.5 and d14.5 pc (data not shown), we could not exclude that fetal loss could be due to altered progesterone production. We therefore compared serum progesterone levels in  $Pten^{tm1Hwu/tm1Hwu};Amhr2^{tm3(cre)Bhr/+}$  and control mice throughout gestation, and failed to detect differences between the two groups (Table 3). Together, these data indicate that primiparous  $Pten^{tm1Hwu/tm1Hwu};Amhr2^{tm3(cre)Bhr/+}$  mice are subfertile due to increased fetal loss, and that this anomaly is of non-ovarian origin.

### *PTEN expression is efficiently targeted in the myometrium and uterine stromal/decidual cells in $Pten^{tm1Hwu/tm1Hwu};Amhr2^{tm3(cre)Bhr/+}$ mice*

To evaluate adult pregnant and non-pregnant  $Amhr2^{tm3(cre)Bhr}$  uterine tissues for evidence of Cre expression,  $Amhr2^{tm3(cre)Bhr}$  mice were mated to the  $Gt(ROSA)26Sor^{tm1Sho}$  reporter strain, which drives GLB1 expression in all cell types with Cre activity.  $Gt(ROSA)26Sor^{tm1Sho/+};Amhr2^{tm3(cre)Bhr/+}$  mice were found to have high levels of GLB1 in the myometrium (Fig. 1B), and lesser levels of staining were observed in the uterine stroma (data not shown), maternal decidua (Fig. 1C) and in the walls of many decidual blood vessels (Fig. 1D). These results confirm and expand upon the findings of other groups that detected Cre activity in the  $Amhr2^{tm3(cre)Bhr}$  uterus (20-22). We next sought to

evaluate uteri from  $Pten^{tm1Hwu/tm1Hwu};Amhr2^{tm3(cre)Bhr/+}$  mice for potential loss of PTEN expression. Comparative immunohistochemical analyses of  $Pten^{tm1Hwu/tm1Hwu}$  and  $Pten^{tm1Hwu/tm1Hwu};Amhr2^{tm3(cre)Bhr/+}$  mice revealed nearly complete abrogation of PTEN expression in the myometrium and stromal compartments, as well as in the maternal decidual cells of pregnant  $Pten^{tm1Hwu/tm1Hwu};Amhr2^{tm3(cre)Bhr/+}$  uteri (Fig. 2A-D). Loss of PTEN was also observed in a small proportion of endometrial epithelial cells (Fig. 2B, inset), mainly in the glandular epithelium. Epithelial cells lacking PTEN appeared hypertrophic, hyperplastic and disorganized. Loss of PTEN expression was confirmed and quantified by immunoblotting, which demonstrated an average 4.03-fold lower level of PTEN in  $Pten^{tm1Hwu/tm1Hwu};Amhr2^{tm3(cre)Bhr/+}$  non-pregnant and d11.5 pregnant uterine wall samples (Fig. 3). This likely represented an underestimation of the reduction of PTEN expression that occurred in decidual and myometrial cells, as the uterine wall samples included cell types not targeted by the  $Amhr2^{tm3(cre)Bhr/+}$  allele, including endothelial and epithelial cells (Fig. 2B, D).

To evaluate the consequences of loss of PTEN expression on the activity of the downstream signaling effector AKT, phosphoAKT expression was studied by immunohistochemistry and immunoblotting. Unexpectedly, no obvious differences could be detected between  $Pten^{tm1Hwu/tm1Hwu}$  and  $Pten^{tm1Hwu/tm1Hwu};Amhr2^{tm3(cre)Bhr/+}$  pregnant and non-pregnant uteri in any cell type (Fig. 2E, F). This result was quantitatively confirmed by immunoblotting (Fig. 3), which failed to detect significant differences in AKT phosphorylation according to genotype or pregnancy status ( $P > 0.05$ ). Uterine tissue surrounding viable or dying fetuses also showed comparable levels of phospho-AKT expression (Fig. 3). Likewise, immunohistochemical and immunoblotting analyses failed to detect differences in the expression or phosphorylation levels of the AKT downstream effectors mTOR and GSK3 $\beta$  (Figs. 2G, 2H, 3 and data not shown,  $P > 0.05$ ). Immunoblotting analyses of additional AKT signaling effectors either revealed no differences between  $Pten^{tm1Hwu/tm1Hwu};Amhr2^{tm3(cre)Bhr/+}$  uterine protein extracts and controls (XIAP), or were undetectable in our samples (FOXO1a, BAD)(not shown).

*$Pten^{tm1Hwu/tm1Hwu};Amhr2^{tm3(cre)Bhr/+}$  mice have fetal trophoblast invasion and maternal decidual regression defects*

To study the consequences of PTEN deficiency in the uterus, comparative histopathologic analyses were conducted on concepti from *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup> and *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> mice at d9.5, d11.5 and d14.5 pc. By d11.5 pc, the placental labyrinth was thin and underdeveloped in most *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> concepti, and trophoblast migration appeared restricted by an abnormally thick maternal decidua (Fig. 4A, B). Quantitative analyses of histological sections showed that mean *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> mesometrial maternal decidua surface area was 2.81-fold greater than in *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup> controls [ $5.651 \pm 0.978 \text{ mm}^2$  (n=24) vs.  $2.009 \pm 0.187 \text{ mm}^2$  (n=19), mean  $\pm$  SEM,  $P < 0.05$ ]. Whereas fetal trophoblast glycogen cells migrated well beyond the parietal trophoblast giant cell border by d14.5 pc in *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup> controls, they were halted at the maternal-fetal interface in *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> concepti (Fig. 4C, D). Furthermore, most fetuses in *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> females appeared smaller than those of their *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup> counterparts (particularly at e11.5), although quantitative analyses were not performed. *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> decidua were abnormal in appearance, notably featuring many mitotic figures at d11.5 pc, little evidence of apoptosis and many cells with unusually abundant cytoplasm, particularly near the trophoblast invasion front. Nonetheless, alkaline phosphatase staining confirmed them to be decidual cells (Fig. 4E, F). BrdU incorporation assays showed regions containing abnormally high numbers of proliferating decidual cells in proximity to the invading trophoblasts in *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> decidua that were not found in *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup> controls (Fig. 4G, H). Quantitative analyses of proliferating decidual cells throughout the mesometrial maternal decidua showed 41.9% more BrDU-positive cells in samples from *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> mice, although this was not found to be statistically significant (Table 4,  $P = 0.1$ ). Conversely, TUNEL assays showed a significant, nearly 9-fold decrease in apoptotic decidual cells in *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> mice relative to controls (Table 4, Fig 4I, J). Together, these results suggest that PTEN loss in maternal decidual cells impedes trophoblast migration by inhibiting decidual regression, and that this is mainly due to inhibition of decidual cell apoptosis.

*Abnormal maternal vascular development in *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> mice*

Histopathologic analyses also revealed poorly transformed maternal vasculature in d11.5 pc in *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> decidua. This was confirmed by immunostaining against the smooth muscle actin binding protein TAGLN (transgelin), which showed persistence of the muscular layer of maternal vessels in *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> even deep within the decidual tissue, contrary to *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup> controls (Fig. 5A, B). To investigate whether poor vascular transformation could be due to altered uNK infiltration, this cell type was labeled using *Dolichos biflorus* agglutinin. Results revealed the presence of 2.63-fold fewer uNKs in *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> decidua than in *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup> controls at d11.5 pc (Table 4, Fig. 5C, D). Maternal vascular transformation appeared complete at d14.5 pc in *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> mice and comparable to controls (data not shown), suggesting that the effects observed at d11.5 pc represented a transient delay. These results demonstrate that maternal vascular remodeling is perturbed in *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> mice, and may be linked to reduced infiltration of uNK cells.

*Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> mice have myometrial abnormalities

Histopathologic analyses of *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> uteri suggested an increase in the thickness of the myometrium (Fig. 6A, B). To confirm this finding in a quantitative manner, we measured myometrial thickness in non-pregnant and pregnant uteri throughout gestation. Results confirmed that increased myometrial thickness occurs in *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> uteri prior to and throughout gestation, with total thickness of the longitudinal and circular layers being nearly twice that of *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup> controls at all timepoints examined (Fig. 6C). Interestingly, TAGLN immunostaining suggested a lower overall level of TAGLN expression in *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> myometrial cells, and the muscle fibers frequently seemed less abundant and disorganized despite the overall greater thickness of the myometrial layer (Fig. 6D, E). Similar results were obtained when *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> myometria were immunostained for ACTA2 ( $\alpha$ -smooth muscle actin) (not shown). To verify if the increase in myometrial thickness could be due to an increase in fibroblasts within the myometrium, immunostaining was performed for the fibroblast marker S100A4. Results failed to show any obvious differences in myometrial fibroblast populations between

*Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> uteri and those from *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup> controls (not shown).

*Severe phenotypic anomalies in Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> females during the second gestation

Continued breeding of *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> females beyond the first gestation failed to produce offspring. Of 11 *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> females kept in breeding pairs, only one brought a gestation to term, but died due to an inability to completely expel the first fetus. In this female, a second completely developed pup was found in the uterus, along with six additional decomposing and partially resorbed pups. Additional timed mating experiments were then performed with *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> females that had previously had one litter. Copulatory plugs were observed in all cases, and females were sacrificed at d9.5, 21.5, 22.5, 42.5, 49.5, 61.5, 112.5 and 119.5 pc and the reproductive tracts were submitted for histopathologic analyses. All uteri showed varying degrees of hyperplasia of both the uterine and glandular epithelia (Fig. 7A). At d9.5, although all uteri examined showed evidence of implantation at several sites and residual maternal decidua (Fig. 7B), no viable fetuses were found. At d22.5 pc (i.e. 2-3 days after expected parturition), necrotic decidua, labyrinth and fetal membranes were frequently identified (Fig. 7C), along with transmural pyometritis and edema in the endometrial stroma (data not shown). At d42.5, a persistent mummified fetus was identified in one *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> female (data not shown), while others showed severe mucometra (Fig. 7D). In addition, evidence of endometrial fibrosis was found at d112.5 and d119.45 pc (not shown). Together, these data indicate that the subfertility observed in primiparous *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> mice progressed to sterility in the subsequent gestation, apparently due to epithelial hyperplasia and other uterine anomalies leading to failure of implanted fetuses develop to term.

## Discussion

Successful implantation is dependant on a complex interplay between the invading trophoblast and the maternal tissue. While some molecular mechanisms by which trophoblast cells invade the uterine tissue have been elucidated (6, 23, 24), the process by

which the decidua permits and regulates this invasion is not well understood. Several studies have shown that different signaling molecules can affect proliferation and apoptosis of uterine stromal and decidual cells *in vitro* by signaling via the PI3K/AKT pathway (12-15, 25, 26); however, the physiological importance of PI3K/AKT signaling during decidualization and decidual regression has not been established. In this report, we have shown that *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>; *Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> maternal decidual cells had vastly reduced PTEN expression, which was associated with greatly reduced apoptosis. This resulted in reduced trophoblast giant cell and glycogen cell migration, poor development of the placental labyrinth and apparent fetal growth restriction. This demonstrates a previously unknown role for PTEN in the regulation of decidual regression and trophoblast invasion, and suggests that PI3K/AKT signaling activity must be repressed in decidual cells at the fetal-maternal interface to permit these processes to occur normally. If the latter holds true, further studies will be required to identify: 1) the physiological agonists and antagonists of PI3K/AKT signaling in decidual cells; 2) which cells produce these factors; 3) how potential PI3K/AKT agonists and antagonists are regulated; and, 4) the mechanisms by which these factors ultimately regulate decidual cell apoptosis. Unexpectedly however, we failed to identify an increase in phospho-AKT expression in response to loss of PTEN in the *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>; *Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> uterus, and also failed to identify differences in the expression or activation of several downstream AKT signaling effectors commonly involved in the regulation of cell proliferation and apoptosis. This may indicate that, in decidual cells, PTEN promotes apoptosis via signaling mechanisms unrelated to the canonical PI3K/AKT pathway, as may also occur in other cell types (27). On the other hand, a subtle or transient deficiency of repression of PI3K/AKT signaling at the fetal-maternal interface in *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>; *Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> decidua could easily have gone undetected in our immunohistochemistry and immunoblotting experiments. Further analyses will therefore be required to confirm PTEN activity as an inhibitor of canonical PI3K/AKT signaling in this context.

In this study, we also identified a transient defect in the remodeling of the maternal vasculature in the pregnant *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>; *Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> uterus, which appeared to be related to decreased infiltration of uNK cells at d11.5 pc. Uterine NK cells are thought to be recruited from the peripheral blood in response to chemokines secreted by decidual, endometrial and trophoblast cells (28), causing their numbers to peak between d10.5 and



d14.5 pc in the maternal compartment of the mouse placenta (9, 29). The relative lack of uNK cells in *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> uteri may therefore be the result of altered secretion of chemoattractants by the decidua, possibly as a result of altered PI3K/AKT signaling causing chemokine genes to be abnormally expressed. However, several other mechanisms could be involved, for example *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> decidual cells may not express the proper complement of cell surface molecules to permit optimal uNK cells adhesion and migration. Alternatively, inhibition of trophoblast migration may prevent trophoblast chemokine production, or impede proper secretion or delivery of these signaling molecules. Thus, the *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> model may provide a useful model to study uNK chemotaxis and may aid to identifying the cell types and chemokines critical for uNK cells infiltration and subsequent maternal vascular remodeling during placentation.

