



Université Catholique de Louvain

Faculté de Médecine

Institut de Duve
Unité de Biologie cellulaire



**Multiplicité des niveaux de contrôle de la bioactivité
de l'interleukine-1 α par les stéroïdes ovariens
dans l'endomètre humain**

Chrystel PRETTO

Promoteur : Professeur Patrick Henriët
Co-promoteur : Professeur Etienne Marbaix

*Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de
Docteur en Sciences biomédicales et pharmaceutiques*

2009

*Il n'y a pas d'erreurs, pas de coïncidences,
Tous les évènements sont des bénédictions
qui nous sont données pour apprendre.*

Elisabeth Kübler-Ross

Remerciements

Après ces quelques années d'expériences, tant scientifiques que professionnelles, c'est tout d'abord au Professeur Pierre Courtoy que je souhaite adresser mes remerciements pour m'avoir permis de réaliser mon travail de recherche au sein de son laboratoire. Dans cet environnement scientifique exceptionnel, j'ai pu mener à bien ce travail dans une ambiance sereine et motivante. Son oeil critique m'a été très précieux pour structurer le travail et pour en améliorer la qualité.

Ma plus vive gratitude s'adresse à mon directeur de thèse, le Professeur Patrick Henriot pour l'aide précieuse qu'il m'a apportée tant au quotidien que dans la réalisation des manuscrits, pour sa patience et son encouragement. Je le remercie de m'avoir si bien guidée dans mes recherches, pour ses conseils mais surtout pour les discussions scientifiques qui m'ont permis d'évoluer.

Mes profonds remerciements vont également au Professeur Etienne Marbaix pour m'avoir intégrée au sein de l'équipe « endomètre » et pour avoir supervisé mon travail de recherche. Merci d'avoir été là dans les moments difficiles, merci pour son soutien et surtout pour son optimisme inébranlable.

Je tiens également à exprimer ma plus grande reconnaissance envers les Professeurs Fred Oppendoes, Christian Singer, Jean-Baptiste Demoulin, François Huaux et Jean-Christophe Renauld pour avoir accepté d'être membre de mon jury.

Je souhaite aussi exprimer toute ma gratitude envers les personnes qui ont contribué de près ou de loin à ce travail. Je pense en particulier, pour leurs conseils ou leurs aides techniques, à Patricia Cornet, à Denis Delvaux et à Héroïse Gaide Chevonnay, ainsi qu'à l'équipe d'immunologie du service d'ANAPATH des cliniques Saint-Luc : merci à Philippe Camby, à Dominique Dubois et à Martine Stevens.

Je souhaite remercier tous les membres de la famille CELLienne qui m'ont permis de travailler dans un univers convivial et agréable : Adrian Caplanusi, Sarah Carpentier, Christophe Chantrain, Antoine Cominelli, Ludovic D'Auria, Philippe de Diesbach, Hervé Emonard, Céline Forez, Christine Galant, Anne-Christine Hick, Thanh Lac, Pascale Lemoine, Michèle Leruth, Yves Marchand, Benoît Marien, Thierry Medts, Francisca N'Kuli,

Christophe Pierreux, Wania Rezende-Lima, Charlotte Selvais, Donatienne Tyteca, Marie-France Van den Hove, Patrick Van der Smissen.

Merci également au « Fonds pour la formation à la recherche dans l'industrie et dans l'agriculture » pour son support financier qui a permis la réalisation de ce travail.

Non je ne vous oublie pas, vous mes amis, vous qui avez toujours été là quand j'en avais besoin, vous qui m'avez encouragée, je vous remercie de tout cœur :

A toi d'abord Nicolas, je tiens à te remercier pour tous les moments passés ensemble, pour nos discussions scientifiques lors des « pauses », pour m'avoir permis de souffler quand j'en avais besoin. Ton amitié est des plus précieuses.

Gülcan, tu sais combien tu comptes pour moi et ton soutien m'a toujours réchauffé le cœur, tu as toujours cru en moi et pour cela je te dis aujourd'hui Merci.

Noëlla, toi qui a subi mon stress et mes angoisses au quotidien, toi qui a su si bien écouter mes présentations, je te remercie de m'avoir supportée durant ces années de vie commune.

Et puis à tous mes amis qui ont amené joie de vivre et bonheur autour de moi, qu'ils soient scientifiques ou non... Merci

Mes remerciements les plus chaleureux sont spécialement réservés à mes parents qui m'ont toujours encouragée et soutenue dans mes projets. Je sais combien ils ont pu se sacrifier pour moi, et je leur en suis extrêmement reconnaissante. Maman, papa, Merci.

Résumé

Le processus de remodelage de la matrice extracellulaire est soumis à une régulation stricte. En particulier, les modifications cycliques de l'endomètre humain sont globalement contrôlées par les fluctuations des concentrations en stéroïdes ovariens, œstradiol et progestérone. L'élimination de la couche superficielle de l'endomètre humain n'est normalement permise que lors de la menstruation, en réponse à la chute brutale des concentrations de ces hormones en fin de cycle, mais elle s'observe également lors d'épisodes de saignement imprévu dit dysfonctionnel. Toutefois, au cours de ces événements physiologiques et pathologiques de dégradation endométriale, l'activité de métalloprotéases matricielles (MMPs), dont les collagénases, reste finement régulée dans le temps et dans l'espace grâce à l'intervention d'un réseau de cytokines, principalement l'interleukine-1 α (IL-1 α). Des études précédentes au laboratoire avaient identifié *in vitro* un mécanisme paracrine d'induction de la production de la collagénase-1 ou MMP-1 par les fibroblastes du stroma endométrial en réponse à l'IL-1 α libérée par les cellules épithéliales. Mon travail a eu pour objectif de préciser les mécanismes de contrôle de l'expression et de la bioactivité de l'IL-1 α dans l'endomètre *in vivo*, en particulier dans le contexte de l'induction menstruelle ou pathologique de la collagénase.

Les variations des concentrations de l'ARNm de l'IL-1 α et de la protéine correspondante ont été examinées par RT-PCR quantitative et ELISA dans des échantillons d'endomètre prélevés au cours des différentes phases du cycle menstruel et pendant des épisodes de saignement dysfonctionnel. L'ARNm et la protéine ont également été localisés par hybridation *in situ* et immunohistochimie afin d'en préciser l'origine cellulaire, à l'aide d'anticorps spécifiques de marqueurs de types cellulaires. L'effet des stéroïdes ovariens sur le contrôle de l'expression et de la libération de l'IL-1 α a été directement investigué en culture d'explants ou de cellules purifiées.

Une différence majeure d'action des stéroïdes ovariens sur l'IL-1 α a été mise en évidence entre glandes et stroma. Les cellules épithéliales synthétisent de l'IL-1 α tout au long du cycle menstruel mais ne la libèrent qu'en réponse à la chute combinée de concentration de l'œstradiol et de la progestérone. Une fois libérée, l'IL-1 α épithéliale induit sa propre amplification paracrine par les fibroblastes du stroma. Celle-ci est toutefois inhibée par les stéroïdes ovariens, qui exercent ainsi un double niveau de blocage : en empêchant la libération épithéliale et la synthèse fibroblastique d'IL-1 α . Ainsi, la production d'IL-1 α par le stroma endométrial est strictement limitée à la menstruation et aux épisodes de saignement dysfonctionnel. L'IL-1 α libérée stimule la production fibroblastique de MMP-1, comme attendu, mais n'est pas responsable de celle de la collagénase-2 ou MMP-8, bien que mes investigations par hybridation *in situ* et immunomarquage montrent clairement le parallélisme d'expression et de répression hormonale des deux métalloprotéases.

En résumé, mes résultats démontrent l'expression d'IL-1 α par au moins deux types de cellules résidentes dans l'endomètre humain et soulignent la multiplicité des niveaux du contrôle hormonal sur cette cytokine. Ils apportent un soutien substantiel à l'implication majeure de l'IL-1 α dans le déclenchement et la régulation locale de la dégradation tissulaire physiopathologique.

Summary

Extracellular matrix remodelling is under tight regulation. In particular, cyclical modifications in the human endometrium are globally controlled by the fluctuations in the concentrations of the ovarian steroids, oestrogen and progesterone. The elimination of the superficial layer of the human endometrium is normally restricted to menstruation, in response to the sudden fall in the concentration of these hormones at the end of the cycle, but it also occurs during irregular bleeding episodes. During these physiopathological events of endometrial degradation, the activity of matrix metalloproteinases (MMPs), among which collagenases, remains finely regulated in time and space due to the action of a network of cytokines, mainly interleukin-1 α (IL-1 α). Former studies from the laboratory had identified *in vitro* a paracrine mechanism of induction of collagenase-1 (MMP-1) production by stromal fibroblasts in response to IL-1 α released from epithelial cells. The aims of my work were to narrow down the mechanisms controlling the expression and bioactivity of IL-1 α in the endometrium *in vivo*, in particular in the context of menstrual or pathological induction of collagenase.

Variations in the mRNA and protein concentrations of IL-1 α were measured by quantitative RT-PCR and ELISA in endometrial samples collected during the different phases of the cycle or during irregular bleeding episodes. IL-1 α mRNA and protein were also localized by *in situ* hybridization and immunohistochemistry in order to specify their cellular origin using antibodies specific to cell type markers. The effect of ovarian steroids on the control of IL-1 α expression and release was directly investigated in culture of explants and purified cells.

A major difference in the action of ovarian steroids on IL-1 α was evidenced between glands and stroma. Epithelial cells synthesize IL-1 α throughout the menstrual cycle but do not release it except in response to the fall in the concentration of both oestradiol and progesterone. Once released, epithelial-derived IL-1 α induces its own paracrine amplification by stromal fibroblasts. However, this amplification is inhibited by the ovarian steroids which therefore exert a double blocking action : by preventing epithelial release and fibroblastic synthesis of IL-1 α . As a consequence, the production of IL-1 α by the endometrial stroma is strictly restricted to menstruation and irregular bleeding episodes. Released IL-1 α induces the fibroblastic production of MMP-1 but is not responsible for that of MMP-8, although my investigations by *in situ* hybridization and immunolabelling clearly show a parallelism in expression and hormonal repression of both these metalloproteinases.

In summary, my data show that IL-1 α is expressed by at least two different types of resident cells in the human endometrium and point to the multiplicity in the levels of hormonal control on this cytokine. They offer a substantial support to the major contribution of IL-1 α to trigger and locally control physiopathological tissue breakdown.

Abréviations

AP-1	"Activator Protein 1"
Bax	"Bcl2-associated X protein"
Bcl2	"B-cell lymphoma 2"
CD	"Cluster Differentiation"
C/EBP	"CCAAT-Enhancer Binding Protein"
CHX	Cycloheximide
CM	Milieu conditionné par les cellules épithéliales
CRE	"cAMP Response Element"
CREB	"CRE Binding protein"
DEPC	Diéthylpyrocarbonate
E	Oestradiol
ELISA	"Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay"
ER	Récepteur des œstrogènes
ERK	"Externally Regulated Kinase"
FasL	Fas Ligand
FGF	"Fibroblast Growth Factor"
FSH	"Follicle Stimulating Hormone"
GM-CSF	"Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor"
H	Hormone
HAX-1	"HCLS1-Associated protein X-1" p78
HEC-1A	Lignée cellulaire provenant d'un adénocarcinome endométrial humain
HIS	Hybridation <i>in situ</i>
IFN	Interféron
IHC	Immunohistochimie
icIL-1Ra	"intracellular IL-1 Receptor antagonist"
IIP1	"IL-1 receptor Interacting Protein"
IκB	Inhibiteur de NF-κB
IL	Interleukine
IL-BP	"Interleukin Binding Protein"
IL-R	"Interleukin Receptor"
IL-1Ra	"Interleukin 1 Receptor antagonist"
IL-1RAcP	"Interleukin 1 Receptor Accessory Protein"
K _d	Constante de dissociation
kDa	kiloDalton
LH	"Luteinizing Hormone"
LIF	"Leukaemia Inhibitory Factor"
MAPKinase	"Mitogen-Activated Protein Kinase"
MMP	Métalloprotéinase matricielle
NC	Non cultivé
NCoR	"Nuclear Co-repressor"
NF-κB	"Nuclear Factor-κB"
NF-IL6	"Nuclear Factor for Interleukin-6 gene"
NK	Cellules "Natural Killer"
P	Progestérone
PBS-T	Solution saline tamponnée au phosphate - Tween 20
PCR	"Polymerase Chain Reaction"

PDGF	"Platelet-Derived Growth Factor"
PR	Récepteur de la progestérone
RT	"Reverse Transcription"
sIL-1Ra	IL-1Ra soluble
Sp1	"Stimulatory Protein 1"
STAT	"Signal Transducer and Activator of Transcription"
TGF	"Transforming Growth Factor"
TIMP	Inhibiteur tissulaire des métalloprotéases
TNF	"Tumour Necrosis Factor "
VEGF	"Vascular Endothelial Growth Factor"

Table des matières

Chapitre I : Introduction	1
1) Le système reproducteur de la femme	1
1.1. Généralités	1
1.2. Régulation hormonale du cycle.....	2
1.3. Modifications utérines au cours du cycle: l'endomètre	4
2) Le remodelage de la matrice extracellulaire endométriale	9
2.1. La matrice extracellulaire	9
2.2. Les métalloprotéinases matricielles	10
2.2.1. Définition.....	10
2.2.2. Régulation transcriptionnelle des MMPs.....	11
2.3. Les MMPs et la menstruation	15
2.3.1. Expression des MMPs dans l'endomètre	15
2.3.2. Contrôle hormonal de l'expression des MMPs.....	16
2.3.3. Les récepteurs des stéroïdes.....	17
2.3.4. Caractère focal de l'expression des MMPs.....	22
3) Les cytokines.....	24
3.1. Généralités	24
3.2. Les cytokines exprimées dans l'endomètre	25
3.3. La superfamille des interleukines.....	26
3.4. Le système interleukine 1	30
3.4.1. Composition et structure	30
3.4.2. Régulation de l'expression des ligands IL-1.....	34
3.4.3. Les récepteurs IL-1	35
3.4.4. Fonctions générales des IL-1.....	38
3.5. Les IL-1 dans le système reproducteur.....	40
3.5.1. Expression et effets du système IL-1 dans les gonades	40
3.5.2. Expression et effets du système IL-1 dans l'endomètre.....	41
4) Pathologies associées aux MMPs et à l'IL-1 α	43
5) Etat de la question et objectif de la thèse	45

Chapitre II : Résultats.....47

1) Niveaux d'expression de l'IL-1 α , de l'IL-1 β et de l'IL-1Ra dans l'endomètre humain au cours du cycle	47
2) Contrôle de l'expression de l'IL-1 α , de l'IL-1 β et de l'IL-1Ra par les stéroïdes ovariens en culture d'explants.....	51
3) Mise en évidence d'un contrôle différentiel de l'expression de l'IL-1 α selon le type cellulaire	53
4) Origine cellulaire de l'IL-1 α	55
5) Immunolocalisation de l'IL-1 α dans l'endomètre pendant des épisodes de saignement dysfonctionnel	59
6) Contrôle hormonal de l'IL-1 α épithéliale en culture d'explants	60
7) Contrôle hormonal de la libération de l'IL-1 α épithéliale	64
8) Mécanisme de libération de l'IL-1 α épithéliale.....	66
9) Contrôle hormonal de la production d'IL-1 α stromale en culture cellulaire et amplification paracrine	69
10) Bioactivité sélective de l'IL-1 α sur les collagénases endométriales	71

Chapitre III : Discussion.....77

Chapitre IV : Conclusion générale et perspectives83

1) Mécanismes moléculaires responsables du contrôle différentiel de l'expression de l'IL-1 α	85
2) Rôle de l'IL-1 α épithéliale	86
3) Mécanisme de libération de l'IL-1 α épithéliale.....	86
4) Libération de l'IL-1 α stromale dans un mécanisme amplificateur	87
5) Identification d'autres protéines stromales régulées par l'IL-1 α	87
6) Démonstration du rôle de l'IL-1 α dans un modèle <i>in vivo</i>	87
7) Pistes thérapeutiques	88

Chapitre V : Patientes et méthodes	91
1) Collecte de tissus	91
2) Culture d'explants.....	92
3) Culture primaire de cellules stromales et épithéliales endométriales purifiées.....	94
4) Quantification d'ARNm	95
5) Microdissection au laser	98
6) Quantification des protéines.....	98
7) Hybridation <i>in situ</i>	100
8) Immunohistochimie	101
9) Coloration à l'argent	103
Table V.1 : Liste des oligonucléotides	104
Table V.2 : Liste des anticorps primaires.....	105
Chapitre VI : Références	107
Chapitre VII : Publications	129
Production of interleukin-1 α by human endometrial stromal cells is triggered during menses and dysfunctional bleeding and is induced in culture by epithelial Interleukin-1 α released upon ovarian steroids withdrawal.....	131
Response of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases messenger ribonucleic acids to ovarian steroids in human endometrial explants mimics their gene- and phase-specific differential control <i>in vivo</i>	141
Régulation de l'activité des métalloprotéases matricielles dans l'endomètre humain	151
Annexes : Séquence des ADNc des gènes étudiés	161

Chapitre I : Introduction

Les recherches menées au sein du laboratoire d'accueil visent globalement à clarifier les mécanismes du remaniement de la matrice extracellulaire et leur régulation. Le remodelage matriciel est observé dans des processus aussi bien physiologiques que pathologiques tels que l'embryogenèse, la menstruation, la cicatrisation, l'arthrite rhumatoïde, l'arthrose, l'athérosclérose, l'inflammation et la progression tumorale (Page-McCaw *et al.* 2007). Chez la femme en âge de procréer, la menstruation consiste en la dégradation et l'élimination cycliques de la couche superficielle de la muqueuse utérine, l'endomètre, en l'absence d'implantation embryonnaire. Cet évènement requiert une régulation complexe et stricte, notamment en raison de l'obligation de confiner dans le temps et dans l'espace l'importante activité protéolytique engendrée. Il constitue ainsi un modèle remarquable pour étudier les mécanismes sous-jacents. En dehors de l'espèce humaine, le phénomène de menstruation n'a été mis en évidence que chez certaines espèces de primates, de musaraignes et de chauves-souris (Rasweiler 1991; Rasweiler et de Bonilla 1992).

1) Le système reproducteur de la femme

[Références principales : Sternberg 1997; Widmaier *et al.* 2004]

1.1. Généralités

Le système reproducteur féminin comprend les organes génitaux externes (seins et vulve) et les **organes génitaux internes** (Figure I.1) situés dans la cavité pelvienne. Ces derniers comportent une paire de gonades et un système de conduits et de cavités qui, sous un contrôle endocrine complexe, assurent la maturation cyclique de gamètes, les ovocytes, ainsi qu'un environnement favorable à la fécondation, à l'implantation d'un éventuel blastocyste et à son développement. Les gonades femelles, appelées **ovaires**, sont des organes ovalaires, symétriques, fixés à la paroi postérieure du bassin. Ils sont logés en regard de l'extrémité libre en forme d'entonnoir des **trompes utérines ou trompes de Fallope**, elles-mêmes en

continuité avec la cavité utérine. **L'utérus**, site de nidation, est un organe impair médian localisé entre la vessie et le rectum. Il a la forme d'un cône aplati dans le sens antéropostérieur et se continue en bas par **le vagin**, cylindre creux à paroi mince très élastique ouvert par son extrémité inférieure dans la vulve. La paroi de l'utérus est tapissée d'une muqueuse, **l'endomètre**.

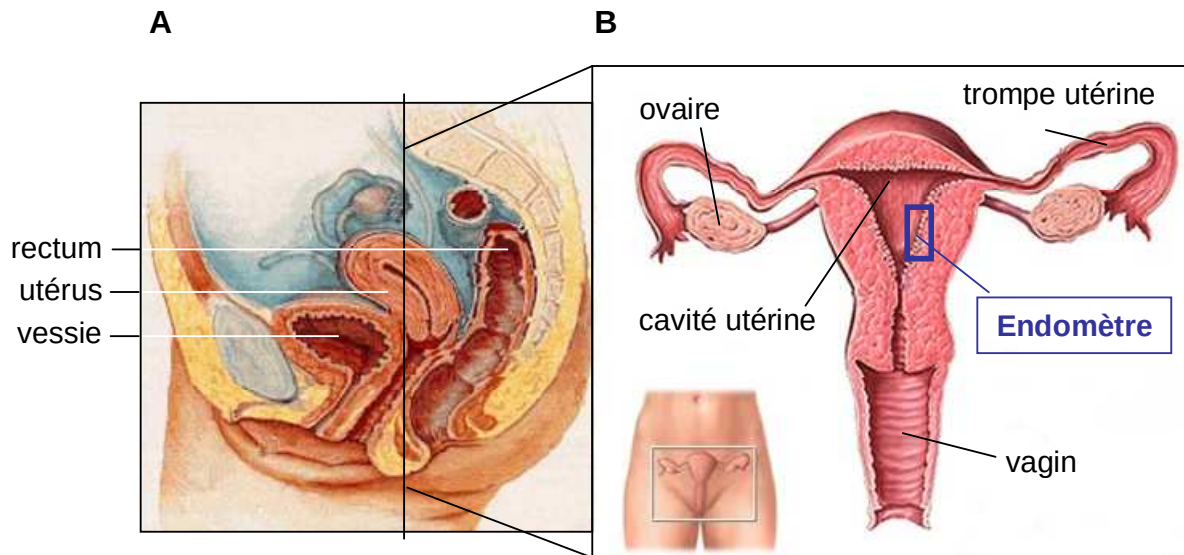


Figure I.1 : Organes génitaux internes. (A) Localisation de l'utérus dans une coupe sagittale de la cavité pelvienne. (B) Localisation anatomique de l'endomètre sur une coupe frontale des organes génitaux internes. Adaptation de "Medical encyclopedia": <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/encyclopedia.html>

1.2. Régulation hormonale du cycle

[Références principales : Shupnik 1996; Yen 1991; Widmaier *et al.* 2004]

Chez la femme, la fonction de reproduction est caractérisée par des cycles dits « menstruels » régulés par la production coordonnée d'hormones hypothalamiques, hypophysaires et ovariennes. Le **cycle menstruel** (Figure I.2) se manifeste depuis la puberté jusqu'à la ménopause. Il est d'une durée moyenne de 28 jours et, par convention, commence au premier jour d'apparition des saignements (j1). Il comporte trois phases distinctes : la phase menstruelle du j1 au j5, la phase proliférative pré-ovulatoire (appelée également phase folliculaire ou phase œstrogénique) du j6 au j14 et la phase sécrétoire post-ovulatoire (aussi appelée phase lutéale ou phase œstroprogestéronique) du j15 au j28.

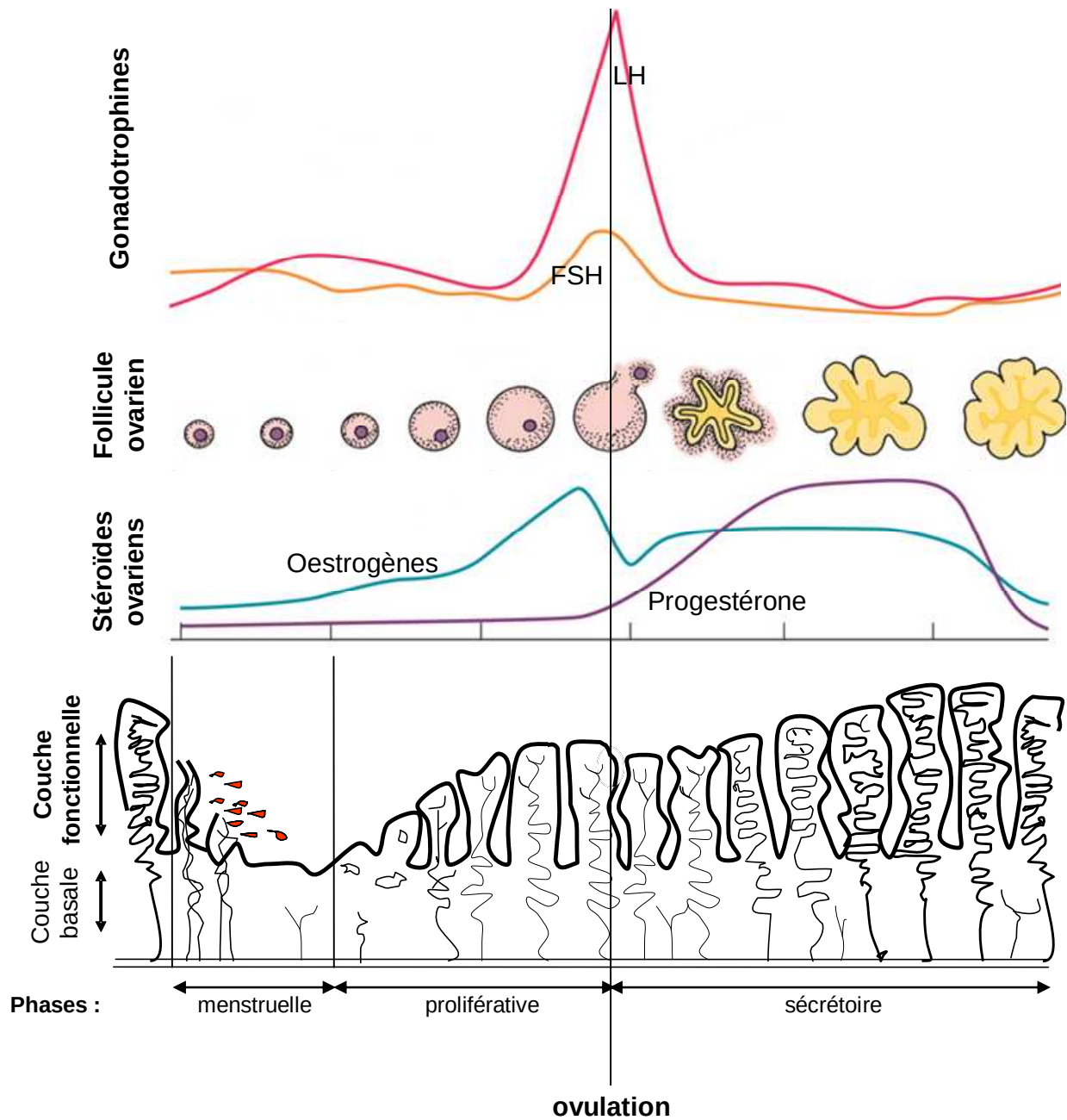


Figure I.2 : Le cycle menstruel. Variation cyclique des concentrations plasmatiques d'hormones gonadotropiques, du développement folliculaire, des concentrations plasmatiques des stéroïdes ovariens et de la morphologie du tissu endométrial. Adaptation de Gilbert 2006.

Pendant la phase menstruelle et au cours des jours qui suivent jusqu'à l'ovulation, l'antéhypophyse augmente sa production de **gonadotrophines**, FSH (Follicle Stimulating Hormone) et LH (Luteinizing Hormone) sous l'action générale de la **GnRH** (Gonadotropin-Releasing Hormone) produite de manière pulsatile par l'hypothalamus. Ces hormones agissent sur les ovaires en stimulant la maturation des follicules ovariens formés d'un ovocyte et des cellules l'entourant. Au j7, un follicule est dominant et commence à sécréter des **œstrogènes**. Les œstrogènes en concentration relativement basse exercent une inhibition par rétrocontrôle négatif sur la sécrétion des gonadotrophines. Avec la croissance du follicule ovarien, la production d'œstrogènes augmente. Lorsque leur concentration est suffisamment élevée, les œstrogènes stimulent la production des gonadotrophines dans un mécanisme de rétrocontrôle positif. On observe alors un pic de LH et de FSH au j14 qui déclenche l'ovulation, expulsion de l'ovocyte de sa coque folliculaire et de l'ovaire vers les trompes utérines. Le follicule ovarien vide dégénère alors en corps jaune (ou glande lutéale). Durant les jours qui suivent l'ovulation, le corps jaune est maintenu grâce à des concentrations faibles mais suffisantes de LH et produit de grandes quantités d'œstrogènes et de **progestérone**. La progestérone inhibe la production des gonadotrophines, résultant en la dégénérescence du corps jaune en fin de cycle. Avec la dégénérescence du corps jaune, la disparition des stéroïdes ovariens entraîne la dégradation menstruelle de l'endomètre. Par ailleurs, l'inhibition de la production des gonadotrophines est levée et le cycle peut recommencer.

1.3. Modifications utérines au cours du cycle: l'endomètre

[Référence principale : Burkitt *et al.* 1993]

D'une manière générale, l'endomètre est constitué de deux couches: **la couche basale ou résiduelle**, adjacente à la musculuse de l'organe (le myomètre), et la **couche fonctionnelle ou superficielle** (Figure I.3 : A). Le tissu endométrial se compose de **cellules épithéliales** unistratifiées cylindriques, qui constituent l'épithélium de surface s'invaginant pour former des glandes, et d'un stroma ou mésenchyme (Figure I.3 : B). Dans le mésenchyme, on retrouve des **cellules stromales** ou fibroblastes du stroma qui élaborent un réseau de soutien riche en fibres de collagène argyrophiles (Figure I.3 : C), des cellules endothéliales bordant

les vaisseaux, des cellules musculaires lisses dans la paroi des artérioles spiralées (Markee 1940), et des cellules inflammatoires infiltrantes des lignées myéloïde et lymphoïde : mastocytes, macrophages, lymphocytes T et granulocytes (ou natural killer cells [NK]). Excepté pour les mastocytes, le nombre de cellules inflammatoires varie tout au long du cycle menstruel et augmente en période périmenstruelle (Kamat et Isaacson 1987). En fin de phase sécrétoire, le stroma est infiltré par de nombreux granulocytes et monocytes-macrophages et des polymorphonucléaires éosinophiles et neutrophiles apparaissent (Salamonsen et Woolley 1999). Au moment des menstruations, ces leucocytes représentent jusqu'à 40% du contingent cellulaire stromal, et 20% des leucocytes sont des macrophages (Jones *et al.* 2004). Selon certains auteurs, cette infiltration de cellules inflammatoires joue un rôle dans le déclenchement de la menstruation (Salamonsen et Lathbury 2000).

Au cours du cycle, les variations en concentration plasmatique d'hormones ovariennes vont modifier les structures et fonctions de l'appareil reproducteur de la femme, essentiellement au niveau de l'endomètre. Ces modifications ont pour but de préparer la muqueuse à l'implantation de l'ovule fécondé et au développement intra-utérin de l'embryon. Globalement, les œstrogènes sont nécessaires à la prolifération de l'endomètre et stimulent l'expression des récepteurs des stéroïdes (Kurita *et al.* 1998; Martin 1980; Prange-Kiel *et al.* 2001), tandis que la progestérone joue un rôle dans la différenciation et la maintenance tissulaires (de Ziegler *et al.* 1998; Gellersen et Brosens 2003). La progestérone exerce également un effet anti-inflammatoire en réprimant la production de cytokines chémoattractives pour les macrophages et les lymphocytes (Kelly *et al.* 1994; Tibbetts *et al.* 1999). Cet effet de la progestérone est probablement essentiel pour constituer un environnement immunologique favorable à l'implantation et au développement du blastocyste et prévenir son rejet par la mère.

Des changements s'observent au niveau de l'endomètre au cours des différentes phases du cycle. Puisque la menstruation requiert les modifications observées au cours des deux phases qui la précèdent et puisqu'elle est déclenchée par la chute de la concentration plasmatique des stéroïdes ovariens en fin de cycle, il est plus opportun de décrire les modifications endométriales en débutant au j6.

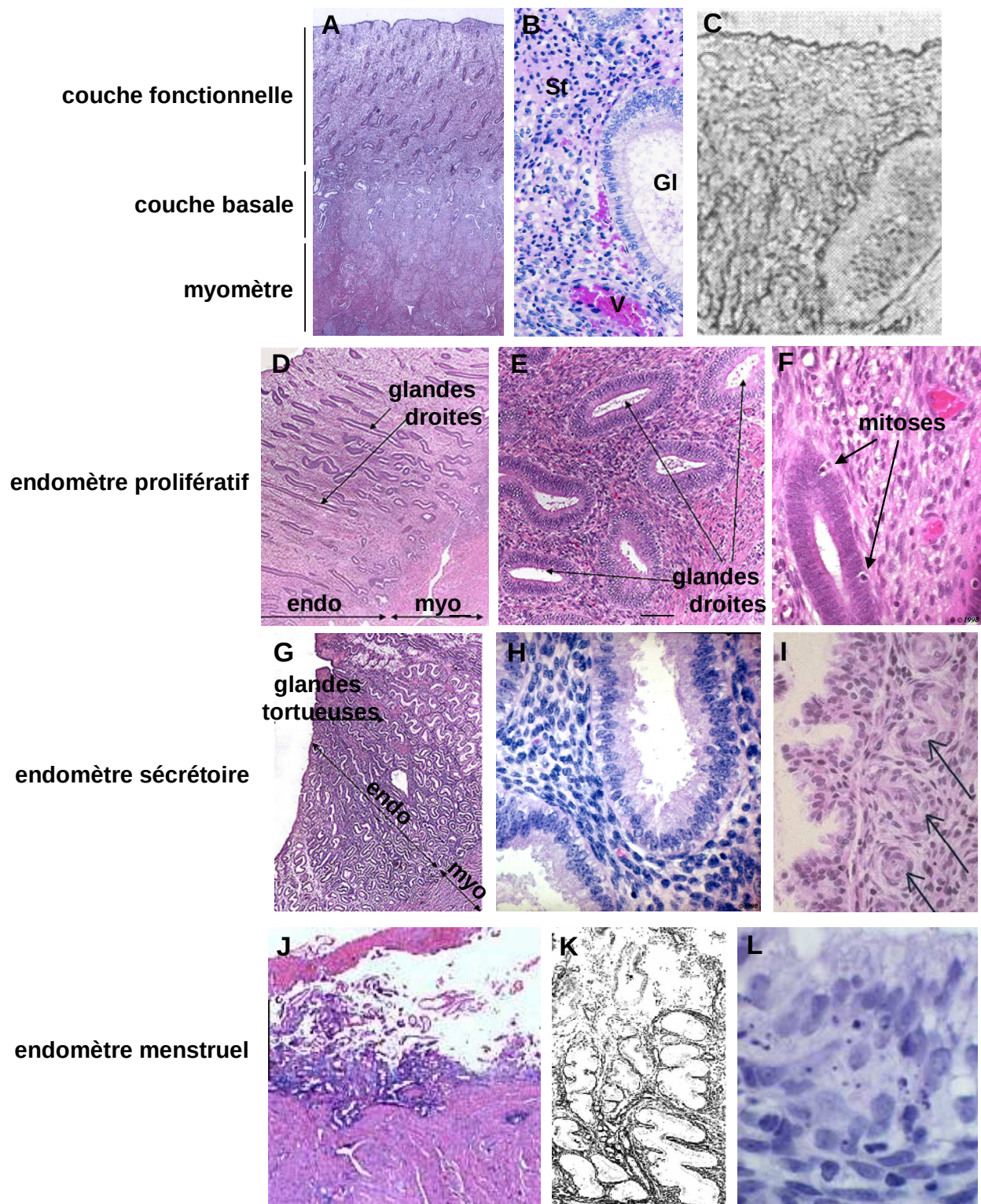


Figure I.3 : Structure histologique de l'endomètre et évolution au cours du cycle. A-C : l'endomètre constitue la muqueuse de la paroi utérine et est formé d'une couche fonctionnelle et d'une couche basale (A). Le tissu endométrial est majoritairement composé de deux compartiments : les glandes (Gl) et un stroma (St) vascularisé (V) (B). La matrice extracellulaire du tissu endométrial est riche en fibres argyrophiles de collagène (C). D-F : endomètre prolifératif montrant des glandes droites et étroites perpendiculaires à la lumière de la cavité utérine (D), constituées d'un épithélium cylindrique pseudostratifié (E) présentant de nombreuses mitoses (F). G-I : endomètre sécrétoire montrant des glandes tortueuses (G) dont l'épithélium sécrète du glycogène (H) et des artérioles qui se spiralisent (flèches en I). En D et G : endomètre (endo) et myomètre (myo). J-L : la couche fonctionnelle de l'endomètre menstruel se dégrade et est éliminée par petits fragments (J) en raison de la dégradation du réseau de soutien de fibres de collagène (K). Dès la fin de la phase sécrétoire et durant la phase menstruelle, on observe dans le tissu de nombreux corps apoptotiques (L).