The exact cause of fetal death in *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> mice remains enigmatic. At primiparity, the loss of some pups could be attributable to reduced trophoblast migration, poor labyrinth development and delayed transformation of the maternal blood vessels. Such defects resulted in shallow implantation, poor fetal-maternal circulation, inadequate embryonic development and ultimately death. However, histopathologic analyses of *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> concepti suggested that the extent of these problems, while entirely compatible with intra-uterine growth restriction, did not appear severe enough to cause fetal death. A possible explanation may be related to the observed uterine glandular epithelial cell hyperplasia, which was infrequently observed in virgin *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> mice but became a common feature throughout the uterus by the second pregnancy. Epithelial hyperplasia has previously been correlated with the loss of PTEN expression. A recent study reported that conditional deletion of *Pten* in the uterine epithelium using a transgenic mouse strain in which Cre expression is driven by the progesterone receptor promoter, resulted in severe epithelial hyperplasia that later developed into endometrial cancer (30). While our analyses of *Gt(ROSA)26Sor*<sup>tm1Sho/+</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> failed to detect Cre activity in the uterine epithelium, Cre-mediated recombination of the floxed *Pten* alleles in *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> uterine epithelial cells may have been stimulated during or following the first pregnancy, perhaps by a transient activation of the *Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr</sup> allele. The exact mechanism of how PTEN loss and subsequent hyperplasia in uterine

epithelial cells may cause fetal loss is unknown, but altered implantation and/or uterine glandular function are likely involved. The presence of mucometra and pyometritis in *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> uteri is suggestive of altered glandular secretions and compromised local immune functions, both of which are likely contributors to the development of sterility in *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> mice.

Another important finding reported in the present study is the increased thickness of the myometrium observed in pregnant and non-pregnant *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> mice. While histopathologic analyses attributed this change mainly to hypertrophy (i.e., increased smooth muscle cell size), we did not determine if smooth muscle cell numbers were also increased. Our finding that fibroblast numbers seem normal in *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> myometria suggests that the increased thickness of the myometrium was due to changes within the smooth muscle cells themselves. Rodent myometrial cells enter a proliferative phase during early pregnancy, and this is thought to be regulated in part by IGF1 signaling via the PI3K/AKT pathway (31). Therefore, the increased thickness of the myometrium in the *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> uterus prior to pregnancy suggests that PTEN normally functions to limit muscular development of the nonpregnant uterus. Whether it is also required during other phases of myometrial development (such as postpartum involution) remains to be determined. Interestingly, uterine muscle fiber development in *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> mice also seemed perturbed, as suggested by abnormal TAGLN and ACTA2 immunostaining patterns. Although the reason for this is unclear, rodent myometrial cells normally undergo synthetic and contractile developmental phases following their proliferation phase in early pregnancy, during which contractile proteins are synthesized in preparation for parturition (31). Thus, it would appear that sustained PI3K/AKT signaling caused by PTEN loss interferes with the later stages of myometrial development during pregnancy, leading to the development of cells with poorly organized muscle fibers. Increased myometrial thickness may therefore not result in increased effective uterine contractile ability, as evidenced by dystocia and the failure to expel the fetal remnants and uterine contents in *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> mice during the second gestation.

In summary, this study demonstrates that PTEN acts in several uterine cell types to regulate critical physiological processes, including decidual regression, trophoblast

invasion, maternal vascular remodeling and epithelial and myometrial proliferation and development. These results confirm and expand the roles played by uterine PI3K/AKT signaling during gestation. We propose that the *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> mouse represents a novel experimental model that will be useful in elucidating the signaling mechanisms that regulate implantation.

## Acknowledgements

The authors thank Dr Franco DeMayo for helpful advice, Dr Jaewook Jeong for assistance with alkaline phosphatase assays, and Kathie Whiteley, Mayra Tsoi and Céline Forget for assistance with mouse procedures. We are also grateful to Drs Richard R. Behringer and Soazik Jamin for providing the *Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr</sup> strain. We are also indebted to Dr Chad Wayne, whose preliminary observations in the *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> model (32) provided the impetus for the present study.

## References

1. **Linzer DHI, Fisher SJ.** The placenta and the prolactin family of hormones: regulation of the physiology of the pregnancy. *Mol Endocrinol* 13: 837-840, 1999.
2. **Jauniaux E, Hempstock J, Greenwold N, Burton GJ.** Trophoblastic oxidative stress in relation to temporal and regional differences in maternal placental blood flow in normal and abnormal early pregnancies. *Am J Pathol* 162: 115-125, 2003.
3. **Hustin J, Jauniaux E, Schaaps JP.** Histological study of the materno-embryonic interface in spontaneous abortion. *Placenta* 11: 477-486, 1990.
4. **Brosens IA.** The utero-placental vessels at term- the distribution and extent of the physiological changes. *Trophoblast Res* 3: 61-67, 1988.
5. **Sheppard BL, Bonnar J.** The maternal blood supply to the placenta in pregnancy complicated by intrauterine fetal growth retardation. *Trophoblast Res* 3:69-81, 1988.
6. **Lyll F.** Mechanisms regulating cytotrophoblast invasion in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 46: 266-73, 2006.
7. **Huppertz B.** The feto-maternal interface: setting the stage for potential immune interactions. *Semin Immunopathol* 29: 83-94, 2007.
8. **Goldman-Wohl D, Yagel S.** Regulation of trophoblast invasion: from normal implantation to pre-eclampsia. *Mol Cell Endocrinol* 187: 233-238, 2002.
9. **Croy BA, Ashkar AA, Minhas K, Greenwood JD.** Can murine uterine natural killer cells give insights into the pathogenesis of preeclampsia. *J Soc Gynecol Investig* 7: 12-20, 2000.
10. **Guimond MJ, Luross JA, Wang B, Terhorst C, Danial S Croy BA.** Absence of natural killer cells during murine pregnancy is associated with reproductive compromise in TgE26 mice. *Biol Reprod* 56: 169-179, 1997.
11. **Cross JC, Hemberger M, Lu Y, Nozaki T, Whiteley K, Masutani M, Adamson SL.** Trophoblast functions, angiogenesis and remodeling of the maternal vasculature in the placenta. *Mol Cell Endocrinol* 187: 207-212, 2002.
12. **Iwase A, ando H, Nagasaka T, Shibata D, Harata T, Shimomura Y, Goto M, Kikkawa F.** Neutral endopeptidase expressed by decidualized stromal cells suppresses akt phosphorylation and deoxyribonucleic acid synthesis induced by endothelin-1 in human endometrium. *Endocrinology* 147: 5153-5159, 2006.

13. **Toyofuku A, Hara T, Taguchi T, Katsura Y, Ohama K, Kudo Y.** Cyclic and characteristic expression of phosphorylated Akt in human endometrium and decidual cells in vivo and in vitro. *Hum Reprod* 21: 1122-1128, 2006.
14. **Tessier C, Prigent-Tessier A, Ferguson-Gottschall S, Gu Y, Gibori G.** PRL antiapoptotic effects in the rat deciduas involves the PI3K/protein kinase B- mediated inhibition of caspase-3 activity. *Endocrinology* 142: 4086-4094, 2001.
15. **Shooner C, Caron PL, Fréchette-Frigon G, Leblanc V, Déry MC, Asselin E.** TGF-beta expression during rat pregnancy and activity on decidual cell survival. *Reprod Biol Endocrinol* 3: 20, 2005.
16. **Chow LM, Baker SJ.** PTEN function in normal and neoplastic growth. *Cancer Lett* 241: 184-196, 2006.
17. **Groszer M, Erickson R, Scripture-Adams DD, Lesche R, Trumpp A, Zack JA, Kornblum HI, Liu X, Wu H.** Negative regulation of neural stem/progenitor cell proliferation by the Pten tumor suppressor gene in vivo. *Science* 294: 2186-2189, 2001.
18. **Jamin SP, Arango NA, Mishina Y, Hanks MC, Behringer RR.** Requirement of Bmpr1a for Müllerian duct regression during male sexual development. *Nat Genet* 32: 408-410, 2002.
19. **Laguë MN, Paquet M, Fan HY, Kaartinen MJ, Chu S, Jamin SP, Behringer RR, Fuller PJ, Mitchell A, Doré M, Huneault LM, Richards JS, Boerboom D.** Synergistic effects of Pten loss and WNT/CTNNB1 signaling pathway activation in ovarian granulosa cell tumor development and progression. *Carcinogenesis* 29: 2062-2072, 2008.
20. **Arango NA, Szotek PP, Manganaro TF, Oliva E, Donahoe PK, Teixeira J.** Conditional deletion of beta-catenin in the mesenchyme of the developing mouse uterus results in a switch to adipogenesis in the myometrium. *Dev Biol* 288: 276-283, 2005.
21. **Szotek PP, Chang HL, Zhang L, Preffer F, Dombkowski D, Donahoe PK, Teixeira J.** Adult mouse myometrial label-retaining cells divide in response to gonadotropin stimulation. *Stem Cells* 25: 1317-1325, 2007.
22. **Petit FG, Jamin SP, Kurihara I, Behringer RR, DeMayo FJ, Tsai MJ, Tsai SY.** Deletion of the orphan nuclear receptor COUP-TFII in uterus leads to placental deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 6293-6298, 2007.
23. **Bischof P, Campana A.** Molecular mediators of implantation. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 14: 801-814, 2000.

24. **Bischof P, Meisser A, Campana A.** Biochemistry and molecular biology of trophoblast invasion. *Ann N Y Acad Sci* 943: 157-162, 2001.
25. **Lathi RB, Mess AP, Tulac S, Nayak NR, Conti M, Giudice LC.** Dose-dependent insulin regulation of insulin-like growth factor binding protein-1 in human endometrial stromal cells is mediated by distinct signaling pathways. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 1599-1606, 2005.
26. **Yoshino O, Osuga Y, Hirota Y, Koga K, Yano T, Tsutsumi O, Taketani Y.** Akt as a possible intracellular mediator for decidualization in human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod* 9: 265-269, 2003.
27. **Blanco-Aparicio C, Renner O, Leal JF, Carnero A.** PTEN, more than the AKT pathway. *Carcinogenesis* 28: 1379-1386, 2007.
28. **Santoni A, Carlino C, Stabile H, Gismondi A.** Mechanisms underlying recruitment and accumulation of decidual NK cells in uterus during pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 59: 417-424, 2008.
29. **Craven CM, Morgan T, Ward K.** Decidual spiral artery remodeling begins before cellular interaction with cytotrophoblasts. *Placenta* 19: 241-252, 1998.
30. **Daikoku T, Hirota Y, Tranguch S, Joshi AR, DeMayo FJ, Lydon JP, Ellenson LH, Dey SK.** Conditional loss of uterine Pten unfailingly and rapidly induces endometrial cancer in mice. *Cancer Res* 68: 5619-5627, 2008.
31. **Shynlova O, Tsui P, Jaffer S, Lye SJ.** Integration of endocrine and mechanical signals in the regulation of myometrial functions during pregnancy and labour. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 144: S2-S10, 2009.
32. **Wayne C, Paquet M, Wu H, Richards JS.** Pregnancy is impaired in *Pten*<sup>flox/flox</sup>*Amhr2*<sup>cre/+</sup> conditional knockout mice. *Program of the 38<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction*, Quebec, Canada, 2005, p 253, 2005.

## Figure legends

Figure 1. *Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr</sup> mice exhibit Cre activity in myometrial and decidual cells and in the blood vessels. Histological sections of uteri from d11.5 pc pregnant *Gt(ROSA)26Sor*<sup>tm1Sho/+</sup> (A, control) and *Gt(ROSA)26Sor*<sup>tm1Sho/+</sup>; *Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> (B-D) were stained for GLB1 activity (blue). Results showed Cre activity in the myometrium (M, panel B), decidual cells (D, panel C; also faintly visible in panel B) and blood vessels (arrow, panel D) in *Gt(ROSA)26Sor*<sup>tm1Sho/+</sup>; *Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> uteri. Original magnification, 400X (panels A, B) and 630X (panels C, D).

Figure 2. Loss of PTEN expression in stromal, decidual and myometrial cells in *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>; *Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> mice. Immunohistochemical analysis of PTEN expression in uteri of non-pregnant (A, B) and d11.5 pc (C, D) *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup> and *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>; *Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> mice showing a loss of PTEN expression in the myometrium (M), uterine stroma, maternal decidual cells (MD) and some uterine glandular epithelial cells (panel B, inset). The same pattern of expression was also observed in *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>; *Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> uteri at d9.5 and d14.5 pc (data not shown). Loss of PTEN expression did not result in appreciable differences in phospho-AKT or phospho-mTOR expression in *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>; *Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> mice (F, H) at d11.5pc, compared to controls (E, G). FTGC = fetal trophoblast giant cells, L= labyrinth. Original magnification, 100X (A-H) and 400X (panel B, inset).

Figure 3. Representative immunoblot analyses of *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup> and *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>; *Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> uterine wall samples from non-pregnant mice and at d11.5 pc. In pregnant mice, uterine tissues surrounding healthy and non-viable fetuses were analyzed separately. Densitometric analyses were performed using n=4 samples per pregnancy/viability status and per genotype, and normalized to corresponding ACTB loading control values prior to statistical analyses. Comparisons between genotypes for each pregnancy/viability status failed to show statistically significant differences for any of the proteins examined, except for PTEN as mentioned in the text. Arrows indicate bands of interest.