Sources : Pr Etienne Marbaix, communication personnelle;
<http://www.isto.ucl.ac.be>; <http://www.cytochemistry.net>
<http://www.medschool.ucsf.edu/irocket/resources/lm/>

- la **phase proliférative** (j6-j14) correspond à la régénération progressive de la couche fonctionnelle: en réponse aux œstrogènes, les cellules épithéliales, endothéliales et stromales prolifèrent à partir de cellules progénitrices de la couche basale (Gargett et al. 2007). L'épithélium de surface se reforme, s'invagine dans le stroma et reconstitue d'abord des glandes droites et étroites qui deviendront progressivement tortueuses avec un épithélium pseudostratifié (Figure I.3 : D et E). De nombreuses figures mitotiques peuvent alors être observées (Figure I.3 : F). Dans le mésenchyme œdémateux, les cellules stromales produisent d'abord de la fibronectine, puis élaborent un réseau riche en fibres argyrophiles constituées de collagènes de type I, III, V et VI. Les artérioles s'allongent et le réseau vasculaire se rétablit.

- la **phase sécrétoire** (j15-j28) suit l'ovulation et correspond à une transformation cellulaire due à l'action combinée des œstrogènes et de la progestérone. Les modifications observées au cours de cette phase visent à enrichir les sécrétions glandulaires en éléments nutritifs nécessaires à la survie d'un éventuel œuf fécondé, à permettre l'adhérence du blastocyste à l'épithélium de surface, et à favoriser la pénétration trophoblastique en constituant un environnement riche et bien vascularisé. Les glandes deviennent plus longues, plus sinueuses (Figure I.3 : G), et présentent une zone lucide d'accumulation de glycogène et de glycoprotéines au pôle basal. En milieu de phase sécrétoire, ces produits de

sécrétion migrent au pôle apical et font protrusion dans la lumière des glandes (Figure I.3 : H). Les artérioles deviennent spiralées et convolutées (Figure I.3 : I). Le stroma est œdémateux. La distension de l'endomètre est maximale et le réseau de fibres argyrophiles paraît plus lâche, propice à l'implantation. En fin de phase sécrétoire, l'œdème régresse, les cellules stromales se décidualisent, c'est-à-dire qu'elles grossissent, s'arrondissent et acquièrent un noyau central et vésiculeux et un cytoplasme clair, abondant, chargé de glycogène, de mucopolysaccharides et de lipides.

- la **phase menstruelle** (j1-j5) correspond à l'élimination de la couche fonctionnelle de l'endomètre en l'absence de fécondation et est accompagnée de saignements (Figure I.3 : J). Elle est due à la chute des taux plasmatiques des stéroïdes ovariens en fin de phase sécrétoire suite à la perte du corps jaune ovarien (Markee 1940). Cette diminution des concentrations hormonales engendre une cascade de signalisation encore mal définie menant à la dégradation protéolytique de la matrice extracellulaire (Figure I.3 : K). On observe simultanément une vasoconstriction des artérioles, qui pourrait diminuer l'apport d'oxygène et de nutriments aux cellules endométriales, et des contractions rythmées du muscle lisse utérin, accentuant la déchirure du mésenchyme et des artérioles. Cette désagrégation s'accompagne d'apoptose (Figure I.3 : L), mort cellulaire programmée, qui touche surtout le compartiment épithélial d'après la littérature, et ce dès la fin de la phase sécrétoire (Dahmoun *et al.* 1999; Hopwood et Levison 1976; Tabibzadeh 1995). Les menstrues sont ainsi composées d'un flux sanguin non coagulable, mêlé de débris tissulaires formés d'amas de cellules glandulaires et stromales qui ne sont plus retenues par le réseau tridimensionnel de fibres de collagène. Toutefois, la couche basale persiste avec quelques culs de sac glandulaires ouverts dans la cavité utérine et des petits vaisseaux.

2) Le remodelage de la matrice extracellulaire endométriale

2.1. La matrice extracellulaire

[Références principales : Aplin *et al.* 1988; Comper 1996]

La matrice extracellulaire se définit comme un réseau de macromolécules sécrétées par les cellules et qui remplit l'espace extracellulaire. Les principales macromolécules de la matrice extracellulaire sont des **protéines fibreuses**, de structure (collagène et élastine) ou d'adhérence (fibronectine et laminine), et des **polysaccharides** (glycosaminoglycannes et protéoglycannes). Dans le stroma endométrial, les **collagènes fibrillaires de type I et III** forment un réseau de fibres argyrophiles qui fournit ainsi un soutien structural permettant le maintien de l'intégrité du tissu et qui lui confère ses propriétés biomécaniques. Au cours du cycle menstruel, ce réseau est remanié. Il se constitue et se modifie d'abord durant les phases proliférative et sécrétoire avant de disparaître en phase menstruelle (Marbaix *et al.* 1996b). Ce remaniement structurel est régulé par des protéases spécifiques qui modulent la matrice extracellulaire; celle-ci n'est donc pas un ensemble figé de molécules, mais bien un complexe dynamique, en constante destruction et reconstruction. Les protéases capables de dégrader les composants de la matrice extracellulaire sont (i) les sérine protéases tels que les activateurs du plasminogène, (ii) les cystéine et aspartyl protéases lysosomiales et (iii) les métalloprotéinases matricielles. Les investigations du laboratoire ont démontré l'implication directe des métalloprotéinases matricielles dans le processus de la menstruation.

2.2. Les métalloprotéinases matricielles

2.2.1. Définition

Les métalloprotéinases matricielles (matrixines ou MMPs), famille de 25 membres connus actuellement, appartiennent à la superfamille des metzincines, des endopeptidases dépendant du zinc et du calcium (Stocker *et al.* 1995). Ces enzymes, synthétisées sous forme de zymogènes (proMMPs latentes), dégradent les composants de la matrice extracellulaire et des membranes basales au pH physiologique (Khasigov *et al.* 2001; Page-McCaw *et al.* 2007). Elles clivent également un assortiment d'autres protéines incluant des facteurs de croissance, des cytokines, des récepteurs membranaires et des molécules d'adhérence (Bornstein et Sage 2002; Cauwe *et al.* 2007; Egeblad et Werb 2002; Noel *et al.* 2008; Sternlicht et Werb 2001).

Les MMPs sont classées en fonction de leur spécificité de substrats. Parmi celles-ci, les *collagénases* 1, 2 et 3 (ou MMP-1, -8 et -13 respectivement) présentent la particularité de pouvoir scinder la triple hélice des collagènes fibrillaires en un site spécifique, générant deux fragments (3/4 amino-terminal et 1/4 carboxy-terminal) qui se dénaturent en gélatine (Murphy *et al.* 1985). Ces MMPs sont toutes directement sécrétées (Birkedal-Hansen *et al.* 1993). La MMP-8 peut également être stockée dans les granules de sécrétion des polymorphonucléaires neutrophiles où elle a été initialement découverte (Mainardi *et al.* 1991).

2.2.2. Régulation transcriptionnelle des MMPs

[Référence principale : Clark *et al.* 2008]

Dans les tissus sains, la dégradation et la synthèse des composants de la matrice extracellulaire sont en équilibre étroit. L'activité protéolytique des MMPs doit donc être finement régulée, ce qui peut se réaliser à différents niveaux. Les étapes de régulation les plus importantes sont la **transcription** de l'ARNm, l'**activation** de la pro-protéine latente et l'**inhibition** de la forme active (Figure I.4).

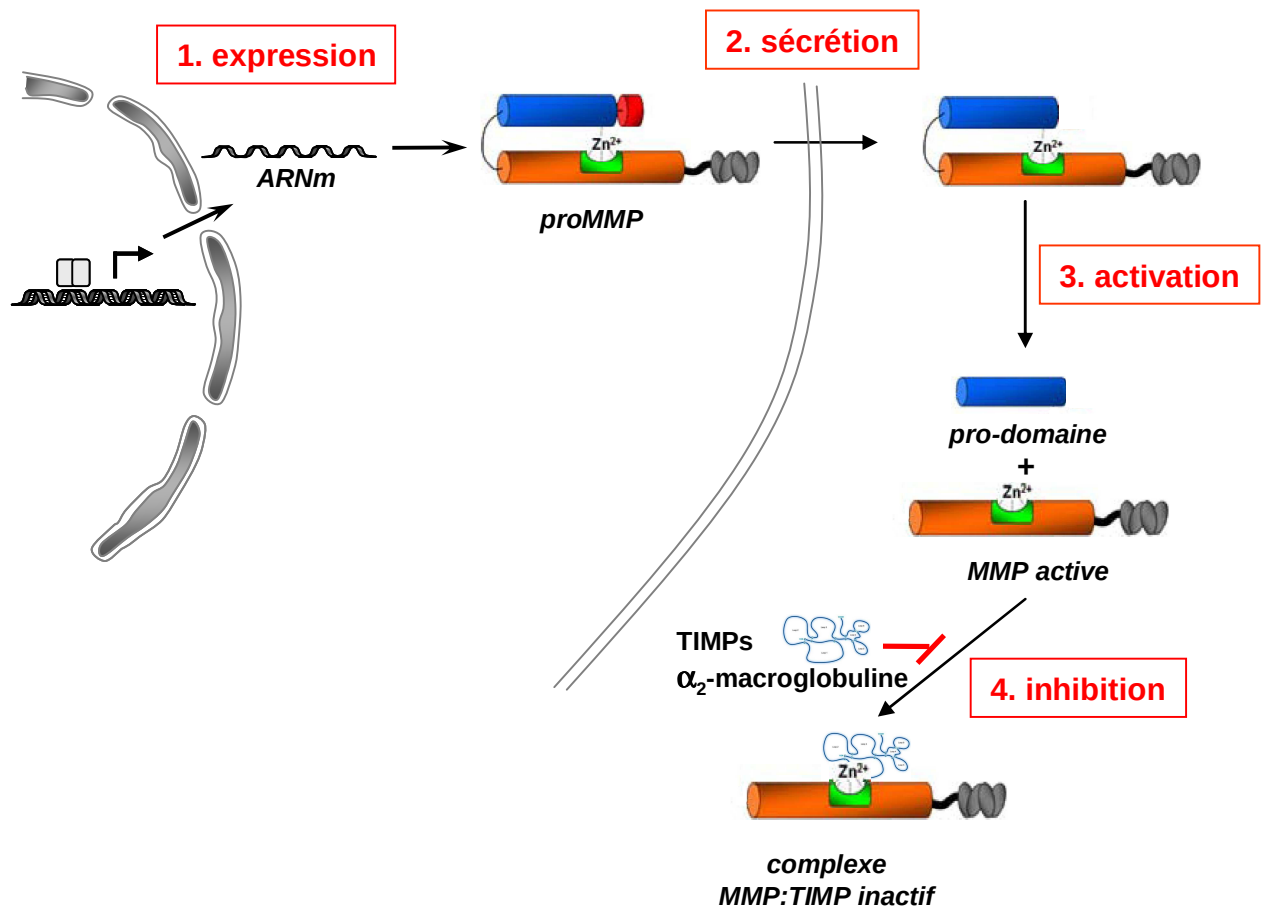


Figure I.4 : Principaux modes de régulation de la bioactivité des MMPs. La plupart des MMPs partagent différents mécanismes de régulation de leur activité dont (1) leur expression, (2) leur sécrétion (régulée dans un nombre limité de types cellulaires tels que les polymorphonucléaires neutrophiles), (3) l'activation de leur forme latente zymogène en forme active par excision du prodomaine qui masque le site catalytique, et (4) leur inhibition par des inhibiteurs physiologiques tels les TIMPs (inhibiteurs tissulaires des MMPs) et l' α_2 -macroglobuline. Adaptation de Alix Berton, communication personnelle.

Toutefois, d'autres mécanismes de régulation s'opèrent également au niveau de la stabilité de l'ARNm (Overall *et al.* 1991), de l'efficacité de la traduction, de la compartimentalisation, du stockage et de la sécrétion (Hasty *et al.* 1990), de la localisation membranaire (Berton *et al.* 2007), de l'oligomérisation, de l'internalisation et de l'autolyse des MMPs (Chakraborti *et al.* 2003). Compte tenu de la nature des travaux présentés dans ce document, seuls les mécanismes de régulation transcriptionnelle sont détaillés ci-dessous.

La plupart des MMPs ne sont que faiblement exprimées dans les tissus normaux mais leur niveau d'expression augmente rapidement en cas de remodelage tissulaire (Coussens *et al.* 2002; Overall et Lopez-Otin 2002). Leur transcription dans les cellules tumorales ou stromales peut être induite ou réprimée par de nombreux stimuli externes incluant des **facteurs de croissance**, des **cytokines** [TNF (Tumour Necrosis Factor)- α , ILs (interleukines), IFNs (interférons),...], la signalisation des **intégrines**, des produits d'**oncogènes** [Ras, Jun,...], la protéine transmembranaire EMMPRIN (Extracellular Matrix Metalloproteinases Inducer ou CD147), le **stress mécanique**, ainsi que par les composants de la matrice extracellulaire comme la fibronectine ou les collagènes de types I et IV (Chakraborti *et al.* 2003).

D'une manière générale, les MMPs humaines peuvent être classées en trois grands groupes en fonction de la composition de leur promoteur (Figure I.5) : (i) les promoteurs comprenant une boîte TATA et un site AP-1 (Activator Protein-1) proximal, dont ceux des MMP-1 et MMP-13; (ii) ceux comprenant une boîte TATA mais pas de site AP-1 proximal, dont celui de la MMP-8 qui présente cependant un site AP-1 distal; et (iii) ceux ne comprenant ni boîte TATA ni site AP-1 proximal. A ces sites minimaux de régulation s'ajoutent différents éléments *cis* qui permettent un contrôle fin et spécifique de l'expression par différents *trans*-régulateurs tels que les facteurs de transcription AP-2, NF- κ B (Nuclear Factor- κ B), STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription)-1, TCF (T-Cell Factor), TIE (TGF- β Inhibitory Element) et l'élément de réponse à l'acide rétinoïque (RARE) qui peuvent agir de façon indépendante ou synergique.

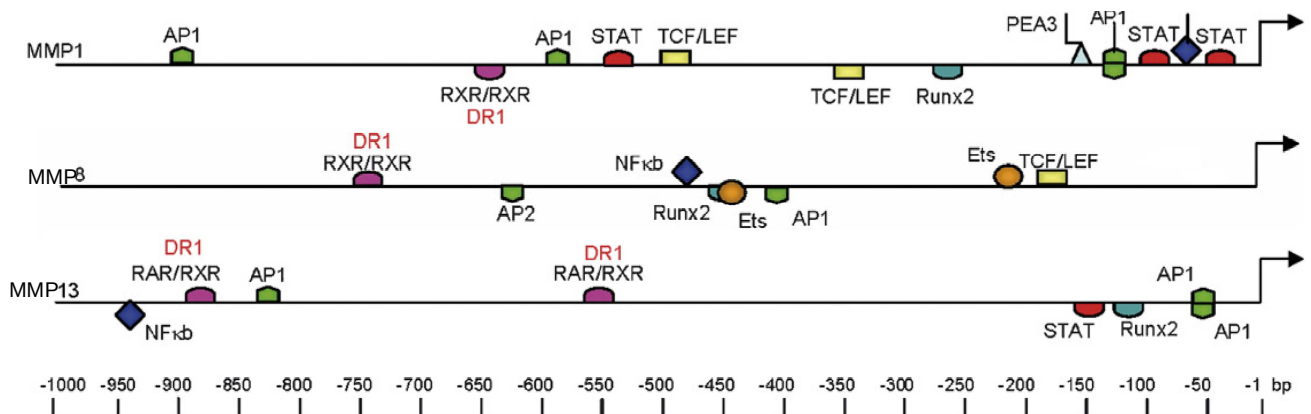


Figure I.5 : Promoteur des gènes MMP-1, -8 et -13. Les séquences consensus pour les différents sites de régulation de la transcription [AP-1 (Activator Protein 1), AP-2, Ets (Erythroblastose), PEA3 (Polyoma Enhancer element A3), NFκB (Nuclear Factor κB), RAR/RXR (Retinoic Acid Response element), RXR/RXR (Retinoid X Response element), Runx2 (Runt-related transcription factor 2), STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) et TCF/LEF (T-Cell Factor/Lymphoid Enhancer Factor)] ont été identifiées à l'aide du programme informatique MatInspector (Genomatix, <http://www.genomatix.de/>) en amont du site d'initiation de la transcription. D'après Clark et al. 2008.

Les différentes voies impliquées dans le contrôle d'expression des MMPs sont (Overall et Lopez-Otin 2002; Tardif *et al.* 2001; Vincenti et Brinckerhoff 2007; Yuan et Varga 2001) (Figure I.6) :

- la **voie NF- κ B** activée par le TNF- α , les IL-1,...
- la **voie des MAPKinases** (Mitogen-activated protein kinases) activée par le FGF (Fibroblast Growth Factor), l'EGF (Epithelial Growth Factor), les intégrines, les esters de phorbol,...
- la **voie JAK** (Janus kinase) -**STAT** inhibitrice stimulée par les IFNs.

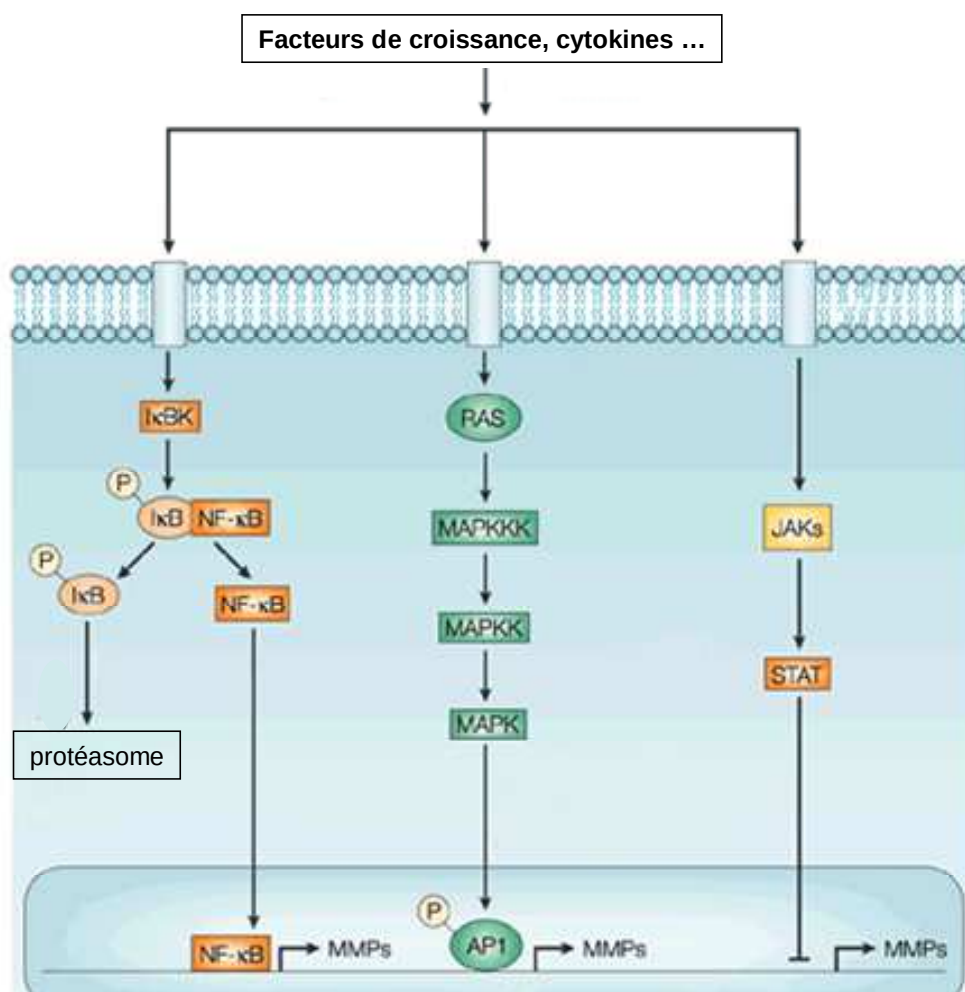


Figure I.6 : Voies de signalisation impliquées dans la transcription des gènes des MMPs. D'après Overall et Lopez-Otin 2002.

2.3. Les MMPs et la menstruation

L'abondance des MMPs dans l'endomètre menstruel, leur contrôle cyclique par les stéroïdes ovariens et leur intervention dans la dégradation tissulaire endométriale ont été largement documentés au cours des 15 dernières années, en particulier par des études menées au sein du laboratoire d'accueil.

2.3.1. Expression des MMPs dans l'endomètre

Plusieurs études ont contribué à déterminer le profil d'expression des MMPs dans l'endomètre humain *in vivo* notamment par immunohistochimie (revues dans Henriet *et al.* 2002) et par RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) en temps réel (Goffin *et al.* 2003; Vassilev *et al.* 2005). De nombreuses MMPs montrent d'importantes variations d'expression au cours du cycle menstruel. Bien que la plupart exhibent une expression maximale en phase menstruelle, les profils varient au cours des autres phases du cycle. Les quantités des ARNm des collagénases 1 et 2 (MMP-1 et MMP-8) sont fortement augmentées (jusqu'à plus de 1000 fois) en phase menstruelle tandis qu'elles sont minimales, voire non détectables durant les autres phases du cycle. L'expression de certaines MMPs reste toutefois plus stable tout au long du cycle. A ce jour, l'expression de la collagénase 3 (MMP-13) n'a pas été détectée dans l'endomètre humain.

Les MMPs dont l'expression est induite en phase menstruelle jouent un rôle clé dans la dégradation tissulaire (Zhang et Salamonsen 2002). La MMP-1 en est une démonstration particulière. Son expression exclusive dans les foyers de lyse souligne son rôle initiateur du remodelage endométrial (Kokorine *et al.* 1996; Marbaix *et al.* 1996a). Par contre, le rôle des MMPs dont l'expression persiste durant les autres phases du cycle reste à préciser.

Dans l'endomètre, la plupart des MMPs, dont la MMP-1, sont synthétisées par les cellules stromales (Rawdanowicz *et al.* 1994; Rodgers *et al.* 1994). En outre, la MMP-8 est produite par des cellules inflammatoires, en particulier les macrophages (Shi *et al.* 1995).

2.3.2. Contrôle hormonal de l'expression des MMPs

L'augmentation soudaine des MMPs en fin de phase sécrétoire a suggéré leur contrôle par les stéroïdes ovariens. La corrélation entre la production d'activité collagénolytique et la chute des concentrations hormonales a premièrement été confirmée en culture d'explants. Dans un tel système, l'ajout de stéroïdes ovariens, 17β -œstradiol et progestérone, aux concentrations physiologiques dans le milieu de culture inhibe la production de MMPs, maintenant l'intégrité du réseau fibrillaire de soutien. Par contre, en l'absence d'hormones, la menstruation est mimée: les MMPs sont induites et le réseau de fibres de collagène s'effrite et disparaît (Marbaix et al. 1996a et 1996b) (Figure I.7).

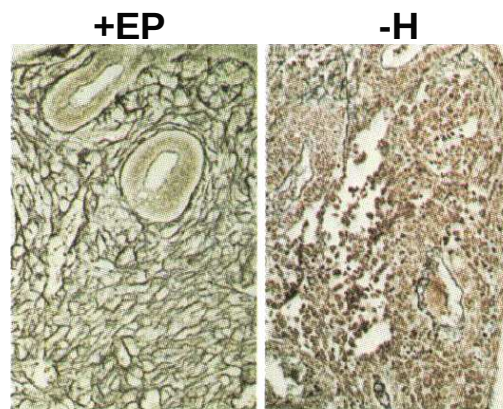


Figure I.7 : Réseau de fibres de collagènes d'explants d'endomètre. Coloration à l'argent du réseau de soutien de fibres de collagène en culture d'explants d'endomètre en présence (+EP) ou en absence (-H) de stéroïdes ovariens. D'après Marbaix et al. 1996b.

Ces explants reflètent alors l'endomètre *in situ* dont ils gardent l'imprégnation hormonale. Seuls les explants de biopsies prélevées pendant la phase périmenstruelle sécrètent abondamment de la collagénase dès le premier jour de culture. En revanche, les explants d'endomètres prélevés en phases proliférative ou sécrétoire, contenant des concentrations résiduelles d'hormones endogènes, ne sécrètent que des quantités négligeables de collagénase au cours du premier jour de culture. La progestérone inhibe fortement la production de collagénase, et cet effet est renforcé par l'addition simultanée d'œstradiol (Marbaix et al. 1995; Osteen et al. 1994).

Le rôle inhibiteur majeur des stéroïdes ovariens sur l'expression des MMPs a été démontré *in vivo* chez le macaque. Des implants d'œstradiol et de progestérone ont été placés sur des femelles macaques ovariectomisées, afin de reproduire les changements hormonaux rencontrés chez la femme. Leur retrait a déclenché une rapide augmentation de l'expression de nombreuses MMPs, dont la MMP-1 (Brenner *et al.* 1996).

2.3.3. Les récepteurs des stéroïdes

Les stéroïdes ovariens transmettent classiquement leurs effets par l'intermédiaire de récepteurs nucléaires spécifiques : ER α (Green *et al.* 1986) et ER β (Enmark *et al.* 1997) pour les œstrogènes et PRA et PRB pour la progestérone (Conneely et Lydon 2000). Ces récepteurs sont des régulateurs transcriptionnels dont l'activité dépend de la liaison des ligands.

De façon générale, l'abondance des récepteurs stéroïdes augmente pendant la phase proliférative sous l'effet inducteur des œstrogènes, est maximale autour de l'ovulation, régresse progressivement au cours de la phase sécrétoire sous l'effet anti-œstrogénique de la progestérone, pour atteindre pendant la phase menstruelle leur niveau le plus faible (Widmaier *et al.* 2004).

Du point de vue histologique, la distribution des récepteurs montre une hétérogénéité tissulaire. Ces récepteurs sont principalement détectés dans le noyau des cellules épithéliales et des fibroblastes endométriaux (Snijders *et al.* 1992). Leur expression varie selon le type cellulaire et la zone endométriale considérée le long du cycle menstruel. Ainsi, ce sont les récepteurs des œstrogènes qui prédominent dans l'endomètre prolifératif, surtout dans le compartiment glandulaire. ER α est détecté dans le noyau des cellules épithéliales et des cellules stromales de la couche fonctionnelle et de la couche basale. Leur détection s'accroît rapidement en phase proliférative et diminue en phase sécrétoire. En fin de phase sécrétoire et durant la menstruation, ER α est quasi indétectable dans les glandes mais persiste dans quelques rares foyers de cellules stromales (Snijders *et al.* 1992). ER β est exprimé dans l'épithélium, le stroma et l'endothélium de l'endomètre (Critchley *et al.* 2002; Lecce *et al.* 2001). Dans les cellules musculaires lisses des vaisseaux, ER α n'est exprimé qu'en fin de phase proliférative et début de phase sécrétoire tandis que ER β

y est essentiellement exprimé en fin de phase sécrétoire. L'endomètre sécrétoire se caractérise par une expression stromale assez stable des récepteurs de la progestérone, tandis que l'expression épithéliale diminue. PRA et PRB colocalisent dans les cellules glandulaires tandis que PRA est mieux représenté dans le compartiment stromal que PRB (Mote *et al.* 2000).

Compte tenu de l'intérêt majeur porté au contrôle par les stéroïdes ovariens dans le cadre de mon travail, j'ai vérifié par immunohistochimie la présence des récepteurs nucléaires hormonaux dans les différents types d'échantillons utilisés: endomètres non cultivés représentatifs des différentes phases du cycle, explants cultivés en présence ou non des stéroïdes ovariens et cellules stromales ou épithéliales purifiées. En accord avec les observations décrites dans la littérature, les trois récepteurs analysés (ER α , PRA et PRB) ont pu être détectés dans les glandes et le stroma des échantillons sécrétoires et prolifératifs, qu'ils aient été cultivés sous forme d'explants ou non (Figure I.8). De fait, dans les échantillons analysés qui proviennent du début de la phase sécrétoire, l'expression épithéliale apparaissait intense comme attendu. Les marquages tissulaires étaient d'intensité comparable avant et après culture, sans influence visible de l'addition hormonale. Le signal de ER α et PRB était plus faible dans les échantillons issus de la phase sécrétoire que dans ceux issus de la phase proliférative. Dans les cellules épithéliales et stromales purifiées et adaptées à la culture en présence des stéroïdes ovariens, les récepteurs ont également pu être détectés mais avec des signaux moins intenses (Figure I.9).

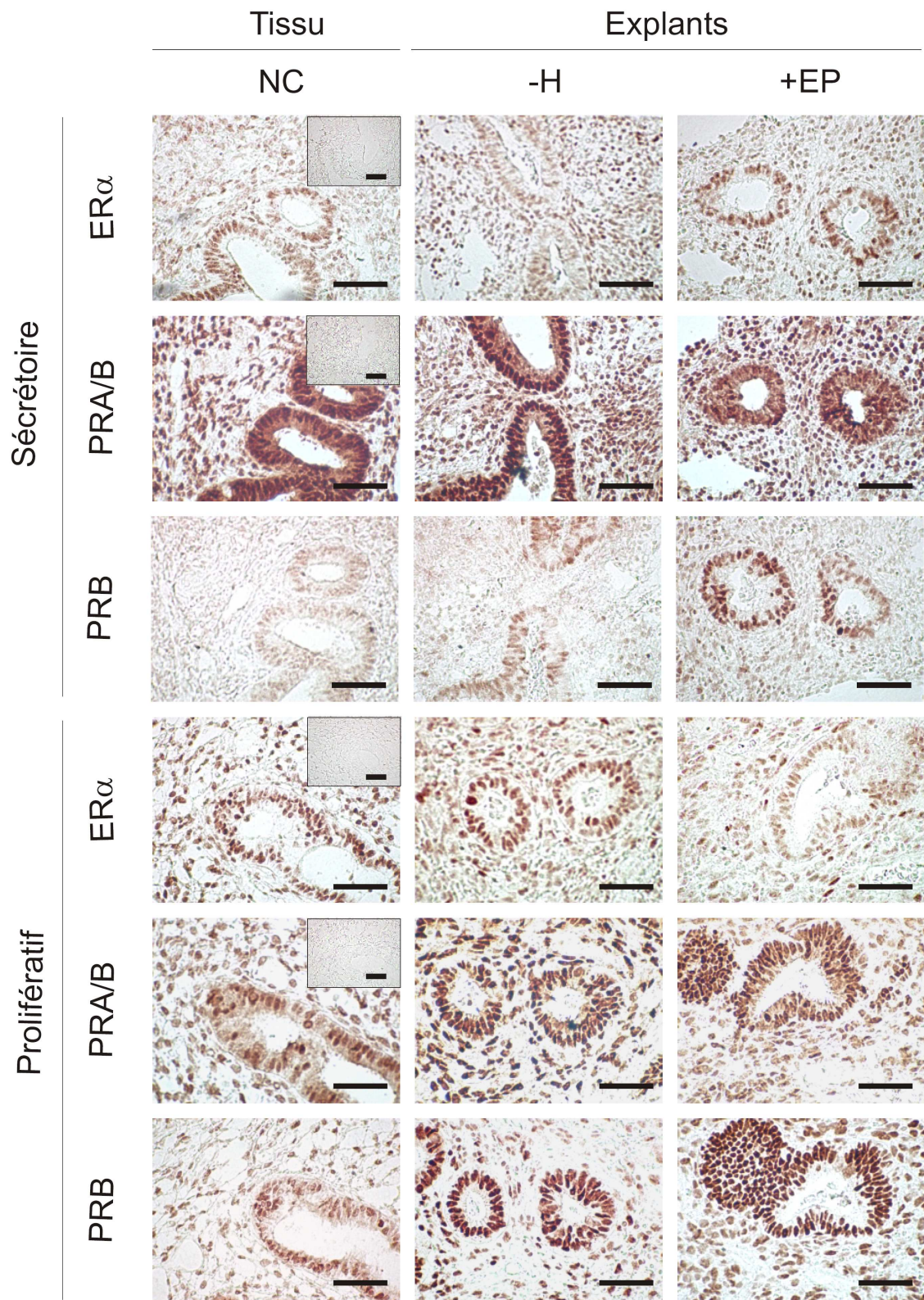


Figure I.8 : Immunodétection de récepteurs des stéroïdes dans l'endomètre non cultivé ou dans les explants cultivés pendant 24h. ER α , PRA et PRB combinés, ou PRB seul ont été immunolocalisés dans des échantillons d'endomètre non cultivés (NC) ou dans des explants issus de 2 endomètres en début de phase sécrétoire et 4 endomètres prolifératifs cultivés 24h en absence (-H) ou en présence (+EP) des stéroïdes ovariens. Les inserts montrent les contrôles négatifs. Les barres correspondent à 50 μ m.

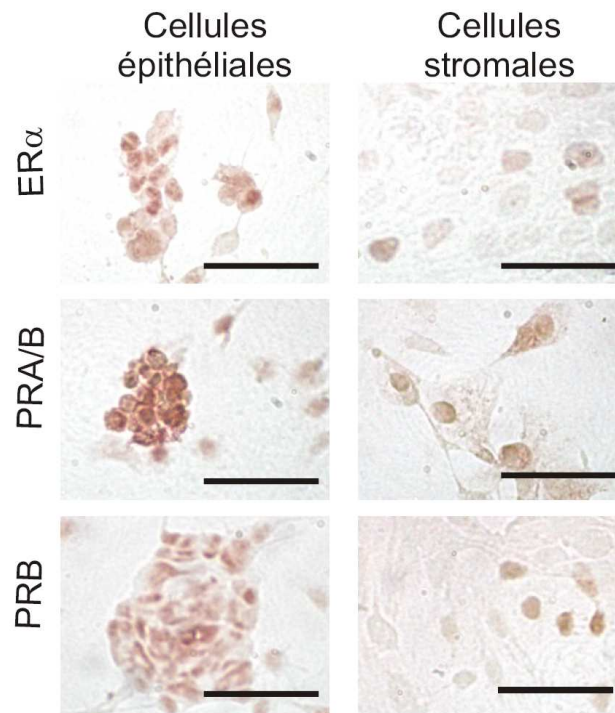


Figure I.9 : Immunodétection de récepteurs des stéroïdes dans les cellules épithéliales et stromales purifiées. *ER α , PRA et PRB combinés, ou PRB seul ont été immunolocalisés dans les cellules épithéliales et stromales purifiées et adaptées à la culture pendant 4j et 8j respectivement en présence de concentrations physiologiques des stéroïdes ovariens. Les barres correspondent à 50 μ m.*

L'utilisation de l'antagoniste compétitif de la progestérone, la mifépristone (RU 486), a démontré que l'hormone agit sur l'expression des MMPs via ses récepteurs (Marbaix *et al.* 1992). Une relation inverse a d'ailleurs été mise en évidence entre l'expression de l'ARNm de la MMP-1 dans les cellules stromales et celle des récepteurs des stéroïdes ovariens. En particulier, les récepteurs de la progestérone sont peu abondants dans les cellules stromales qui expriment la MMP-1 et sont indétectables dans les cellules épithéliales adjacentes (Figure I.10) (Kokorine *et al.* 1996).

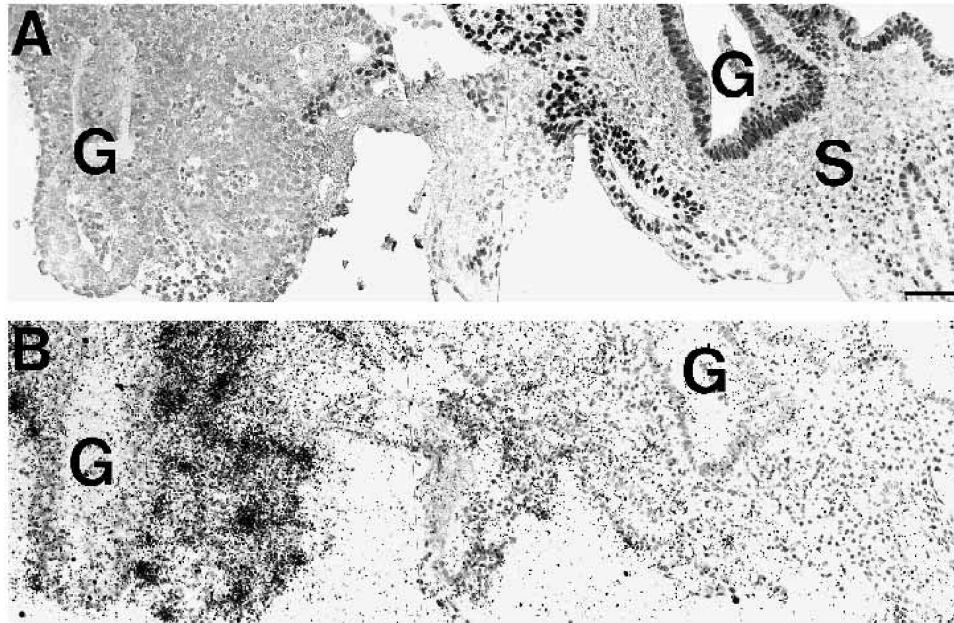


Figure I.10 : Immunodétection des récepteurs de la progestérone et hybridation in situ de l'ARNm de la MMP-1. (A) Les récepteurs de la progestérone ont été détectés par immunohistochimie dans des explants d'endomètre prolifératif cultivés 48h en absence des stéroïdes ovariens. Les récepteurs sont détectés essentiellement dans le noyau des cellules épithéliales des glandes (G) et des cellules stromales (S) dans la région droite de la microphotographie. (B) Hybridation in situ de l'ARNm de la MMP-1 sur une coupe adjacente à A. L'ARNm de la MMP-1 est essentiellement détecté dans les cellules stromales de la partie gauche de la microphotographie. La barre correspond à 50 μ m. D'après Kokorine et al. 1996.