Figure 4. Defects in trophoblast invasion and maternal decidual regression in *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> mice. (A) Photomicrograph of a *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup> conceptus at d11.5 pc showing a well-developed labyrinth (L) and spongiotrophoblast (S), normal migration of the fetal trophoblast giant cells (FTGC), and a regressing maternal decidua (MD). (B) Photomicrograph of a *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> conceptus at d11.5 pc showing an underdeveloped labyrinth, reduced trophoblast migration and a persistent maternal decidua. (C) Cytokeratin immunohistochemical analysis of a *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup> conceptus at d14.5, showing normal invasion of trophoblast glycogen cells (border indicated with a green dotted line) beyond the trophoblast giant cell border (red dotted line). Glycogen cells are seen as negative images (gaps) in the immunohistochemistry specimen (D) Same as C, in a *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> conceptus. Note the failure of the glycogen cells to invade the decidua. (E, F) Alkaline phosphatase staining (blue) of *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup> and *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> decidual cells. M=myometrium. (G, H) BrdU incorporation and (I, J) TUNEL analysis of *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup> and *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> uteri at d11.5 pc showing increased proliferation and reduced apoptosis in the maternal decidual cells. Arrows indicate examples of BrdU and TUNEL positive cells, and these are also shown at higher magnification in the subpanels. Original magnification, 50X (A, B), 100X (C-J), 1000X (subpanels G-J).

Figure 5. Decreased uNK infiltration and poorly transformed blood vessels in the maternal decidua of *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> mice. (A, B) TAGLN immunohistochemistry and (C, D) *Dolichos biflorus* agglutinin lectin analyses on uteri from d11.5 pc mice, showing decreased numbers of uNK cells and poorly transformed blood vessels (arrowheads, also shown at higher magnification in the subpanel) in *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> maternal decidua compared to well-transformed blood vessels (arrows, also shown at higher magnification in the subpanel) in the *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup> controls. Original magnification, 100X (A, B), 200X (C, D), 1000X (subpanels A, B).

Figure 6. Increased myometrial thickness in *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> mice. (A, B) Photomicrographs of d14.5 *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup> and *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup>



uteri illustrating a thicker myometrium in the latter (M=myometrium). (C) Histogram of myometrial thickness measurements in non-pregnant, d9.5, d11.5 and d14.5 pc *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup> and *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> mice. Columns and error bars denote mean  $\pm$  SEM. Asterisk (\*) denotes significant difference from control ( $P < 0.05$ ). (D, E) TAGLN immunohistochemical analysis of *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup> and *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> uteri at d11.5 pc. Note the disorganized staining pattern in *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> myometrial cells. Original magnification, 200X (A, B) or 1000X (D, E).

Figure 7. Histopathologic analysis of *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> uteri during the second pregnancy. Photomicrographs depict epithelial hyperplasia at d9.5 pc (panel A, arrow), residual maternal decidua at d9.5 pc (panel B, circumscribed by dashed line), necrotic maternal decidua at d22.5 pc (panel C, circumscribed by dashed line, arrows indicate labyrinth and fetal membranes) and mucometra at d41.5 pc (panel D, arrows). Original magnification, 400X (A), 200X (B), 20X (C) and 12.5X (D).

Table 1. Fertility in primiparous *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> mice

	<i>Pten</i> <sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>	<i>Pten</i> <sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup> ; <i>Amhr2</i> <sup>tm3(cre)Bhr/+</sup>
Plugs observed	10	12
Pregnancies brought to term	10	8
Total number of pups	62	42
Litter size (mean ± SEM)	6.2 ± 0.73	3.5 ± 0.97*

Asterisk (\*) denotes a significant difference from control ( $P < 0.05$ ).

Table 2. Reduced fetal viability at e11.5 in *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> females

	<i>Pten</i> <sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>	<i>Pten</i> <sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup> ; <i>Amhr2</i> <sup>tm3(cre)Bhr/+</sup>
Number of pregnancies	5	4
Number of viable fetuses	29	17
Total number of concepti	35	31
Fetal viability	85.9%	54.8%

Table 3. Serum progesterone levels are normal in pregnant

*Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> mice

	<i>Pten</i> <sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>	<i>Pten</i> <sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup> ; <i>Amhr2</i> <sup>tm3(cre)Bhr/+</sup>
d9.5 pc	18.76 ± 2.77 (n=6)	26.46 ± 7.85 (n=4)
d11.5 pc	22.98 ± 2.39 (n=9)	17.29 ± 3.62 (n=5)
d14.5 pc	34.50 ± 4.44 (n=6)	41.30 ± 9.07 (n=6)

Values are ng/ml.

Table 4. Decreased apoptosis and uNK cells in *Pten*<sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>;*Amhr2*<sup>tm3(cre)Bhr/+</sup> maternal decidua

	<i>Pten</i> <sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup>	<i>Pten</i> <sup>tm1Hwu/tm1Hwu</sup> ; <i>Amhr2</i> <sup>tm3(cre)Bhr/+</sup>
BrDU	36.26 ± 8.28 (n=6)	51.44 ± 5.12 (n=8)
TUNEL	31.57 ± 5.98 (n=7)	3.530 ± 0.597* (n=8)
uNKs	468.7 ± 29.8 (n=6)	178.2 ± 40.5* (n=8)

All figures are mean cells/mm<sup>2</sup> ± SEM. Asterisk (\*) denotes a significant difference from control ( $P < 0.05$ ).

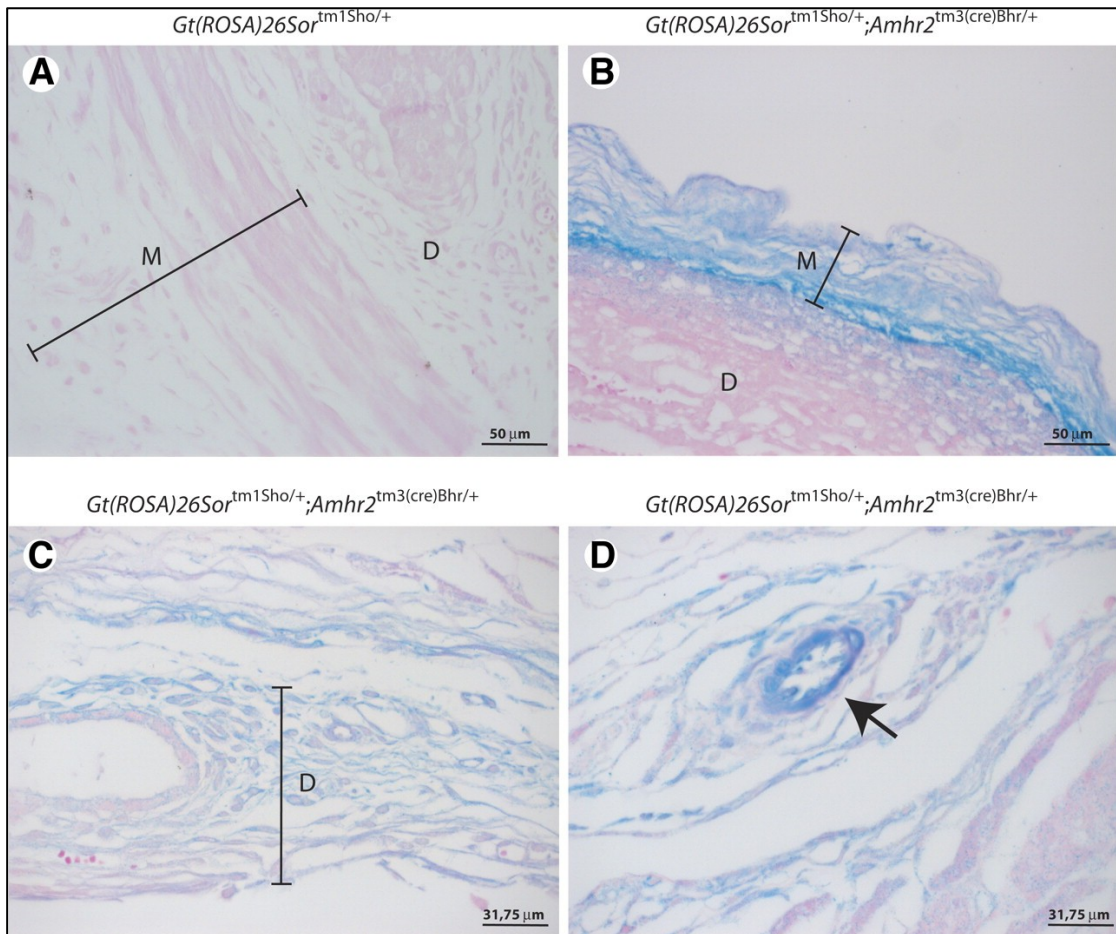
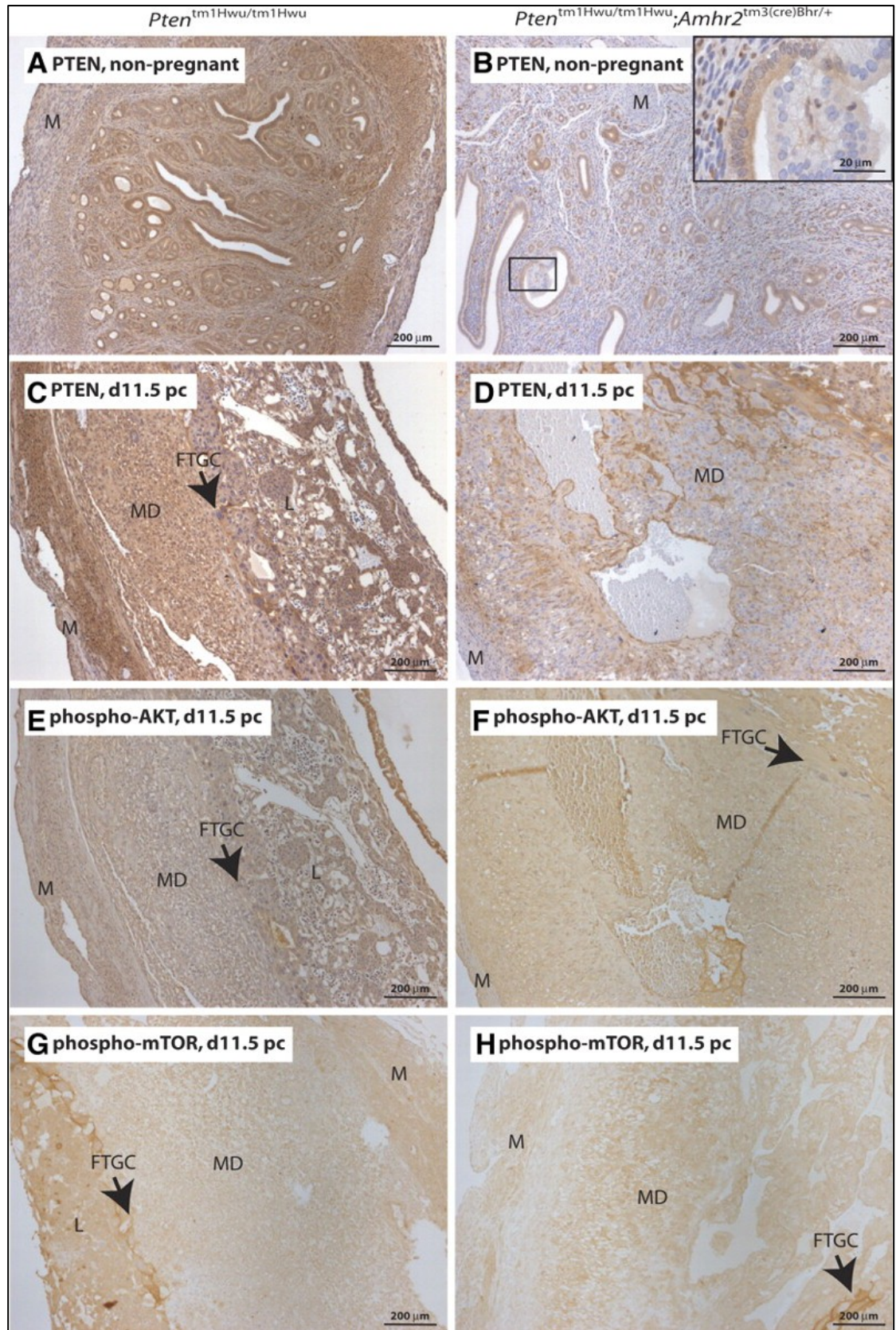
**Figure 1**

Figure 2





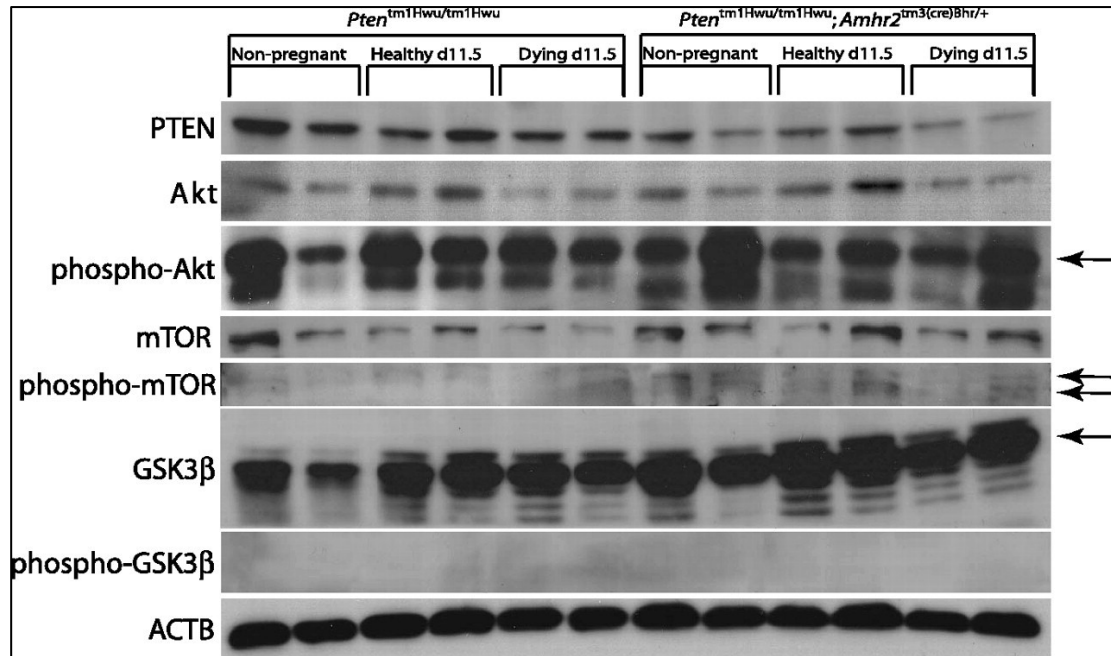
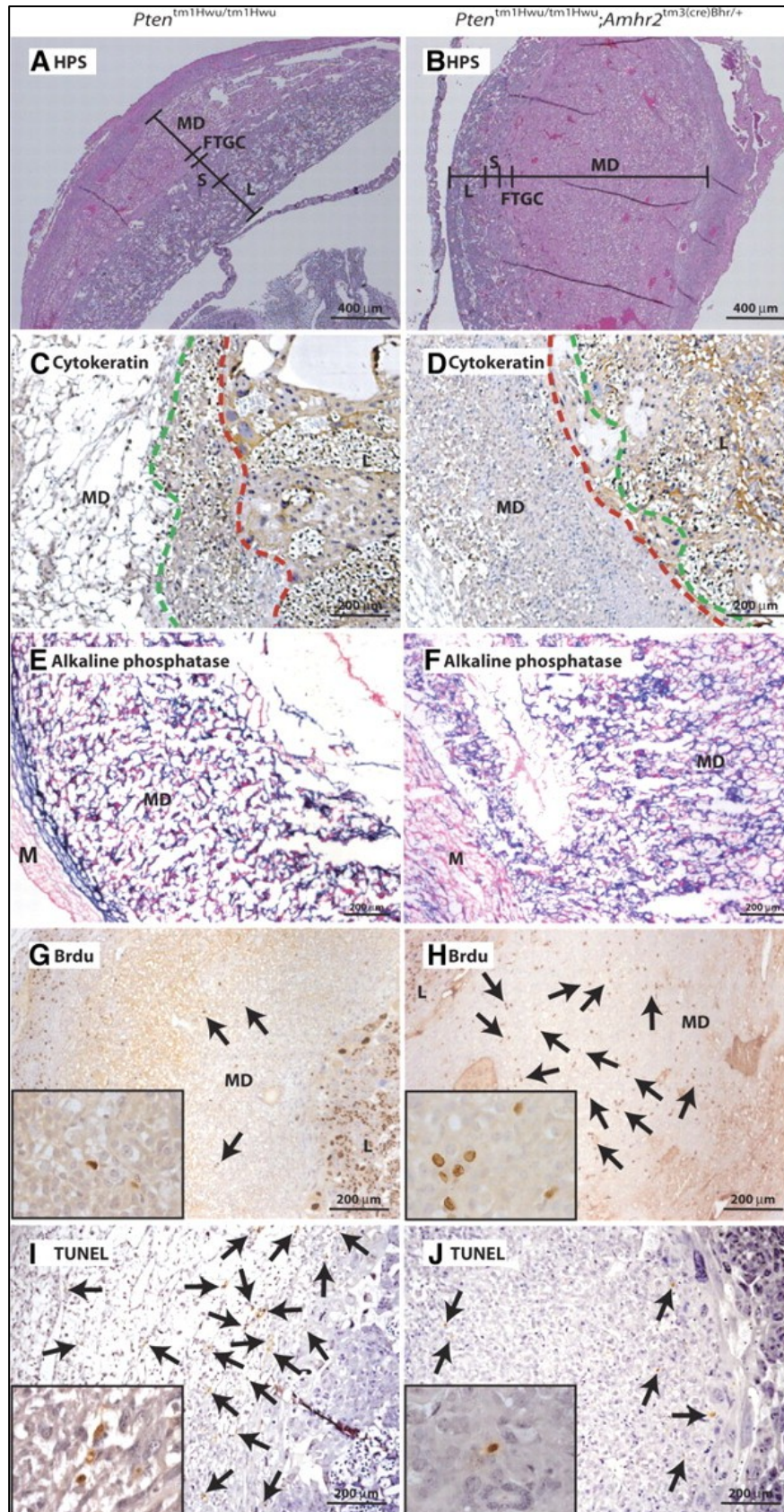
**Figure 3**

Figure 4





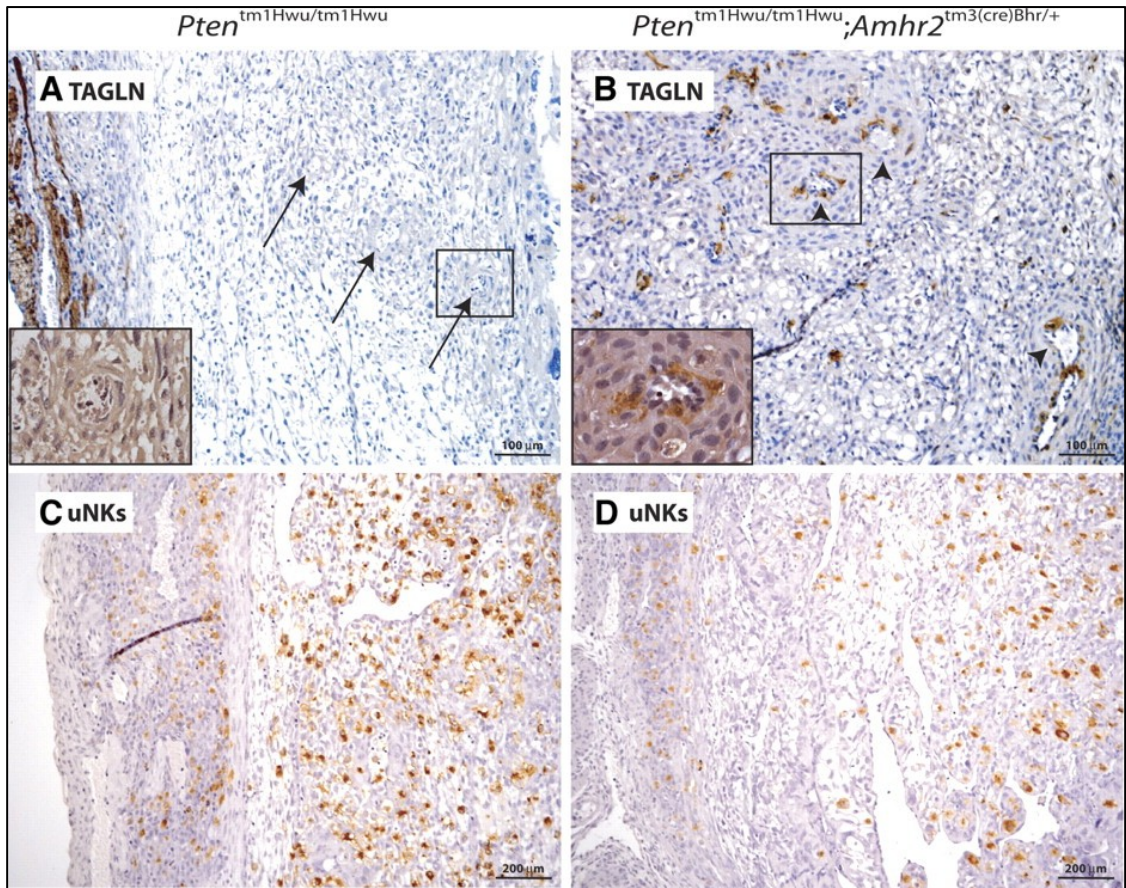
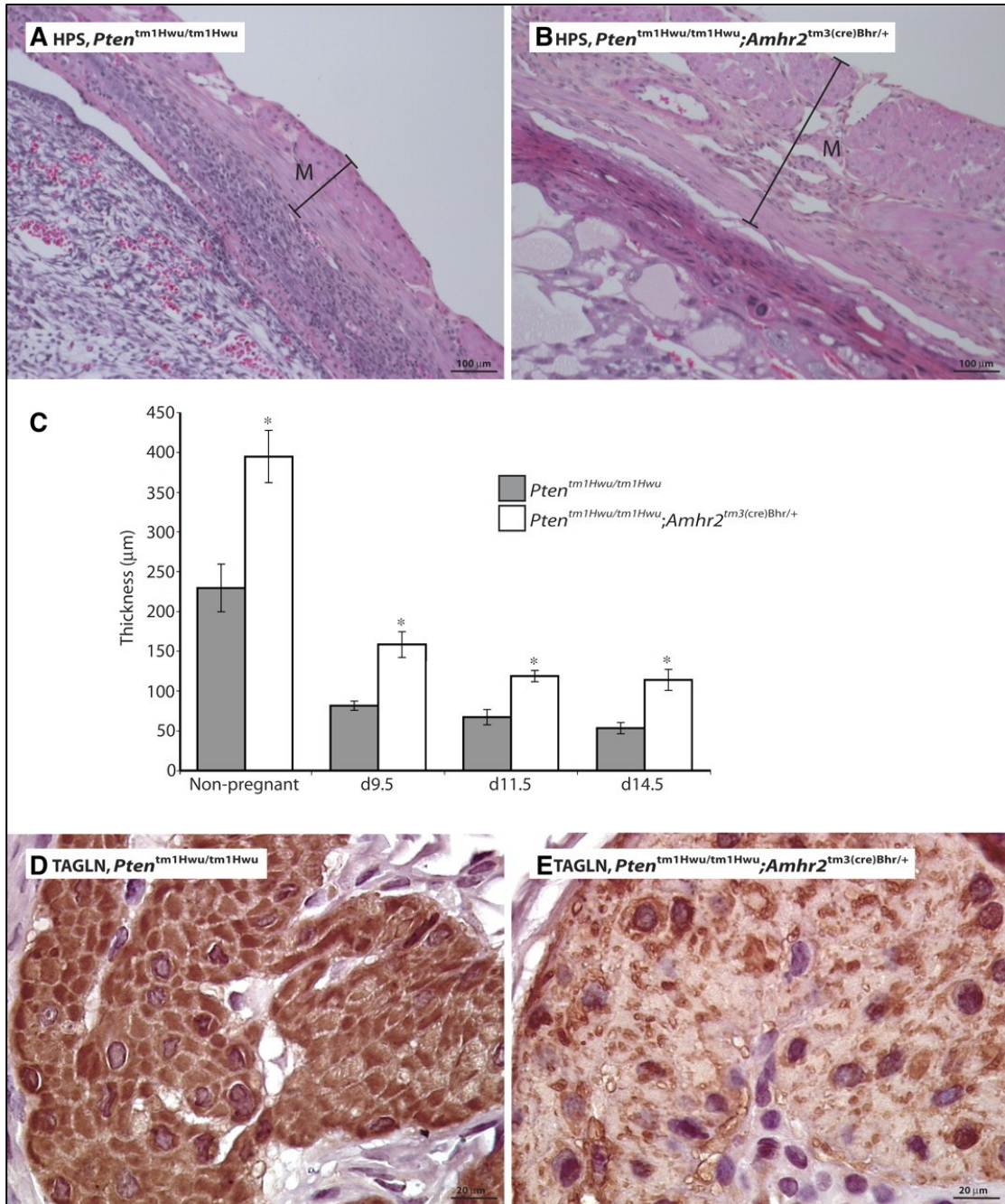
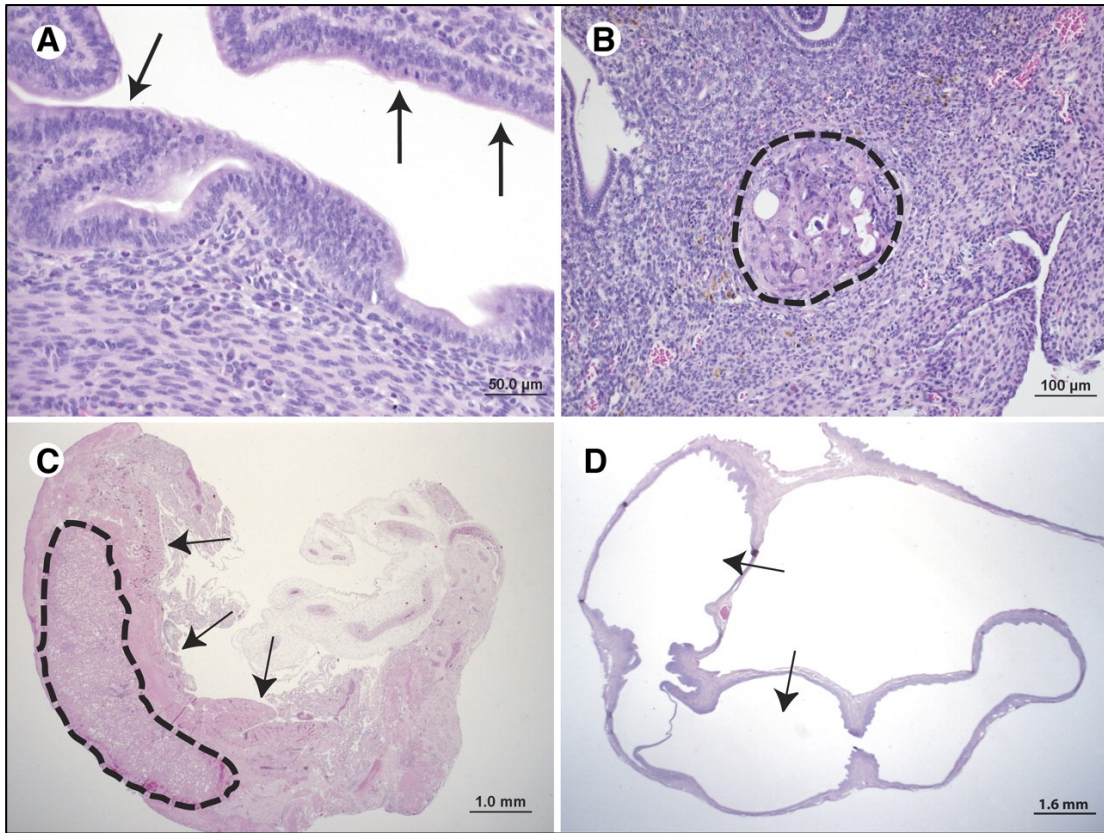
**Figure 5**