L'effet potentialisant de l'œstradiol peut s'expliquer par la stimulation de l'expression des récepteurs de la progestérone (Aronica et Katzenellenbogen 1991). Toutefois, les mécanismes sous-jacents aux contrôles hormonaux sont fort complexes et seulement partiellement déchiffrés à l'heure actuelle. En effet, à l'hétérogénéité de l'expression de ces récepteurs s'ajoute celle de leurs effets. Autant les isoformes du récepteur des œstrogènes que celles du récepteur de la progestérone peuvent induire des réponses antagonistes. Il a ainsi été démontré que ER β inhibe ER α (Hall et McDonnell 1999) et que PRB a des effets prolifératifs inhibés par PRA (Mulac-Jericevic et al. 2000). De plus, la région promotrice des MMPs ne contient généralement pas d'élément de réponse aux récepteurs des stéroïdes, suggérant l'implication de régulateurs intermédiaires (Boonyaratanakornkit et Edwards 2004; O'Brien et al. 2006; Wehling et Losel 2006).

2.3.4. Caractère focal de l'expression des MMPs

Tant dans l'endomètre humain menstruel *in vivo* que dans le système de culture d'explants non menstruels en absence des hormones, la dégradation tissulaire ainsi que l'expression de nombreuses MMPs, essentiellement les MMP-1, -2 et -3, par les fibroblastes du stroma sont initialement focalisées autour des glandes endométriales (Figure I.11), avant de s'étendre à l'ensemble de la couche fonctionnelle (Freitas *et al.* 1999; Jeziorska *et al.* 1996; Kokorine *et al.* 1996; Marbaix *et al.* 1996a; Rodgers *et al.* 1994; Zhang et Salamonsen 2002).

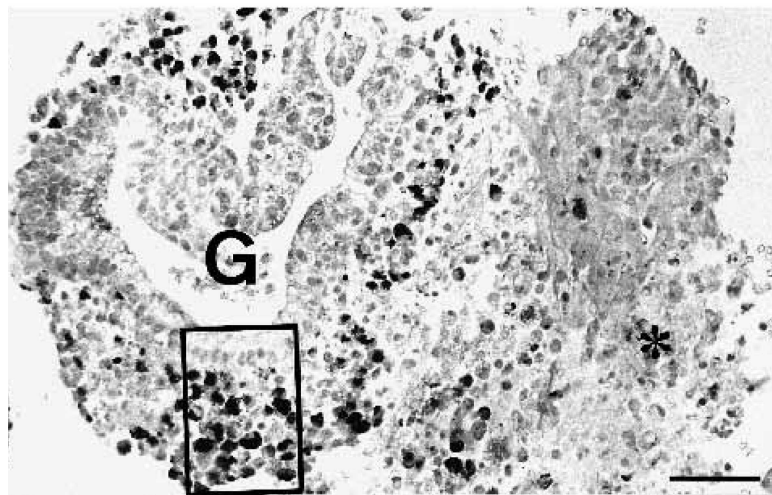


Figure I.11 : Dégradation focale de la matrice extracellulaire. La MMP-1 a été mise en évidence par immunohistochimie dans des explants d'endomètre cultivés pendant 24h en absence de stéroïdes ovariens et en présence de monensine 10 μ M, un inhibiteur de la voie de sécrétion endo-membranaire. La MMP-1 est essentiellement produite par les cellules stromales qui entourent la glande (G), tandis que la MMP-1 n'est pas détectée dans le stroma plus distant (*). La barre correspond à 50 μ m. D'après Kokorine *et al.* 1996.

La précision spatio-temporelle de l'expression des MMPs reflète l'intervention de régulateurs locaux, notamment d'origine épithéliale, qui médient les effets des stéroïdes ovariens (Kokorine *et al.* 1996; Rodgers *et al.* 1994) et agissent ensemble pour stimuler l'expression des MMPs (Singer *et al.* 1999a) et dégrader rapidement les différents composants de la matrice extracellulaire (Marbaix *et al.* 1996b). La communication entre les cellules épithéliales et les cellules stromales a été démontrée *in vitro* en co-culture de cellules purifiées (Osteen *et al.* 1994; Singer *et al.* 1997). Pour induire efficacement une augmentation de l'activité collagénolytique

par les cellules stromales, celles-ci doivent être cultivées d'une part en absence de stéroïdes ovariens, et d'autre part en présence d'un milieu conditionné par les cellules épithéliales (Figure I.12). De telles observations renforcent l'hypothèse d'une régulation fine, paracrine, de l'expression des MMPs.

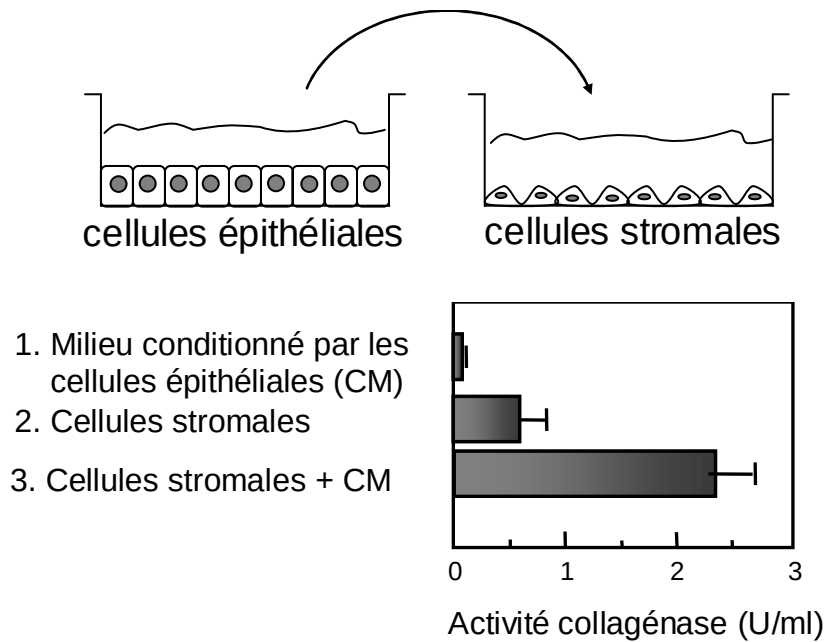


Figure I.12 : Signalisation paracrine de l'induction de la production d'activité collagénase. Les cellules épithéliales et stromales purifiées cultivées indépendamment n'expriment pas d'activité collagénase (1 et 2). En présence de milieu conditionné par les cellules épithéliales, les cellules stromales produisent davantage d'activité collagénase (3). D'après Singer et al. 1997.

3) Les cytokines

[Référence principale : Durum *et al.* 2000]

3.1. Généralités

Les cytokines constituent une famille de petits peptides ou glycoprotéines qui assurent la communication intercellulaire localement, de manière paracrine, juxtacrine ou autocrine, après liaison à leurs récepteurs spécifiques. Certaines sont sécrétées et diffusent librement dans le milieu extracellulaire, d'autres sont retenues à la membrane plasmique. Les cytokines sont caractérisées (i) par leur implication en cascade ou en réseau, (ii) par la pléiotropie de leurs effets, suite à l'expression de leurs récepteurs par de nombreux types cellulaires, (iii) par leur haute affinité pour ces récepteurs et (iv) par les similitudes des domaines cytoplasmiques des récepteurs engendrant une redondance des effets. Les cytokines sont aujourd'hui regroupées en sous-familles en fonction de leur homologie de structure ou de celle de leur récepteur (Tableau I.1).

Hématopoïétines	IL-2 IL-3 IL-4 IL-5 IL-6 IL-7 IL-9 IL-11 IL-12 EPO LIF GM-CSF G-CSF OSM CNTF GH TPO	Interleukine 2 Interleukine 3 Interleukine 4 Interleukine 5 Interleukine 6 Interleukine 7 Interleukine 9 Interleukine 11 Interleukine 12 Erythropoïétine Facteur inhibiteur leucémique Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor Granulocyte colony-stimulating factor Oncostatine M Ciliary neutropic factor Growth hormone Thrombopoïétine
Famille des TNF	TNF LT α LT β CD40L CD30L CD27L FasL	Tumor Necrosis Factor Lymphotoxine α Lymphotoxine β CD40 ligand CD30 ligand CD27 ligand Fas ligand

Famille des IL-1	IL-1 α IL-1 β IL-1Ra IL-18 bFGF aFGF ECGF	Interleukine 1 α Interleukine 1 β Interleukine 1 receptor antagonist Interleukine 18 Basic fibroblast growth factor Acidic fibroblast growth factor Endothelial cell growth factor
Famille des chimiokines α (CXC)	IL-8 GRO $\alpha/\beta/\gamma$ NAP-2 ENA 78 GCP-2 PF4 CTAP-3 MIG γ IP-10	Interleukine 8 Melanocytes growth-stimulating factor Neutrophil-activating protein Epithelial neutrophil-activating peptide 78 Granulocyte chemotactic protein Platelet factor 4 Connective tissue-activating peptide 3 Monokine induced by IFN γ IFN γ -inductible protein 10
Famille des chimiokines β (CC)	MCP-1 MCP-2 MCP-3 MIP-1 α MIP-1 β RANTES	Monocyte chemoattractant protein 1 Monocyte chemoattractant protein 2 Monocyte chemoattractant protein 3 Macrophage inflammatory protein 1 α Macrophage inflammatory protein 1 β Regulated upon activation normal T cell expressed and secreted
Famille des PDGF	PDGF A PDGF B CSF SCF	Platelet-derived growth factor A Platelet-derived growth factor B Macrophage colony-stimulating factor Stem cell factor
Famille des TGF- β	TGF- β BMP 1, 2A, 2B, 4	Transforming growth factor β Bone morphogenetic protein

Tableau I.1 : Familles des cytokines regroupées en fonction de leur homologie de structure ou de celle de leur récepteur. D'après Durum et al. 2000.

3.2. Les cytokines exprimées dans l'endomètre

Parmi les cytokines exprimées dans l'endomètre humain se trouvent les facteurs de croissance transformants (TGFs), dérivés des plaquettes (PDGF), fibroblastiques (FGFs), des granulocytes/macrophages (GM-CSF), le facteur inhibiteur de leucémie (LIF), les interleukines (ILs) et le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α) (Giudice 1994; Giudice et Saleh 1995; Tabibzadeh et Sun 1992). Dans le système reproducteur féminin, ces cytokines sont essentiellement impliquées dans la prolifération et la différenciation cellulaires ainsi que dans l'implantation embryonnaire (Dimitriadis *et al.* 2005; Giudice et Saleh 1995; Sharkey 1998; von

Wolff *et al.* 2000). Toutefois, certaines sont capables de réguler, *in vitro*, la production de MMPs par les fibroblastes endométriaux et joueraient un rôle dans le phénomène de la menstruation (Singer *et al.* 1999a). Ainsi, parmi les mieux définies dans ce processus, les TGF- β s, en tant que médiateurs des effets de la progestérone, sont connus pour inhiber l'expression des MMPs, en particulier celle de la MMP-3 par les cellules stromales et de la MMP-7 par les cellules épithéliales (Bruner *et al.* 1999; Bruner *et al.* 1995). Cependant, des analyses récentes sur un large éventail d'échantillons montrent que, bien qu'exprimés tout au long du cycle, les TGF- β s sont surexprimés en phase menstruelle. Durant les phases non menstruelles du cycle, les isoformes présentent des profils d'expression différents, voire opposés (pour TGF- β 2 et TGF- β 3), et il a été démontré en culture d'explants que ces cytokines sont différenciellement régulées (Gaide Chevronnay *et al.* 2008). Néanmoins, dans l'endomètre, la régulation de la libération des TGF- β s et/ou de leur maturation en forme active reste à définir et intervient très probablement dans leur bioactivité (Munger *et al.* 1997). LEFTY-A, également appelé EBAF (Endometrial Bleeding-Associated Factor), est un membre présumé de la famille des TGF- β s (Kothapalli *et al.* 1997) qui aurait un rôle inhibiteur sur la voie des TGF- β s (Cheng *et al.* 2004). Dans l'endomètre, l'expression de l'ARNm de LEFTY-A est augmentée de manière spectaculaire en fin de cycle, juste avant le déclenchement des menstruations, suite à la chute des concentrations en stéroïdes ovariens. LEFTY-A stimule la production des MMP-3, -7 et -9 en culture d'explants (Cornet *et al.* 2005; Cornet *et al.* 2002).

3.3. La superfamille des interleukines

[Références principales : Dinarello 1997; Durum *et al.* 2000]

Le terme interleukine est né, en 1979, dans l'objectif de regrouper sous un seul terme générique les cytokines issues des monocytes/macrophages (les interleukines-1) et des lymphocytes (les interleukines-2). Trente-cinq interleukines ont été identifiées à ce jour. Toutefois, celles-ci n'ont en commun que l'appellation. En effet, les interleukines n'ont ni parenté biochimique, ni spectre d'action particulier qui pourrait les caractériser. Elles représentent toutefois les composants essentiels

des réponses immunitaires innées et acquises. La famille des interleukines se subdivise (i) en interleukines T1 (IL-2, IL-12 et IL-15) et T2 (IL-4 et IL-5) qui participent à l'immunité acquise, originellement identifiées comme produit des cellules T helper de type 1 et de type 2, (ii) en interleukines régulatrices (les IL-10) qui inhibent les réactions inflammatoires, (iii) en cytokines proinflammatoires (IL-1, IL-6, IL-8 et IL-18) et enfin (iv) en un groupe d'interleukines ne pouvant être classées parmi l'une des catégories précitées (IL-3) (Kaiser *et al.* 2004).

Certaines interleukines sont présentes dans l'endomètre. On y retrouve ainsi les IL-1, IL-6, IL-8, IL-11 et IL-15. Leur rôle touche les différentes fonctions endométriales. Parmi les membres du système IL-1 détectés dans l'endomètre (Tabibzadeh et Sun 1992), l'IL-1 α est un inducteur potentiel des MMPs en culture primaire de cellules stromales (Rawdanowicz *et al.* 1994). Son rôle comme relais en réponse à la chute des concentrations en stéroïdes ovariens a été démontré en culture primaire de fibroblastes purifiés (Singer *et al.* 1997; Singer *et al.* 1999b). En effet, comme évoqué précédemment (voir 2.3.4), l'addition de milieu conditionné par des cellules épithéliales combiné au retrait hormonal provoque une augmentation de l'activité collagénolytique libérée par les fibroblastes. L'ajout d'un anticorps bloquant spécifiquement l'IL-1 α ou d'inhibiteurs naturels de cette cytokine inhibe cet effet (Figure I.13). Par ailleurs, des explants endométriaux ne libèrent rapidement de l'IL-1 α en culture que s'ils proviennent d'échantillons menstruels, riches en activité collagénolytique (Figure I.14).

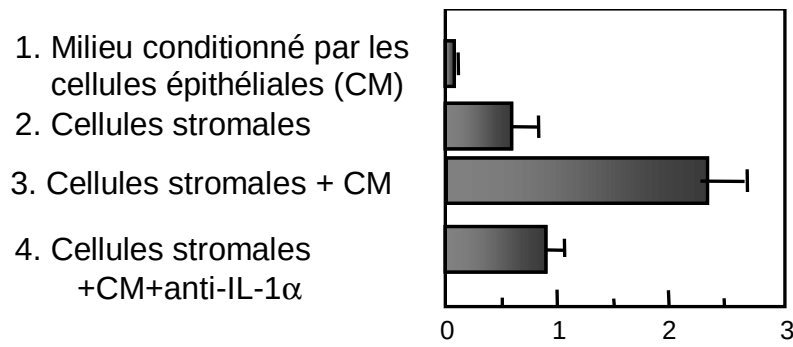


Figure I.13 : Inhibition de la production stromale d'activité collagénase par un anticorps inhibant spécifiquement l'activité de l'IL-1 α . Les cellules épithéliales et stromales purifiées cultivées indépendamment n'expriment pas ou peu d'activité collagénase (1 et 2). En présence de milieu conditionné par les cellules épithéliales, les cellules stromales expriment de l'activité collagénase (3), un effet qui est inhibé par l'addition d'un anticorps bloquant spécifiquement l'IL-1 α (4). D'après Singer et al. 1997.

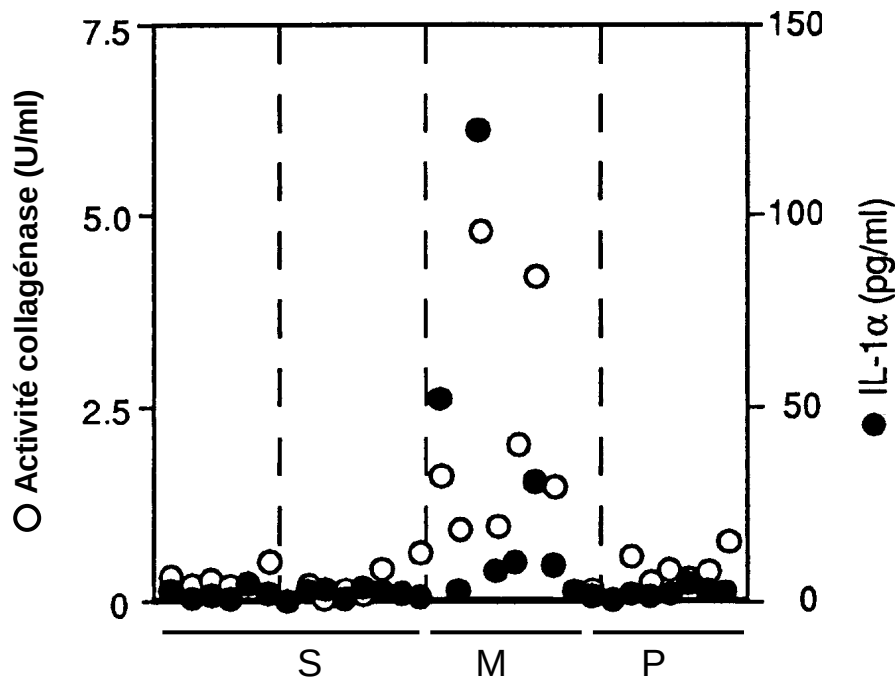


Figure I.14 : Libération d'IL-1 α par le tissu endométrial. Dosage de la libération de collagénase et d'IL-1 α par des explants d'endomètres prélevés durant les phases sécrétoire (S), menstruelle (M) et proliférative (P) du cycle et cultivés pendant 24h en absence de stéroïdes ovariens. D'après Singer et al. 1997.

L'implication éventuelle de l'IL-1 β a également été investiguée mais ce ligand n'est pas sécrété par les explants cultivés en l'absence d'hormone (Singer *et al.* 1999b) et son inhibition par un anticorps spécifique ne permet pas d'inhiber l'induction d'activité collagénase par les fibroblastes primaires cultivés en présence de milieu conditionné par les cellules épithéliales (Singer *et al.* 1997). Par contre, son expression par le blastocyste durant les étapes précoces du développement suggère son rôle dans l'implantation et le dialogue materno-foetal la précédant (Krussel *et al.* 2003; von Wolff *et al.* 2000). En particulier, l'IL-1 β pourrait initier une cascade menant à l'expression des MMPs afin de favoriser l'invasion trophoblastique en cas de fécondation (Chung *et al.* 2001).

L'IL-6 et l'IL-11, exprimées par les cellules épithéliales ainsi que des cellules stromales en milieu de phase sécrétoire, sont toutes deux impliquées dans le processus de décidualisation stromale et l'implantation embryonnaire (Cork *et al.* 2002; Dimitriadis *et al.* 2005; Tabibzadeh *et al.* 1995; von Wolff *et al.* 2002), bien que les mécanismes moléculaires sous-jacents soient encore inexpliqués.

L'IL-8, localisée dans les cellules épithéliales et dans les cellules stromales périvasculaires, est un puissant chémoattractant dont l'expression est inhibée par la progestérone. L'IL-8 joue ainsi un rôle clé dans le recrutement des cellules immunitaires (Kelly *et al.* 1994; Milne *et al.* 1999).

L'IL-15 est exprimée par les macrophages, par les cellules épithéliales en phase proliférative, par les cellules stromales péri-vasculaires en phase sécrétoire, ainsi que par l'endomètre en début de gestation. Toutefois son rôle dans la fonction endométriale n'a pas été clairement identifié à ce jour (Okada *et al.* 2000a; Okada *et al.* 2000b).

Enfin, l'IL-18 est une cytokine pro-inflammatoire qui présente la même structure secondaire que les agonistes IL-1 et a donc été classée dans cette famille. Son activité est dépendante de sa liaison au récepteur, l'IL-18R, et d'une protéine capable de la séquestrer appelée IL-18BP (IL-18 binding protein). Dans l'endomètre, l'IL-18BP est augmentée en milieu de phase sécrétoire et inhibe l'activité de l'IL-18, suggérant son implication dans le processus implantatoire (Huang *et al.* 2006).

3.4. Le système interleukine 1 (IL-1)

3.4.1. Composition et structure

Les IL-1 ont en commun leur structure secondaire composée de 12 feuillets β permettant une exposition correcte des sites de liaison aux récepteurs (Huisin *et al.* 2004). Chez les mammifères, elles sont également caractérisées par la présence d'un motif conservé [F/C]-X-S-[A/S/L/V]-X-X-P-X-X-[F/Y/L/I/V]-[L/I]-[S/C/A]-T-X-X-X-X-X-X-X-X-X-X-[L/I/V/M] présent dans la région carboxy-terminale (Huisin *et al.* 2004) mais dont la fonction n'est pas établie. Produites par une grande variété de cellules, les IL-1 ne sont habituellement pas présentes en quantités mesurables dans la circulation. La famille des IL-1 est aujourd'hui composée de 10 ligands (Tableau I.2) (Huisin *et al.* 2004). Les formes majeures sont les agonistes IL-1 α et IL-1 β et l'antagoniste compétiteur physiologique, IL-1Ra (March *et al.* 1985). L'IL-1 α et l'IL-1 β présentent une identité en acides aminés et en nucléotides de respectivement 26 et 45%, essentiellement dans la région carboxy-terminale (Dower *et al.* 1986). Ces trois molécules issues de gènes différents, regroupés sur le chromosome 2q14 (Steinkasserer *et al.* 1992), lient leur récepteur de surface membranaire, le récepteur de type 1 (IL-1RI) et le récepteur leurre de type 2 (IL-1RII). L'IL-1RI contient dans sa région cytosolique un domaine de 200 résidus hautement conservé, le domaine TIR (Toll/IL-1 receptor). Ce domaine, d'abord identifié chez la drosophile où il a été appelé Toll, est essentiel pour la liaison aux protéines adaptatrices de la transduction du signal. La superfamille des Toll-like récepteurs se subdivise en fonction de l'homologie de leurs domaines extracellulaires, qui sont soit de type immunoglobuline, soit riches en résidus leucine. Les récepteurs IL-1 sont de type immunoglobuline (O'Neill et Dinarello 2000).

Ligand	Récepteur
IL-1 α (IL-1F1)	IL-1RI, IL-1RII
IL-1 β (IL-1F2)	IL-1RI, IL-1RII
IL-1Ra (IL-1F3, IRAP)	IL-1RI, IL-1RII
IL-18 (IL-1F4, IL-1 γ , IGIF)	IL-18R, IL-18BP
IL-1F5 (IL-1 δ , IL-1Hy, IL-1H3, IL-1RP3, IL-IL1, FIL1 δ)	?
IL-1F6 (FIL1 ϵ)	?
IL-1F7 (FIL1 ξ , IL-1H4, IL-1RP1, IL-1H)	IL-1RI, IL-18R, IL18BP
IL-1F8 (IL-1 η , IL-1H2)	?
IL-1F9 (IL-1H1, IL-1RP2, IL-1 ϵ)	IL-1Rrp2
IL-F10 (IL-Hy2)	IL-1RI

Tableau I.2 : Nomenclature et récepteurs des ligands de la famille IL-1. Les noms entre parenthèses sont des synonymes. Abréviations: FIL1 et IL-1F, Family of IL-1; IGIF, Interferon- γ -Inducing Factor; IL, Interleukin; IL-BP, IL Binding Protein; IL-H, IL Homologous; IL-1Ra et IRAP, IL-1 Receptor antagonist; IL-RP, IL-1 Related Protein; IL-R, IL Receptor; IL-Rrp, IL Receptor related protein. D'après Huising et al. 2004.

Les agonistes IL-1 α et β sont principalement produits par des cellules de type hématopoïétique telles que les monocytes et les macrophages mais aussi par de nombreux autres types cellulaires dont des fibroblastes, des cellules épidermiques et des cellules endothéliales (Stylianou et Saklatvala 1998). Après leur traduction, ils sont stockés dans la cellule sous la forme de précurseurs (pro-IL-1) de 31 kDa. Bien que ne disposant pas de peptide signal, les deux isoformes sont pourtant sécrétées après clivage peptidique de l'extrémité amino-terminale, générant des formes matures de 17 kDa (Tableau I.3). Le mécanisme de sécrétion de l'IL-1 α reste énigmatique et n'est pas commun à celui de l'IL-1 β qui transite dans des vésicules de sécrétion d'une voie non conventionnelle (Rubartelli et al. 1990). L'IL-1Ra, de 22 kDa, par contre, est libéré dans le milieu extracellulaire par la voie classique.

	IL-1 α	IL-1 β	IL-1Ra
Précurseur	271 aa	269 aa	177 aa
Forme mature	159 aa	153 aa	152 aa
PM (kDa)	17,5	17,3	22

Tableau I.3 : Nombre d'acides aminés des ligands IL-1 humains et poids moléculaire de leur forme mature. D'après Roux-Lombard 1998.

La forme pro-IL-1 α non clivée est aussi active que la forme mature (Roux-Lombard 1998) et présente une séquence de rétention cytoplasmique (résidus 168-201) (Sudo *et al.* 2005). Des modifications de phosphorylation (Beuscher *et al.* 1988) et de myristoylation (Stevenson *et al.* 1993) favorisent la localisation de la pro-IL-1 α à la membrane plasmique où elle est clivée par des cystéine protéases dépendant du calcium, les calpaïnes (Kavita et Mizel 1995; Kobayashi *et al.* 1990). La pro-pièce amino-terminale de l'IL-1 α ainsi libérée présente un signal d'adressage vers le noyau (Wessendorf *et al.* 1993) où elle joue le rôle d'activateur transcriptionnel (McMahon *et al.* 1997; Werman *et al.* 2004) tandis que la forme mature est libérée par un mécanisme de sécrétion non-conventionnel (Nickel 2005) mal défini. Les avancées les plus récentes sur le sujet suggèrent que l'IL-1 α serait libérée par flip-flop membranaire après sa translocation au feuillet interne de la membrane plasmique sous forme d'un complexe (Prudovsky *et al.* 2002) dépendant du cuivre avec la protéine chaperonne S100A13 (Figure I.15) (Mandinova *et al.* 2003; Rajalingam *et al.* 2007), un mécanisme démontré pour la sécrétion également non-conventionnelle de FGF-1 (Prudovsky *et al.* 2003; Prudovsky *et al.* 2008). Le flip-flop membranaire peut être induit par de nombreux stimuli extracellulaires, notamment ceux menant à l'apoptose, un processus connu de libération de l'IL-1 α (Ashikaga *et al.* 1998; Hogquist *et al.* 1991; Iglesias *et al.* 1998; Sarih *et al.* 1993).

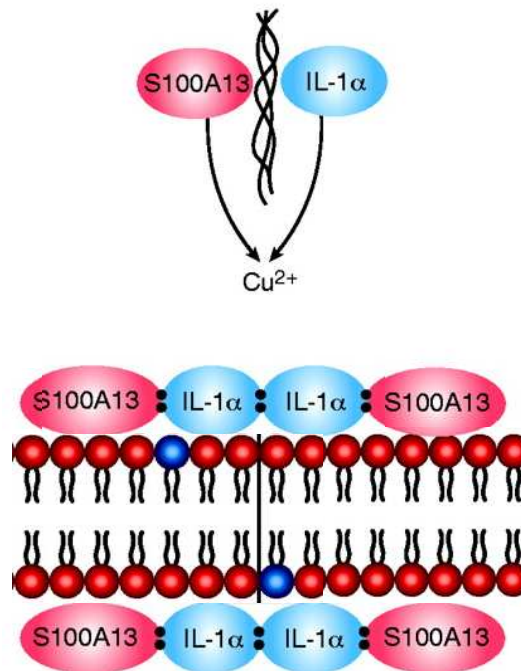


Figure I.15 : Modèle de la libération de l'IL-1 α induite par le stress cellulaire. Les composants du complexe, IL-1 α et S100A13, sont transportés à la membrane plasmique par un mécanisme dépendant du cytosquelette d'actine. Le complexe dépendant du cuivre IL-1 α -S100A13 se forme à la membrane plasmique et serait libéré dans le milieu extracellulaire par flip-flop du feuillet membranaire cytoplasmique vers le feuillet extracellulaire. D'après Prudovsky et al. 2003.

La pro-IL-1 β intracellulaire est incorporée au sein de vésicules de sécrétion à l'aide de transporteurs de type ABC (ATP-Binding Cassette) (Andrei et al. 1999). Durant le processus de sa libération, la pro-IL-1 β est clivée en sa forme mature carboxy-terminale de 17 kDa par la protéase ICE (IL-1 β converting enzyme), appelée également caspase-1 (Dinarello 1997), elle-même activée par un complexe appelé "inflammasome" (Ogura et al. 2006). Sans en être un substrat, l'IL-1 α est toutefois capable de se lier à cette enzyme (Keller et al. 2008). L'invalidation du gène ICE empêche la maturation de l'IL-1 β mais également la production de l'IL-1 α par un mécanisme non élucidé (Kuida et al. 1995; Li et al. 1995). Malgré l'absence de production de forme mature d'IL-1, les souris délétées pour ICE se développent et se reproduisent néanmoins normalement (Kuida et al. 1995).

3.4.2. Régulation de l'expression des ligands IL-1 (Figure I.16)

[Référence principale : Stylianou et Saklatvala 1998]

L'expression des agonistes IL-1 peut être induite par des cytokines telles que TNF- α et NGF (Nerve growth factor), par les agonistes IL-1 eux-mêmes, dans un mécanisme de boucle amplificatrice (Dinarello *et al.* 1987; Huang *et al.* 2001; West-Mays *et al.* 1995), par des endotoxines bactériennes, les lipopolysaccharides, des virus ou encore par des antigènes (Dinarello 1997).

Le promoteur du gène de l'IL-1 α ne contient pas de motif TATA. L'expression de l'IL-1 α est contrôlée par des éléments de régulation liant les facteurs nucléaires NF- κ B et NF-IL6, Sp1 (Stimulatory protein 1) et AP-1 (Bailly *et al.* 1996; McDowell *et al.* 2005). L'expression de l'IL-1 α est inhibée par méthylation des CpGs dans la région promotrice proximale (van Rietschoten *et al.* 2006) mais certaines cellules, telles que les kératinocytes, la synthétisent constitutivement (Kawaguchi 1994; Kupper *et al.* 1986).

Le promoteur de l'IL-1 β comprend le motif TATA et des sites d'interaction avec NF- β A, NF- κ B, NF-IL6, CREB (cAMP response element binding protein), AP-1, Sp1 et Spi.1 (Spleen focus forming virus Proviral Integration 1). L'ARNm de l'IL-1 β se retrouve de manière constitutive dans de nombreux tissus et organes ; toutefois, il est dégradé sans signal complémentaire (Watkins *et al.* 1999). La transcription et la traduction de l'IL-1 β sont ainsi dissociées, ce qui est une particularité de l'IL-1 β (Schindler *et al.* 1990).

L'expression de l'IL-1Ra est régulée par les facteurs de transcription AP-1, CREB et NF- β A. Un épissage alternatif du premier exon (Butcher *et al.* 1994) mène à la production de trois isoformes de 16 à 22 kDa : une forme soluble glycosylée et sécrétée par la voie classique, (sIL-1Ra, 22 kDa), et deux formes intracellulaires non glycosylées (icIL-1RaI et icIL-1RaII, de 18 et 16 kDa respectivement). Le sIL-1Ra est inducible par de nombreuses cytokines, dont les agonistes IL-1, dans la plupart des cellules tandis que les icIL-1Ra sont constitutivement exprimés par les kératinocytes

et les cellules épithéliales de l'intestin (Dinarello 1996). Le sIL-1Ra se lie à l'IL-1RI sans engendrer de réponse biologique, ce qui le classe parmi les cytokines anti-inflammatoires.

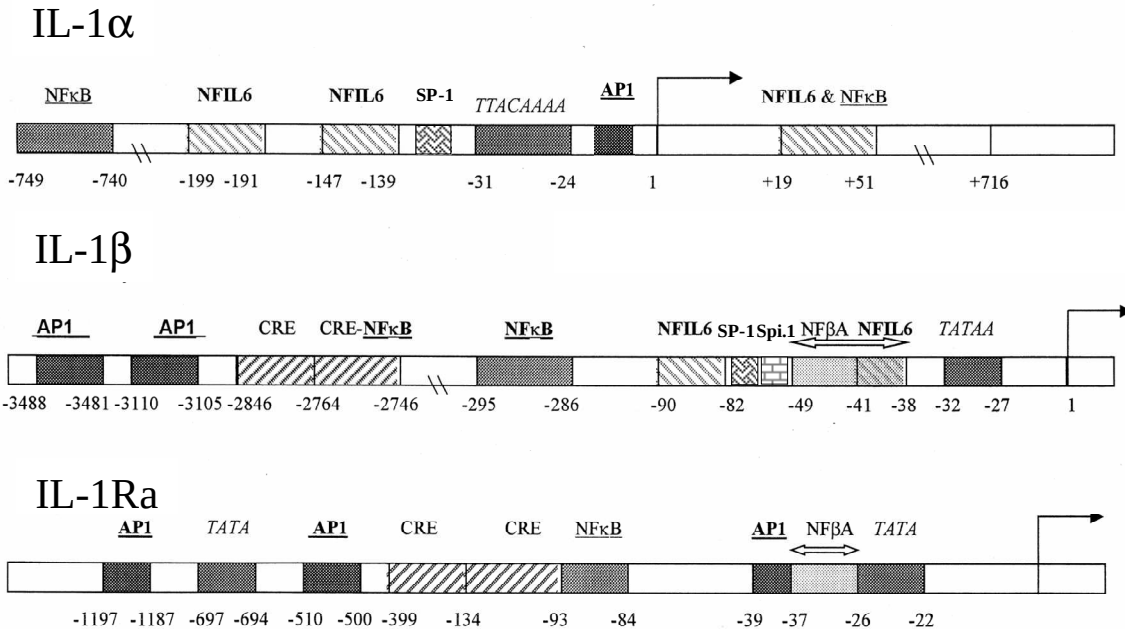


Figure I.16 : Promoteur des gènes IL-1 α , IL-1 β et IL-1Ra. Abréviations : AP1, Activator Protein 1; CRE, cAMP Response Element; NF β A, Nuclear Factor β A; NFIL-6, Nuclear Factor for Interleukin 6; NF κ B, Nuclear Factor κ B; SP1, Stimulatory Protein 1. Adapté de Stylianou et Saklatvala 1998.

3.4.3. Les récepteurs de l'IL-1

Les deux principaux récepteurs de l'IL-1 (Figure I.17) sont issus de gènes différents mais présentent 28% et 18% d'identité de séquence de leurs domaines extracellulaires et transmembranaires, respectivement (Martin et Falk 1997). Suite à un clivage protéolytique, la partie extracellulaire des deux récepteurs peut également se présenter sous forme soluble (Symons et al. 1991), séquestrant ainsi les agonistes IL-1 dans le milieu extracellulaire, sans induire de transduction de signal intracellulaire.