Figure 6



**Figure 7**



## Chapitre 5 : Discussion générale

La tumeur des cellules de la granulosa (GCT) est une pathologie rare chez la femme et son pronostic est souvent meilleur que le cancer de l'épithélium de surface ovarien. Par contre, chez les patientes souffrant de grades plus avancés, une récurrence est possible et elle peut même survenir jusqu'à dix ans après le diagnostic initial. Dans ces cas, le pronostic s'assombrit énormément puisque 80% des patientes décèdent de cette récurrence (48, 93). Malgré ces statistiques, la faible incidence de la GCT limite le nombre d'études dédiées à mieux comprendre sa biologie moléculaire. Une des conséquences de ce manque de données se manifeste entre autres au niveau des techniques de diagnostic qui n'ont pas été conçues pour détecter spécifiquement et avec sensibilité cette pathologie, tant au stade initial qu'à la récurrence (93).

Le développement de modèles animaux de cette maladie fournirait à la communauté scientifique un puissant outil préclinique pour le développement de nouvelles interventions thérapeutiques. De plus, ces animaux permettraient de développer des nouvelles techniques de diagnostic spécifiques et sensibles à la maladie initiale et à la récurrence. Malheureusement, les différents modèles de souris transgéniques créés dans le passé partageaient peu de similarités avec la maladie retrouvée chez la femme.

Au début des années 1990, une lignée de souris transgéniques a été créée afin de provoquer une déficience en inhibine, hormone ovarienne sécrétée par les cG durant la folliculogénèse (96, 104). Les femelles « *Inha*<sup>-/-</sup> » présentaient une infertilité due à des tumeurs ovariennes et les analyses histopathologiques ont révélées que les cellules tumorales n'étaient pas assez différenciées pour être identifiées comme étant des cG, cT ou encore des cellules stromales ovariennes. Ces souris ont tout de même permis d'attribuer à l'inhibine un rôle de répresseur de prolifération au niveau ovarien (75).

Dans le courant de cette même période, une seconde lignée fut créée en utilisant le promoteur de *Inha* afin de diriger l'expression du transgène oncogénique « SV40 T-ag » aux cellules de la granulosa. Les femelles « *inhap*/SV40 T-ag » ont développé des tumeurs ovariennes bilatérales dont les cellules exprimaient des marqueurs moléculaires des cG. Par contre, ces cellules ne se comportaient pas comme telles, en fait elles semblaient être des cG en lutéinisation (64).

Nous considérons que les souris « *Inha*<sup>-/-</sup> » et « *inhap*/SV40 T-ag » ne sont pas des modèles animaux représentatifs de la maladie chez la femme par leur manque de similarités au niveau cellulaire ainsi qu'au niveau moléculaire avec la GCT humaine. Effectivement, aucune lésion génétique au niveau de l'inhibine n'a été impliquée dans l'étiologie de la GCT ni dans d'autres types de cancers ovariens chez la femme (64, 75).

Plus récemment, des expériences ont résulté en la création de souris transgéniques surexprimant la LH. Les femelles « bLH $\beta$ -CTP » étaient infertiles et venaient à développer des tumeurs constituées de cG et cT. Par contre, chez la femme, une surexpression de LH a été associée à une baisse de fertilité et des fausses-couches et non à la tumorigenèse. Par conséquent, tout comme les lignées de souris « *Inha*<sup>-/-</sup> » et « *inhap*/SV40 T-ag », les femelles « bLH $\beta$ -CTP » n'étaient pas représentatives de la biologie moléculaire de la GCT chez la femme (88).

Au milieu des années 2000, des études ont été dédiées à une voie de signalisation dont l'activation est retrouvée dans 90% des cas de cancers du côlon chez l'humain : la voie WNT/CTNNB1 (17-19, 48). Cette voie est activée lorsque WNT se lie et active ses corécepteurs membranaires « frizzled » (FZD) et « lipoprotein receptor-related proteins » (LRP). CTNNB1, un facteur de transcription et protéine-clé de cette voie, est alors libéré du complexe protéinique APC/AXIN/GSK3 $\beta$  et peut migrer dans le noyau pour induire l'expression de ses gènes cibles. Par contre, si WNT n'active pas ses corécepteurs, le complexe protéinique lie et phosphoryle CTNNB1 dans le cytoplasme pour ensuite induire son ubiquitination et sa dégradation par les protéasomes (17-19, 70). Cette voie est cruciale pour le développement embryonnaire de l'ovaire. De plus, plusieurs de ses molécules sont exprimées à différents stades de la folliculogenèse et sont impliquées dans la stéroïdogénèse. Par exemple, CTNNB1 est retrouvé dans les cG *in vitro* et maximise l'induction de la transcription de *Cyp19a1* par FSH dans ces cellules (FIGURE 8) (70).

Voyant l'importance de la voie WNT/CTNNB1 dans l'ovaire, des expériences ont ensuite été effectuées afin d'évaluer le niveau d'expression protéinique de CTNNB1 des cG et des cGCT humaines. Ces analyses ont révélé une augmentation de l'intensité du signal nucléaire de CTNNB1 dans les cellules tumorales, contrairement aux cG, dans lesquelles il était retrouvé dans le cytoplasme, autour du noyau ou encore près de la membrane plasmique (17). Ceci démontrait donc un dérèglement de la voie de signalisation résultant en une translocalisation nucléaire de CTNNB1 dans les cGCT

humaines. En constatant l'importance potentielle de la voie dans l'étiologie de la GCT, une lignée de souris transgéniques a été créée grâce à la technologie Cre-LoxP afin qu'elles expriment une forme mutante active de CTNNB1 et ce, seulement dans les cG (19). Pour ce faire, il a fallu cibler de façon conditionnelle les séquences géniques codant pour les sites nécessaires à la phosphorylation et dégradation de CTNNB1 par APC/AXIN/GSK3 $\beta$ , localisées dans le troisième exon du gène *Cttnb1*. La souche *Amhr2*<sup>cre</sup> a été utilisée pour diriger l'expression de la recombinaise virale *Cre* dans les cG, résultant en l'expression d'un mutant de CTNNB1 qui ne possédait pas les sites nécessaires à sa dégradation et qui pouvait être constamment translocalisé dans le noyau des cG (17-19). À partir de cinq à six semaines d'âge, les analyses histologiques des ovaires de ces souris *Cttnb1*<sup>flox(ex3)/+</sup>; *Amhr2*<sup>cre/+</sup> ont révélé des amas de cG désorganisées, nommés des lésions pré-tumorales, dont certaines possédaient même des antres folliculaires mais sans ovocytes. Ces lésions se développaient en GCT plus tard dans la vie de ces animaux, atteignant 57% des souris de 7.5 mois d'âge. Des structures folliculaires avec des cavités remplies de liquide éosinophile ont été retrouvées dans ces tumeurs ovariennes, ce qui est aussi caractéristique de la pathologie humaine (48). Par contre, les cas les plus avancés de GCT humaines peuvent se métastaser vers d'autres organes et ensemercer la cavité abdominale; ces caractéristiques n'ont pas été observées chez les femelles *Cttnb1*<sup>flox(ex3)/+</sup>; *Amhr2*<sup>cre/+</sup> (17, 18, 48). Par conséquent, le phénotype de GCT des femelles *Cttnb1*<sup>flox(ex3)/+</sup>; *Amhr2*<sup>cre/+</sup> se rapproche énormément de la GCT retrouvée chez la femme tant au niveau moléculaire (dérèglement de la voie WNT/CTNNB1) qu'au niveau histologique (nécrose, ossification). Il a été proposé que ceci fasse de cette lignée de souris le modèle animal le plus représentatif de la maladie humaine à ce moment (17, 18).

Au départ, notre projet consistait à établir si un dérèglement de la voie de signalisation PI3K/AKT était retrouvé dans l'étiologie des GCT chez la femme, en se basant sur son importance dans l'ovaire et sa régulation par FSH dans les cG lors de la folliculogénèse. Nous avons donc évalué l'expression de PTEN et AKT phosphorylé (PAKT) dans des tissus ovariens sains et des GCT humains. Le niveau d'ARNm et protéinique de PTEN ne démontrait aucune variation significative entre les échantillons normaux et tumoraux. En fait, sa localisation était limitée à des cellules stromales non tumorales entourant les GCT. Par contre, même si le niveau d'expression de PAKT semblait constant entre les tissus ovariens sains et les GCT, sa localisation variait d'un type

de tissu à l'autre. Effectivement, dans les cG, PAKT était retrouvée dans le cytoplasme, alors que dans une proportion des cGCT, elle était localisée autour du noyau des cellules tumorales. Ce changement de localisation a probablement un lien avec l'activité nucléaire de PAKT et démontre un dérèglement de la voie de signalisation PI3K/AKT qui pourrait jouer un rôle dans l'étiologie de la GCT chez la femme (74). Pour tester cette hypothèse, nous avons donc créé une lignée de souris grâce à la technologie Cre-LoxP en utilisant le même promoteur spécifique aux cG que les souris *Ctnnb1*<sup>flox(ex3)/+</sup>; *Amhr2*<sup>cre/+</sup>. Par contre, dans notre cas, ce fut le gène *Pten* qui fut excisé du génome des cG afin de provoquer une perte de PTEN dans les cG des souris *Pten*<sup>flox/flox</sup>; *Amhr2*<sup>cre/+</sup>.

La majorité de nos femelles *Pten*<sup>flox/flox</sup>; *Amhr2*<sup>cre/+</sup> (93%) démontraient un phénotype de sous-fertilité : elles donnaient naissance à environ deux fois moins de souriceaux que les femelles contrôles. Par contre, nous n'avons décelé aucune anomalie ovarienne, tant histologique que fonctionnelle. En effet, le nombre de concepti implantés à J9.5pc dans les souris *Pten*<sup>flox/flox</sup>; *Amhr2*<sup>cre/+</sup> n'était pas différent de celui du groupe de référence. De plus, des expériences ont révélé que les niveaux ovariens de l'ARNm et de la protéine PTEN semblaient constants entre le groupe de femelles expérimentales et les contrôles. Ceci pourrait signifier que l'excision du gène *Pten* par la recombinase virale n'était pas assez efficace au point de causer une perte de *Pten* dans la plupart des cG, expliquant ainsi la fonction ovarienne normale chez la majorité des femelles *Pten*<sup>flox/flox</sup>; *Amhr2*<sup>cre/+</sup>. Toutefois, l'autre petite proportion de ces femelles (7%) ont développé des GCT entre de 7 semaines et 7 mois d'âge. Des analyses histopathologiques des tumeurs ont révélé des sites de nécrose, d'ossification et de kystes, aussi observés dans le modèle *Ctnnb1*<sup>flox(ex3)/+</sup>; *Amhr2*<sup>cre/+</sup>. De plus, des embolies et des métastases ont été retrouvées dans les poumons, ce qui fait de cette lignée de souris le premier modèle à démontrer cette caractéristique des formes avancées de la maladie chez la femme (48). Par contre, aucun signe d'ensemencement de la cavité abdominale et les organes internes n'a été observé.