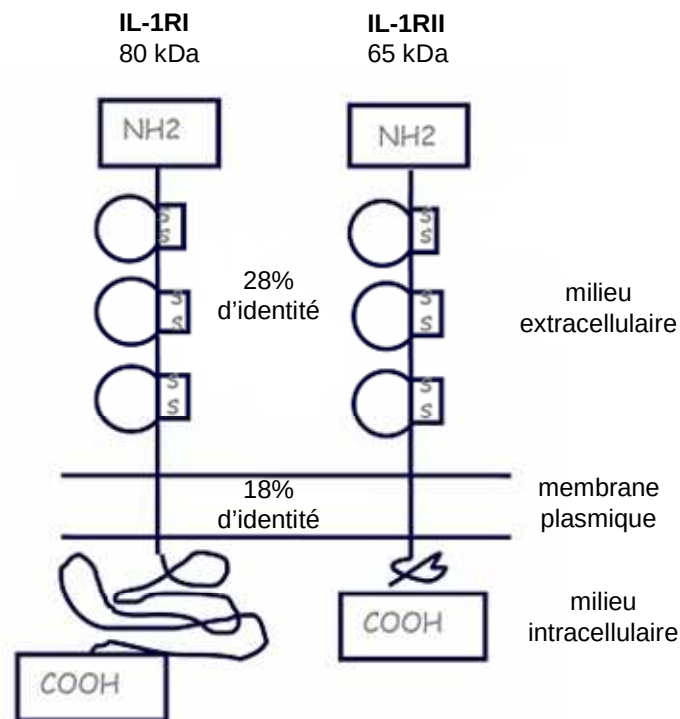


Figure I.17 : Représentation schématique des récepteurs membranaires IL-1.
D'après Cavaillon 1991.

Le récepteur de type I est une glycoprotéine de 80 kDa, exprimée par de nombreux types cellulaires dont les fibroblastes (Dower *et al.* 1990). Ce récepteur fixe majoritairement l'IL-1 α et l'IL-1Ra ($K_d=10^{-10}$ M) et présente une affinité moindre pour l'IL-1 β ($K_d=10^{-9}$ M) (Kilian *et al.* 1986). Une protéine accessoire associée au récepteur (IL-1RAcP) augmente son affinité pour les ligands IL-1 en stabilisant le complexe et intervient dans la cascade de signalisation (Cullinan *et al.* 1998; Greenfeder *et al.* 1995; Lang *et al.* 1998; Wesche *et al.* 1996). Plusieurs voies sont impliquées dans la transduction du signal IL-1 (Boch *et al.* 2001; Martin et Falk 1997), aboutissant à l'activation de facteurs de transcription dont Jun et Fos, NF- κ B, Myc, C/EBP et NF-IL6. Ainsi, l'IL-1RAcP recrute la protéine MyD88 (Myeloid Differentiation Factor 88), un adaptateur de la protéine de signalisation en aval de IRAK (IL-1 Receptor Associated Kinase) (Muzio *et al.* 1997), qui à son tour active TRAF 6 (TNF Receptor Associated Factor 6) (Takatsuna *et al.* 2003) responsable de l'activation du facteur de transcription NF- κ B. La voie des sphingomyélinases (SMyélinases) est également activée grâce à l'IL-1RAcP, entraînant une augmentation des céramides, second messager régulant l'homéostasie cellulaire

(Santana *et al.* 1996). Une autre molécule se lie également au récepteur de type I, l'IIP1 (IL-1 Receptor Interacting Protein), mais uniquement s'il est quiescent (Martin et Falk 1997). L'IIP1 présente un domaine GAP-like (GTPase Activating Protein-like). Quand un agoniste se lie au récepteur, l'IIP1 se dissocie et, en parallèle, une protéine GEF (Guanosine Nucleotide Exchange Function) est activée et active à son tour une protéine G qui se lie à des molécules effectrices en amont du système MAPkinase (Figure I.18).

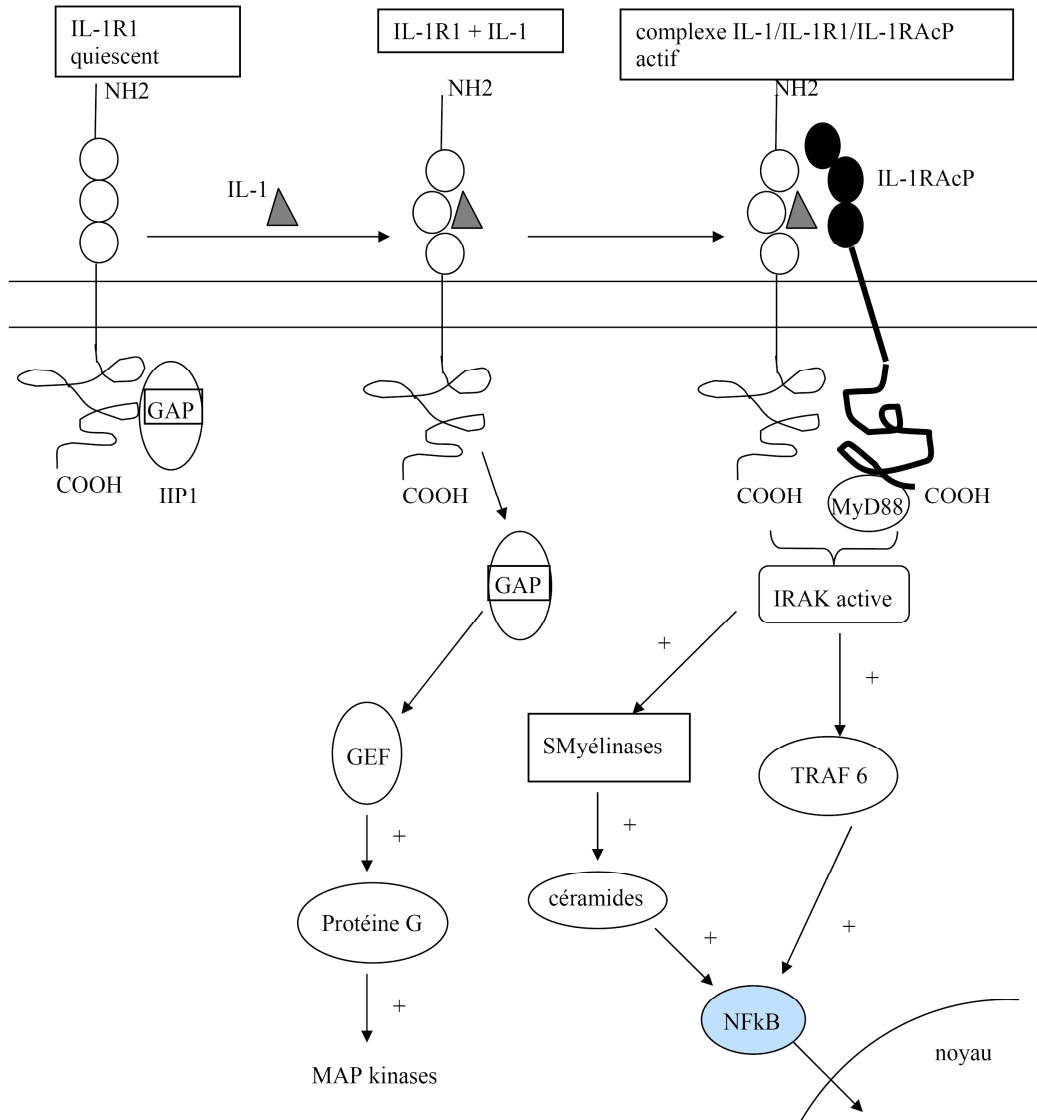


Figure I.18 : Schéma des voies de signalisation induite par les ligands IL-1 lors de leur liaison à l'IL-1RI. Abréviations: GAP, GTPase Activating Protein like; GEF, Guanosine nucleotide Exchange Function; IIP1, IL-1 receptor Interacting Protein; IL-1, Interleukin 1; IL-1RAcP, IL-1 Receptor Accessory Protein; IRAK, IL-1 Receptor Associated protein Kinase; MAP kinases, Mitogen Activated Protein kinase; MyD88, Myeloid Differentiation factor 88; NFκB, Nuclear Factor κB; Smyélinases, Sphingomyélinases; TRAF 6, TNF Receptor Associated Factor 6. D'après Martin et Falk 1997.

Le récepteur de type II a un poids moléculaire de 65 kDa (McMahan *et al.* 1991) et n'a qu'une courte extrémité cytoplasmique (Slack *et al.* 1993) qui ne transmet pas de signalisation directe (Slack *et al.* 1993). Selon certains auteurs, l'IL-1RII participerait à la biodisponibilité de ses ligands (Colotta *et al.* 1994; Stylianou et Saklatvala 1998). Ce récepteur présente une meilleure affinité pour l'IL-1 β ($k_d=10^{-9}$ - 10^{-10} M) que pour l'IL-1 α ou l'IL-1Ra ($k_d=10^{-8}$ M) (McMahan *et al.* 1991).

3.4.4. Fonctions générales des IL-1

[Références principales : Mire-Sluis et Thorpe 1998; Rosenwasser 1998]

L'IL-1 α et l'IL-1 β partagent une pléthore d'effets biologiques, affectant de nombreux organes et cellules, qui sont généralement impliqués dans les processus inflammatoires et immunitaires. Ces effets sont médiés indirectement par l'induction de la synthèse d'autres régulateurs dont la corticotropine, les prostaglandines (Kniss *et al.* 1997), l'oxyde nitrique, et les IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α et GM-CSF.

De façon non exhaustive, on retrouve des effets :

 systémiques : fièvre, somnolence, anorexie, choc thermique, hypotension,
 neutrophilie, hyposidérémie, hyperlipidémie, hypoalbuminurie.

 locaux : angiogenèse et vasodilatation, fibrose, extravasation et influx
 lymphocytaires, induction de chemokines, induction de MMPs.

 immunologiques : stimulation des cellules T (synthèse de lymphokines, IL-2)
 et B (prolifération et production d'anticorps) et des cellules NK
 (prolifération et activation).

 inflammatoires : augmentation des molécules d'adhérence sur l'endothélium,
 synthèse des protéines hépatiques de la phase aiguë.

Bien que les deux agonistes majeurs aient la capacité de produire les mêmes effets par l'intermédiaire de leur récepteur, l'invalidation de chacun de ces gènes chez la souris a démontré le rôle critique de l'IL-1 β dans le processus inflammatoire, essentiellement en phase aiguë, contrairement à l'IL-1 α (Fantuzzi et Dinarello 1996). Les souris déficientes en IL-1 β ne développent pas de fièvre et celles n'exprimant pas l'IL-1Ra ont une fièvre exacerbée (Horai 2005). Le développement normal et l'homéostasie préservée des souris déficientes en récepteur de type I montrent que

le système IL-1 n'est pas crucial à la survie (Labow *et al.* 1997). Toutefois, les cytokines sont caractérisées par des spectres d'action redondants. Il peut donc être supposé que d'autres cytokines viennent compenser la déficience.

Il faut distinguer les effets précités, médiés par le récepteur, de ceux de la pro-pièce de l'IL-1 α qui agit comme messenger intracellulaire et peut réguler la différenciation (Kariya *et al.* 1991; Stevenson *et al.* 1997), la prolifération (Beasley et Cooper 1999; Maier *et al.* 1994), la migration (McMahon *et al.* 1997; Merhi-Soussi *et al.* 2005) ainsi que l'apoptose (Pollock *et al.* 2003) des cellules. La pro-IL-1 α (ou sa propièce uniquement) est transloquée à la membranaire nucléaire par un mécanisme actif dépendant de son signal de localisation nucléaire et de son association au complexe "importine" constitué de la protéine RAN (Ras-related nuclear GTP-binding protein) échangeuse de nucléotides GTP-GDP. Grâce à leur petite taille, l'IL-1 α et l'IL-1 β peuvent également être transloquées passivement à travers la membrane nucléaire (Luheshi *et al.* 2008). Enfin, certains auteurs ont rapporté que l'IL-1 α peut être internalisée par endocytose du récepteur et transloquée dans le noyau cellulaire par un mécanisme non élucidé (Grenfell *et al.* 1989).

L'IL-1Ra sert à moduler les effets potentiellement excessifs des ligands IL-1 dans le déroulement naturel de l'inflammation. Dans les cellules carcinomateuses de l'ovaire, les formes icIL-1Ra atténuent l'expression des gènes induite en réponse à l'IL-1 β par l'altération de leur ARNm (Watson *et al.* 1995). Les icIL-1Ra modulent également les effets intracellulaires de la pro-IL-1 α (Higgins *et al.* 1999; Merhi-Soussi *et al.* 2005).

3.5. Les IL-1 dans le système reproducteur

3.5.1. Expression et effets du système IL-1 dans les gonades et de l'œuf fécondé

Au niveau des gonades, les agonistes IL-1 sont détectés dans le fluide folliculaire (Barak *et al.* 1992). Les ARNm de l'IL-1 α , de l'IL-1 β , de l'IL-1Ra et de l'IL-1RI sont présents dans les cellules qui constituent le cumulus ainsi que dans les cellules de la granuleuse, à l'exception de l'ARNm de l'IL-1 α . La thèque des ovules ne produit par contre que l'IL-1RI (Gerard *et al.* 2004) (Figure I.19).

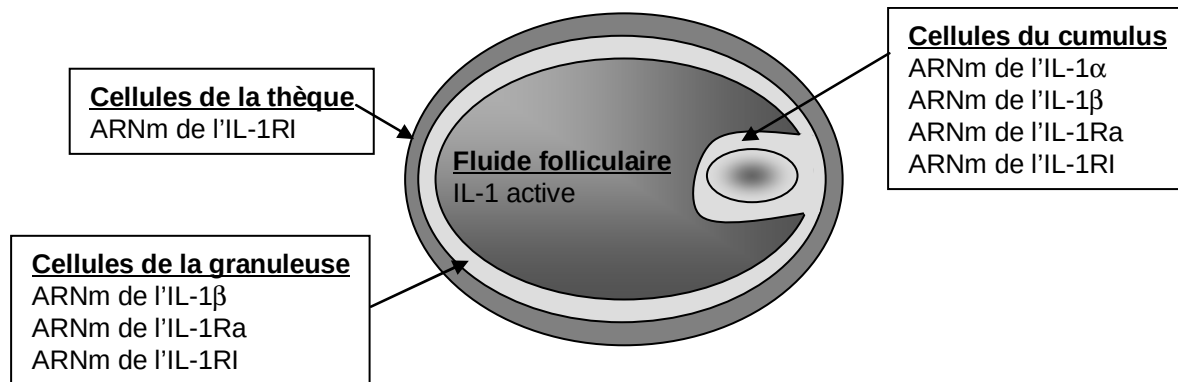


Figure I.19 : Localisation des composants du système IL-1 dans le follicule ovarien humain. D'après Gérard *et al.* 2004.

Les IL-1 β , IL-1Ra et IL-1RI sont également exprimés dans le blastocyste (Krussel *et al.* 2003). Cultivés *in vitro*, les œufs fécondés humains produisent d'importantes concentrations d'IL-1 α et d'IL-1 β et la présence de ces cytokines dans le milieu de culture a été corrélée à une implantation réussie après une fécondation *in vitro* (Karagouni *et al.* 1998). Au niveau du site implantatoire, de l'IL-1 β active est détectée dans les villosités et le trophoblaste extravillousitaire ainsi que dans les cellules déciduales maternelles. L'IL-1RI est présent dans le syncytiotrophoblaste villositaire et dans la couche trophoblastique (Paulesu *et al.* 2008).

Le système IL-1, en particulier l'IL-1 β , joue un rôle dans l'ovulation. En effet, la perfusion d'IL-1 β chez le rat résulte en une augmentation du taux d'ovocytes ovulés (Brannstrom *et al.* 1993). A l'inverse, la perfusion d'IL-1Ra diminue ce taux et retarde l'ovulation (Martoriati *et al.* 2003). D'autres fonctions ovariennes sont également

influencées par le système IL-1, notamment la stéroïdogenèse. Toutefois, les effets semblent différents d'une espèce à l'autre. Chez la femme, les études *in vitro* montrent que l'IL-1 stimule la production de la progestérone (Sjogren *et al.* 1991) mais inhibe celle des œstrogènes par les cellules de la granuleuse (Barak *et al.* 1992).

3.5.2. Expression et effets du système IL-1 dans l'endomètre

La détection du système IL-1 au site d'implantation suggère qu'il joue un rôle dans ce processus. En effet, les souris transgéniques qui surexpriment l'IL-1Ra montrent des défauts d'implantation sans modification de la croissance de l'embryon (Simon *et al.* 1994). Toutefois, les souris déficientes pour un des autres gènes majeurs du système IL-1 (IL-1 α , IL-1 β ou IL-1RI) se reproduisent normalement (Horai *et al.* 1998).

Les études du système IL-1 dans l'endomètre humain sont à ce jour peu nombreuses et ont parfois mené à des conclusions contradictoires. Une expression constante de l'IL-1 α tout au long du cycle menstruel dans les cellules épithéliales et stromales a été proposée sur base d'un nombre très limité d'observations par RT-PCR non quantitative et immunohistochimie (Tabibzadeh et Sun 1992). Des expériences menées au laboratoire ont établi une origine épithéliale de l'IL-1 α (Singer *et al.* 1997). De même, alors que la protéine IL-1 β n'est que peu ou pas détectée dans l'endomètre selon certains auteurs (Tabibzadeh et Sun 1992), d'autres la localisent dans les cellules endothéliales et quelques foyers de cellules stromales (Simon *et al.* 1993a) et observent une augmentation de son expression en fin de phase sécrétoire (Bergqvist *et al.* 2001; Kauma *et al.* 1990; von Wolff *et al.* 2000). Enfin, l'expression de l'IL-1Ra est également controversée. En effet, la protéine est essentiellement localisée par immunohistochimie dans les cellules épithéliales en phase proliférative (Simon *et al.* 1995) tandis que les quantités de son ARNm et la libération de la protéine correspondante augmentent en phase sécrétoire (Fukuda *et al.* 1995).

L'expression des récepteurs IL-1 est moins l'objet de controverses. L'IL-1RI, l'IL-1RAcP et l'IL-1RII sont exprimés par les cellules épithéliales et par les cellules stromales de l'endomètre tout au long du cycle (Bigonnesse *et al.* 2001a; Bigonnesse *et al.* 2001b; Boucher *et al.* 2001; Simon *et al.* 1993a). L'expression de l'IL-1RI augmente en phase sécrétoire (Bigonnesse *et al.* 2001a; Simon *et al.* 1993b) tandis que celle de l'IL-1RII décroît (Boucher *et al.* 2001). L'IL-1RAcP ne varie pas de manière significative (Bigonnesse *et al.* 2001b). La documentation relative aux différentes isoformes des récepteurs dans l'endomètre, en particulier des formes solubles qui entrent en compétition avec leurs homologues membranaires reste actuellement fort limitée.

Parmi les nouveaux membres de la famille des ligands IL-1, l'IL-1F5 (Busfield *et al.* 2000) et l'IL-1F7 (Kumar *et al.* 2002) sont exprimés dans le tissu utérin. Toutefois, ni l'origine cellulaire précise de ces ligands, ni leur rôle biologique dans l'utérus ou dans d'autres tissus, ni l'identité de leur récepteur n'ont été investigués.

Les ligands IL-1 peuvent potentiellement stimuler l'expression de toutes les MMPs dont le promoteur contient une TATA box et un site AP-1 proximal. Dans l'endomètre, l'effet inducteur des IL-1 sur l'expression des MMP-1, 2, 3, 7 et 9 a été démontré (Huang *et al.* 1998; Osteen *et al.* 1997; Rawdanowicz *et al.* 1994; Singer *et al.* 1997), ainsi que l'inhibition de sa bioactivité par la présence de la progestérone (Keller *et al.* 2000; Singer *et al.* 1997). Toutefois, l'action des ligands IL-1 dans l'endomètre se manifeste également par la production d'autres cytokines et facteurs de croissance, dont TNF- α (Laird *et al.* 1996), IL-8 (Arici *et al.* 1996) et LIF (Arici *et al.* 1995) qui sont à leur tour capables d'induire des MMPs et d'influencer la prolifération, la différenciation et l'apoptose cellulaires (Frank *et al.* 1995; Rossi *et al.* 2005; Simon *et al.* 1997; Tanaka *et al.* 1998). Ces mécanismes contribuent à la constitution d'un réseau complexe de cytokines contrôlant la fonction endométriale et dont les nombreuses interconnexions permettent de compenser la déficience de l'une d'entre elles.

4) Pathologies associées aux MMPs et à l'IL-1 α

La protéolyse mal contrôlée des composants de la matrice extracellulaire conduit à différentes pathologies telles que le cancer, le développement de plaques athéromateuses et leur rupture, l'arthrite rhumatoïde, ou encore l'arthrose qui impliquent une surexpression des MMPs (Murphy et Nagase 2008; Rannou et al. 2006). Les objectifs thérapeutiques menés jusqu'à aujourd'hui, dans le développement cancéreux essentiellement, ont visé à inhiber les effecteurs principaux du remodelage matriciel, les MMPs. Toutefois, ces traitements n'ont conduit qu'à des résultats décevants ou peu spectaculaires (Zucker *et al.* 2000). Ainsi, si l'inhibition des MMPs par leurs inhibiteurs tissulaires (TIMPs) décroît la croissance tumorale dans les modèles de souris transgéniques, la possibilité d'utiliser les TIMPs en thérapie humaine est limitée notamment en raison des effets paradoxaux de ces protéines multifonctionnelles, qui se sont en réalité avérées favoriser la croissance tumorale. L'utilisation des inhibiteurs synthétiques de la production ou de l'activité des MMPs n'a malheureusement pas été plus fructueuse auprès de patients souffrant de cancer avancé. Certaines MMPs ont des effets anti-prolifératifs, d'autres se dégradent entre elles et leur inhibition stabilise les MMPs substrats, causant ainsi une augmentation paradoxale de leur activité. La surexpression conjointe de MMPs et d'IL-1 α dans plusieurs types de pathologies ouvre la voie à de nouvelles perspectives thérapeutiques (Apte *et al.* 2006; Fuchs *et al.* 2004; Hoyland *et al.* 2008). Ainsi, par exemple dans différents carcinomes, les fibroblastes avoisinant la tumeur produisent la MMP-1, favorisant l'invasion tumorale (Boire *et al.* 2005), en réponse à l'IL-1 α libérée par les cellules cancéreuses (Loffek *et al.* 2005; Wolf *et al.* 2001). Une corrélation directe entre l'expression de l'IL-1 α et l'invasion a été mise en évidence dans les cellules cancéreuses (Lewis *et al.* 2006; Singer *et al.* 2002)

Dans les pathologies du système reproducteur, l'implication des MMPs a été démontrée dans les saignements dysfonctionnels et l'endométriose. Les saignements dysfonctionnels sont des troubles fréquents chez les femmes sous traitement progestatif, auxquels sont associées une dégradation focale de la matrice extracellulaire, une surexpression de MMPs et une libération accrue de l'IL-1 α

(Galant *et al.* 2004; Galant *et al.* 2000; Hickey *et al.* 2006; Labied *et al.* 2008). L'endométriose, une pathologie caractérisée par la localisation ectopique de cellules endométriales, bien que considérée comme bénigne, partage certaines caractéristiques avec les carcinomes. Les cellules ont la capacité d'envahir le tissu avoisinant en détruisant la matrice extracellulaire environnante, ce qui mène à des douleurs pelviennes et à l'infertilité (Nisolle *et al.* 2007). Ces lésions endométriosiques synthétisent des MMPs spécifiques, dont la MMP-1, et présentent des anomalies du système IL-1, à savoir une libération excessive de l'IL-1 α et/ou une diminution des inhibiteurs naturels (IL-1Ra et IL-1RII), suggérant leur implication dans les mécanismes pathologiques sous-jacents (Hudelist *et al.* 2005; Kharfi *et al.* 2002; Kokorine *et al.* 1997; Lawson *et al.* 2008). Chez la souris, il a été démontré que l'IL-1 favorise les étapes d'adhérence nécessaires à l'endométriose (Beliard *et al.* 2003).

5) Etat de la question et objectif de la thèse

La dégradation de la matrice extracellulaire est un aspect fondamental des mécanismes de remodelage tissulaire physiologiques et pathologiques. Ce remodelage est particulièrement bien illustré par l'endomètre humain entre la ménarche et la ménopause. Au cours de chaque cycle menstruel, la muqueuse présente une séquence de modifications caractéristiques qui préparent l'implantation d'un éventuel embryon; à défaut, la couche fonctionnelle de l'endomètre se délite et est éliminée. La chute de production d'œstrogènes et de progestérone par les ovaires induit l'expression et l'activation de MMPs, responsables de la lyse de la matrice extracellulaire et ainsi, de l'élimination de la couche superficielle de l'endomètre. Toutefois, les mécanismes et le contrôle de la lyse menstruelle de l'endomètre restent encore mal compris. Le contrôle cyclique global par les stéroïdes ovariens ne suffit pas à rendre compte de la réponse des MMPs. Le caractère focal de l'induction menstruelle de l'expression des MMPs résulte très vraisemblablement d'un réseau local de relais paracrines et intracellulaires qui contrôle dans le temps mais aussi dans l'espace l'expression et l'activité des MMPs.

L'IL-1 α , une cytokine proinflammatoire, peut être produite par de nombreux types cellulaires. En culture de cellules endométriales purifiées, de l'IL-1 α d'origine épithéliale joue un rôle clé dans la stimulation d'expression stromale de MMP-1, une collagénase. Bien que la production d'IL-1 α soit généralement associée à l'inflammation et à la souffrance cellulaire, elle survient également transitoirement de manière physiologique au cours du développement embryonnaire et au terme du cycle menstruel. Toutefois, le contrôle de l'expression et de la biodisponibilité de l'IL-1 α endométriale était encore pauvrement documenté lors de l'initiation de ce travail. Mon travail de recherche a dès lors eu pour objectif de déterminer avec précision le profil d'expression et les mécanismes de régulation de la biodisponibilité de l'IL-1 α dans l'endomètre humain, en particulier dans le contexte de son action inductrice de MMPs menstruelles. A cette fin, l'IL-1 α et son ARNm ont été quantifiés et localisés dans un large échantillonnage d'endomètres prélevés aux différentes phases du cycle. L'effet des stéroïdes ovariens sur les quantités et la localisation de l'ARNm et de la protéine a été analysé en culture d'explants. Les effets de l'IL-1 α étant

influencés par l'IL-1 β et l'IL-1Ra, l'expression et le contrôle de ces compétiteurs du récepteur ont été comparés à ceux de l'IL-1 α .

En résumé, mes recherches ont permis de déterminer que, dans l'endomètre humain, l'IL-1 α est essentiellement produite par les cellules résidentes, épithéliales et fibroblastiques, et que les mécanismes de régulation de son expression diffèrent largement entre les deux types cellulaires. La mise en évidence de stocks épithéliaux permanents et d'un mécanisme d'auto-amplification paracrine par le stroma pendant les saignements physio-pathologiques complète la caractérisation d'une cytokine qui offre trois niveaux de contrôle local à l'induction rapide de l'expression de collagénase dans un tissu se remodelant.

Chapitre II : Résultats

L'objectif principal de mon travail a consisté à identifier les mécanismes de régulation de l'expression et de la biodisponibilité de l'IL-1 α dans l'endomètre humain au cours du cycle menstruel et à préciser la contribution des stéroïdes ovariens. A cette fin, plusieurs méthodologies analytiques complémentaires ont été utilisées sur des prélèvements d'endomètre humain avant ou au terme de leur culture sous forme d'explants ou de cellules épithéliales et stromales purifiées.

1) Niveaux d'expression de l'IL-1 α , de l'IL-1 β et de l'IL-1Ra dans l'endomètre humain au cours du cycle.

Les quantités d'ARNm d'IL-1 α et de β -actine ont été mesurées par RT-PCR en temps réel à partir de 78 échantillons endométriaux prélevés durant les différentes phases du cycle. Puisque l'action de l'IL-1 α est influencée par les ligands IL-1 compétitifs du récepteur IL-1 de type I, les profils d'expression de l'IL-1 β et de l'IL-1Ra ont été également mesurés dans les mêmes échantillons. Il a par ailleurs été démontré au laboratoire que les quantités d'ARNm de la β -actine ne varient pas de manière significative dans l'endomètre au cours du cycle (Cornet *et al.* 2002). Elles ont dès lors été utilisées pour normaliser celles de chaque ARNm d'intérêt en exprimant les mesures sous forme de quantités relatives (Figure II.1 : A, C et E). En parallèle, les protéines correspondantes ont été quantifiées par ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) dans 39 de ces échantillons et 15 autres supplémentaires (Figure II.1 : B, D et F).

Les différents ARNm et protéines ont été détectés dans tous les échantillons analysés, à l'exception de la protéine IL-1 β qui était sous le seuil de détection dans 8/24 échantillons sécrétoires et 9/19 échantillons prolifératifs, en dépit d'une sensibilité identique des tests ELISA de quantification de l'IL-1 α et de l'IL-1 β . Dans l'ensemble, les profils d'expression des trois ligands IL-1 au cours du cycle se sont avérés comparables (Figure II.1). L'analyse statistique par le test de Kruskal-Wallis a révélé des variations significatives des ARNm des trois ligands IL-1 et de la protéine

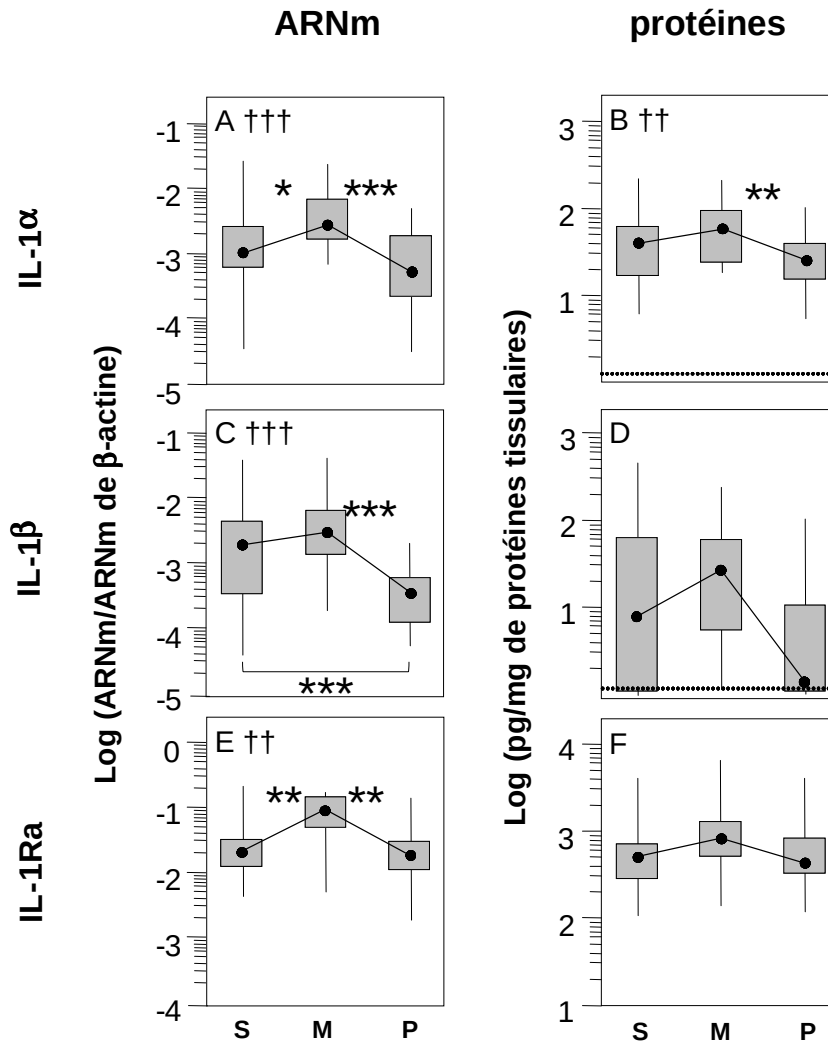


Figure II.1 : Expression des ligands IL-1 au cours du cycle menstruel. La quantité d'ARNm d'IL-1α, d'IL-1β et d'IL-1Ra (A, C et E) et des protéines correspondantes (B, D et F) a été mesurée dans, respectivement, 78 et 54 échantillons d'endomètre humain prélevés au cours des phases sécrétoire (S), menstruelle (M) et proliférative (P) du cycle. Les graphiques sont centrés sur la phase menstruelle pour mettre en évidence les variations d'expression qui la caractérisent. Les mesures ont été normalisées par rapport aux quantités d'ARNm de β-actine ou de protéines totales dans les mêmes extraits. Les médianes (points reliés) et les percentiles 75 et 25 (limites des rectangles) sont présentés sur une échelle logarithmique. Les valeurs minimales et maximales sont indiquées au moyen des barres verticales. Les lignes pointillées représentent les limites inférieures de détection. Le caractère significatif des variations globales au cours du cycle a été déterminé à l'aide du test de Kruskal-Wallis : ††, $P < 0,005$; †††, $P < 0,001$, tandis que le test non paramétrique de Wilcoxon a été utilisé pour comparer les phases entre elles : *, $P < 0,05$; **, $P < 0,005$; ***, $P < 0,001$.

IL-1 α entre les différentes phases du cycle en dépit d'importantes variations individuelles entre échantillons au sein d'une même phase. Les tests *post-hoc* plus spécifiques de Wilcoxon ont confirmé le caractère significatif des augmentations de 2,7 et de 4,3 fois des quantités relatives d'ARNm d'IL-1 α et d'IL-1Ra respectivement, entre la phase sécrétoire et la phase menstruelle. Par contre, les différences d'expression des protéines correspondantes (1,5 et 1,6 fois respectivement) n'étaient pas significatives. De plus, une diminution significative de 2,3 à 20 fois des quantités relatives d'ARNm des trois ligands IL-1 et de la protéine IL-1 α a été mesurée entre la phase menstruelle et la phase proliférative. En outre, les quantités d'ARNm de l'IL-1 β étaient 5,6 fois plus élevées en phase sécrétoire qu'en phase proliférative, mais cette variation n'était pas significative pour la protéine.

En résumé, même si toutes les variations n'étaient pas significatives, les médianes les plus élevées ont été systématiquement mesurées dans les échantillons menstruels. Toutefois, l'amplitude des variations mesurées au cours du cycle menstruel est restée extrêmement modeste au regard de celle d'autres ARNm (par exemple de LEFTY-A et de MMP-1) étudiés de manière comparable au laboratoire et dont le niveau varie de 100 à plus de 1000 fois entre la phase menstruelle et les autres phases du cycle (Cornet *et al.* 2002; Vassilev *et al.* 2005) (Figure II.2). En particulier, bien que les quantités relatives médianes de l'ARNm de LEFTY-A ($3,7 \times 10^{-3}$) étaient similaires à celles de l'IL-1 α et de l'IL-1 β ($3,0 \times 10^{-3}$) au cours de la phase menstruelle, elles étaient nettement inférieures durant les phases sécrétoires et prolifératives ($2,7 \times 10^{-4}$ et $4,6 \times 10^{-5}$, respectivement) à celles de l'IL-1 α ($1,1 \times 10^{-3}$ et $5,6 \times 10^{-4}$) et de l'IL-1 β ($1,9 \times 10^{-3}$ et $3,4 \times 10^{-4}$). De telles observations suggèrent que la persistance d'une expression non menstruelle importante des IL-1 α et β nécessite le recours à un (des) autre(s) mécanisme(s) de régulation de leur bioactivité.

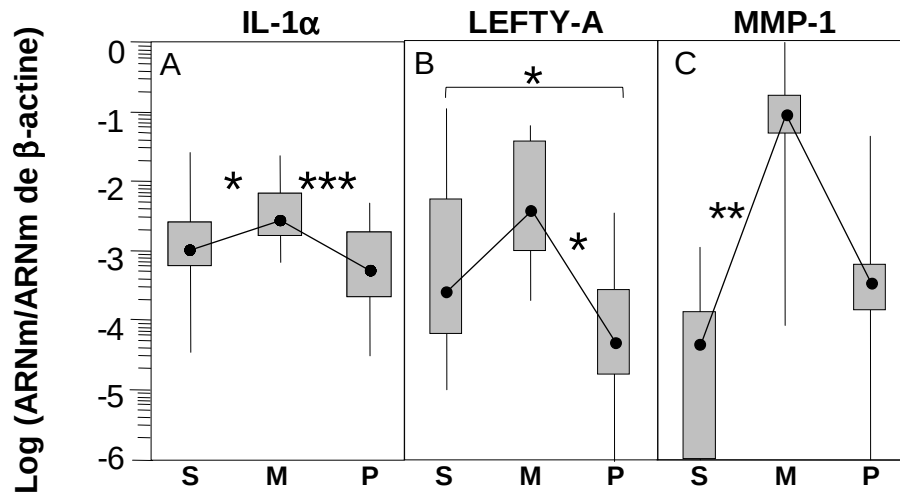


Figure II.2 : Comparaison des quantités relatives des ARNm de l'IL-1 α , de LEFTY-A et de la MMP-1. Les ARNm d'IL-1 α (A), de LEFTY-A (B) et de la MMP-1 (C) ont été quantifiés dans des échantillons d'endomètres humains prélevés au cours des phases sécrétoire (S, n=16), menstruelle (M, n=14) et proliférative (P, n=16) du cycle. Les mesures ont été normalisées par rapport aux quantités d'ARNm de β -actine dans les mêmes extraits et sont présentées comme à la figure 1. Le caractère significatif des variations entre les phases du cycle a été déterminé à l'aide du test non paramétrique de Wilcoxon : *, $P < 0,05$; **, $P < 0,005$; ***, $P < 0,001$.