Nous avons ensuite émis l'hypothèse qu'une synergie fonctionnelle entre les voies de signalisation PI3K/AKT et WNT/CNNB1 dans les cG résulterait en un phénotype tumoral ovarien plus sévère que celui retrouvé chez les souris *Ctnnb1*<sup>flox(ex3)/+</sup>; *Amhr2*<sup>cre/+</sup> et *Pten*<sup>flox/flox</sup>; *Amhr2*<sup>cre/+</sup>. Pour tester cette hypothèse, nous avons créé une seconde lignée de souris transgéniques avec les deux mutations qui dérègleraient les deux voies dans les cG. Contrairement aux souris *Pten*<sup>flox/flox</sup>; *Amhr2*<sup>cre/+</sup>, toutes les femelles



*Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Ctnnb1*<sup>flox(ex3)/+</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> ont développé des GCT avec des sites de nécrose, d'ossification et des kystes. Par contre, ces tumeurs se sont avérées beaucoup plus agressives que le modèle *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup>. Effectivement, le développement de la maladie se déclenchait à la naissance et sa croissance était tellement rapide qu'elle provoquait la mort des animaux au plus tard à huit semaines d'âge. De plus, les GCT de ces souris avaient la capacité de se métastaser aux poumons et aussi d'ensemencer la cavité abdominale et envahir les tissus hépatiques, pancréatiques, surrénales et même la paroi abdominale. Ces caractéristiques pathologiques font de la lignée *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Ctnnb1*<sup>flox(ex3)/+</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> le modèle le plus représentatif des cas avancés de GCT chez la femelle. De plus, elle a permis d'établir une synergie fonctionnelle entre les voies de signalisation WNT/CTNNB1 et PI3K/AKT dans l'étiologie de ce type de tumeur. D'une part, les lésions pré-tumorales des souris *Ctnnb1*<sup>flox(ex3)/+</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> ne nuisaient pas à la santé des femelles et devenaient des GCT seulement à longue échéance, indiquant le rôle de la voie WNT/CTNNB1 surtout au niveau de l'initiation du développement tumoral. D'autre part, peu de femelles *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> ont développé des GCT, mais celles-ci se sont avérées très agressives, suggérant l'implication de la voie PI3K/AKT surtout dans la progression et la croissance des tumeurs. La présence à la fois d'une lésion initiatrice (*Ctnnb1*) et accélératrice (*Pten*) expliquerait l'impressionnant phénotype tumoral des souris *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Ctnnb1*<sup>flox(ex3)/+</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup>.

Nous proposons que les lignées de souris *Ctnnb1*<sup>flox(ex3)/+</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> et *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Ctnnb1*<sup>flox(ex3)/+</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> représentent d'excellents outils pour étudier la biologie moléculaire de la GCT. Le phénotype que ces souris développent est 100% pénétrant et très peu variable et elles présentent tous les stades de la maladie, débutant avec les lésions pré-tumorales des souris *Ctnnb1*<sup>flox(ex3)/+</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup>, jusqu'aux stades plus avancés, soit les GCT métastatiques des femelles *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Ctnnb1*<sup>flox(ex3)/+</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup>. De plus, ces souris sont immunocompétentes, donc peu dispendieuses, et nous permettent d'étudier l'initiation et la progression de la maladie dans l'organe d'origine. Nous proposons que les femelles *Ctnnb1*<sup>flox(ex3)/+</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> et *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Ctnnb1*<sup>flox(ex3)/+</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> sont des modèles idéaux pour le développement de nouvelles techniques de diagnostic sensibles et spécifiques ainsi que des traitements conçus en fonction de la GCT initiale et même de sa récurrence.

Puisqu'un des objectifs de notre projet était d'étudier le rôle de la voie de signalisation PI3K/AKT dans l'étiologie de la GCT, nous avons donc analysé les GCT des femelles *Pten*<sup>flox/flox</sup>; *Amhr2*<sup>cre/+</sup> afin d'élucider les mécanismes moléculaires de cette voie impliqués dans la pathogenèse de cette maladie. Étonnement, en plus d'une perte de PTEN, les cGCT ont aussi démontré une perte drastique de PAKT. Il est possible que cette perte soit un mécanisme moléculaire adaptatif de la cellule-même qui, en tentant de contrôler sa propre prolifération, aurait activé une autre phosphatase qui aurait compensé pour la perte de PTEN. Malgré la perte de PAKT, la régulation de l'activité de certaines de ses cibles effectrices a été modifiée dans les cGCT. Effectivement, nous avons observé une perte drastique du facteur de transcription pro-apoptotique FOXO1A et une augmentation du marqueur de prolifération mTOR (tant à l'état phosphorylé et non-phosphorylé). Il nous est difficile d'expliquer par quels mécanismes la perte de PAKT pourrait amener une perte de FOXO1A et une augmentation de mTOR, tous deux processus souvent répertoriés dans plusieurs types de cancer (22, 45, 53, 57, 83, 101).

Dans les cG, AKT vise à inhiber FOXO1A afin de stimuler la transcription de *Ccnd2*, gène pro-mitotique, et inactiver celle de *Cdkn1b*, gène impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire (FIGURE 11, chapitre 2 section 2.1.2.3.2.) (59). FOXO1A est aussi reconnu pour réguler négativement le niveau protéinique de HIF1 $\alpha$  (7). Par conséquent, si, dans les cG, l'inactivation de FOXO1A par AKT est combinée à la stimulation de mTOR, régulateur positif de HIF1 $\alpha$  (FIGURE 10, chapitre 2 section 2.1.2.3.1.) (6, 59), cette convergence pourrait provoquer une augmentation marquée du niveau protéinique de HIF1 $\alpha$ . Celui-ci peut donc se lier à HIF1 $\beta$  et induire l'expression de gènes cibles, dont *Vegf*, facteur angiogénique et de survie cellulaire (3, 6, 52, 59, 69, 81, 95, 97). Des études futures permettront de confirmer si une inhibition de FOXO1A accompagnée d'une activation de mTOR résulte en une augmentation de HIF1 $\alpha$  plus importante que celle obtenue par les deux mécanismes séparément. En conclusion, dans les cGCT des femelles *Pten*<sup>flox/flox</sup>; *Amhr2*<sup>cre/+</sup>, nous observons un dérèglement dans la régulation de l'activité de FOXO1A et mTOR par la voie PI3K/AKT et cette modification de l'activité de ces deux cibles effectrices d'AKT pourrait être un élément-clé dans le développement de la GCT.

Nos souris ont été créées en utilisant le transgène *Amhr2*<sup>cre</sup> pour diriger l'activité de la recombinase virale *Cre* vers les cG. Chez les souris *Pten*<sup>flox/flox</sup>; *Amhr2*<sup>cre/+</sup>, l'efficacité de la recombinase s'est avérée faible puisque les femelles de ce génotype qui n'ont pas



développé de tumeurs présentaient un niveau protéinique ovarien de PTEN normal. Peut-être aurions-nous eu plus de succès en utilisant un promoteur plus actif qu'*Amhr2* dans les cG, par exemple celui de *Cyp19a1* (FIGURE 8, chapitre 2 section 2.1.1.) (43, 44). Par contre, le promoteur *Amhr2* présente plusieurs avantages. Il est exprimé dans les canaux de Müller de l'embryon murin à partir du J14pc, ce qui permet d'évaluer le rôle d'un gène lors du développement embryonnaire. Ensuite, son expression persiste après la naissance et se retrouve chez la souris adulte au niveau de plusieurs organes du système reproducteur femelle : l'ovaire incluant les cG et les cESO (43, 44), les oviductes et même le stroma et le myomètre utérin (9, 10, 35). Cette expression dans le tractus reproducteur offre ainsi la possibilité d'évaluer la fonction d'un gène dans ses divers organes. En effet, si la majorité de nos souris *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> ne démontraient aucune anomalie ovarienne, elles donnaient tout de même naissance à moins de souriceaux que les femelles contrôles. En sachant qu'*Amhr2* peut diriger l'activité Cre vers l'utérus, nous nous sommes concentrés sur cet organe afin d'élucider le phénotype de sous-fertilité de ces souris.

Bien que les femelles *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> démontraient un nombre de concepti semblables aux souris contrôles au J9.5pc, la viabilité fœtale diminuait de 30% au J11.5pc. Réalisant cela, nous avons effectué des analyses nous permettant d'évaluer le niveau de PTEN dans l'utérus. Nous avons observé une diminution drastique et significative de l'intensité de l'expression de PTEN dans le myomètre, le stroma utérin des souris vierges et la DM des souris gestantes du groupe *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup>. Par contre, l'expression utérine d'aucune des cibles effectrices de la voie PI3K/AKT en aval de PTEN n'a été modifiée dans les femelles *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup>, ce qui soulève une importante question : comment une perte de PTEN peut provoquer un phénotype utérin sans dérégler la voie de signalisation PI3K/AKT? Une théorie stipule que PTEN peut œuvrer via d'autres molécules indépendantes de la voie PI3K/AKT, tel CDKN1B, TRP53 ou encore CCND (16). Il est donc possible que d'autres cascades de réactions moléculaires utérines soient altérées par cette perte de PTEN, provoquant ainsi le phénotype utérin observé chez les femelles *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup>.

Toutefois, même si le fonctionnement de la voie de signalisation PI3K/AKT dans l'utérus n'a pas été modifié par la perte de *Pten*, plusieurs processus cellulaires utérins durant la gestation des souris *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> ont été dérèglés. Normalement, au moment de l'implantation à J4.5pc, le stroma utérin se différencie en DM pour ensuite

entrer dans une vague apoptotique importante, ce qui permet au fœtus de s'implanter et au placenta de se développer (2, 29, 55, 62). La DM chez les femelles *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> démontrait à J11.5pc un niveau d'apoptose significativement plus faible que celles des souris contrôles. En fait, les cellules de la DM semblaient proliférer plus que normalement au lieu d'entrer en apoptose. Ceci est logique puisque *Pten* est un répresseur tumoral qui prône l'apoptose : sans lui, l'inhibition qu'il exerce sur la prolifération cellulaire est levée et les cellules peuvent donc débiter la mitose. Cette baisse du niveau d'apoptose due à une perte de *Pten* dans cellules de la DM chez les souris *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> illustre clairement et pour la première fois le rôle de *Pten* lors du processus de régression de la DM durant la gestation.

Un remodelage défectueux des artères spiralées est une autre conséquence de la perte de *Pten*. Normalement, les vaisseaux sanguins de la DM subissent un remodelage par les uNKS recrutés vers l'utérus qui consiste en une érosion et perte de la couche musculaire lisse des artères spiralées (31, 33, 60, 92). Le but de ce remodelage est d'augmenter l'apport sanguin et les éléments essentiels à l'embryogenèse vers le fœtus (4, 30). Au J11.5pc, il y avait environ 2.5 fois moins d'uNKS dans la DM de nos souris gestantes *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> par rapport au groupe de référence. De plus, les artères spiralées de ces femelles avaient conservé leur couche musculaire lisse, contrairement aux vaisseaux sanguins des souris contrôles. Ce remodelage défectueux pourrait diminuer l'apport sanguin vers le foetus et être une des causes de la baisse de viabilité fœtale chez les femelles *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup>. Ces résultats démontrent aussi le rôle important de *Pten* lors du recrutement des uNKS vers la DM pendant le remodelage des artères spiralées.

La perte de *Pten* au niveau de l'utérus lors de la gestation provoque une DM persistante et des artères spiralées qui conservent leur couche musculaire lisse, résultant en une décidualisation défectueuse. La décidualisation a lieu afin de faciliter l'invasion des cellules du trophoblaste fœtal (50, 73); toute lacune peut donc nuire à la migration des cellules placentaires. Effectivement, nos expériences ont démontré qu'au J14.5pc, les cellules glycogéniques étaient au même niveau que les TCG dans la DM des femelles gestantes *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup>, alors qu'elles les dépassent dans la DM des souris contrôles. Ces deux types de cellules du trophoblaste migraient moins profondément dans la DM de nos souris expérimentales. Cette régression défectueuse de la DM et une

invasion restreinte du tissu fœtal ont résulté en une placentation superficielle avec un amincissement du spongiotrophoblaste et du labyrinthe. Tout ceci pourrait être une des causes de la sous-fertilité des femelles *Pten*<sup>flox/flox</sup>; *Amhr2*<sup>cre/+</sup> et démontre pour la première fois l'importance cruciale de *Pten* dans la régression de la DM lors de l'invasion du trophoblaste durant la gestation de la souris.

Tel que mentionné plus haut, *Amhr2* peut diriger l'activité de la recombinaise virale Cre vers le myomètre et, en effet, les femelles *Pten*<sup>flox/flox</sup>; *Amhr2*<sup>cre/+</sup> ont démontré un phénotype myométrial causé par la perte de *Pten*. Le myomètre des souris expérimentales était environ deux fois plus épais que celui des contrôles tant chez les souris vierges que chez les souris gestantes. De plus, leurs fibres musculaires présentaient des anomalies histologiques, elles semblaient moins nombreuses, désorganisées et exprimaient moins de « transgeline » (TAGLN) et de «  $\alpha$ -smooth muscle actin » (ACTA2), marqueurs de muscles lisses. Il est plausible que l'épaississement et la désorganisation du myomètre des femelles *Pten*<sup>flox/flox</sup>; *Amhr2*<sup>cre/+</sup> pourrait restreindre le développement embryonnaire des conceptus ou même de nuire à l'expulsion des fœtus lors de la parturition, contribuant ainsi au phénotype de sous-fertilité des souris *Pten*<sup>flox/flox</sup>; *Amhr2*<sup>cre/+</sup>.