2) Contrôle de l'expression de l'IL-1 α , de l'IL-1 β et de l'IL-1Ra par les stéroïdes ovariens en culture d'explants.

La dégradation tissulaire endométriale et l'expression de la MMP-1 sont fortement inhibées par l'addition d'une combinaison d'œstradiol et de progestérone en culture d'explants (Vassilev *et al.* 2005), ce qui reflète et peut expliquer leur régulation *in vivo*. Les variations cycliques plus limitées des quantités d'ARNm des ligands IL-1 suggèrent un contrôle global moins strict de leur expression par les stéroïdes ovariens. Afin de tester cette hypothèse, des explants d'endomètre ont été cultivés pendant 24h en présence (+EP) ou non (-H) d'œstradiol 1nM et de progestérone 100nM. Les explants ont été préparés à partir de 10 échantillons prélevés durant la phase proliférative et de 10 autres échantillons prélevés durant la phase sécrétoire. Les quantités relatives d'ARNm d'IL-1 α , d'IL-1 β et d'IL-1Ra, ainsi que celles des protéines correspondantes, ont été mesurées au terme de la culture.

La quantité des ARNm des trois ligands et des protéines d'IL-1 α et d'IL-1 β a systématiquement augmenté par rapport au tissu non cultivé (NC) correspondant (Figure II.3 : A à F) pour atteindre des valeurs identiques, voire supérieures, à celles mesurées dans les échantillons menstruels non cultivés. L'addition des stéroïdes ovariens a réduit d'environ 2,5 fois l'augmentation des quantités relatives des protéines IL-1 α et IL-1 β et d'ARNm d'IL-1 β dans les explants prélevés en phase proliférative, mais pas dans les explants provenant d'endomètres sécrétoires, probablement en raison de la présence des hormones endogènes. Par contre, les stéroïdes ovariens n'ont pas influencé le niveau d'expression de l'IL-1Ra ni de son ARNm (Figure II.3 : E et F).

L'inhibition, par les stéroïdes ovariens, de l'augmentation des quantités d'ARNm des ligands IL-1 en réponse à la mise en culture fut nettement inférieure à celles mesurées pour LEFTY-A (17 fois) ou la MMP-1 (12 fois) (Cornet *et al.* 2002; Vassilev *et al.* 2005), indiquant le caractère mineur du contrôle hormonal sur l'expression d'IL-1 α et IL-1 β dans le tissu endométrial dans son ensemble. Cependant, d'éventuelles variations locales d'expression et de réponse aux hormones, par exemple selon le type cellulaire, n'étaient pas prises en compte dans ces mesures globales et leur investigation a fait l'objet des expériences suivantes.

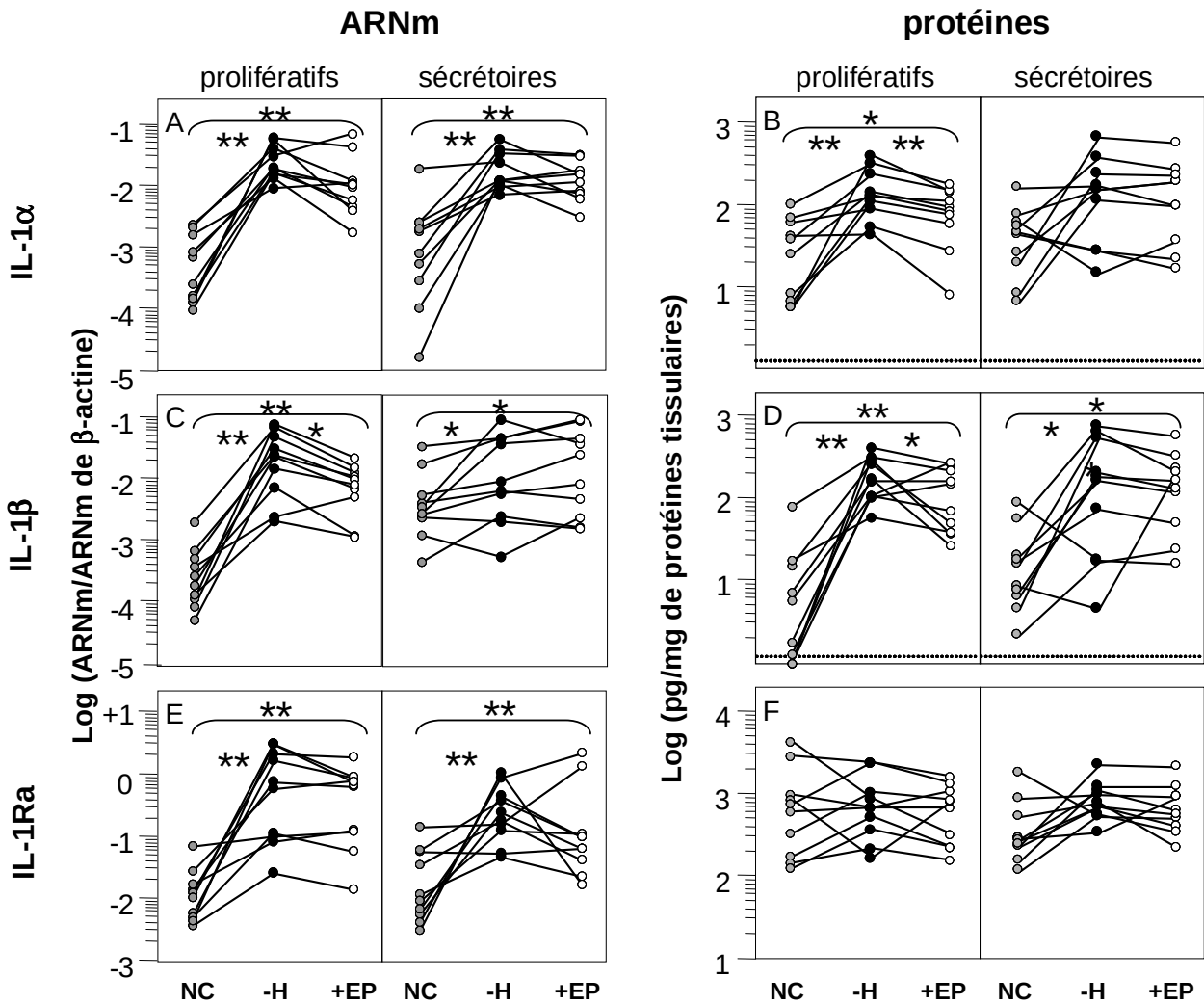


Figure II.3 : Contrôle hormonal de l'expression des ligands IL-1 en culture d'explants. Les quantités d'ARNm d'IL-1 α , d'IL-1 β et d'IL-1Ra et des protéines correspondantes ont été mesurées dans des explants d'endomètres prolifératifs ou sécrétoires cultivés 24h en présence (○) ou non (●) d'œstradiol 1nM et de progestérone 100 nM. Les quantités relatives sont présentées comme à la figure 1 et comparées aux valeurs correspondantes avant culture (○). Les lignes pointillées représentent les limites inférieures de détection. Les variations paires ont été soumises au test de Wilcoxon : *, P<0,05; **, P<0,005.

3) Mise en évidence d'un contrôle différentiel de l'expression de l'IL-1 α selon le type cellulaire.

La contribution respective des compartiments glandulaire et stromal dans la production des ligands IL-1 a d'abord été déterminée en répétant la quantification de leurs ARNm dans des foyers cellulaires isolés par microdissection dans le cadre de la thèse de doctorat d'Héloïse Gaide Chevronnay. Des sections histologiques d'explants de trois endomètres prolifératifs cultivés pendant 24h en présence ou non des stéroïdes ovariens ont été microdisséquées pour séparer stroma et glandes (Figure II.4).

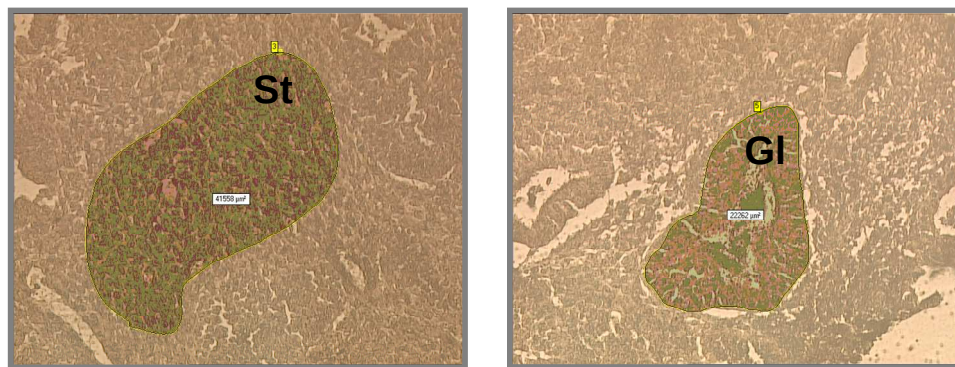


Figure II.4 : Microdissection d'explants. Des foyers de cellules stromales (St) et de glandes (Gl) ont été prélevés par microdissection au laser sur des coupes d'explants (microphotographies représentatives fournies par Héloïse Gaide Chevronnay).

Compte tenu de la faible quantité de matériel obtenu, les ARNm ont subi une amplification linéaire avant la mesure des quantités relatives des ARNm des ligands IL-1 par PCR en temps réel (Figure II.5).

Dans les explants cultivés en absence d'hormones, des quantités similaires ont été mesurées dans les deux compartiments pour l'ARNm de l'IL-1 α et pour celui de l'IL-1Ra, contrairement à l'ARNm de l'IL-1 β qui s'est distingué par une prédominance stromale. L'addition des stéroïdes ovariens à la culture a provoqué une réduction moyenne de 14 fois des quantités relatives d'ARNm de l'IL-1 α dans le stroma, et de plus de 25 fois de celles de l'ARNm de l'IL-1 β dans les glandes, bien que la relevance physiologique de cette dernière différence reste à déterminer dans

la mesure où les valeurs avoisinent le seuil de détection. Aucune autre variation systématique n'a été relevée.

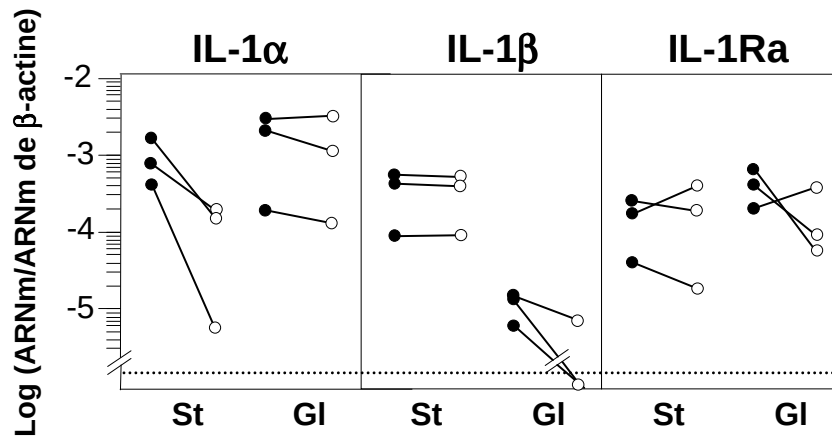


Figure II.5 : Contrôle hormonal spécifique de l'expression des ARNm des ligands IL-1 dans le stroma et les glandes d'explants cultivés. Les quantités d'ARNm d'IL-1 α , d'IL-1 β et d'IL-1Ra ont été mesurées dans les compartiments stromal (St) et glandulaire (Gl) isolés par microdissection au laser à partir de trois échantillons d'endomètres prolifératifs cultivés 24h en présence (○) ou non (●) d'hormones, normalisées par rapport aux quantités d'ARNm de β -actine et présentées individuellement sur une échelle logarithmique. Les lignes pointillées représentent la limite inférieure de détection.

Il faut noter qu'un biais a été introduit dans ces mesures, principalement en raison de l'amplification linéaire pratiquée sur les ARN avant quantification. Ce biais étant systématiquement et identiquement appliqué à tous les échantillons microdisséqués, il ne devrait pas fausser les comparaisons entre ces échantillons. Par contre, il est très certainement à l'origine des différences de quantités relatives d'ARNm relevées entre échantillons microdisséqués ou non. En dépit de ce biais, ces résultats indiquent clairement un contrôle hormonal de l'expression de l'IL-1 α limité au compartiment stromal et masqué, dans les quantifications totales, par l'abondance de son expression épithéliale.

4) Origine cellulaire de l'IL-1 α .

Les expériences de microdissection au laser ont montré que l'IL-1 α est exprimée dans les compartiments glandulaire et stromal de l'endomètre. Dans le compartiment stromal, les cellules inflammatoires, qui sont abondantes en fin de cycle menstruel, pourraient contribuer à une partie importante de la production d'IL-1 α . Toutefois, l'influx de cellules inflammatoires ne peut expliquer l'augmentation des quantités d'ARNm de l'IL-1 α dans les explants. Afin de préciser la nature des cellules stromales produisant l'IL-1 α et de confirmer le contrôle hormonal différentiel de l'expression d'IL-1 α par les deux compartiments cellulaires, l'ARNm de l'IL-1 α a été localisé par hybridation *in situ* sur des sections histologiques (i) d'endomètres non cultivés représentatifs des différentes phases du cycle (Figure II.6) ou (ii) d'explants cultivés (Figure II.7).

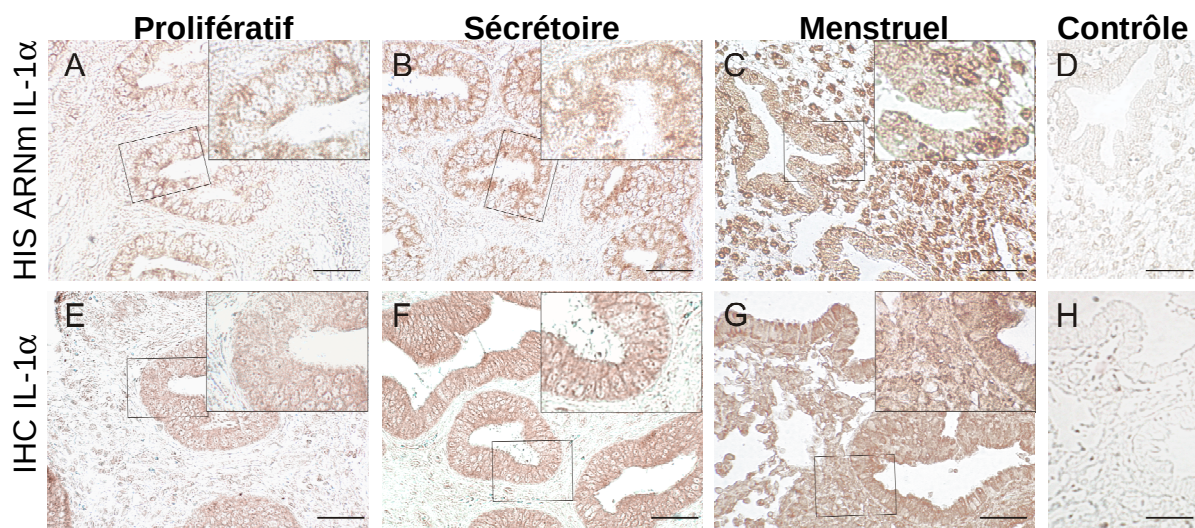


Figure II.6 : Localisation tissulaire de l'ARNm et de la protéine de l'IL-1 α au cours du cycle menstruel. Champs caractéristiques de la localisation par hybridation *in situ* (HIS) de l'ARNm de l'IL-1 α (A-C) et par immunohistochimie (IHC) de la protéine correspondante (E-G) détectés dans des échantillons d'endomètres prolifératifs (A et E; n=10), sécrétoires (B et F; n=15) et menstruels (C et G; n=10). Les contrôles négatifs pour l'hybridation *in situ* ou l'immunohistochimie ont été réalisés pour chaque échantillon sur une coupe adjacente à l'aide de la sonde sens ou d'un anticorps non relevant, et les contrôles effectués sur un endomètre menstruel sont présentés en D et H respectivement. Les inserts représentent des agrandissements de quatre fois des zones encadrées. Les barres correspondent à 50 μ m.

Comme attendu, des variations majeures d'expression ont été observées dans le stroma mais non dans les glandes. L'ARNm de l'IL-1 α a été détecté dans les cellules épithéliales de tous les prélèvements non cultivés testés (Figure II.6 : A à C), quelle que soit la phase du cycle, et dans tous les explants cultivés (Figure II.7 : A et B). De même, un marquage stromal abondant a été observé sur les coupes d'endomètres non cultivés prélevés pendant la phase menstruelle (Figure II.6 : C) et d'explants cultivés en absence d'hormones (Figure II.7 : B). Par contre, aucun signal stromal n'a pu être décelé sur les coupes des échantillons prélevés durant les phases proliférative et sécrétoire (Figure II.6 : A et B) et seul un très faible signal a été observé sur un nombre limité de coupes d'explants cultivés en présence des stéroïdes ovariens (Figure II.7 : A). Le profil immunohistochimique de la protéine est remarquablement superposable au signal de l'ARNm et reproduit en particulier le contraste de marquage stromal tant entre endomètres non menstruels et menstruels (Figure II.6 : E à G) qu'entre explants cultivés en présence ou non des stéroïdes ovariens (Figure II.7 : C et D). Un marquage cytosolique homogène de l'ensemble des cellules est observé tant dans le compartiment glandulaire que dans le compartiment stromal, à l'exception des glandes menstruelles caractérisées par un enrichissement apical ou parfois basal (Figure II.6 : G).

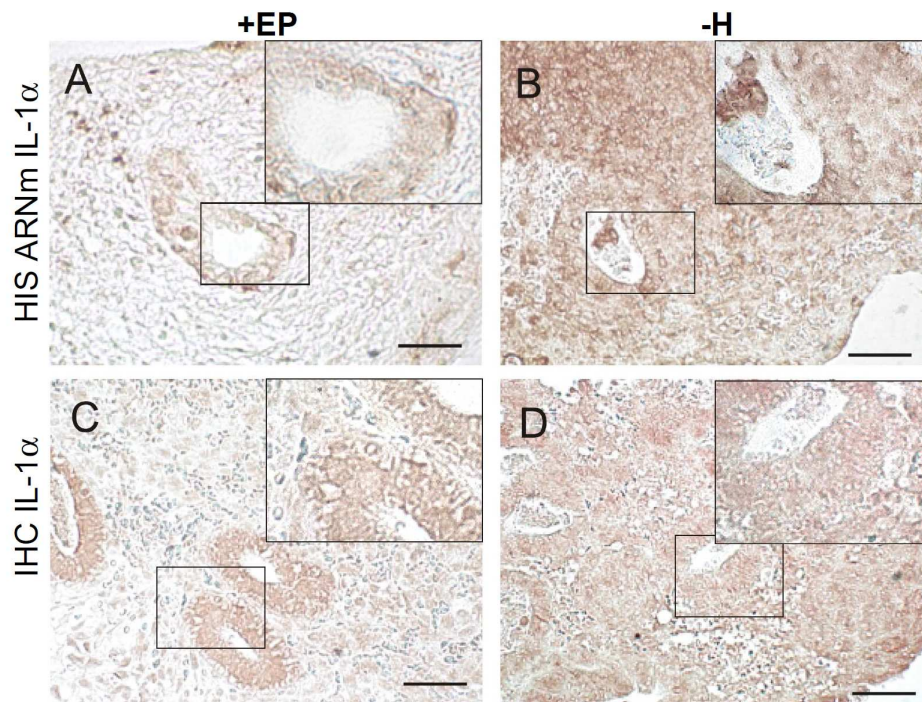


Figure II.7 : Contrôle de la localisation tissulaire de l'ARNm et de la protéine IL-1 α en culture d'explants. Des champs caractéristiques d'hybridation in situ (HIS) de l'ARNm de l'IL-1 α (A et B) et de l'immunohistochimie (IHC) de la protéine correspondante (C et D) sont présentés dans des échantillons d'endomètres cultivés 24h en présence (+EP; A et C) et en absence (-H; B et D) de stéroïdes ovariens. Les inserts représentent des agrandissements de quatre fois des zones encadrées. Les barres correspondent à 50 μ m.

Le stroma endométrial contient différents types cellulaires majeurs qui peuvent être reconnus par immunodétection de marqueurs relativement spécifiques : les cellules stromales de type fibroblastique, qui expriment le CD10 ; les leucocytes, qui expriment le CD45 ; les lymphocytes Natural Killers (NK), qui expriment le CD56 ; et les macrophages, qui expriment en abondance le CD68. Afin d'identifier les cellules stromales contenant l'IL-1 α , une immunodétection simultanée d'IL-1 α et de ces divers marqueurs a été réalisée sur la même section histologique ou sur des sections adjacentes d'endomètre menstruel et d'explants cultivés sans addition d'hormones (Figure II.8).

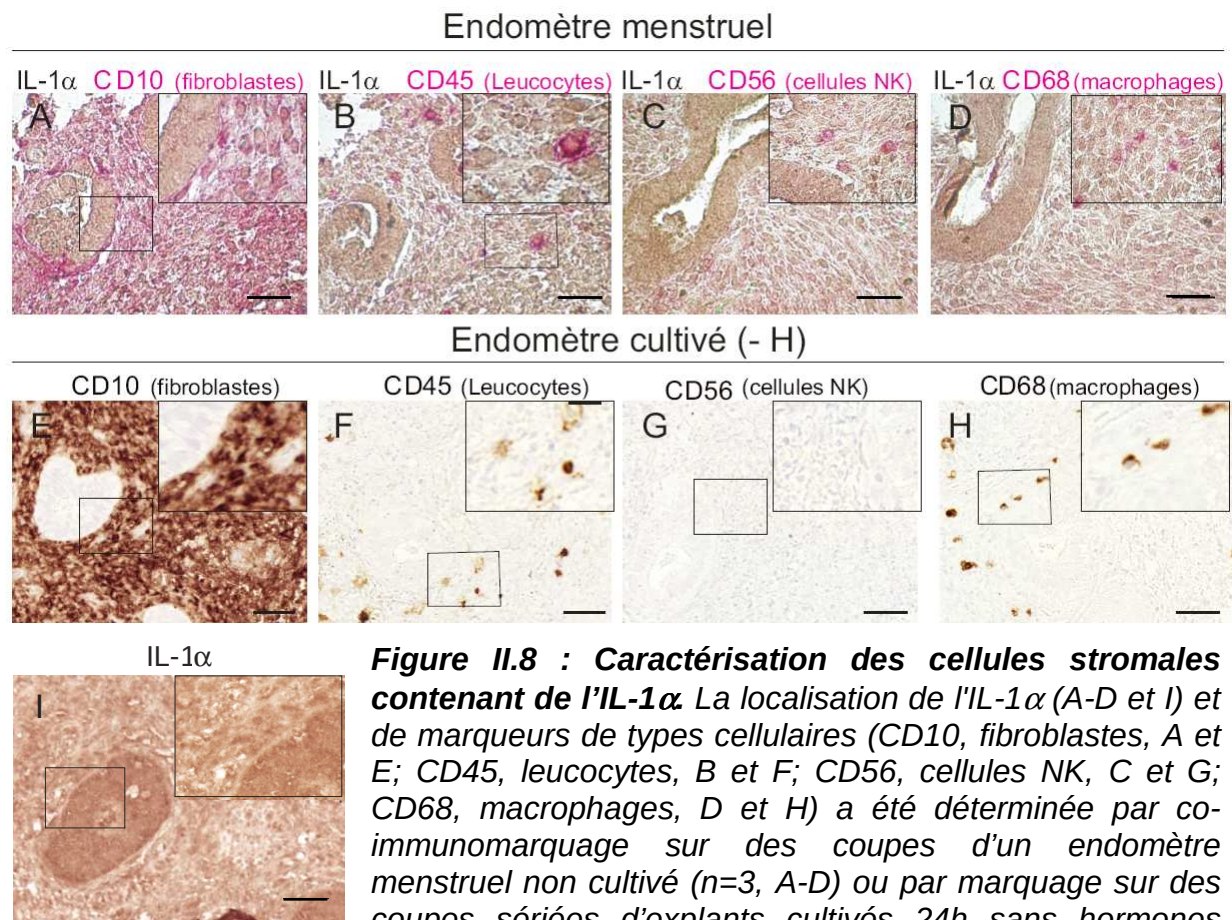


Figure II.8 : Caractérisation des cellules stromales contenant de l'IL-1 α La localisation de l'IL-1 α (A-D et I) et de marqueurs de types cellulaires (CD10, fibroblastes, A et E; CD45, leucocytes, B et F; CD56, cellules NK, C et G; CD68, macrophages, D et H) a été déterminée par co-immunomarquage sur des coupes d'un endomètre menstruel non cultivé (n=3, A-D) ou par marquage sur des coupes sériées d'explants cultivés 24h sans hormones (n=5; E-I). Les inserts représentent des agrandissements de quatre fois des zones encadrées. Les barres correspondent à 50 μ m.

Chacun de ces types cellulaires a pu être détecté dans les tissus analysés, tant non cultivés (Figure II.8 : A à D) que cultivés (Figure II.8 : E à I) à l'exception de CD56. Toutefois, les résultats ont clairement montré que la protéine IL-1 α était majoritairement présente dans les cellules de type fibroblastique exprimant le CD10.

Collectivement, les résultats d'hybridation *in situ* et d'immunolocalisation indiquent que les fibroblastes sont responsables de la majorité de la production stromale d'IL-1 α sous le contrôle des stéroïdes ovariens, bien qu'une contribution de cellules hématopoïétiques ne puisse être exclue. De façon inattendue, aucun signal extracellulaire n'a été immunodéecté, même dans l'endomètre menstruel et les explants cultivés sans hormones. Cette apparente contradiction à l'hypothèse d'une augmentation de la libération de l'IL-1 α dans ce type d'échantillons est discutée plus loin.

5) Immunolocalisation de l'IL-1 α dans l'endomètre pendant des épisodes de saignement dysfonctionnel.

Des explants menstruels ou préparés à partir d'endomètres prélevés pendant des épisodes de saignement dysfonctionnel libèrent de grandes quantités d'IL-1 α dès le premier jour de culture, contrairement aux explants d'endomètres prolifératifs et sécrétoires qui n'en libèrent qu'après deux jours de culture (Galant *et al.* 2000; Singer *et al.* 1997). Plus limité spatialement que le remodelage menstruel, le saignement dysfonctionnel se caractérise par la présence, en dehors de la période attendue, de foyers tissulaires dégradés à proximité de zones préservées qui conservent le marquage des fibres argyrophiles (Figure II.9 : A et C). La localisation cellulaire de l'IL-1 α (Figure II.9 : B et D) a été déterminée sur des coupes de 9 biopsies endométriales prélevées au cours d'épisodes de saignement dysfonctionnel et comparée à la coloration à l'argent pratiquée sur des coupes adjacentes.

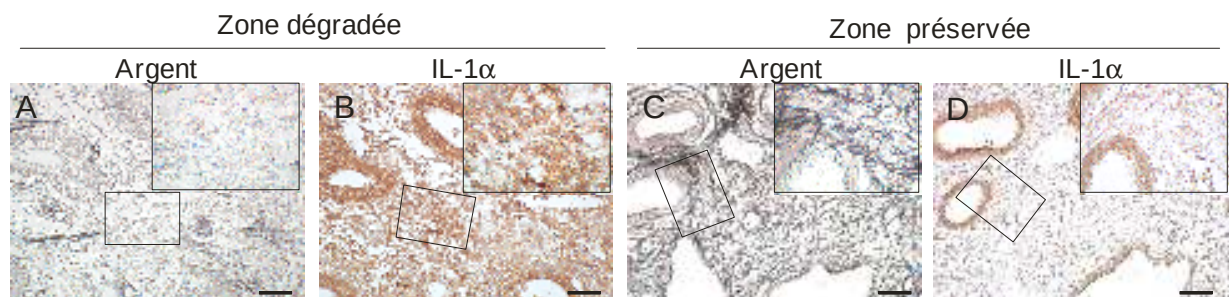


Figure II.9 : Localisation cellulaire de l'IL-1 α dans l'endomètre de patientes souffrant de saignements anormaux. Des aires tissulaires dégradées (A) ou préservées (C) d'échantillons d'endomètres présentant du saignement dysfonctionnel ($n=9$) ont été identifiées au moyen de la coloration à l'argent du réseau de fibres de collagène argyrophiles. L'IL-1 α a été détectée sur des coupes adjacentes (B et D).

Les inserts représentent des agrandissements de quatre fois des zones encadrées. Les barres correspondent à 50 μ m.

Comme dans tous les échantillons normaux analysés, l'IL-1 α a été détectée dans l'ensemble des cellules épithéliales, tant dans les foyers dégradés que dans les régions préservées. Ce marquage épithélial généralisé était en contraste frappant avec l'hétérogénéité du signal stromal, absent des régions préservées mais ubiquitaire dans les zones dégradées.

Le parallélisme entre menstruation et saignement dysfonctionnel semble donc s'étendre, en amont de la contribution des mêmes MMPs, à des mécanismes déclencheurs locaux communs. Bien que les échantillons pathologiques n'aient plus été utilisés dans la suite de l'étude, cette constatation prouve le double intérêt, fondamental et appliqué au développement de nouvelles thérapies, de comprendre les mécanismes de contrôle de l'expression de l'IL-1 α endométriale.

6) Contrôle hormonal de l'IL-1 α épithéliale en culture d'explants.

Plusieurs de nos observations convergeaient pour démontrer une production épithéliale continue d'IL-1 α tout au long du cycle, sans influence des stéroïdes ovariens. Toutefois, l'absence d'IL-1 α immunodélectable dans les milieux conditionnés pendant 24h par des explants non menstruels ainsi que les niveaux limités d'ARNm de MMP-1 mesurés en dehors de la menstruation suggéraient un contrôle post-translationnel de la bioactivité de l'IL-1 α épithéliale. Ainsi, les stéroïdes ovariens pourraient empêcher la libération de l'IL-1 α épithéliale. Pour tester cette hypothèse, des explants non menstruels ont été cultivés en présence de cycloheximide (+CHX), un inhibiteur de la traduction protéique, afin de bloquer toute néosynthèse d'IL-1 α et investiguer le sort, après 24h de culture d'explants, de l'IL-1 α présente dans le compartiment épithélial au moment du prélèvement (Figure II.10 : A et B). L'immunolocalisation systématique de la cytokératine a permis de vérifier la préservation cellulaire et l'absence d'effet globalement toxique de la CHX (Figure II.10 : C et D).

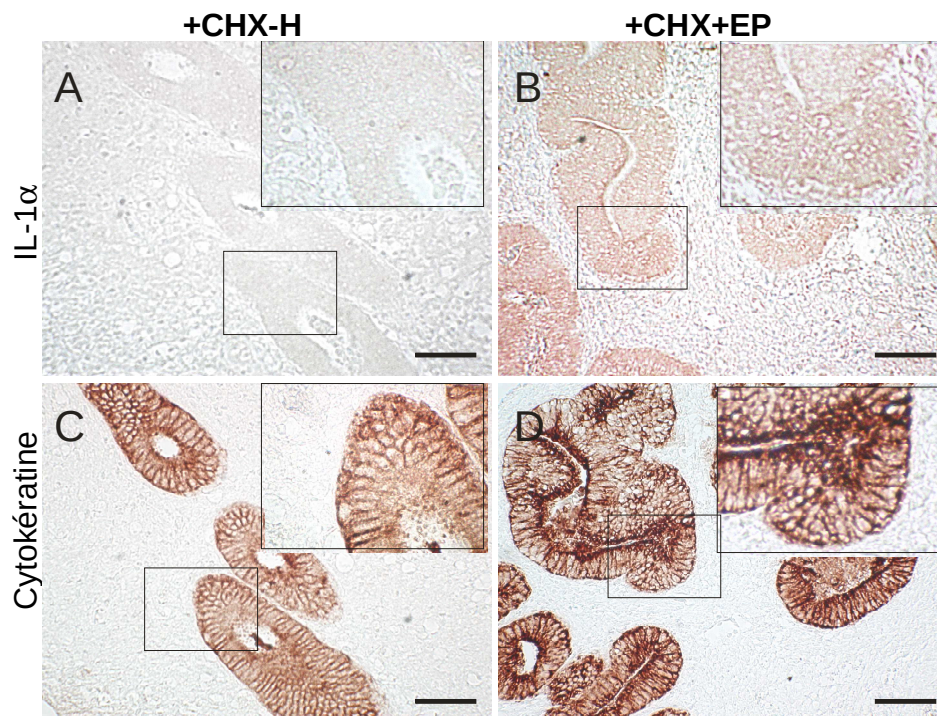


Figure II.10 : Effet des stéroïdes ovariens sur la détection de l'IL-1 α dans les explants cultivés en présence de cycloheximide. Des champs caractéristiques de l'immunomarquage de l'IL-1 α (A et B) et de la cytokératine (C et D) sur coupes adjacentes d'explants cultivés en présence de cycloheximide (+CHX) et en présence (+EP) ou non (-H) d'hormones stéroïdes sont présentés. Les inserts représentent des agrandissements de quatre fois des zones encadrées. Les barres correspondent à 50 μ m.

En confirmation de notre hypothèse, le marquage épithélial de l'IL-1 α n'a été préservé que dans les explants cultivés en présence des stéroïdes ovariens, suggérant la dégradation ou la libération de la cytokine en l'absence d'hormones.

Ces deux mécanismes potentiels ont été testés en mesurant par ELISA les concentrations d'IL-1 α dans les extraits totaux des explants cultivés en présence de CHX et dans les milieux conditionnés correspondants.

Etonnamment, et en contraste flagrant avec l'immunohistochimie, des quantités similaires d'IL-1 α ont été mesurées dans les homogénats d'explants cultivés en présence et en absence des stéroïdes ovariens (Figure II.11). De plus, l'absence d'hormones n'a entraîné aucune modification significative du pourcentage d'IL-1 α recueillie dans les milieux conditionnés (moins de 2% de l'IL-1 α mesurée dans les homogénats ; non représenté).

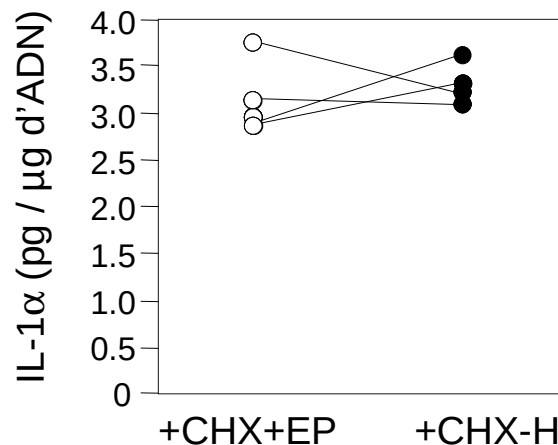


Figure II.11 : Contrôle hormonal des quantités d'IL-1 α dans les explants cultivés en présence de cycloheximide. Les quantités d'IL-1 α ont été mesurées dans des explants cultivés pendant 24h en présence de cycloheximide et en présence (○) ou non (●) des stéroïdes ovariens. Les valeurs ont été normalisées par rapport à la quantité d'ADN dans les tissus. Quatre cultures indépendantes sont représentées.

Cette discordance entre marquage immunohistochimique et quantification par ELISA pouvait s'expliquer par des différences de spécificité des anticorps (par exemple si l'anticorps utilisé pour l'immunohistochimie reconnaît préférentiellement la pro-forme de l'IL-1 α) ou par une disparition d'une partie de l'IL-1 α lors de la préparation des coupes pour immunohistochimie. Afin de tester la première hypothèse, des homogénats d'endomètres cultivés ou non ont été soumis à des analyses par Western blotting en utilisant le même anticorps anti-IL-1 α que pour l'immunohistochimie. Malheureusement, malgré plusieurs adaptations de la procédure, aucune détection spécifique n'a pu être obtenue, même sur une piste contrôle contenant de l'IL-1 α recombinante. Selon notre seconde hypothèse, l'élimination d'une partie de l'IL-1 α au cours de la préparation des lames pour l'immunohistochimie pourrait refléter ses différentes localisations tissulaires, en

particulier l'existence d'une proportion d'IL-1 α extracellulaire se trouvant encore dans le tissu, à distinguer de l'IL-1 α recueillie dans le milieu de culture. Ainsi, seules les formes intracellulaires d'IL-1 α seraient détectables par immunohistochimie, par opposition à la forme libérée, maintenue dans le réseau matriciel extracellulaire. Afin de comparer les contingents intra- et extracellulaires d'IL-1 α , des explants cultivés en présence de CHX et avec ajout ou non d'œstradiol et de progestérone ont été soumis à une digestion protéolytique modérée afin de récupérer la fraction résistante, enrichie en cellules intactes. Les quantités d'IL-1 α préservée (et donc présumée intracellulaire) ont été mesurées dans les homogénats préparés après protéolyse (Figure II.12 : protéase +) et comparées à celles relevées dans des homogénats d'explants non protéolysés (Figure II.12 : protéase -). Les mesures ont été normalisées par référence à une protéine cytosolique, la sous-unité 20S du protéasome, afin de tenir compte des dommages cellulaires engendrés par la protéolyse.