La lignée de souris *Pten*<sup>flox/flox</sup>; *Amhr2*<sup>cre/+</sup> nous a permis de démontrer pour la première fois l'implication de *Pten* dans les cellules déciduelles lors de l'implantation fœtale et nous procurent des informations cruciales concernant les processus de prolifération, d'apoptose et d'invasion fœtale chez la souris en gestation. Cette lignée peut même être considérée comme un modèle animal de pathologies humaines pouvant survenir durant la grossesse, tel que la pré-éclampsie. Cette maladie est commune, affectant environ 5% des grossesses, et se manifeste chez la mère par une hypertension et une protéinurie et chez l'enfant par un état d'hypoxie fœtale. Si la pré-éclampsie n'est pas traitée efficacement, elle s'aggrave en éclampsie qui peut être mortelle tant pour la mère que pour le fœtus. Les symptômes de cette maladie originent d'une placentation superficielle ainsi qu'un remodelage défectueux des artères spiralées de la DM, qui sont des phénomènes retrouvés chez les femelles gestantes *Pten*<sup>flox/flox</sup>; *Amhr2*<sup>cre/+</sup> (36, 50, 73). Des études additionnelles seront nécessaires afin de valider la souris *Pten*<sup>flox/flox</sup>; *Amhr2*<sup>cre/+</sup> comme modèle potentiel pour la pré-éclampsie et, le cas échéant, elle pourrait servir à la fois à mieux comprendre la pathogénèse de cette maladie, ainsi qu'à développer des nouveaux traitements.

## Chapitre 6 : Conclusions

En conclusion, nos expériences ont permis d'élucider les rôles physiopathologiques de la voie de signalisation PI3K/AKT dans le tractus reproducteur femelle.

Au niveau ovarien, nous avons démontré qu'un dérèglement de cette voie, seul ou en combinaison avec un dérèglement de la voie WNT/CTNNB1, résulte en le développement de GCT. Ces découvertes représentent des progrès importants de notre compréhension de l'étiologie moléculaire de la GCT. Ces études ont également permis de créer deux lignées de souris transgéniques, *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup> et *Pten*<sup>flox/flox</sup>;*Ctnnb1*<sup>flox(ex3)/+</sup>;*Amhr2*<sup>cre/+</sup>, qui serviront de modèles animaux de la maladie retrouvée chez la femme.

Enfin, nous avons établi pour la première fois le rôle de *Pten* dans l'utérus dans le recrutement des uNKS et leur remodelage des artères spiralées, ainsi que la régression de la DM lors de l'invasion du trophoblaste fœtal. Ces rôles s'avèrent critiques pour le développement et la survie de l'embryon.

## Bibliographie

1. Abel MH, Wootton AN, Wilkins V, Huhtaniemi I, Knight PG, Charlton HM. The effect of a null mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene on mouse reproduction. *Endocrinology*. 2000 May;141(5):1795-803.
2. Abrahamsohn PA, Zorn TM. Implantation and decidualization in rodents. *nJ Exp Zool*. 1993 Sep 1;266(6):603-28.
3. Abramovich D, Parborell F, Tesone M. Effect of a vascular endothelial growth factor (VEGF) inhibitory treatment on the folliculogenesis and ovarian apoptosis in gonadotropin-treated prepubertal rats. *Biol Reprod*. 2006 Sep;75(3):434-41.
4. Adamson SL, Lu Y, Whiteley KJ, Holmyard D, Hemberger M, Pfarrer C, Cross JC. Interactions between trophoblast cells and the maternal and fetal circulation in the mouse placenta. *Dev Biol*. 2002 Oct 15;250(2):358-73.
5. Adhikari D, Liu K. Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles. *Endocr Rev*. 2009 Aug;30(5):438-64.
6. Alam H, Maizels ET, Park Y, Ghaey S, Feiger ZJ, Chandel NS, Hunzicker-Dunn M. Follicle-stimulating hormone activation of hypoxia-inducible factor-1 by the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT/Ras homolog enriched in brain (Rheb)/mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway is necessary for induction of select protein markers of follicular differentiation. *J Biol Chem*. 2004 May 7;279(19):19431-40.
7. Alam H, Weck J, Maizels E, Park Y, Lee EJ, Ashcroft M, Hunzicker-Dunn M. Role of the phosphatidylinositol-3-kinase and extracellular regulated kinase pathways in the induction of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 activity and the HIF-1 target vascular endothelial growth factor in ovarian granulosa cells in response to follicle-stimulating hormone. *Endocrinology*. 2009 Feb;150(2):915-28.
8. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Biologie moléculaire de la cellule*. Éditions Médecine-Sciences Flammarion, 3<sup>e</sup> édition, New York 1995.
9. Arango NA, Kobayashi A, Wang Y, Jamin SP, Lee HH, Orvis GD, Behringer RR. A mesenchymal perspective of Müllerian duct differentiation and regression in *Amhr2-lacZ* mice. *Mol Reprod Dev*. 2008 Jul;75(7):1154-62.

10. Arango NA, Szotek PP, Manganaro TF, Oliva E, Donahoe PK, Teixeira J. Conditional deletion of beta-catenin in the mesenchyme of the developing mouse uterus results in a switch to adipogenesis in the myometrium. *Dev Biol*. 2005 Dec 1;288(1):276-83.
11. Auersperg N, Wong AS, Choi KC, Kang SK, Leung PC. Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology. *Endocr Rev*. 2001 Apr;22(2):255-88.
12. Azueta A, Gatus S, Matias-Guiu X. Endometrioid carcinoma of the endometrium: pathologic and molecular features. *Semin Diagn Pathol*. 2010 Nov;27(4):226-40.
13. Bansal N, Yendluri V, Wenham RM. The molecular biology of endometrial cancers and the implications for pathogenesis, classification, and targeted therapies. *Cancer Control*. 2009 Jan;16(1):8-13.
14. Bell DA. Origins and molecular pathology of ovarian cancer. *Mod Pathol*. 2005 Feb;18 Suppl 2:S19-32.
15. Bertrand L, Horman S, Beauloye C, Vanoverschelde JL. Insulin signalling in the heart. *Cardiovasc Res*. 2008 Jul 15;79(2):238-48.
16. Blanco-Aparicio C, Renner O, Leal JF, Carnero A. PTEN, more than the AKT pathway. *Carcinogenesis*. 2007 Jul;28(7):1379-86.
17. Boerboom D, Paquet M, Hsieh M, Liu J, Jamin SP, Behringer RR, Sirois J, Taketo MM, Richards JS. Misregulated Wnt/beta-catenin signaling leads to ovarian granulosa cell tumor development. *Cancer Res*. 2005 Oct 15;65(20):9206-15.
18. Boerboom D, White LD, Dalle S, Courty J, Richards JS. Dominant-stable beta-catenin expression causes cell fate alterations and Wnt signaling antagonist expression in a murine granulosa cell tumor model. *Cancer Res*. 2006 Feb 15;66(4):1964-73.
19. Boyer A, Goff AK, Boerboom D. WNT signaling in ovarian follicle biology and tumorigenesis. *Trends Endocrinol Metab*. 2010 Jan;21(1):25-32.
20. Buchanan EM, Weinstein LC, Hillson C. Endometrial cancer. *Am Fam Physician*. 2009 Nov 15;80(10):1075-80.
21. Campbell NA. *Biologie*. Éditions du Renouveau Pédagogique Inc., 1<sup>ère</sup> édition, Québec 1995.

22. Carnero A. The PKB/AKT pathway in cancer. *Curr Pharm Des.* 2010 Jan;16(1):34-44.
23. Chaudhry P, Asselin E. Resistance to chemotherapy and hormone therapy in endometrial cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2009 Jun;16(2):363-80.
24. Chen X, He J, Ding Y, Zeng L, Gao R, Cheng S, Liu X, Wang Y. The role of MTOR in mouse uterus during embryo implantation. *Reproduction.* 2009 Aug;138(2):351-6.
25. Chen XL, Ma HL, Xie Y, Yang R, Wei SL. Expression of phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten in mouse endometrium and its effect during blastocyst implantation. *Sheng Li Xue Bao.* 2008 Feb 25;60(1):119-24.
26. Cheng Z, Tseng Y, White MF. Insulin signaling meets mitochondria in metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2010 Oct;21(10):589-98.
27. Choi CH, Lee JS, Kim SR, Kim TJ, Lee JW, Kim BG, Bae DS. Clinical significance of pmTOR expression in endometrioid endometrial carcinoma. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2010 Dec;153(2):207-10.
28. Chow LM, Baker SJ. PTEN function in normal and neoplastic growth. *Cancer Lett.* 2006 Sep 28;241(2):184-96.
29. Correia-da-Silva G, Bell SC, Pringle JH, Teixeira NA. Patterns of uterine cellular proliferation and apoptosis in the implantation site of the rat during pregnancy. *Placenta.* 2004 Jul;25(6):538-47.
30. Cross JC, Hemberger M, Lu Y, Nozaki T, Whiteley K, Masutani M, Adamson SL. Trophoblast functions, angiogenesis and remodeling of the maternal vasculature in the placenta. *Mol Cell Endocrinol.* 2002 Feb 22;187(1-2):207-12.
31. Croy BA, Ashkar AA, Minhas K, Greenwood JD. Can murine uterine natural killer cells give insights into the pathogenesis of preeclampsia? *J Soc Gynecol Investig.* 2000 Jan-Feb;7(1):12-20.
32. Croy BA, Esadeg S, Chantakru S, van den Heuvel M, Paffaro VA, He H, Black GP, Ashkar AA, Kiso Y, Zhang J. Update on pathways regulating the activation of uterine Natural Killer cells, their interactions with decidual spiral arteries and homing of their precursors to the uterus. *J Reprod Immunol.* 2003 Aug;59(2):175-91.

33. Croy BA, He H, Esadeg S, Wei Q, McCartney D, Zhang J, Borzychowski A, Ashkar AA, Black GP, Evans SS, Chantakru S, van den Heuvel M, Paffaro VA Jr, Yamada AT. Uterine natural killer cells: insights into their cellular and molecular biology from mouse modelling. *Reproduction*. 2003 Aug;126(2):149-60.
34. Czech MP. PIP2 and PIP3: complex roles at the cell surface. *Cell*. 2000 Mar 17;100(6):603-6.
35. Daikoku T, Hirota Y, Tranguch S, Joshi AR, DeMayo FJ, Lydon JP, Ellenson LH, Dey SK. Conditional loss of uterine Pten unfailingly and rapidly induces endometrial cancer in mice. *Cancer Res*. 2008 Jul 15;68(14):5619-27.
36. Davison JM, Homuth V, Jeyabalan A, Conrad KP, Karumanchi SA, Quaggin S, Dechend R, Luft FC. New aspects in the pathophysiology of preeclampsia. *J Am Soc Nephrol*. 2004 Sep;15(9):2440-8.
37. Dery MC, Leblanc V, Shooner C, Asselin E. Regulation of Akt expression and phosphorylation by 17beta-estradiol in the rat uterus during estrous cycle. *Reprod Biol Endocrinol*. 2003 Jun 12;1:47.
38. Dierich A, Sairam MR, Monaco L, Fimia GM, Gansmuller A, LeMeur M, Sassone-Corsi P. Impairing follicle-stimulating hormone (FSH) signaling in vivo: targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Nov 10;95(23):13612-7.
39. Dupont J, Holzenberger M. Biology of insulin-like growth factors in development. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2003 Nov;69(4):257-71.
40. Eckert R, Randall D, Burggren W, French K. *Physiologie Animale: mécanismes et adaptations*. Éditions De Boeck Université, 4<sup>e</sup> édition, Paris 1999.
41. Elghazi L, Bernal-Mizrachi E. Akt and PTEN: beta-cell mass and pancreas plasticity. *Trends Endocrinol Metab*. 2009 Jul;20(5):243-51.
42. Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet*. 2006 Aug;7(8):606-19.
43. Fan HY, Liu Z, Paquet M, Wang J, Lydon JP, DeMayo FJ, Richards JS. Cell type-specific targeted mutations of Kras and Pten document proliferation arrest in granulosa cells versus oncogenic insult to ovarian surface epithelial cells. *Cancer Res*. 2009 Aug 15;69(16):6463-72.



44. Fan HY, Shimada M, Liu Z, Cahill N, Noma N, Wu Y, Gossen J, Richards JS. Selective expression of KrasG12D in granulosa cells of the mouse ovary causes defects in follicle development and ovulation. *Development*. 2008 Jun;135(12):2127-37.
45. Fresno Vara JA, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, González-Barón M. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev*. 2004 Apr;30(2):193-204.
46. Fruman DA, Meyers RE, Cantley LC. Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:481-507.
47. Fu Z, Tindall DJ. FOXOs, cancer and regulation of apoptosis. *Oncogene*. 2008 Apr 7;27(16):2312-9.
48. Fuller PJ, Chu S. Signalling pathways in the molecular pathogenesis of ovarian granulosa cell tumours. *Trends Endocrinol Metab*. 2004 Apr;15(3):122-8.
49. Geva E, Jaffe RB. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology and pathology. *Fertil Steril*. 2000 Sep;74(3):429-38.
50. Goldman-Wohl D, Yagel S. Regulation of trophoblast invasion: from normal implantation to pre-eclampsia. *Mol Cell Endocrinol*. 2002 Feb 22;187(1-2):233-8.
51. Gonzalez E, McGraw TE. The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell Cycle*. 2009 Aug 15;8(16):2502-8.
52. Greenaway J, Connor K, Pedersen HG, Coomber BL, LaMarre J, Petrik J. Vascular endothelial growth factor and its receptor, Flk-1/KDR, are cytoprotective in the extravascular compartment of the ovarian follicle. *Endocrinology*. 2004 Jun;145(6):2896-905.
53. Guertin DA, Sabatini DM. An expanding role for mTOR in cancer. *Trends Mol Med*. 2005 Aug;11(8):353-61.
54. Hayes MP, Ellenson LH. Molecular alterations in uterine serous carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2010 Feb;116(2):286-9.
55. Hogan B, Costantini F, Lacy E. Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual. Cold spring Harbor Laboratory, USA 1985.
56. Horton HR, Moran LA, Ochs RS, Rawn JD, Scrimgeour KG. Principes de biochimie. Éditions De Boeck Université, 1<sup>ère</sup> édition, Bruxelles 1994.