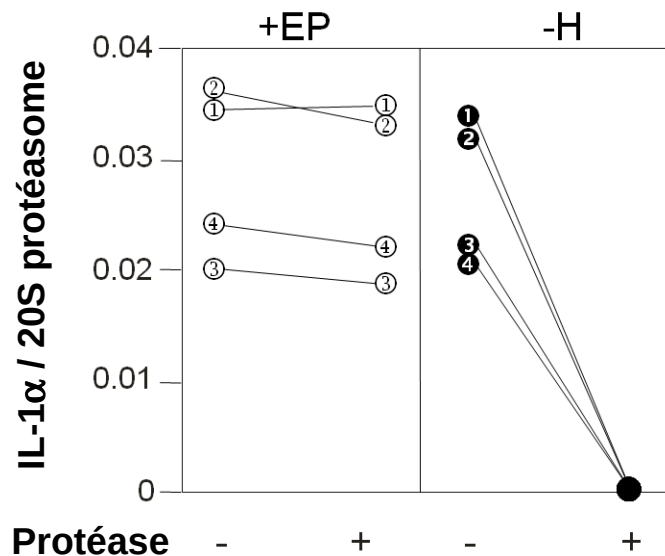


Figure II.12 : Contrôle hormonal des quantités intracellulaires d'IL-1 α dans les explants cultivés en présence de cycloheximide. Les quantités d'IL-1 α ont été mesurées dans les extraits totaux (protéase -) ou dans la fraction résistante après protéolyse des composants de la matrice extracellulaire (protéase +) d'explants cultivés pendant 24h en présence de cycloheximide et en présence (○) ou non (●) des stéroïdes ovariens. Les valeurs ont été normalisées par rapport aux quantités correspondantes de la sous-unité 20S du protéasome (variant de 81 à 157 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ d'ADN). Quatre expériences indépendantes sont représentées.

Des rapports identiques IL-1 α /sous-unité 20S (entre 0,02 et 0,04) ont été mesurés dans la fraction résistante aux protéases et dans les lysats totaux à partir des explants cultivés en présence des stéroïdes ovariens. Par contre, en l'absence des hormones, l'IL-1 α n'a pas été détectée dans les homogénats des explants protéolysés, malgré des niveaux stables de sous-unité 20S du protéasome. Globalement ces résultats suggéraient que les stéroïdes ovariens agissent principalement sur l'IL-1 α épithéliale en bloquant sa libération.

7) Contrôle hormonal de la libération de l'IL-1 α épithéliale en culture cellulaire.

L'hypothèse du contrôle hormonal de la libération d'IL-1 α épithéliale a été directement testée en culture cellulaire. Des cellules épithéliales ont été purifiées puis adaptées pendant 3 jours à la culture sur une matrice de collagène de type IV en présence des stéroïdes ovariens. Les cellules ont ensuite été soumises à un retrait de 24h de l'œstradiol et/ou de la progestérone, en présence d'inhibiteurs de protéases afin de prévenir toute dégradation éventuelle de l'IL-1 α libérée. Au terme des 24h de traitement, les quantités relatives d'ARNm de l'IL-1 α ont été mesurées par RT-PCR (Figure II.13 : A) et la protéine a été quantifiée par ELISA dans les lysats cellulaires et dans les milieux conditionnés (Figure II.13 : B).

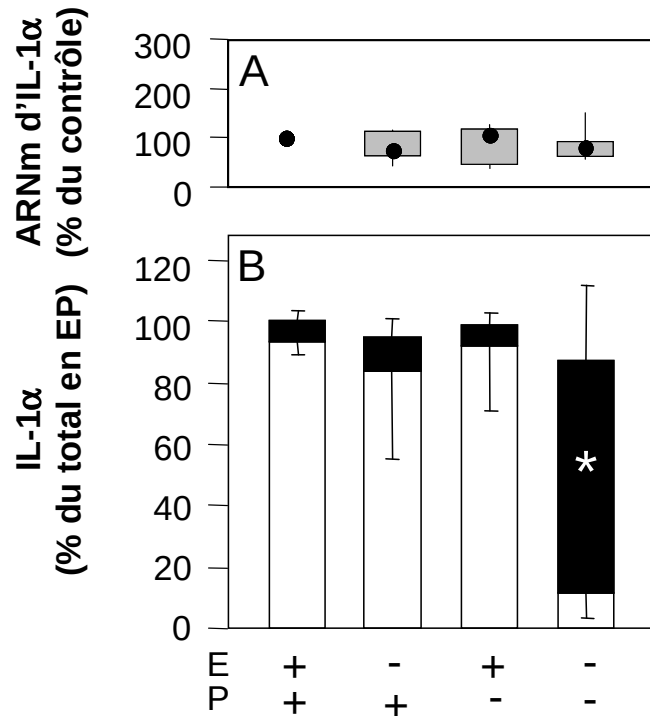


Figure II.13 : Contrôle hormonal de l'expression et de la libération d'IL-1α par des cellules épithéliales purifiées. Des cellules épithéliales purifiées à partir de 5 endomètres non menstruels ont été adaptées pendant 3 jours à la culture en présence des stéroïdes ovariens puis soumises, pendant 24h, à un retrait total ou partiel des hormones. Des inhibiteurs de protéases ont été ajoutés au milieu pour préserver l'IL-1α libérée. Le niveau d'ARNm d'IL-1α a été mesuré par RT-PCR en temps réel dans les lysats cellulaires, rapporté au niveau d'ARNm de β -actine et présenté en pourcentage de la condition contrôle, dans laquelle les deux stéroïdes ovariens ont été maintenus (A). La quantité de protéine IL-1α a été mesurée par ELISA dans les lysats cellulaires ($\square$) et les milieux conditionnés correspondants ($\blacksquare$) et présentée en pourcentage de la valeur moyenne totale mesurée dans la condition de culture contrôle (B, 24 pg/ μ g d'ADN). Le caractère significatif des variations entre les conditions a été déterminé à l'aide du test de Wilcoxon : *, $P < 0,05$.

Aucune variation des quantités relatives d'ARNm de l'IL-1α ou des quantités totales de la protéine (lysats + milieu; hauteur totale des histogrammes de la figure II.13 : B) n'a été relevée en réponse au retrait hormonal simple ou combiné. Par contre, le retrait simultané de l'œstradiol et de la progestérone, mais pas leur retrait isolé, a provoqué une augmentation importante (de 13 fois) de la libération d'IL-1α, la fraction libérée suite au retrait combiné représentant 86,5% de l'IL-1α totale, par comparaison à 6,6% du total dans la condition contrôle où les deux stéroïdes ont été maintenus. Ces résultats indiquaient clairement le rôle répressif de l'œstradiol et de la progestérone sur la libération de l'IL-1α épithéliale mais sans préciser le mécanisme sécréteur mis en route en leur absence.

8) Mécanisme de libération de l'IL-1 α épithéliale.

Un nombre limité d'expériences préliminaires a été réalisé afin de déterminer si l'apoptose contribue à la libération d'IL-1 α par les cellules épithéliales de l'endomètre humain. Afin de disposer d'une biomasse suffisante, nous avons choisi d'utiliser des cellules dérivées d'un adénocarcinome endométrial et, parmi les quelques lignées disponibles, notre choix s'est porté sur les cellules HEC-1A qui produisent des quantités d'IL-1 α proches de celles de l'épithélium endométrial normal. Dans un premier temps, pour mimer l'expérience de libération de l'IL-1 α par les cellules épithéliales purifiées, des cellules HEC-1A ont été soumises à un retrait combiné d'œstradiol et de progestérone pendant 24h après 5 jours de culture en leur présence.

A l'inverse de ce que nous avons observé avec les cellules purifiées, les cellules HEC-1A n'ont pas libéré davantage d'IL-1 α suite au retrait hormonal (entre 15 et 20% de l'IL-1 α totale; Figure II.14).

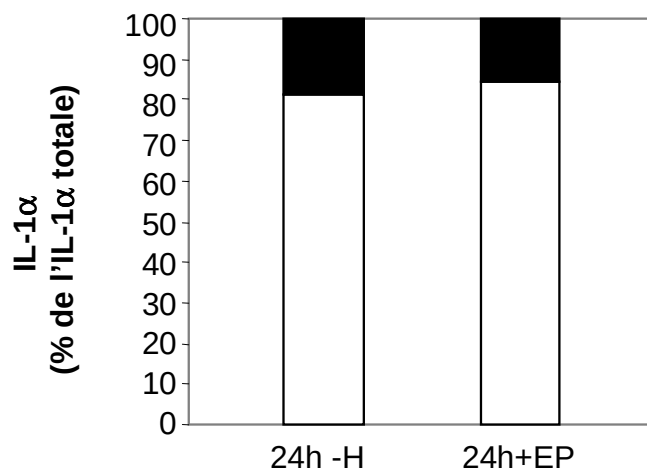


Figure II.14 : Effet du retrait hormonal sur la libération d'IL-1 α par les cellules HEC-1A. Des cellules HEC-1A ont été cultivées pendant 5 jours en présence d'œstradiol et de progestérone puis soumises pendant 24h au retrait ou au maintien des hormones. Les quantités d'IL-1 α ont été mesurées par ELISA dans les lysats cellulaires (□) et les milieux conditionnés correspondants (■) et sont exprimées en pourcentage de l'IL-1 α totale (lysat + milieu conditionné). Ces résultats proviennent d'une expérience unique.

Parallèlement, l'immunomarquage d'IL-1 α suivi d'une visualisation en microscopie confocale n'a pas permis de détecter d'exposition extracellulaire de la cytokine au niveau de la membrane cytoplasmique des cellules HEC-1A, même dans la culture en l'absence d'hormones (Figure II.15 : A et B). La présence d'IL-1 α dans les cellules HEC-1A a été vérifiée par immunomarquage après perméabilisation de la membrane cytoplasmique. Contrairement au marquage cytosolique relativement homogène dans le tissu complet, l'IL-1 α apparaissait principalement sous forme d'un anneau péricellulaire dans les cellules HEC-1A (Figure II.15 : C).

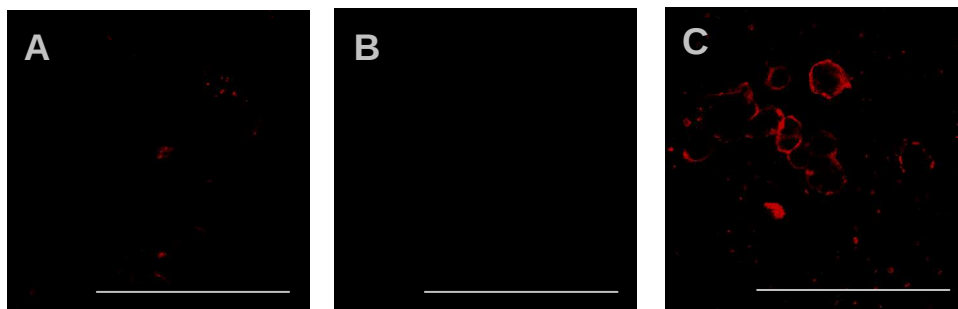


Figure II.15 : Effet des hormones sur l'immunomarquage d'IL-1 α dans les cellules HEC-1A. Des cellules HEC-1A ont été cultivées pendant 5 jours en présence des stéroïdes ovariens puis 24h supplémentaires en leur présence (A) ou non (B et C). L'IL-1 α a été détectée par immunofluorescence sans (A et B) ou après perméabilisation des cellules (C), et visualisée par microscopie confocale. Les barres correspondent à 50 μ m.

L'absence de libération d'IL-1 α par les cellules HEC-1A ne remettait pas en cause notre hypothèse puisqu'elle peut s'expliquer notamment par une déficience d'entrée en apoptose de ces cellules en réponse au retrait hormonal. Nous avons dès lors directement testé l'effet d'agents pro-apoptotiques connus, le TNF- α et la camptothécine, sur la libération d'IL-1 α par les cellules HEC-1A.

L'ajout de ces substances, seules ou combinées, pendant 24h de culture n'a cependant pas augmenté la libération d'IL-1 α mais n'a pas non plus induit d'apoptose dans ces cellules, comme l'a indiqué l'absence d'immunodétection de phosphatidylsérine au feuillet externe de la membrane plasmique cellulaire (Figure II.16).

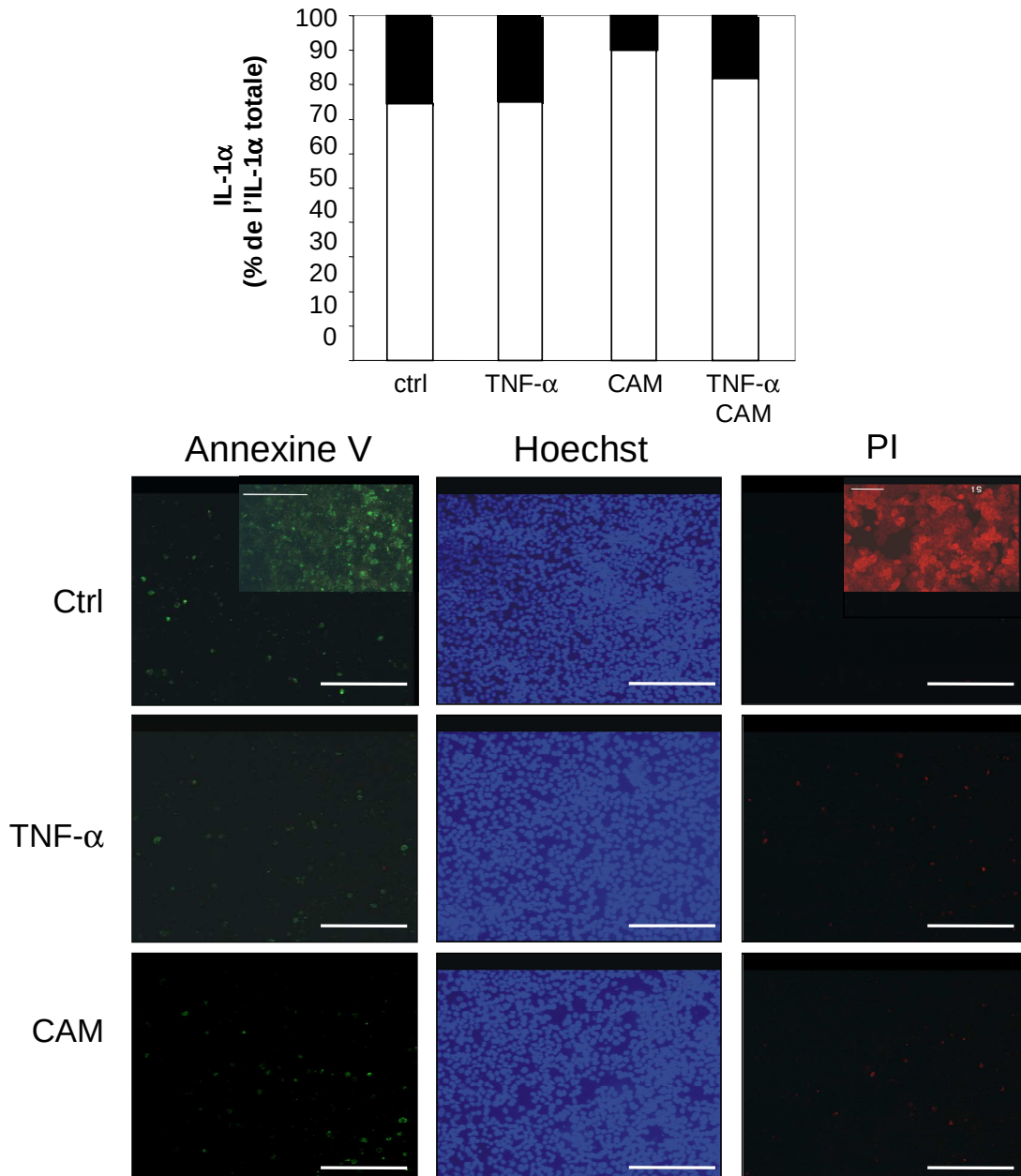


Figure II.16 : Effets d'agents pro-apoptotiques sur la libération d'IL-1 α , sur la localisation des phosphatidylsérines membranaires et sur la perméabilité membranaire de cellules HEC-1A. Des cellules HEC-1A ont été cultivées pendant 24h en absence (ctrl) ou en présence de TNF- α 100ng/ml et/ou de camptothécine 4 μ M (CAM). Au terme de la culture, les quantités d'IL-1 α ont été mesurées par ELISA dans les lysats cellulaires ($\square$) et les milieux conditionnés correspondants ($\blacksquare$) et sont exprimées en pourcentage de l'IL-1 α totale. Ces résultats proviennent d'une expérience unique. En parallèle, les phosphatidylsérines membranaires ont été marquées à l'aide d'annexine V couplée à la fluorescéine et la perméabilité membranaire a été investiguée par marquage différentiel des noyaux à l'aide agents intercalants fluorescents diffusant (Hoechst 33342) ou non (iodure de propidium, PI) au travers des membranes non perméabilisées. En insert, le marquage a été pratiqué sur des cellules perméabilisées par un traitement à la saponine 0,05% pendant 10 min. Les barres correspondent à 50 μ m.

En résumé, ces quelques expériences préliminaires ont été réalisées, par malchance, avec des cellules hautement résistantes à l'apoptose. Elles ne remettent toutefois pas en cause notre hypothèse puisque, à défaut de montrer que le retrait hormonal provoque une apoptose qui déclenche la libération d'IL-1 α , nous avons observé que la libération d'IL-1 α ne s'effectuait pas par des cellules résistantes à l'apoptose. Il est évident que ces expériences devront être répétées avec une autre lignée épithéliale ou avec des cellules purifiées.

9) Contrôle hormonal de la production d'IL-1 α stromale en culture cellulaire et amplification paracrine.

Les observations par hybridation *in situ* ont montré que la production d'IL-1 α stromale est induite, *in vivo*, au moment de la chute des concentrations des stéroïdes ovariens. D'autre part, les expériences de culture de cellules épithéliales purifiées ont indiqué que le retrait hormonal stimule la libération des stocks intracellulaires d'IL-1 α . La concordance des événements suggérait que, comme cela a été montré pour la production stromale d'activité collagénolytique, l'IL-1 α d'origine épithéliale pourrait directement provoquer l'augmentation de l'expression d'IL-1 α stromale, induisant ainsi un mécanisme de boucle amplificatrice paracrine. Pour tester cette hypothèse, des cellules stromales ont été purifiées, adaptées pendant 8 jours à la culture en présence des stéroïdes ovariens puis soumises, pendant 24h, au retrait de l'œstradiol et/ou de la progestérone simultanément à l'addition ou non d'IL-1 α recombinante. Les quantités relatives d'ARNm de l'IL-1 α ont été mesurées au terme du traitement (Figure II.17).

Le simple retrait des stéroïdes ovariens n'a pas engendré de modification significative de la quantité d'ARNm de l'IL-1 α . Par contre, l'addition concomitante de 100 pg/ml d'IL-1 α recombinante a conduit à une augmentation moyenne de 2,7 fois. Une augmentation similaire (2,4 fois) a été observée lorsque l'addition d'IL-1 α recombinante a été réalisée en maintenant l'œstradiol seul, mais pas en maintenant la progestérone (seule ou en combinaison avec l'œstradiol).

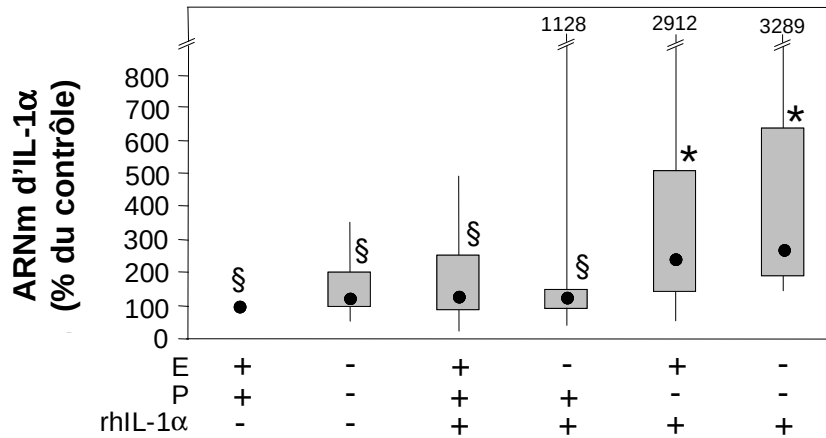


Figure II.17 : Effet du retrait hormonal et de l'IL-1 α recombinante sur l'expression stromale d'IL-1 α . Les cellules stromales de 7 endomètres non menstruels ont été adaptées pendant 8 jours à la culture en présence des stéroïdes ovariens puis soumises pendant 24h à leur maintien ou à leur retrait total ou partiel, et/ou à l'addition d'IL-1 α recombinante (rhIL-1 α). La quantité relative d'ARNm d'IL-1 α a été mesurée et est présentée en pourcentage de la condition contrôle où les deux stéroïdes ovariens ont été maintenus. Le niveau relatif d'ARNm d'IL-1 α par rapport à la β -actine varie de 3×10^{-4} à 7×10^{-3} (médiane = 2×10^{-3}) dans cette condition contrôle. Le caractère significatif des variations entre les conditions a été déterminé à l'aide du test de Wilcoxon : $P < 0,05$; * par rapport à E+P+, § par rapport à rhIL-1 α +

Comme nos observations dans des explants d'endomètre (Figure II.5) ont indiqué que les cellules épithéliales sont susceptibles de produire simultanément de l'IL-1 α et un inhibiteur de sa bioactivité, l'IL-1Ra, nous avons vérifié que l'IL-1 α présente dans du milieu conditionné par des cellules épithéliales pouvait effectivement augmenter la synthèse d'IL-1 α par les cellules stromales. Des cellules stromales préalablement adaptées à la culture pendant 8 jours en présence des stéroïdes ovariens ont été cultivées en présence de milieu conditionné pendant 3 jours par des cellules épithéliales. Ce milieu, contenant 15 pg/ml d'IL-1 α selon un dosage par ELISA, a été additionné ou non d'œstradiol et/ou de progestérone.

Les quantités relatives d'ARNm de l'IL-1 α dans les cellules stromales (Figure II.18), mesurées au terme de 24h d'addition de ce milieu conditionné, étaient 4,7 fois supérieures (entre valeurs médianes) en l'absence des hormones par rapport au contrôle dans lequel œstradiol et progestérone ont été maintenus. Le maintien de l'œstradiol seul n'a pas empêché une augmentation similaire (3,4 fois), contrairement au maintien de la progestérone seule. Cet effet était entièrement provoqué par l'IL-1 α présente dans le milieu de culture puisqu'il a été totalement inhibé en ajoutant, dans le milieu conditionné, un anticorps bloquant spécifiquement l'IL-1 α .

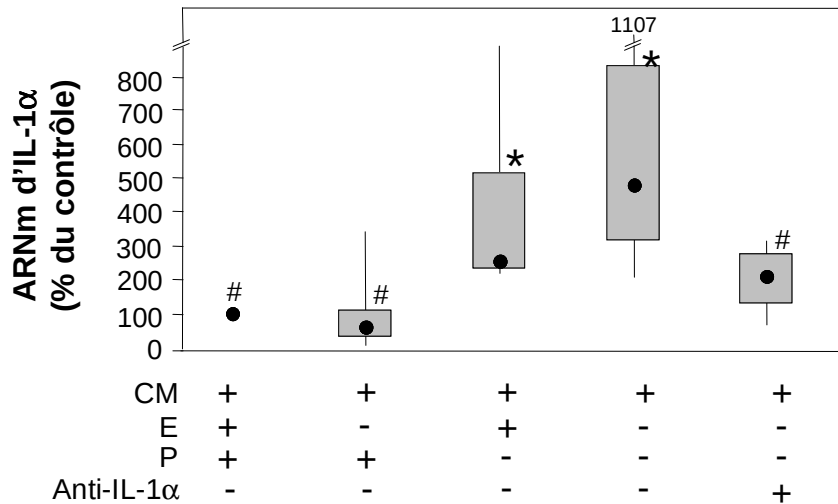


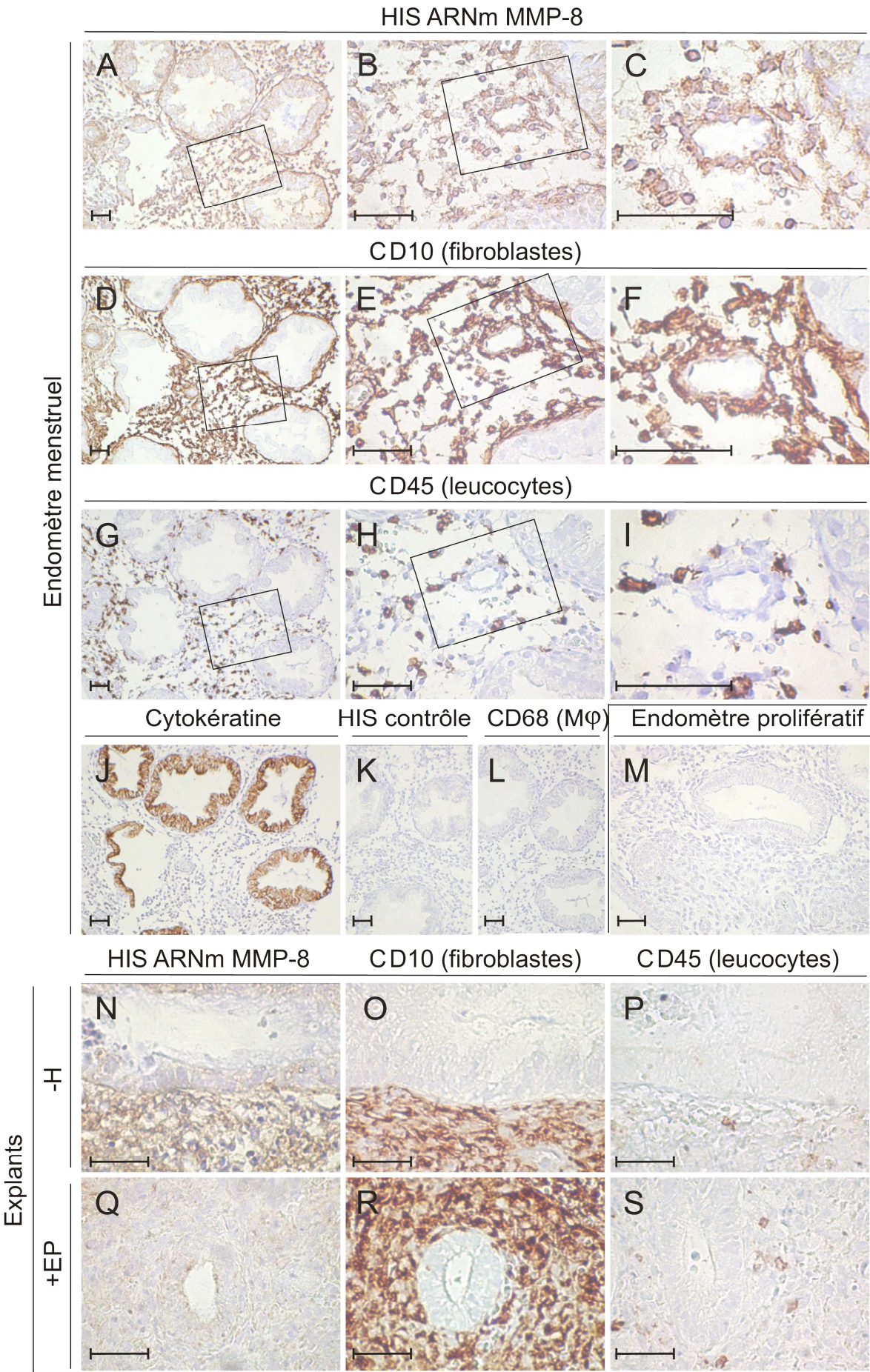
Figure II.18 : Effet des stéroïdes ovariens et contribution de l'IL-1 α épithéliale à la stimulation de l'expression stromale d'IL-1 α . Les cellules stromales de 7 endomètres non menstruels ont été adaptées pendant 8 jours à la culture en présence des hormones, puis cultivées pendant 24h en présence de milieu conditionné par les cellules épithéliales (CM), avec maintien ou retrait d'œstradiol et/ou de progestérone, et avec addition, ou non, d'un anticorps dirigé contre l'IL-1 α . La quantité relative d'ARNm d'IL-1 α a été mesurée et est exprimée en pourcentage de la condition contrôle où les deux stéroïdes ovariens ont été maintenus. Le niveau relatif d'ARNm d'IL-1 α par rapport à la β -actine dans cette condition contrôle varie de 1×10^{-4} à 2×10^{-2} (médiane = $1,5 \times 10^{-3}$). Le caractère significatif des variations entre les conditions a été déterminé à l'aide du test de Wilcoxon : $P < 0,05$; * par rapport à CM+E+P+, # par rapport à CM+.

10) Bioactivité sélective de l'IL-1 α sur les collagénases endométriales.

Des études antérieures réalisées au laboratoire (Singer *et al.* 1997) ont montré que l'IL-1 α endométriale stimule la production et la libération d'activité collagénolytique par des cellules stromales et que cet effet est directement réprimé par les hormones. Cette activité résulte en partie de l'expression stromale de la MMP-1 (ou collagénase-1) qui a été démontrée par hybridation *in situ* dans l'endomètre menstruel et dans les explants cultivés sans hormones (Kokorine *et al.* 1996). La quantification précise des variations des quantités d'ARNm des MMPs endométriales réalisée par V. Vassilev pendant le début de mon doctorat a indiqué qu'en plus de la collagénase 1 (MMP-1), l'endomètre humain exprime aussi la collagénase 2 (MMP-8) mais pas la collagénase 3 (MMP-13; Vassilev *et al.* 2005 et communication personnelle). Plus particulièrement, les quantités relatives des ARNm de la MMP-1 et de la MMP-8 augmentent de plus de 2 logarithmes pendant la phase

menstruelle, par comparaison aux autres phases du cycle, ainsi qu'en réponse à la mise en culture d'explants non menstruels sans ajout d'hormones. Comme pour l'ARNm de la MMP-1, l'induction de la MMP-8 est inhibée par l'ajout des stéroïdes ovariens en culture (Vassilev *et al.* 2005). La MMP-8 est également connue sous le nom de collagénase des neutrophiles, terme qui témoigne bien de son origine cellulaire la mieux documentée. L'abrupte augmentation des quantités relatives de son ARNm en fin de phase sécrétoire pourrait dès lors résulter de l'infiltration des cellules inflammatoires dans le stroma endométrial observée au même moment. Toutefois, *in vivo*, la synthèse d'ARNm de MMP-8 par les neutrophiles polymorphonucléaires n'a lieu que durant leur maturation au sein de la moelle osseuse, la MMP-8 étant ensuite stockée dans des granules de sécrétion jusqu'au moment de sa libération au niveau des sites inflammatoires (Mainardi *et al.* 1991). Les neutrophiles qui envahissent l'endomètre ne devraient donc plus contenir d'importantes quantités d'ARNm de MMP-8. Par ailleurs, plusieurs études ont rapporté la présence *in vivo* d'ARNm de MMP-8 dans certains types cellulaires non inflammatoires tels que les chondrocytes articulaires, les fibroblastes gingivaux et des membranes synoviales (Cole *et al.* 1996; Hanemaaijer *et al.* 1997; Kiili *et al.* 2002). Afin de déterminer l'origine cellulaire de la MMP-8 endométriale, j'ai localisé son ARNm par hybridation *in situ* sur des coupes d'endomètres collectés aux différentes phases du cycle ou d'explants cultivés (Figure II.19 : A-C, N et Q).

Figure II.19 : Localisation endométriale de l'ARNm de la MMP-8 au cours du cycle menstruel et son contrôle par les stéroïdes ovariens en culture d'explants. Des champs caractéristiques de la localisation par hybridation *in situ* (HIS) de l'ARNm de la MMP-8 (A-C, M, N et Q) détecté dans des échantillons d'endomètre menstruel (A à L) et prolifératif (M) non cultivé ou dans des explants d'endomètre prolifératif cultivés pendant 24h en absence (-H, N-P) ou en présence des stéroïdes ovariens (+EP, Q-S) sont présentés. Les types cellulaires du stroma ont été caractérisés par immunodétection sur coupes sériées des marqueurs CD10 (fibroblastes, D à F, O et R), CD45 (leucocytes, G à I, P et S) et CD68 (macrophages, Mφ, L). Un contrôle négatif pour l'hybridation *in situ* a été réalisé à l'aide de la sonde sens pour chaque échantillon sur une coupe adjacente. Un exemple représentatif est montré en K. B-C, E-F et H-I sont des agrandissements progressifs de A, D et G respectivement. Les barres correspondent à 50 µm.



Contrairement aux échantillons prélevés durant les phases proliférative (Figure II.19 : M) et sécrétoire (non montré) dans lesquels aucun marquage n'a été détecté, l'ARNm de la MMP-8 était abondant dans le stroma des échantillons menstruels (Figure II.19 : A-C). Un contraste similaire a été observé dans les explants dont le stroma présentait un important signal pour l'ARNm de la MMP-8 au terme d'une culture en l'absence mais non en présence des stéroïdes ovariens (Figure II.19 : N et Q). Les marqueurs de différenciation cellulaire CD10, CD45 et CD68 ont été immunodétectés sur des sections adjacentes afin de préciser le(s) type(s) cellulaire(s) produisant la MMP-8 dans l'endomètre menstruel et les explants. Le profil d'immunodétection du marqueur des cellules fibroblastiques endométriales CD10 (Figure II.19 : D-F, O et R) a parfaitement coïncidé avec le profil de localisation de l'ARNm de MMP-8, contrairement au marqueur leucocytaire CD45 (Figure II.19 : G-I, P et S) ou macrophagique CD68 (Figure II.19 : L).

Le parallélisme d'augmentation d'expression stromale des MMP-1 et MMP-8, tant au cours de la phase menstruelle qu'en culture d'explants sans ajout hormonal, nous a incités à investiguer l'éventualité d'un contrôle de l'expression stromale de la MMP-8 par l'IL-1 α , comme pour la MMP-1 (Singer *et al.* 1997). Pour ce faire, les ARNm des MMP-1 et MMP-8 ont été quantifiés dans les préparations d'ARN obtenues au terme de cultures de cellules stromales en présence d'IL-1 α recombinante (Figure II.20) ou de milieu conditionné épithélial (Figure II.21), simultanément au retrait hormonal, et préalablement analysées pour y mesurer les quantités d'ARNm d'IL-1 α (voir point 9).

Le retrait hormonal seul n'a causé aucun changement significatif des quantités d'ARNm de MMP-1 et de MMP-8 (Figure II.20). Par contre, la combinaison de ce retrait à l'addition d'IL-1 α recombinante a induit une augmentation de 3,5 fois (entre médianes) des quantités relatives de l'ARNm de la MMP-1 (confirmant une observation antérieure de Vassil Vassilev, communication personnelle) mais pas de celui de la MMP-8. Une augmentation similaire de l'ARNm de la MMP-1 (2,5 fois) en réponse à l'ajout d'IL-1 α recombinante a été mesurée lorsque l'œstradiol a été maintenu dans le milieu de culture, mais pas si la progestérone est maintenue (seule ou en combinaison avec l'œstradiol).