57. Huang H, Tindall DJ. FOXO factors: a matter of life and death. *Future Oncol.* 2006 Feb;2(1):83-9.
58. Huang H, Tindall DJ. Dynamic FoxO transcription factors. *J Cell Sci.* 2007 Aug 1;120(Pt 15):2479-87.
59. Hunzicker-Dunn M, Maizels ET. FSH signaling pathways in immature granulosa cells that regulate target gene expression: branching out from protein kinase A. *Cell Signal.* 2006 Sep;18(9):1351-9.
60. Huppertz B. The feto-maternal interface: setting the stage for potential immune interactions. *Semin Immunopathol.* 2007 Jun;29(2):83-94.
61. Jiang BH, Liu LZ. PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. *Adv Cancer Res.* 2009;102:19-65.
62. Joswig A, Gabriel HD, Kibschull M, Winterhager E. Apoptosis in uterine epithelium and decidua in response to implantation: evidence for two different pathways. *Reprod Biol Endocrinol.* 2003 May 26;1:44.
63. Jurisicova A, Detmar J, Caniggia I. Molecular mechanisms of trophoblast survival: from implantation to birth. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2005 Dec;75(4):262-80.
64. Kananen K, Markkula M, Rainio E, Su JG, Hsueh AJ, Huhtaniemi IT. Gonadal tumorigenesis in transgenic mice bearing the mouse inhibin alpha-subunit promoter/simian virus T-antigen fusion gene: characterization of ovarian tumors and establishment of gonadotropin-responsive granulosa cell lines. *Mol Endocrinol.* 1995 May;9(5):616-27.
65. Kazi AA, Molitoris KH, Koos RD. Estrogen rapidly activates the PI3K/AKT pathway and hypoxia-inducible factor 1 and induces vascular endothelial growth factor A expression in luminal epithelial cells of the rat uterus. *Biol Reprod.* 2009 Aug;81(2):378-87.
66. Kim D, Chung J. Akt: versatile mediator of cell survival and beyond. *J Biochem Mol Biol.* 2002 Jan 31;35(1):106-15.
67. Klotz DM, Hewitt SC, Ciana P, Raviscioni M, Lindzey JK, Foley J, Maggi A, DiAugustine RP, Korach KS. Requirement of estrogen receptor-alpha in insulin-like growth factor-1 (IGF-1)-induced uterine responses and in vivo evidence for IGF-1/estrogen receptor cross-talk. *J Biol Chem.* 2002 Mar 8;277(10):8531-7.

68. Kong D, Park EJ, Stephen AG, Calvani M, Cardellina JH, Monks A, Fisher RJ, Shoemaker RH, Melillo G. Echinomycin, a small-molecule inhibitor of hypoxia-inducible factor-1 DNA-binding activity. *Cancer Res.* 2005 Oct 1;65(19):9047-55.
69. Kosaka N, Sudo N, Miyamoto A, Shimizu T. Vascular endothelial growth factor (VEGF) suppresses ovarian granulosa cell apoptosis in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Nov 23;363(3):733-7.
70. Lapointe E, Boerboom D. WNT signaling and the regulation of ovarian steroidogenesis. *Front Biosci (Schol Ed).* 2011 Jan 1;3:276-85.
71. Lengyel F, Vértés Z, Kovács KA, Környei JL, Sümegi B, Vértés M. Effect of estrogen and inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase on Akt and FOXO1 in rat uterus. *Steroids.* 2007 May;72(5):422-8.
72. Liu Z, Rudd MD, Hernandez-Gonzalez I, Gonzalez-Robayna I, Fan HY, Zeleznik AJ, Richards JS. FSH and FOXO1 regulate genes in the sterol/steroid and lipid biosynthetic pathways in granulosa cells. *Mol Endocrinol.* 2009 Sep;23(9):1522.
73. Lyall F. Mechanisms regulating cytotrophoblast invasion in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2006 Aug;46(4):266-73.
74. Martelli AM, Faenza I, Billi AM, Manzoli L, Evangelisti C, Falà F, Cocco L. Intranuclear 3'-phosphoinositide metabolism and Akt signaling: new mechanisms for tumorigenesis and protection against apoptosis? *Cell Signal.* 2006 Aug;18(8):1101-7.
75. Matzuk MM, Finegold MJ, Su JG, Hsueh AJ, Bradley A. Alpha-inhibin is a tumour-suppressor gene with gonadal specificity in mice. *Nature.* 1992 Nov 26;360(6402):313-9.
76. Myatt SS, Lam EW. The emerging roles of forkhead box (Fox) proteins in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2007 Nov;7(11):847-59.
77. Niswender GD, Juengel JL, Silva PJ, Rollyson MK, McIntush EW. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol Rev.* 2000 Jan;80(1):1-29.
78. Ongerer EM, Verderame MF, Hammond JM. Follicle-stimulating hormone induction of ovarian insulin-like growth factor-binding protein-3 transcription requires a TATA box-binding protein and the protein kinase A and phosphatidylinositol-3 kinase pathways. *Mol Endocrinol.* 2005 Jul;19(7):1837-48.

79. Podsypanina K, Lee RT, Politis C, Hennessy I, Crane A, Puc J, Neshat M, Wang H, Yang L, Gibbons J, Frost P, Dreisbach V, Blenis J, Gaciong Z, Fisher P, Sawyers C, Hedrick-Ellenson L, Parsons R. An inhibitor of mTOR reduces neoplasia and normalizes p70/S6 kinase activity in Pten<sup>+/-</sup> mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Aug 28;98(18):10320-5.
80. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Katz LC, Lamantia AS, McNamara JO, Williams SM. *Neurosciences*. Éditions De Boeck, 2<sup>e</sup> édition, Bruxelles 2003.
81. Quintana R, Kopcow L, Sueldo C, Marconi G, Rueda NG, Barañao RI. Direct injection of vascular endothelial growth factor into the ovary of mice promotes follicular development. *Fertil Steril*. 2004 Oct;82 Suppl 3:1101-5.
82. Quirk SM, Cowan RG, Harman RM, Hu CL, Porter DA. Ovarian follicular growth and atresia: the relationship between cell proliferation and survival. *J Anim Sci*. 2004;82 E-Suppl:E40-52.
83. Reagan-Shaw S, Ahmad N. The role of Forkhead-box Class O (FoxO) transcription factors in cancer: a target for the management of cancer. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007 Nov 1;224(3):360-8.
84. Richards JS. Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocr Rev*. 1994 Dec;15(6):725-51.
85. Richards JS, Hedin L. Molecular aspects of hormone action in ovarian follicular development, ovulation, and luteinization. *Annu Rev Physiol*. 1988;50:441-63.
86. Richards JS, Russell DL, Ochsner S, Hsieh M, Doyle KH, Falender AE, Lo YK, Sharma SC. Novel signaling pathways that control ovarian follicular development, ovulation, and luteinization. *Recent Prog Horm Res*. 2002;57:195-220.
87. Richards JS, Sharma SC, Falender AE, Lo YH. Expression of FKHR, FKHRL1, and AFX genes in the rodent ovary: evidence for regulation by IGF-I, estrogen, and the gonadotropins. *Mol Endocrinol*. 2002 Mar;16(3):580-99.
88. Risma KA, Clay CM, Nett TM, Wagner T, Yun J, Nilson JH. Targeted overexpression of luteinizing hormone in transgenic mice leads to infertility, polycystic ovaries, and ovarian tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Feb 28;92(5):1322-6.
89. Rudd MD, Gonzalez-Robayna I, Hernandez-Gonzalez I, Weigel NL, Bingman WE 3rd, Richards JS. Constitutively active FOXO1a and a DNA-binding domain

- mutant exhibit distinct co-regulatory functions to enhance progesterone receptor A activity. *J Mol Endocrinol.* 2007 Jun;38(6):673-90.
90. Rugh R. *The mouse; its reproduction and development.* Burgess Publishing Co., USA 1968.
  91. Sansal I, Sellers WR. The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway. *J Clin Oncol.* 2004 Jul 15;22(14):2954-63.
  92. Santoni A, Carlino C, Stabile H, Gismondi A. Mechanisms underlying recruitment and accumulation of decidual NK cells in uterus during pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 2008 May;59(5):417-24.
  93. Schumer ST, Cannistra SA. Granulosa cell tumor of the ovary. *J Clin Oncol.* 2003 Mar 15;21(6):1180-9.
  94. Shan W, Liu J. Epithelial ovarian cancer: focus on genetics and animal models. *Cell Cycle.* 2009 Mar 1;8(5):731-5.
  95. Sharp FR, Bernaudin M. HIF1 and oxygen sensing in the brain. *Nat Rev Neurosci.* 2004 Jun;5(6):437-48.
  96. Sherwood L. *Physiologie humaine.* Éditions De Boeck Université, 2e édition, Bruxelles 2000.
  97. Shin SY, Lee JY, Lee E, Choi J, Yoon BK, Bae D, Choi D. Protective effect of vascular endothelial growth factor (VEGF) in frozen-thawed granulosa cells is mediated by inhibition of apoptosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2006 Apr 1;125(2):233-8.
  98. Simpson L, Parsons R. PTEN: life as a tumor suppressor. *Exp Cell Res.* 2001 Mar 10;264(1):29-41.
  99. Soliman GA. The mammalian target of rapamycin signaling network and gene regulation. *Curr Opin Lipidol.* 2005 Jun;16(3):317-23.
  100. Somanath PR, Razorenova OV, Chen J, Byzova TV. Akt1 in endothelial cell and angiogenesis. *Cell Cycle.* 2006 Mar;5(5):512-8.
  101. Stokoe D. The phosphoinositide 3-kinase pathway and cancer. *Expert Rev Mol Med.* 2005 Jun 6;7(10):1-22.
  102. Testa JR, Bellacosa A. AKT plays a central role in tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Sep 25;98(20):10983-5.

103. Toker A, Yoeli-Lerner M. Akt signaling and cancer: surviving but not moving on. *Cancer Res.* 2006 Apr 15;66(8):3963-6.
104. Tortora GJ, Grabowski SR. *Principes d'anatomie et de physiologie.* Éditions du Renouveau Pédagogique Inc., 9<sup>e</sup> édition, Québec 2001.
105. Van den Heuvel MJ, Xie X, Tayade C, Peralta C, Fang Y, Leonard S, Paffaro VA Jr, Sheikhi AK, Murrant C, Croy BA. A review of trafficking and activation of uterine natural killer cells. *Am J Reprod Immunol.* 2005 Dec; 54 (6):322-31.
106. Wahl H, Daudi S, Kshirsagar M, Griffith K, Tan L, Rhode J, Liu JR. Expression of metabolically targeted biomarkers in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2010 Jan;116(1):21-7.
107. Walker MP, Diaugustine RP, Zeringue E, Bungler MK, Schmitt M, Archer TK, Richards RG. An IGF1/insulin receptor substrate-1 pathway stimulates a mitotic kinase (cdk1) in the uterine epithelium during the proliferative response to estradiol. *J Endocrinol.* 2010 Nov;207(2):225-35.
108. Wan X, Harkavy B, Shen N, Grohar P, Helman LJ. Rapamycin induces feedback activation of Akt signaling through an IGF-1R-dependent mechanism. *Oncogene.* 2007 Mar 22;26(13):1932-40.
109. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Jun 6;92(12):5510-4.
110. Wayne CM, Fan HY, Cheng X, Richards JS. Follicle-stimulating hormone induces multiple signaling cascades: evidence that activation of Rous sarcoma oncogene, RAS, and the epidermal growth factor receptor are critical for granulosa cell differentiation. *Mol Endocrinol.* 2007 Aug;21(8):1940-57.
111. Zhang HY, Zhang PN, Sun H. Aberration of the PI3K/AKT/mTOR signaling in epithelial ovarian cancer and its implication in cisplatin-based chemotherapy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2009 Sep;146(1):81-6.
112. Beg MA, Ginther OJ. Follicle selection in cattles and horses: role of intrafollicular factors. *Reproduction.* 2006 Sep; 132 (3):365-77

113. Fortune JE, Rivera GM, Evans AC, Turzillo AM. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biol Reprod.* 2001 Sep;65(3):648-54.
114. Son WY, Das M, Shalom-Paz E, Holzer H. Mechanisms of follicle selection and development. *Minerva Ginecol.* 2011 Apr;63(2):89-102.
115. [http://www.nature.com/nm/journal/v14/n11/fig\\_tab/nm.f.1895\\_F4.html](http://www.nature.com/nm/journal/v14/n11/fig_tab/nm.f.1895_F4.html)