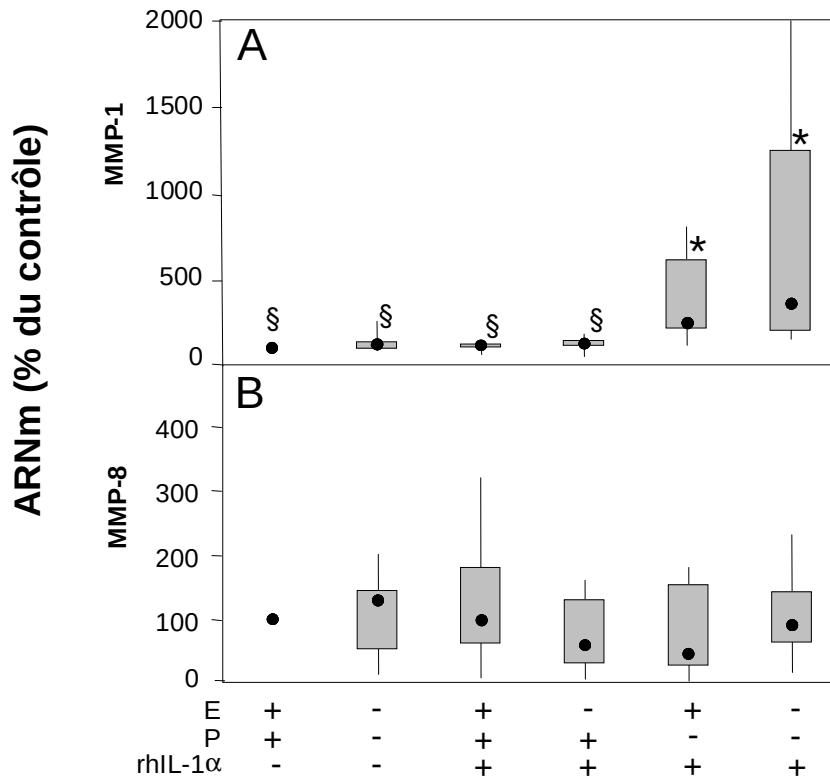


Figure II.20 : Effet du retrait hormonal et de l'IL-1 α recombinante sur l'expression stromale des MMP-1 et MMP-8. Les cellules stromales de 7 endomètres non menstruels ont été adaptées pendant 8 jours à la culture en présence des stéroïdes ovariens, puis soumises pendant 24h à leur maintien ou à leur retrait total ou partiel, et/ou à l'addition de 100pg/ml d'IL-1 α recombinante (rhIL-1 α). La quantité relative des ARNm des MMP-1 (A) et MMP-8 (B) a été mesurée et est présentée en pourcentage de la condition où les deux stéroïdes ovariens ont été maintenus. Le niveau relatif d'ARNm de MMP-1 et de MMP-8 dans cette condition contrôle varie respectivement de 1×10^{-1} à 2 (médiane= 4×10^{-1}) et de 1×10^{-3} à 2×10^{-1} (médiane= 2×10^{-2}). Le caractère significatif des variations entre les conditions a été déterminé à l'aide du test de Wilcoxon : $P < 0,05$; * par rapport à E+P+, § par rapport à rhIL-1 α +

De la même manière, la quantité relative médiane d'ARNm de la MMP-1 dans les cellules stromales, mesurée au terme de 24h d'addition de milieu conditionné par les cellules épithéliales purifiées, était 7 fois supérieure en l'absence des stéroïdes ovariens par rapport à leur présence combinée (condition contrôle) (Figure II.21). Le maintien de l'œstradiol seul n'a pas empêché une augmentation similaire (8,2 fois), contrairement au maintien de la progestérone seule. Comme pour l'augmentation de l'expression d'IL-1 α stromale, et en confirmation des observations précédentes du laboratoire (Singer et al. 1999b), l'induction était causée par l'IL-1 α présente dans le milieu conditionné puisqu'elle a été totalement inhibée par l'ajout d'un anticorps spécifique. La quantité relative d'ARNm de MMP-8 a subi une augmentation plus

modeste (1,7 fois) en réponse au retrait hormonal en présence de milieu conditionné par les cellules épithéliales (Figure II.21 : B). Contrairement à l'ARNm de la MMP-1, cette augmentation n'a pas été observée lorsque l'œstradiol seul a été maintenu et, surtout, elle n'a pas été inhibée par l'anticorps dirigé contre l'IL-1 α . Collectivement, ces résultats suggèrent que les cellules épithéliales sont responsables de l'augmentation d'expression stromale de MMP-8 mais par le biais d'un mécanisme paracrine impliquant un agent stimulateur non identifié autre que l'IL-1 α .

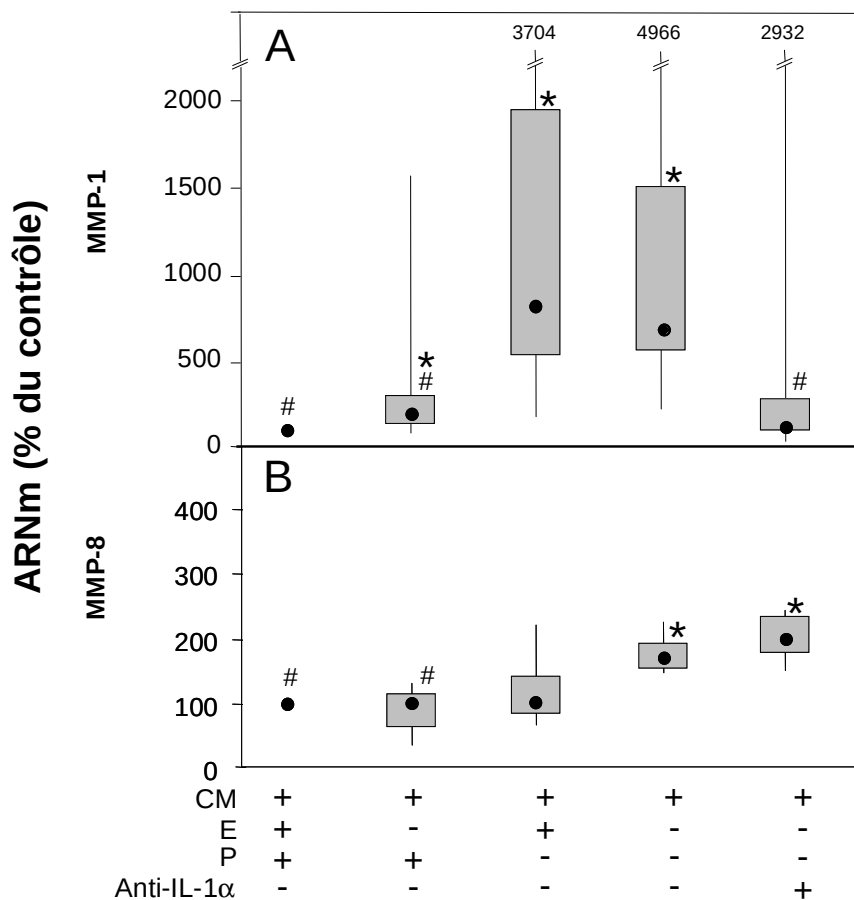


Figure II.21 : Effet des stéroïdes ovariens et contribution de l'IL-1 α à la stimulation par les cellules épithéliales de l'expression stromale des MMP-1 et MMP-8. Les cellules stromales de 7 endomètres non menstruels ont été adaptées pendant 8 jours à la culture en présence des hormones, puis cultivées pendant 24h en présence de milieu conditionné par les cellules épithéliales (CM), avec maintien ou retrait d'œstradiol et/ou de progestérone, et avec addition, ou non, d'un anticorps dirigé contre l'IL-1 α . La quantité relative des ARNm des MMP-1 (A) et MMP-8 (B) a été mesurée et est exprimée en pourcentage de la condition où les deux stéroïdes ovariens ont été maintenus. Le niveau relatif d'ARNm de MMP-1 et de MMP-8 dans cette condition contrôle varie, respectivement, de 5×10^{-2} à 9×10^{-1} (médiane = 3×10^{-1}) et de 4×10^{-5} à 6×10^{-3} (médiane = 6×10^{-4}). Le caractère significatif des variations entre les conditions a été déterminé à l'aide du test de Wilcoxon : $P < 0,05$; * par rapport à CM+E+P+, # par rapport à CM+.

Chapitre III : DISCUSSION

Notre étude sur une collection importante d'échantillons a permis de déterminer que les ligands IL-1 α , IL-1 β et IL-1Ra sont tous trois présents dans l'endomètre humain tant au niveau des ARNm que des protéines, à l'exception de l'IL-1 β dont la protéine n'est pas détectable dans 40% des échantillons non menstruels analysés. D'une manière générale, l'IL-1Ra est 10 fois plus abondant que l'IL-1 α et l'IL-1 β . Il convient toutefois de noter que les tests RT-PCR et ELISA utilisés dans notre étude mesurent les 3 isoformes d'IL-1Ra. L'IL-1Ra, qui présente une affinité pour l'IL-1RI 3 à 10 fois supérieure à celle des agonistes, bloque efficacement l'activité IL-1 *in vitro*. Toutefois, il a été démontré dans certaines pathologies qu'un excès d'IL-1Ra de 100 à 1000 fois est nécessaire pour contrer la bioactivité des agonistes IL-1 (Arend *et al.* 1990). Bien que l'excès d'environ 10 fois d'IL-1Ra dans l'endomètre contribue probablement à inhiber l'IL-1RI, le rôle de cet antagoniste dans le contrôle global et surtout local de l'activité des agonistes IL-1 reste à clarifier.

Dans notre collection d'échantillons endométriaux, les médianes des quantités d'ARNm et de protéine des trois ligands étudiés sont maximales au moment de la menstruation. Toutefois, les différences entre la phase menstruelle et les autres phases du cycle sont faibles par rapport à celles mesurées pour d'autres médiateurs reconnus du remodelage matriciel endométrial, notamment LEFTY-A et les collagénases MMP-1 et MMP-8 (Cornet *et al.* 2002; Vassilev *et al.* 2005). L'extrême sensibilité du système IL-1/IL-1RI pourrait expliquer cette différence. En effet, il a été rapporté que l'occupation de quelques récepteurs (3 à 7) par cellule suffit à déclencher une cascade de signalisation (Curtis *et al.* 1989). Par opposition, la dégradation rapide et massive des abondantes chaînes de collagène du stroma endométrial nécessite l'action de nombreuses molécules de protéases. Cet argument n'est cependant pas valable pour la cytokine LEFTY-A. Si le profil de l'IL-1 α se démarque de celui de LEFTY-A, ce n'est pas en raison du pic menstruel qu'ils présentent tous deux, mais à cause des niveaux très élevés d'expression non menstruelle de l'IL-1 α par les cellules épithéliales. Cette expression permanente permet vraisemblablement de constituer un stock d'IL-1 α épithéliale qui, une fois libérée en réponse à la chute des concentrations en stéroïdes ovariens, engendre une cascade d'évènements favorable à la dégradation tissulaire. L'accumulation

intra-épithéliale d'IL-1 α durant les phases proliférative et sécrétoire est ainsi un moyen efficace de déclencher rapidement une réponse menstruelle maximale en fin de cycle.

Nous pouvons également envisager la possibilité que l'IL-1 α participe à des fonctions intracellulaires durant les phases non menstruelles du cycle. En effet, la pro-IL-1 α possède à son extrémité amino-terminale une séquence de localisation nucléaire et peut migrer dans le noyau où elle interagit avec des facteurs de transcription, dont le suppresseur de croissance Necdin (Hu *et al.* 2003), ou avec les complexes d'histone acétyltransférases dans un rôle d'activateur transcriptionnel (Buryskova *et al.* 2004). En outre, la proIL-1 α est également capable de réguler l'apoptose (Pollock *et al.* 2003), probablement grâce à sa capacité de liaison à la protéine modulatrice d'apoptose ubiquitaire HAX-1 (Yin *et al.* 2001). L'activité intracellulaire de la pro-IL-1 α peut aussi influencer la prolifération (Beasley et Cooper 1999; Lonnemann *et al.* 1995), la migration (Maier *et al.* 1994; McMahon *et al.* 1997), et la différenciation cellulaires (Stevenson *et al.* 1997) ou encore sensibiliser les cellules aux stimuli inflammatoires (Werman *et al.* 2004). Compte tenu de la diversité des fonctions potentielles de l'IL-1 α intracellulaire, il est fort probable que le rôle endométrial de la cytokine ne soit pas restreint à l'induction de la collagénase 1 en phase menstruelle.

Dans le contexte menstruel, la chute hormonale provoque la libération de l'IL-1 α épithéliale. La libération d'un pool d'IL-1 α est rare mais a été précédemment décrite dans l'épiderme humain (Didierjean *et al.* 1989) et de souris (Wood *et al.* 1996) et à partir de l'épithélium de la cornée (Narayanan *et al.* 2005). La voie de sécrétion qu'emprunte l'IL-1 α est encore mal connue. L'apoptose est l'un des rares mécanismes décrits menant à la libération de l'IL-1 α (Hogquist *et al.* 1991; Iglesias *et al.* 1998) et reste le mécanisme le plus probable d'induction de la libération de l'IL-1 α épithéliale dans l'endomètre. En dehors de la menstruation, le nombre de cellules apoptotiques est limité sous l'action des stéroïdes ovariens (Song *et al.* 2002) qui induisent des facteurs anti-apoptotiques, dont Bcl2 (Kanda et Watanabe 2003). Au contraire, en fin de cycle, le nombre de cellules apoptotiques augmente considérablement dans l'endomètre, essentiellement dans le compartiment épithélial (Hopwood et Levison 1976). Le retrait des stéroïdes ovariens suffit à induire l'apoptose endométriale chez la souris (Rotello *et al.* 1992) et stimule l'expression de

facteurs pro-apoptotiques, tels que Bax, dans l'endomètre humain (Tao *et al.* 1997). Les variations de concentration des stéroïdes ovariens modifient dès lors l'équilibre entre les deux familles d'acteurs moléculaires qui conditionnent la survie cellulaire. En fin de phase sécrétoire, le rapport Bcl2 (anti-apoptotique)/Bax (pro-apoptotique) s'inverse en faveur de la mort cellulaire (Dahmoun *et al.* 1999; Tao *et al.* 1997). Parmi les autres médiateurs de l'apoptose, Fas et son ligand (FasL) sont également présents dans l'endomètre tout au long du cycle et surexprimés en fin de phase sécrétoire. Durant la phase proliférative, ces protéines sont retenues dans l'appareil de Golgi et dans les vésicules cytoplasmiques. En fin de phase sécrétoire, Fas et FasL sont libérés et peuvent provoquer de l'apoptose (Song *et al.* 2002). Dans la lignée de carcinome endométrial HHUA et dans le tissu endométrial normal, il a été démontré que le système Fas/FasL active les caspases 3, 8 et 9 dont l'expression est accrue en fin de phase sécrétoire (Abe *et al.* 2006). Les investigations préliminaires réalisées en culture cellulaire n'ont pas apporté de démonstration directe de l'induction d'apoptose en réponse au retrait hormonal mais fournissent un soutien indirect à notre hypothèse dans la mesure où les cellules HEC-1A, qui ont résisté aux signaux pro-apoptotiques, ont préservé leurs stocks intracellulaires d'IL-1 α .

Les lymphocytes affluent dans l'endomètre en fin de cycle mais sont également présents, en nombre plus restreint, en dehors de la menstruation et donc dans les explants cultivés. Bien que nos observations n'excluent pas la production d'IL-1 α par des cellules hématopoïétiques, ce sont des fibroblastes qui sont responsables de la majeure partie de la production d'IL-1 α stromale dans l'endomètre qui se dégrade. Dans l'endomètre, l'IL-1 α est donc majoritairement produite par des cellules résidentes, non inflammatoires. Mais les deux types cellulaires impliqués, épithélium et fibroblastes, se distinguent par leur régulation par les stéroïdes ovariens. A ce jour, aucun autre tissu ne présente la particularité d'un tel contrôle différentiel de l'expression de l'IL-1 α en fonction du compartiment cellulaire. Les mécanismes sous-jacents restent à identifier mais combinent vraisemblablement des différences de réponse à des signaux stimulateurs aussi bien qu'à des signaux inhibiteurs.

L'œstradiol et la progestérone modulent classiquement l'expression des gènes cibles via leurs récepteurs nucléaires. Deux isoformes du récepteur existent pour

chacune des deux hormones stéroïdes ovariennes : ER α et ER β , PRA et PRB. Les différentes isoformes peuvent exercer des effets contradictoires (Brayman *et al.* 2006; Conneely *et al.* 2003; Giangrande *et al.* 1997; Goldman et Shalev 2006; Lessey 2003). Bien que nous ayons localisé les récepteurs stéroïdiens dans l'ensemble des échantillons étudiés, des variations modérées de leur expression relative n'ont peut-être pas été détectées. Toutefois, ces différences d'expression sont insuffisantes pour expliquer les caractéristiques spécifiques d'expression d'IL-1 α et la contribution de co-récepteurs, tels que les corépresseurs nucléaires NCoR1 et NCoR2, doit aussi être considérée (Giangrande *et al.* 2000). La mise en évidence récente de voies non génomiques (Wehling et Losel 2006) via des isoformes membranaires des récepteurs stéroïdiens (Fernandes *et al.* 2005) devrait aussi être envisagée dans le contexte du contrôle transcriptionnel de l'IL-1 α . En effet des récepteurs non nucléaires des œstrogènes et de la progestérone ont été identifiés. Ceux-ci peuvent induire la voie de signalisation intracellulaire ERK (Externally Regulated Kinase) (Filardo *et al.* 2002; Peluso *et al.* 2006; Tang *et al.* 2005), capable d'influencer à son tour d'autres voies de signalisation, dont la voie NF- κ B. L'expression cellulaire différentielle de l'IL-1 α pourrait ainsi être le résultat de différences dans l'activation de ces voies stimulatrices. Alternativement, nos résultats n'excluent pas une régulation différentielle de la stabilité de l'IL-1 α et/ou de son ARNm. L'addition d'acétate de médroxyprogestérone aux cellules musculaires lisses myométriales diminue significativement la quantité de protéine IL-1 α induite par la sérotonine via un déclin rapide des niveaux d'ARNm d'IL-1 α (Lan *et al.* 1999). Un tel mécanisme pourrait contribuer à minimiser les quantités stromales d'IL-1 α durant les phases non menstruelles du cycle.

Dans les cellules du stroma, la production et l'activité d'IL-1 α et des MMPs sont réprimées au niveau transcriptionnel par la présence de la progestérone. Leur induction dépend d'une combinaison entre le retrait de la progestérone et la présence d'un activateur, en l'occurrence l'IL-1 α épithéliale. En effet, une fois libérée, l'IL-1 α provoque la dégradation de la matrice extracellulaire non seulement en stimulant l'expression de collagénase 1 mais aussi en amplifiant son expression par une boucle paracrine.

Les similitudes d'expression, de localisation et de contrôle hormonal des MMP-1 et MMP-8 auraient pu suggérer que la MMP-8 ait une régulation identique à

celle de la MMP-1. Cependant, l'utilisation d'un anticorps bloquant spécifique en culture cellulaire indique que la MMP-8 stromale n'est pas induite par l'IL-1 α . Cette réponse différentielle des MMP-1 et MMP-8 à l'IL-1 α peut s'expliquer par des différences dans leur promoteur respectif, en particulier l'absence de site proximal AP-1 dans celui de la MMP-8, région qui médie l'expression de MMP-1 dans les chondrocytes (Angel and Karin 1992; Catterall *et al.* 2001). L'absence de stimulation de la MMP-8 par l'IL-1 α est toutefois surprenante puisque le promoteur de la MMP-8 contient une séquence de réponse à la stimulation de la voie NF- κ B induite par l'IL-1 α . Les autres éléments de régulation de l'expression de l'ARNm de la MMP-8 jouent donc un rôle complémentaire majeur.

Chapitre IV : Conclusion générale et perspectives

Au cours des dernières années, la vision restreinte du contrôle des MMPs par les stéroïdes ovariens dans le cadre des remaniements tissulaires cycliques de l'endomètre humain a évolué vers une intégration de mécanismes intermédiaires de régulation spatio-temporelle. Parmi ceux-ci, notre laboratoire avait rapidement épinglé le rôle prépondérant de l'IL-1 α mais de nombreuses questions restaient largement ouvertes à propos de sa régulation.

Mon étude a permis de déterminer que dans l'endomètre humain, l'IL-1 α est produite par des cellules résidentes et que le contrôle de sa bioactivité par les stéroïdes ovariens s'exerce au niveau de sa libération par les cellules épithéliales et de son expression dans les cellules stromales. Mes résultats peuvent se résumer sous la forme d'un modèle qui met en évidence le triple niveau de contrôle des stéroïdes ovariens sur l'expression des MMPs induite par l'IL-1 α (Figure IV.1). Tout d'abord, les stéroïdes ovariens empêchent la libération d'IL-1 α épithéliale produite de manière constitutive. Ensuite, la progestérone (seule ou en combinaison avec l'œstradiol) inhibe la production d'IL-1 α stromale. Enfin, cette même hormone prévient l'expression de la MMP-1 inductible par l'IL-1 α . La chute hormonale en fin de cycle, principalement de la progestérone, résulte donc simultanément en une levée du frein exercé sur les trois étapes du modèle et en une libération massive d'inducteurs locaux s'auto-amplifiant.

Bien qu'elle apporte une contribution importante à la compréhension des mécanismes de contrôle et d'action de l'IL-1 α dans le déclenchement de la menstruation, mon étude ouvre de nouvelles pistes de réflexion et d'investigations.

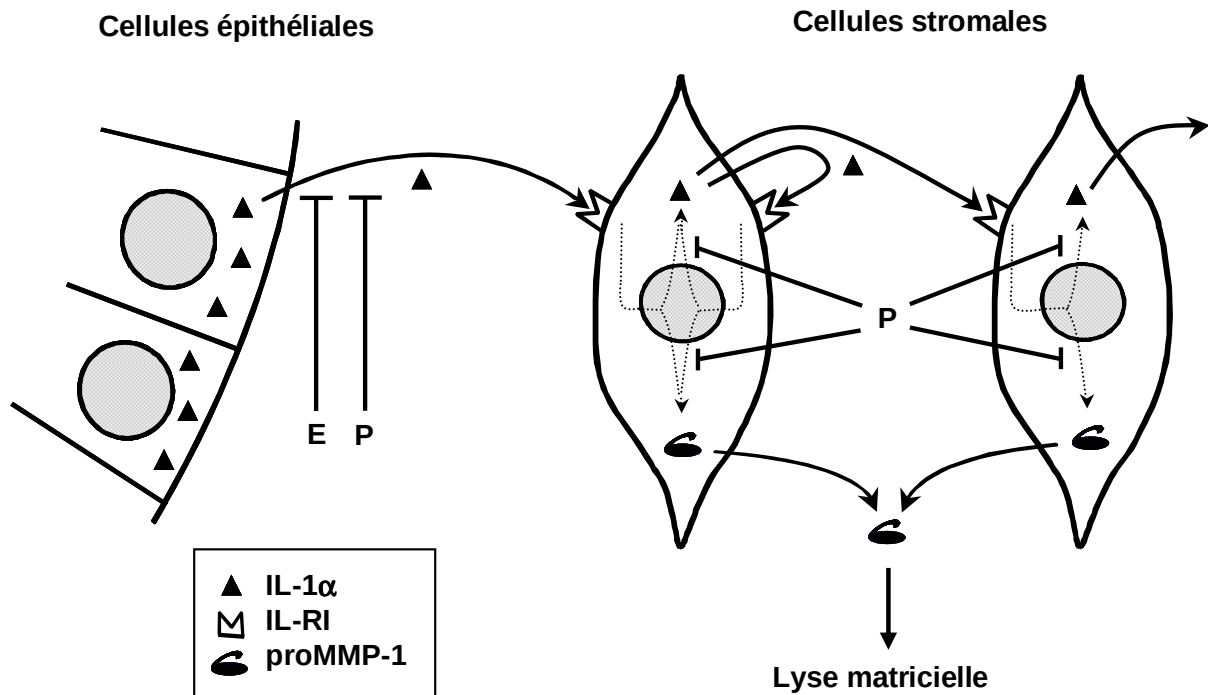


Figure IV.1 : Modèle proposé de régulation de l'IL-1α par les stéroïdes ovariens dans la cascade de signalisation menant à l'expression de MMP-1 et à la lyse menstruelle de la matrice extracellulaire endométriale. L'IL-1α exprimée constitutivement par les cellules épithéliales est libérée suite à la chute de la concentration plasmatique en stéroïdes ovariens. L'IL-1α épithéliale stimule l'expression de MMP-1 mais aussi sa propre expression par les cellules du stroma dans un mécanisme d'amplification paracrine. La libération de l'IL-1α épithéliale est inhibée par l'œstradiol et/ou par la progestérone, tandis que seule la progestérone inhibe la production stromale d'IL-1α et de MMP-1.

1) Mécanismes moléculaires responsables du contrôle différentiel de l'expression de l'IL-1 α .

Les fibroblastes du stroma endométrial produisent de l'IL-1 α , de la MMP-1 et de la MMP-8 uniquement pendant des épisodes de dégradation tissulaire physiologique (menstruation) ou pathologique (saignements dysfonctionnels). Par contre, les cellules épithéliales produisent en permanence de l'IL-1 α mais pas de MMP-1 ni de MMP-8. La progestérone est le répresseur majeur de l'expression fibroblastique des trois gènes mais n'a pas d'effet sur l'expression épithéliale d'IL-1 α bien qu'elle atteigne de la même manière les deux types cellulaires. Les promoteurs des trois gènes présentent de nombreuses similitudes de régions régulatrices. L'analyse comparative des mécanismes de contrôle transcriptionnel des trois gènes dans les cellules stromales serait dès lors profitable à leur compréhension. Une attention particulière devrait être portée aux séquences de liaison des facteurs AP-1 et NF- κ B, aux interactions possibles entre ces deux voies de signalisation, et au mode d'action des récepteurs des stéroïdes ovariens. Les récepteurs nucléaires de la progestérone peuvent inhiber les deux voies (Bamberger *et al.* 1996; Davies *et al.* 2004). Puisque les deux isoformes du récepteur de la progestérone peuvent avoir des effets opposés sur des gènes cibles, il est possible que des quantités différentes d'isoformes A et B dans les cellules épithéliales et stromales, qui n'auraient pas été décelées par notre analyse immunohistochimique, soient au moins partiellement responsables du contrôle différentiel. L'inhibition de l'expression des récepteurs des stéroïdes ovariens par interférence avec l'ARN et/ou leur surexpression distincte devrait permettre de préciser leur rôle. L'implication éventuelle des corégulateurs de transcription, notamment les co-activateurs SRC-1 (Steroid Receptor Coactivator-1; Onate *et al.* 1995) et p300/CBP (Hanstein *et al.* 1996) et les co-represseurs SMRT (Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid hormones receptors; Chen et Evans 1995) et NcoR (Kurokawa *et al.* 1995) pourra également être envisagée, notamment par des expériences d'EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) ou d'immunoprécipitation de chromatine (ChIP).

2) Rôle de l'IL-1 α épithéliale.

La présence d'IL-1 α dans les cellules épithéliales tout au long du cycle menstruel suggère d'autres fonctions que celles développées dans cette thèse. Il conviendrait, dans un premier temps, de déterminer la localisation subcellulaire de la protéine afin, surtout, d'identifier son éventuelle présence dans le noyau ou à la membrane cytoplasmique. Le recours à l'immunofluorescence permettrait de coupler la détection de l'IL-1 α à celle de marqueurs spécifiques de compartiments cellulaires. Il conviendrait par ailleurs de préciser la nature des formes d'IL-1 α (pro-IL-1 α complète, pro-pièce ou forme mature) présentes dans les différents compartiments. Le fractionnement cellulaire, maîtrisé au laboratoire, serait suivi de Western blotting à l'aide d'anticorps spécifiques des deux régions amino- et carboxy-terminales. Dans le cas d'une présence nucléaire, l'accrochage de l'IL-1 α sur des séquences régulatrices de gènes cibles pourrait être mise en évidence par la méthode d'immunoprécipitation de chromatine suivie d'hybridation de séquences régulatrices potentielles sur micropuces (ChIP on chip).

3) Mécanisme de libération de l'IL-1 α épithéliale.

L'immunofluorescence couplée à la microscopie confocale devrait également permettre de déterminer une éventuelle exposition extracellulaire de l'IL-1 α à la membrane cytoplasmique des cellules épithéliales purifiées en réponse au retrait hormonal ou à l'addition d'agents pro-apoptotiques. Cette investigation devrait s'accompagner d'une recherche des marqueurs d'apoptose [caspase 3 clivée, PARP (Poly-(ADP-Ribose) Polymerase) clivé] dans les cellules. Par ailleurs, la libération de l'IL-1 α semble dépendre de sa liaison à la membrane plasmique sous forme d'un complexe avec la protéine chaperonne S100A13. Celle-ci est présente dans l'endomètre et est surexprimée dans les lésions endométriosiques (Hayrabedyan *et al.* 2005). Nous avons observé l'IL-1 α sous forme de marquage périmembranaire dans les cellules HEC-1A. La proximité de S100A13 devrait être recherchée par co-immunofluorescence et microscopie confocale. L'association de l'IL-1 α avec la protéine S100A13 devrait être confirmée par co-immunoprécipitation.

4) Libération de l'IL-1 α stromale dans un mécanisme amplificateur.

Dans l'hypothèse où la production d'IL-1 α stromale induite par l'IL-1 α épithéliale aurait pour fonction d'amplifier le signal d'origine épithéliale, notamment sur la synthèse de MMP-1, il conviendrait de vérifier la libération effective de cette IL-1 α par les fibroblastes. La stratégie utilisée devrait impérativement permettre la distinction entre IL-1 α épithéliale et stromale. Une première procédure possible serait de cultiver des cellules stromales en présence d'acides aminés radiomarqués, de les stimuler par de l'IL-1 α non-radioactive et de mesurer la radioactivité contenue dans les protéines immunoprécipitées par un anticorps spécifique de l'IL-1 α . Compte tenu de l'extrême sensibilité du système IL-1 α /IL-1RI, une autre procédure consisterait à stimuler les fibroblastes avec des concentrations minimales d'IL-1 α et de vérifier, dans le milieu conditionné, la présence de quantités d'IL-1 α supérieures à celles engagées.

5) Identification d'autres protéines stromales régulées par l'IL-1 α .

Bien que sa propre amplification paracrine et l'induction de la MMP-1 constituent déjà deux rôles majeurs de l'IL-1 α endométriale, il est probable que l'IL-1 α libérée à partir des cellules épithéliales agisse sur d'autres cibles. Les autres MMPs induites pendant la menstruation (Goffin *et al.* 2003; Vassilev *et al.* 2005) devraient être considérées en priorité et leur réponse à l'IL-1 α analysée par des expériences de culture cellulaire et de RT-PCR similaires à celles utilisées pour déterminer le contrôle d'expression des MMP-1 et MMP-8. De nouvelles cibles pourraient être identifiées en comparant sur micropuce les profils d'expression génique de cellules cultivées en présence ou non d'IL-1 α recombinante et/ou des stéroïdes ovariens.

6) Démonstration du rôle de l'IL-1 α dans un modèle *in vivo*.

Puisque seuls la femme et quelques mammifères supérieurs présentent des mécanismes typiques de menstruation, les souris transgéniques ne sont d'aucune utilité pour préciser le rôle *in vivo* de l'IL-1 α dans ce processus. Par contre, notre

laboratoire a récemment développé un modèle de xénogreffes sous-cutanées d'explants d'endomètre humain dans le flanc de souris SCID (Severe Combined ImmunoDeficiency). Lorsque ces souris sont soumises à un retrait de pastilles délivrant régulièrement de l'œstradiol et de la progestérone, les greffons subissent rapidement une dégradation tissulaire s'accompagnant d'une augmentation de l'expression des MMPs menstruelles. L'investigation des variations d'expression de l'IL-1 α et des autres cytokines d'intérêt (LEFTY-A, TGF- β s) dans ce modèle se fera très prochainement. Un avantage majeur de ce modèle est qu'il permettra, sans ambiguïté, de faire la distinction entre l'IL-1 α d'origine humaine produite par les cellules résidentes et l'IL-1 α murine éventuellement produite par les nombreux leucocytes qui infiltrent les greffons lors du retrait des pastilles hormonales. Un des objectifs les plus ambitieux du laboratoire serait de pouvoir implanter des greffons reconstitués à partir de mélange de collagène, de cellules épithéliales et de cellules stromales (Masuda *et al.* 2007) après avoir modifié le profil d'expression génique cellulaire par extinction ou surexpression de gènes cibles. L'obtention de cellules épithéliales n'exprimant plus d'IL-1 α et leur application à ce modèle devrait fournir la meilleure opportunité de démonstration *in vivo* du rôle de l'IL-1 α dans la (pseudo)menstruation humaine.

7) Pistes thérapeutiques.

En dehors d'occurrences spontanées, les saignements dysfonctionnels constituent un effet secondaire majeur de plusieurs contraceptifs à long terme. Le développement de molécules dérivées des stéroïdes ovariens naturels occupe de nombreuses firmes pharmaceutiques mais s'avère extraordinairement complexe en raison des multiples effets, parfois antagonistes, générés par les stéroïdes ovariens.

L'échappement des patientes sous traitement progestatif de longue durée au pouvoir inhibiteur de la progestérone et l'apparition quasi systématique de saignements dysfonctionnels dans les premiers mois de ce type de traitement sont toujours mal compris et restent encore un des grands défis de la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués (Vekemans 1995).

Le ciblage d'un intermédiaire indispensable pourrait dès lors s'avérer une alternative attractive. Une molécule dérivée de l'IL-1Ra, l'Anakinra (Kineret[®]) est déjà

utilisée comme traitement contre l'arthrite rhumatoïde (Bresnihan 2002). Bien que les patientes recevant ce traitement ne semblent pas subir de modification de leur cycle menstruel, il se peut qu'un ajustement des concentrations de principe actif et de mode de délivrance fournisse un moyen de réduire significativement les saignements dysfonctionnels.

Chapitre V : Matériel et méthodes

1) Collecte de tissus.

Cette thèse s'intègre dans le cadre d'une étude portant sur la régulation de l'expression, de l'activation et de l'activité des MMPs dans l'endomètre humain, approuvée par le comité d'éthique de la faculté de médecine de l'Université catholique de Louvain. Tous les prélèvements proviennent de patientes des cliniques universitaires Saint-Luc (UCL, Bruxelles, Belgique) et Sainte-Anne Saint-Rémy (Bruxelles, Belgique), en âge de reproduction, indemnes de pathologies endométriales et sans traitement hormonal, et de 9 patientes souffrant de saignements anormaux dont 4 étaient sous traitement hormonal au moment du prélèvement. Le tissu endométrial humain a été obtenu à partir de pièces d'hystérectomie ou de biopsies prélevées aux différentes phases du cycle menstruel. Les endomètres provenant de pièces d'hystérectomie ont été récoltés par un anatomopathologiste expérimenté, le professeur Etienne Marbaix, sous hotte à flux laminaire, à l'aide d'une lame de bistouri stérile, puis placés directement dans une solution saline tamponnée au phosphate (PBS : NaCl 140mM; KCl 2,5mM; Na₂HPO₄ 8mM; KH₂PO₄ 1,5mM; pH 7,4) maintenue à 4°C sur glace (Figure V .1).

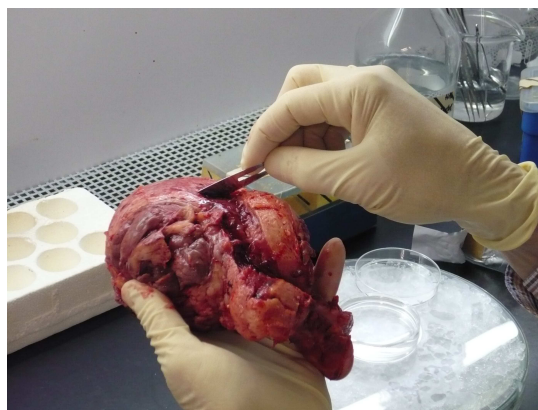


Figure V.1 : Récolte de tissu endométrial à partir d'une pièce d'hystérectomie. Le tissu endométrial est délicatement gratté à l'aide d'une lame de bistouri stérile, puis placé dans une solution de PBS stérile maintenue à 4°C.

Une partie des tissus prélevés a été fixée dans une solution de paraformaldéhyde 4% (Prosan, Merelbeke, Belgique) et enrobée en paraffine pour l'analyse histologique et la datation précise de la phase du cycle. La datation a été établie sur base de critères histologiques prédéfinis (Noyes *et al.* 1975) et sur la notion clinique de la date des dernières règles. Une partie des échantillons a été congelée à -20°C pour les analyses protéiques ou à -80°C dans une solution de lyse (guanidine thiocyanate 4M; Tris-HCl 0,001M; β -mercaptoéthanol 0,97%; pH 7,5; SV Total RNA Isolation System; Promega, Leiden, Pays-Bas) en vue d'une extraction des ARN totaux. Le reste du tissu a été utilisé pour la culture d'explants endométriaux ou de cellules purifiées.

2) Culture d'explants.

La culture d'explants, c'est-à-dire de fragments tissulaires, est un modèle expérimental qui permet aux cellules de garder leurs contacts avec les cellules adjacentes ainsi qu'avec les éléments de la matrice extracellulaire. Le maintien de cet agencement tridimensionnel de la structure tissulaire reproduit pour les cellules un environnement proche de ce qu'elles rencontrent *in vivo* à la nuance importante que le tissu est évidemment dépourvu de vascularisation sanguine (et lymphatique) et de l'afflux de cellules inflammatoires et d'autres cellules apportées par la circulation. Le tissu peut être maintenu dans des conditions de viabilité tout-à-fait acceptables d'un point de vue morphologique pendant 2 à 3 jours, dans un environnement de culture rudimentaire, en l'absence de sérum, de facteurs de croissance et d'hormones. Les explants provenant d'endomètre prolifératif résistent en général mieux que ceux provenant d'endomètre sécrétoire à ces conditions de culture.

Pour la culture d'explants, technique couramment utilisée au laboratoire d'accueil, le tissu endométrial a été découpé dans du PBS à 4°C en fragments d'environ 1mm de côté à l'aide d'une lame de bistouri stérile. Les explants ont été répartis sur une membrane Biopore® de chambre de culture Millicell® (Millipore, Bedford, MA), à raison de 6 ou 24 explants par nacelle de 12mm ou 30mm de diamètre, respectivement. Chaque nacelle a été déposée dans un des puits d'une boîte de culture multi-puits (Greiner, Frickenhausen, Allemagne), préalablement rempli de 0,3 ou 1,2ml de milieu de culture pour explants [Dulbecco's modified

Eagle's medium (DMEM); Invitrogen™, Paisley, Royaume-Uni] sans rouge phénol, additionné de L-glutamine 1,5mM, d'HEPES 20mM, de D-glucose 4g/l, de pénicilline-streptomycine 100µg/ml, et de fungizone-amphotéricine B 1µg/ml (Figure V.2).

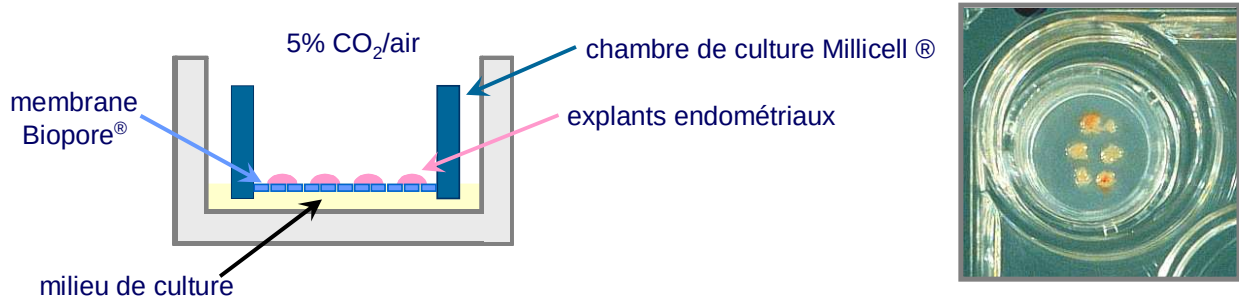


Figure V.2 : Mise en culture d'explants endométriaux. Les explants ont été répartis sur une membrane Biopore® de chambre de culture Millicell® et cultivés en présence de milieu de culture pour explants pendant 24h dans une étuve à 37°C en présence de 5% de CO₂.

Le cas échéant, du 17β-œstradiol (E) et/ou de la progestérone (P) (Sigma-Aldrich, Bornem, Belgique), aux concentrations plasmatiques physiologiques de 1nM et de 100nM respectivement, ont été ajoutés au milieu de culture. Ces stéroïdes sont solubles en milieu aqueux grâce à leur association à la 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrine (0,3µM, Sigma-Aldrich) qui leur procure une cavité hydrophobe. Ce vecteur a été ajouté en concentration appropriée à chaque condition contrôle. Il a été démontré précédemment que ce vecteur de stéroïdes n'affecte en rien l'expression des ARNm (Cornet *et al.* 2005; Marbaix *et al.* 1996b). Certaines cultures ont été effectuées en présence de cycloheximide (CHX) 8µM (Sigma-Aldrich). Les explants ont été cultivés pendant 24h dans une étuve à 37°C en présence de 5% de CO₂. En fin de culture, les milieux conditionnés ont été récoltés et conservés à -20°C tandis que les explants ont été soit conservés comme précédemment, soit enrobés dans du milieu Tissue-Tek® O.C.T tissue-freezing (Sakura, Zoeterwoude, Pays-Bas) et congelés dans de l'isopentane refroidi à l'azote liquide pour la microdissection au laser.

3) Culture primaire de cellules stromales et épithéliales endométriales purifiées.

Pour purifier les cellules stromales et épithéliales de l'endomètre, la matrice extracellulaire du tissu endométrial a d'abord été digérée pendant 1h à 37°C par la collagénase bactérienne de type IA (1mg/ml; Sigma-Aldrich). Le produit de digestion a été filtré une première fois sur une membrane de nylon de 300µm de porosité (Merck Biosciences, Darmstadt, Allemagne) afin d'éliminer les débris tissulaires non digérés. Les cellules stromales ont ensuite été purifiées par passage du premier filtrat à travers un second filtre de nylon de 30µm de porosité tandis que les cellules épithéliales, maintenues sous forme d'amas glandulaires, ont été retenues sur le filtre et récoltées par rinçage du filtre inversé. Les deux types cellulaires ont été adaptés à la culture dans du milieu DMEM-F12 (Invitrogen™), contenant 10% de sérum foetal bovin traité au charbon actif, 100U/ml de pénicilline et 100µg/ml de streptomycine (Invitrogen™), ainsi que les stéroïdes ovariens aux concentrations utilisées en culture d'explants. Les cellules stromales ont ensuite été cultivées 24h en présence ou non (i) d'IL-1α humaine recombinante (100pg/ml; R&D Systems, Minneapolis, MN) ou (ii) de milieu conditionné par des cellules épithéliales auquel a été ajouté soit un anticorps monoclonal de souris neutralisant spécifiquement l'IL-1α (5µg/ml, clone 4414,141; R&D Systems), soit un anticorps monoclonal non relevant (5µg/ml clone RPC5; Ancell, Bayport, MN). Les cellules épithéliales ont été cultivées dans des puits de culture préalablement tapissés de collagène de type IV (Sigma-Aldrich) par incubation d'une solution de collagène 25µg/ml pendant 2h à 37°C. Les puits ont ensuite été lavés et stérilisés à l'aide d'une solution d'éthanol à 70%. La quantité minimale de cellules épithéliales disposées par puits de 24mm de diamètre correspond à 40µg d'ADN (dosé selon la méthode décrite par Kapuscinski et Skoczylas en 1978). Les cellules épithéliales ont été cultivées pendant 24h sans sérum en présence d'inhibiteurs de protéases Complete® (1 tablette/50ml ; Roche, Mannheim, Allemagne). Durant les dernières 24h de culture, les cellules épithéliales et les cellules stromales ont été soumises au maintien ou au retrait de E et/ou de P. Au terme de la culture, les surnageants ont été récoltés et conservés à -20°C pour les analyses protéiques, tandis que les lysats cellulaires ont été récoltés soit dans 200µl de tampon PBS contenant 1% de Tween 20 (Merck Biosciences) (PBS-T) pour

les analyses protéiques, soit dans 175µl de tampon de lyse pour l'extraction de l'ARN.

4) Quantification d'ARNm.

4.1. Extraction d'ARN.

L'ARN total a été extrait, selon le protocole recommandé, à l'aide du kit « SV Total RNA Isolation System » (Promega) en réalisant successivement après la lyse, les étapes de séparation des ARN des autres composants cellulaires, de précipitation à l'éthanol et de purification sur colonne échangeuse d'anions. Ainsi, les lysats tissulaires ou cellulaires conservés à -80°C dans 175µl de tampon de lyse ont été décongelés et homogénéisés à l'aide d'un pilon (KONTES Glass company, Vineland, NJ). Le lysat a été dilué dans 350µl d'une solution de dilution fournie (composition non mentionnée), chauffé à 70°C pendant 3 min maximum puis centrifugé pendant 10 min à 12500g afin de précipiter les protéines et les débris cellulaires. L'ARN, resté en solution dans le surnageant, a été dilué dans 200µl d'éthanol 95% et transféré sur colonne de silice par centrifugation à 12500g. La membrane a ensuite été lavée dans une solution d'acétate de potassium 60mM, Tris-HCl 10mM pH 7,5 et éthanol 60%. L'ADN génomique a été éliminé par une incubation de 15 min à température ambiante en présence d'une solution composée de 40µl de « Yellow core » (Tris-HCl 0,0225M pH 7,5; NaCl 1,125M; yellow dye 0,0025%), de 5µl de MnCl₂ 9mM et de 5µl de DNase I. La réaction a été stoppée par l'addition de 200µl de « DNase Stop » (isothiocyanate de guanidine 2M; Tris-HCl 4mM pH 7,5; éthanol 57%). La membrane a été lavée à nouveau, puis l'ARN a été élué par centrifugation à 12500g dans de l'eau traitée au diéthylpyrocarbonate (DEPC; Sigma-Aldrich). La concentration d'ARN a été déterminée en mesurant l'absorbance de la solution à 260nm (sachant que 1 unité de densité optique (DO) correspond à 40µg/µl d'ARN) à l'aide d'un spectrophotomètre UV/Visible Ultrospec 3100pro (GE Healthcare, Piscataway, NJ).

4.2. Transcription inverse.

La transcription inverse a été réalisée selon les modalités du kit « Thermoscript™ RT-PCR System » (Invitrogen™). Cette étape permet de produire de l'ADN complémentaire (ADNc) à partir de l'ARNm extrait. Cette opération utilise la propriété des ARNm de posséder, à leur extrémité 3', une queue polyA sur laquelle vient s'hybrider une amorce oligo(dT). Une transcriptase d'origine virale utilise cette amorce pour réaliser l'élongation d'un brin d'ADN par incorporation de dNTPs complémentaires au brin d'ARN. L'hétéroduplex ARN/ADNc est mis en présence d'une RNaseH d'origine bactérienne qui digère de manière spécifique le brin d'ARN, laissant le brin d'ADNc intact. Deux cents ng d'ARN total extrait ont d'abord été incubés 5 min à 65°C en présence de 1µl d'oligo(dT)₂₀ 50µM. L'ADNc a ensuite été synthétisé par 15U de transcriptase inverse Thermoscript pendant 60 min à 50°C en présence de tampon de synthèse (Tris acétate 50mM pH 8,5; acétate de potassium 75mM; acétate de magnésium 8mM), de DTT 5mM, de 40U de RNase OUT et de dNTPs 0,5mM. La réaction a finalement été inhibée par une incubation de 5 min à 85°C. L'ADNc a été conservé à 4°C.

4.3. Quantification.

Les quantités d'ADNc cibles ont été mesurées par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en temps réel d'ADN double brin. Cette technique quantitative est basée sur la détection et la mesure de la fluorescence d'un agent intercalant émise à chaque cycle d'amplification d'une réaction de PCR (Figure V.3). La quantification absolue est réalisée par comparaison des cycles seuils (Ct) des échantillons par rapport à ceux d'étalons de concentration connue (standard). Chaque étalon a été préparé à partir des amplicons cibles, obtenus par PCR et purifiés à l'aide du kit « Qiaquick Gel Extraction » (Qiagen, Hilden, Allemagne), puis insérés dans un plasmide pCR®4-TOPO® (TOPO TA cloning® kit, Invitrogen™) et amplifiés dans des bactéries *Escherichia Coli* XL1-blue (Stratagene, Amsterdam, Pays-Bas). Après purification à l'aide du kit « Qiagen Plasmid Purification » (Qiagen), la concentration d'ADN plasmidique a été déterminée par mesure de la DO à 260 nm, sachant que 1 unité de DO correspond à 50µg/µl d'ADN. Le nombre de copies par µl a été calculé selon la formule : $6 \times 10^{23} (\text{copies/mol}) \times \text{concentration}(\text{g}/\mu\text{l}) / \text{PM}(\text{g/mol})$.

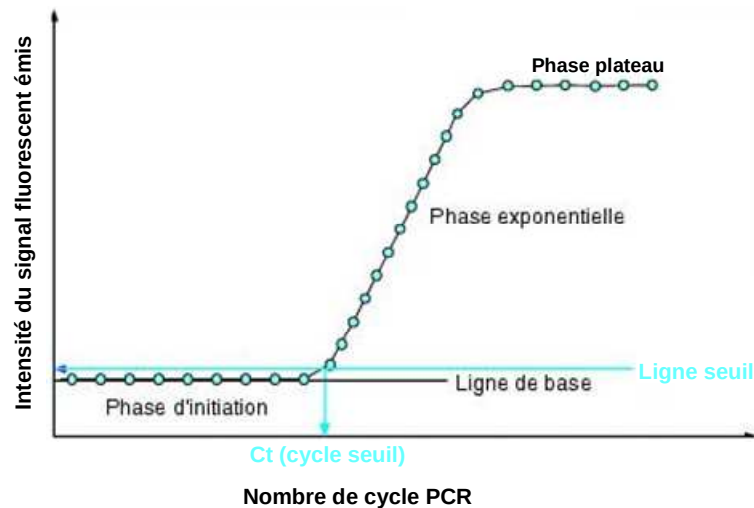


Figure V.3 : Schéma d'amplification par PCR d'une séquence cible observée par fluorescence. La réaction met en jeu trois phases : une phase d'initiation, une phase exponentielle et une phase plateau. La ligne de base reflète l'intensité du bruit de fond de fluorescence. La ligne seuil correspond au seuil de détection au-delà duquel la courbe suit une variation exponentielle et son intersection avec la courbe d'amplification indique le cycle seuil, directement lié à la quantité d'ADN de départ.

Le vecteur a été linéarisé par digestion du site de restriction unique 5'G↓AATTC-3' par l'enzyme EcoRI (Roche), aliquoté et conservé à -20°C . Après décongélation, chaque aliquote n'a fait l'objet que d'une utilisation unique et rapide.

Pour la réaction de PCR en temps réel, les échantillons ainsi que les étalons ont été préparés selon les modalités des kits "LightCycler-FastStart DNA Master for Hybridization Probes" ou "LightCycler-FastStart DNA Master for SYBRGreen" (Roche) qui comprennent ou non, respectivement, l'addition d'une sonde spécifique. Ainsi, au mélange réactionnel ont été ajoutées les amorces sens et antisens spécifiques (500nM ; Invitrogen™) (Table V.1), la sonde 200nM lorsqu'approprié et du MgCl_2 à la concentration optimale de 2mM pour la β -actine, de 3mM pour les ligands IL-1 et de 4mM pour les MMP-1 et MMP-8, le tout porté à un volume final de 20 μl avec de l'eau traitée au DEPC. Les réactions d'amplification ont été réalisées à l'aide d'un Thermocycler pour PCR en temps réel « MyIQ Single-Color Real-time PCR Detection System » (Bio-Rad, Hercules, CA). Après une dénaturation initiale pendant 5 min à 95°C , les ADNc ont été soumis à 40 cycles d'amplification comportant une étape de dénaturation à 95°C pendant 30 sec et une étape d'hybridation-élongation à la température optimale (Table V.1) pendant 30 sec. Les

résultats ont été analysés à l'aide du logiciel "MyIQ System Software, 1.0.410" (Bio-Rad). La spécificité du produit amplifié a été vérifiée après chaque réaction de PCR en temps réel par l'homogénéité de la température de dénaturation des amplicons double brin produits. Chaque mesure d'ARNm cible a été normalisée par rapport à celle de l'ARNm de la β -actine dans le même échantillon. Les résultats représentent la moyenne de deux mesures indépendantes pour chaque cible et ont été présentés soit sur une échelle logarithmique, soit normalisés par rapport à une condition de référence. Les critères de validation de la PCR en temps réel sont le parallélisme des courbes d'amplification, en particulier entre échantillons et les standards, et la pente de la droite obtenue à partir des réactions d'amplification des standards qui doit être égale à 3,33.

5) Microdissection au laser.

La microdissection au laser des explants cultivés et congelés dans du Tissue-Tek[®] O.C.T tissue-freezing (Sakura, Zoeterwoude, Pays-Bas) a été réalisée sur 20 coupes environ par Héloïse Gaide Chevronnay dans le cadre de son doctorat. D'une manière générale, 50 glandes et 50 foyers de cellules stromales ont été récoltés séparément par échantillon à l'aide du PALM[®] MicroBeam System (P.A.L.M. Microlaser Technologies, Bernried, Allemagne). L'ARN extrait a été amplifié linéairement en fonction des modalités du kit "Two-cycle amplification" (Affymetrix, Santa Clara, CA). Quatre cents ng de l'ARN complémentaire obtenu ont été transcrits en sens inverse comme décrit précédemment à l'aide de l'amorce sens des gènes cibles ("#2" pour la β -actine).

6) Quantification des protéines.

Les quantités de protéines ciblées (ligands IL-1) mesurées par ELISA ont été normalisées par rapport aux quantités de protéines totales dans les mêmes échantillons.

Le dosage des protéines totales dans les lysats endométriaux a été réalisé à l'aide d'acide bicinchoninique (BCA), en mesurant la liaison de ce colorant aux protéines et en la comparant à celle obtenue avec des quantités connues d'une

protéine de référence, l'albumine de sérum bovin. Les échantillons endométriaux ou cellulaires récoltés dans du PBS-T 1% ont été homogénéisés à l'aide d'un pilon (KONTES Glass company). Le dosage s'est effectué en triple exemplaire dans une plaque de 96 puits en mélangeant 100µl des échantillons à 100µl d'une mixture composée de 50% de micro-réactif A (NaHCO_3 0,226M; Na_2CO_3 0,322M; tartrate 0,015M et NaOH 0,2M), de 48% de micro-réactif B (BCA 4%, Sigma-Aldrich) et de 2% de micro-réactif C ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 4%). La plaque a été incubée pendant 1h à 60°C, puis pendant 5 min à température ambiante. La lecture de la DO à 590 nm a été réalisée au moyen d'un spectrophotomètre « SpectraCount™ » (Packard Bioscience Company).

Les concentrations en IL-1 α , IL-1 β et IL-1Ra dans les homogénats tissulaires totaux et les surnageants de culture ont été mesurées par dosage colorimétrique ELISA selon les modalités recommandées dans les kits "Quantikines®" appropriés (R&D Systems, Minneapolis, MN). Les puits d'une microplaque ont été remplis de 50µl d'une solution de dilution (PBS; BSA 1%; pH 7,2-7,4) et incubés pendant 2h à température ambiante en présence d'étalons ou des échantillons à tester dilués dans un volume total de 200µl. Les puits ont été rincés 3 fois dans une solution de PBS-T 0,05%; pH 7,2-7,4. L'anticorps secondaire couplé à la peroxydase de raifort a été ajouté et incubé pendant 1h à température ambiante. Les puits ont à nouveau été lavés 3 fois, remplis de 200µl d'une mixture composée de 50% de solution A (H_2O_2) et de 50% de substrat de la peroxydase (tétraméthylbenzidine, concentration non mentionnée) et incubés pendant 20 min à température ambiante. La réaction a été arrêtée par l'addition de 50µl de solution Stop (H_2SO_4 2N).

La mesure des quantités de la sous-unité 20S du protéasome a été réalisée en incubant les échantillons pendant 16h à 4°C dans une microplaque (NUNC-Immo Plate, Life Technologies) tapissée de l'anticorps monoclonal de souris MCP21 (5µg/ml ; Pr Benoît Van den Eynde, Institut Ludwig pour la recherche contre le cancer, Bruxelles, Belgique). Les puits ont été lavés au PBS-T 0,1%. Les interactions aspécifiques ont été inhibées par 1h d'incubation à température ambiante en présence de PBS contenant 2% d'albumine de sérum bovin. Les puits ont été lavés au PBS-T 0,1% et incubés pendant 1h à température ambiante en présence de protéines purifiées à partir de sérum de lapin immunisé contre la sous-unité 20S du

protéasome (1mg/ml, Institut Ludwig pour la recherche contre le cancer). Les puits ont été rincés et incubés pendant 1h à température ambiante en présence d'un anticorps de chèvre (1/1000; Southern Biotechnology Associates) dirigé contre les fragments Fc des immunoglobulines de lapin et conjugué à la phosphatase alcaline. Un substrat de la phosphatase alcaline, le p-nitrophényl phosphate (Sigma-Aldrich), a finalement été ajouté à raison de 50 µl dans chaque puits et incubé pendant 10 min à température ambiante (Schultz *et al.* 2002).

Les concentrations ont été mesurées par colorimétrie (Microplate reader ; MDS Analytical Technologies, Berkshire, Royaume-Uni) à 450 nm pour les tests Quantikine® et à 405 nm pour la sous-unité 20S du protéasome. Les concentrations des protéines cibles ont été calculées par comparaison aux valeurs obtenues pour les étalons correspondants (R&D Systems et Institut Ludwig pour la recherche contre le cancer).

7) Hybridation *in situ*.

L'hybridation *in situ* est une technique qui permet de localiser, sur coupe histologique, un ARNm au moyen d'une sonde antisens spécifique (Table V.1). Des sondes non isotopiques de type oligonucléotidique marquées à la fluorescéine ont été utilisées. Ces dernières ont été détectées à l'aide d'anticorps spécifiques de la fluorescéine. Concrètement, les hybridations *in situ* ont été réalisées sur des sections histologiques de 5µm d'épaisseur d'échantillons enrobés en paraffine. Toutes les solutions aqueuses ont été traitées avec du DEPC 0,1% (v/v). Après élimination de la paraffine dans des bains de xylol (2x10 min), le tissu a été réhydraté dans des bains d'éthanol de concentration décroissante (99%, 90%, 80%, 70%, 50%, 5 min chacun) suivis de bains d'eau distillée (2x5 min). Les coupes ont été traitées à la protéinase K (1µg/ml, Roche) diluée dans une solution de Tris-HCl (100mM; pH 8,0) et d'EDTA 50mM pendant 30 min à 37°C, puis acétylées dans un bain d'acétate anhydrique 0,25% (v/v) et de triéthanolamine 0,1M à pH 8,0 pendant 10 min. Les coupes ont ensuite été incubées pendant 1h à 50°C dans une solution d'hybridation [formamide 40% (v/v), dextran sulfate 10% (w/v), solution de Denhardt 2% (vol/vol, Sigma-Aldrich), et SSC (Sodium Saline Citrate) 4x] pour bloquer les réactions aspécifiques. Le SSC 1x correspond à du NaCl 150mM et citrate de sodium 15mM. Les ARNm

cibles ont été hybridés en chambre humide (c'est-à-dire contenant une solution de SSC 4x avec 50% de formamide (v/v)) en incubant les coupes pendant une nuit à température optimale (Table V.1) en présence de sonde 1,5ng/μl préalablement marquée à l'extrémité 3' par de la fluorescéine-déoxyuridine 5'-triphosphate selon les modalités du kit "Gene Images 3'-oligolabeling Module" (GE HealthCare, Piscataway, NJ). Après l'hybridation, les coupes ont été lavées dans des bains de SSC 4x, 2x et 0,1x de 10 min chacun, puis fixées au paraformaldéhyde 4% pendant 5 min. Un bain de 30 min dans de l'H₂O₂ 0,3% a permis de bloquer les peroxydases endogènes. Les lames ont été traitées pendant 30 min dans une solution de blocage des épitopes aspécifiques composée de Tris-HCl 50mM pH 7,4 contenant 1% de BSA et 10% de sérum de chèvre (NGS pour Normal Goat Serum). Les sondes fixées ont été visualisées par immunohistochimie classique (voir point 8) à l'aide de l'anticorps anti-fluorescéine (Table V.2).

8) Immunohistochimie.

Les échantillons enrobés en paraffine ont été coupés en sections de 5μm d'épaisseur à l'aide d'un microtome. Les coupes ont été étalées sur des lames Superfrost+® (International Medical, Belgium), déparaffinées par 3 passages de 10 min chacun dans des bains d'Histosafe® (Yvsolab, Beerse, Belgique) suivis de 3 passages dans des bains de propanol. Les peroxydases endogènes ont été inhibées en incubant les coupes dans un bain d'H₂O₂ à 0,3% (v/v) pendant 30 min à température ambiante. Les interactions non-spécifiques ont été inhibées en incubant les coupes dans un bain de PBS contenant 1% de BSA (w/v) pendant 60 min à température ambiante. Les coupes ont ensuite été incubées pendant une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire approprié (Table V.2). Après 3 lavages de 5 min (le premier dans du PBS contenant 1% de BSA et les deux autres dans du PBS), l'anticorps fixé de manière spécifique a été détecté en incubant les coupes pendant 1h à température ambiante avec un anticorps secondaire (EnVision®, DakoCytomation) couplé à la peroxydase de raifort (HRP pour Horseradish peroxidase) et dirigé contre le fragment Fc de l'anticorps primaire. Les coupes ont ensuite été rincées (Tris-HCl 50mM, pH 7,4, 2x5 min) et l'activité peroxydase révélée par une incubation de 10 min dans une solution de 3,3'-diaminobenzidine (Liquid DAB Substrate, Chromogen System; DakoCytomation) en présence d'H₂O₂ à 0,03% (v/v). Les coupes ont été

lavées pendant 10 min dans l'eau courante, déshydratées et montées. Pour les doubles immunomarquages, la première cible a d'abord été détectée comme décrit ci-dessus. Après la première révélation, les coupes ont été lavées et incubées dans de l'HCl 0,1M pendant 1h à température ambiante puis lavées à l'eau courante. Les étapes d'inhibition des interactions non spécifiques et de détection ont été répétées mais avec l'emploi d'un anticorps secondaire (PA EnVision®, DakoCytomation) couplé à la phosphatase alcaline dont l'activité a été révélée par une incubation de 30 min en présence du substrat chromogène (Fast Red 1mg/ml; Naphtol AS-MX 0,4mg/ml; Levamisole 0,15mg/ml) dissous dans un tampon Tris-HCl 0,1M, pH 7,4 (Sigma-Aldrich). Les microphotographies ont été prises en microscopie optique (Jenalumar) à l'aide d'un appareil photographique digital (Nikon Coolpix 4500).

Pour l'immunomarquage fluorescent de l'IL-1 α , les cellules ont été cultivées sur un couvre-objet dans une boîte de culture multipuits. Après 20 min de fixation au paraformaldéhyde 4% à température ambiante, les cellules ont été rincées 3x dans une solution de PBS et éventuellement perméabilisées en les incubant pendant 10 min dans une solution de saponine 0,05% diluée dans du PBS. Les interactions non spécifiques ont été inhibées en incubant des cellules pendant 30 min en présence d'une solution de Q-PBS (albumine de sérum bovin 1%; saponine 0,01%; azide 0,02%; PBS). Les cellules ont ensuite été incubées pendant 1h à température ambiante en présence d'anticorps primaire dilué dans une solution de Q-PBS. Après 6 lavages de 5 min chacun dans du PBS, les cellules ont été incubées pendant 1h à température ambiante en chambre noire en présence d'anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de souris couplé à un fluorochrome (Alexa-568 ou Alexa 488, Invitrogen™). Après montage, le marquage a été observé par microscopie confocale (microscope inversé Axiovert Zeiss, couplé à un système confocal Bio-Rad 1024).

Le marquage fluorescent de la phosphatidylsérine membranaire des cellules HEC-1A vivantes a été réalisé selon les modalités du kit "Annexin-V-Fluos Staining Kit" (Roche). Les cellules lavées dans du PBS ont été incubées pendant 15 min dans une solution prête à l'emploi d'Annexin-V-Fluos et examinées par microscopie à fluorescence (Axiophot, Zeiss).

9) Coloration à l'argent.

La coloration histologique à l'argent permet de mettre en évidence un réseau de fibres riches en collagènes principalement de type III. Les sections histologiques ont été déparaffinées comme décrit précédemment. Les coupes ont été incubées dans des bains successifs de permanganate de potassium additionné de quelques gouttes d' H_2SO_4 pendant 3 min, d'acide oxalique 1% pendant 1 min, d'alun de fer 2% pendant 15 min, de solution argentique (AgNO_3 10% 6ml; NH_3 , volume approprié jusqu'au changement de couleur de la solution; NaOH 6ml; eau distillée 50ml) pendant 2 min, de formol 10% pendant 2 min, de chlorure d'or 0,2% pendant 30 sec, d'hyposulfite de soude 2,5% pendant 2 min et enfin d'isopropanol avant le montage des lames. Entre chaque bain, les coupes ont été rincées à l'eau distillée.

Table V.1: Liste des oligonucléotidesAmorces pour PCR en temps réel

IL-1 α	sens	5'-TTCGAGCCAATGATCAGTACC-3'	} 60°C
IL-1 α	antisens	5'-AGCACCCATGTCAAATTTCA-3'	
IL-1 β	sens	5'-ACCTGTCCTGCGTGTTGAAAG-3'	} 60°C
IL-1 β	antisens	5'-ATGTACCAGTTGGGGAAGT-3'	
IL-1Ra	sens	5'-CTCATGCTCTGTTCTTGGGAAT-3'	} 60°C
IL-1Ra	antisens	5'-AGGTCAGTGATGTAAGTGCCTC-3'	
MMP-1	sens	5'-GCAAACACATCTGACCTACAGG-3'	} 60°C
MMP-1	antisens	5'-TCTCAATGGCATGGTCCAC-3'	
MMP-1	sonde	5'-FAM-CACGCCAGATTTGCCAAGA-TAMRA-3'	
MMP-8	sens	5'-GGTTTTATGTAAACCCAG-3'	} 65°C
MMP-8	antisens	5'-GCTGTGGGGTATAGTTTC-3'	
MMP-8	sonde	5'-FAM-CCCAAGTGGGAACGCACT-TAMRA-3'	
β -actine	sens	5'-AGCCTCGCCTTTGCCGA-3'	} 67°C
β -actine	antisens	5'-TCACGCCCTGGTGCCTG-3'	
β -actine	sonde	5'-FAM-CCGCCGCCGTCCACACCCGCC-TAMRA-3'	

Amorces pour PCR en temps réel d'échantillons microdisséqués

β -actine#2	sens	5'-GCTTGACTCAGGATTTAAAACTGG-3'	} 60°C
β -actine#2	antisens	5'-GGGACTTCCTGTAACAATGCATCTC-3'	

Sondes antisens pour l'hybridation *in situ* des ARNm

IL-1 α	5'-GAACATTATATGTTAGTGTGTTGTTCAACTCTT ACAAAGAGTG-3'	} 40°C
MMP-8	5'-AGGTAGAATGGATACAGTGATGGGAAA-3' et 5'-CCTTACTTCTAACCAAAATCTAGTTC-3'	} 50°C

Les sondes contrôles sens sont composées des séquences antiparallèles.

Les températures indiquées à droite correspondent à celles utilisées lors de l'étape d'hybridation-élongation en PCR en temps réel ou d'hybridation dans le protocole d'hybridation *in situ*.

Table V.2: Liste des anticorps primaires

Cible	Origine	Clones	Concentration	Fournisseur
CD10	souris	56C6	2,0µg/ml	Biocare Medical
CD45	souris	PD7/26, 2B11	1,0µg/ml	Dakocytomation
CD56	souris	1B6	0,9µg/ml	Novocastra
CD68	souris	PG-M1	5,0µg/ml	Dakocytomation
Cytokératine	souris	AE1/AE3	1,5µg/ml	Dakocytomation
ERα	lapin	IgG	1/300	ThermoScientific
Fluorescéine	lapin	IgG	1/300	Dakocytomation
IL-1α	souris	4414.141	3,3µg/ml	R&D Systems
PRA et B	souris	1A6	0,9µg/ml	Novocastra
PRB	souris	SAN27	0,1µg/ml	Novocastra
Contrôle	souris	E13, RPC5		Argene Biosoft
Contrôle	lapin	Ig (anti- <i>h. pylori</i>)		Dakocytomation

Chapitre VI : Références

Abe H, Shibata MA, Otsuki Y (2006) Caspase cascade of Fas-mediated apoptosis in human normal endometrium and endometrial carcinoma cells. *Mol Hum Reprod* **12**, 535-541.

Andrei C, Dazzi C, Lotti L, Torrisi MR, Chimini G, Rubartelli A (1999) The secretory route of the leaderless protein interleukin 1beta involves exocytosis of endolysosome-related vesicles. *Mol Biol Cell* **10**, 1463-1475.

Angel P, Karin M (1992) Specific members of the Jun protein family regulate collagenase expression in response to various extracellular stimuli. *Matrix Suppl* **1**, 156-164.

Aplin JD, Charlton AK, Ayad S (1988) An immunohistochemical study of human endometrial extracellular matrix during the menstrual cycle and first trimester of pregnancy. *Cell Tissue Res* **253**, 231-240.

Apte RN, Dotan S, *et al.* (2006) The involvement of IL-1 in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and tumor-host interactions. *Cancer Metastasis Rev* **25**, 387-408.

Arend WP, Welgus HG, Thompson RC, Eisenberg SP (1990) Biological properties of recombinant human monocyte-derived interleukin 1 receptor antagonist. *J Clin Invest* **85**, 1694-1697.

Arici A, Engin O, Attar E, Olive DL (1995) Modulation of leukemia inhibitory factor gene expression and protein biosynthesis in human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* **80**, 1908-1915.

Arici A, MacDonald PC, Casey ML (1996) Progestin regulation of interleukin-8 mRNA levels and protein synthesis in human endometrial stromal cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* **58**, 71-76.

Aronica SM, Katzenellenbogen BS (1991) Progesterone receptor regulation in uterine cells: stimulation by estrogen, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, and insulin-like growth factor I and suppression by antiestrogens and protein kinase inhibitors. *Endocrinology* **128**, 2045-2052.

Ashikaga T, Honma M, Munemura K, Kataoka T, Endo T, Yamasaki M, Magae J, Nagai K (1998) Selective induction of interleukin-1 production and tumor killing activity of macrophages through apoptosis by the inhibition of oxidative respiration. *Biosci Biotechnol Biochem* **62**, 1115-1121.

Bailly S, Fay M, Israel N, Gougerot-Pocidalo MA (1996) The transcription factor AP-1 binds to the human interleukin 1 alpha promoter. *Eur Cytokine Netw* **7**, 125-128.

Bamberger AM, Bamberger CM, Gellersen B, Schulte HM (1996) Modulation of AP-1 activity by the human progesterone receptor in endometrial adenocarcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 6169-6174.

- Barak V, Yanai P, Treves AJ, Roisman I, Simon A, Laufer N (1992) Interleukin-1: local production and modulation of human granulosa luteal cells steroidogenesis. *Fertil Steril* **58**, 719-725.
- Beasley D, Cooper AL (1999) Constitutive expression of interleukin-1alpha precursor promotes human vascular smooth muscle cell proliferation. *Am J Physiol* **276**, H901-912.
- Beliard A, Noel A, Goffin F, Frankenne F, Foidart JM (2003) Adhesion of endometrial cells labeled with 111Indium-tropolonate to peritoneum: a novel in vitro model to study endometriosis. *Fertil Steril* **79 Suppl 1**, 724-729.
- Bergqvist A, Bruse C, Carlberg M, Carlstrom K (2001) Interleukin 1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in endometriotic tissue and in endometrium. *Fertil Steril* **75**, 489-495.
- Berton A, Selvais C, Lemoine P, Henriët P, Courtoy PJ, Marbaix E, Emonard H (2007) Binding of matrilysin-1 to human epithelial cells promotes its activity. *Cell Mol Life Sci* **64**, 610-620.
- Beuscher HU, Nickells MW, Colten HR (1988) The precursor of interleukin-1 alpha is phosphorylated at residue serine 90. *J Biol Chem* **263**, 4023-4028.
- Bigonnesse F, Labelle Y, Akoum A (2001a) Triphasic expression of interleukin-1 receptor type I in human endometrium throughout the menstrual cycle of fertile women and women with unexplained infertility. *Fertil Steril* **75**, 79-87.
- Bigonnesse F, Marois M, Maheux R, Akoum A (2001b) Interleukin-1 receptor accessory protein is constitutively expressed in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod* **7**, 333-339.
- Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA (1993) Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* **4**, 197-250.
- Boch JA, Wara-aswapati N, Auron PE (2001) Interleukin 1 signal transduction--current concepts and relevance to periodontitis. *J Dent Res* **80**, 400-407.
- Boire A, Covic L, Agarwal A, Jacques S, Sherifi S, Kuliopulos A (2005) PAR1 is a matrix metalloprotease-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells. *Cell* **120**, 303-313.
- Boonyaratanakornkit V, Edwards DP (2004) Receptor mechanisms of rapid extranuclear signalling initiated by steroid hormones. *Essays Biochem* **40**, 105-120.
- Bornstein P, Sage EH (2002) Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 608-616.
- Boucher A, Kharfi A, Al-Akoum M, Bossu P, Akoum A (2001) Cycle-dependent expression of interleukin-1 receptor type II in the human endometrium. *Biol Reprod* **65**, 890-898.

- Brannstrom M, Wang L, Norman RJ (1993) Ovulatory effect of interleukin-1 beta on the perfused rat ovary. *Endocrinology* **132**, 399-404.
- Brayman MJ, Julian J, Mulac-Jericevic B, Conneely OM, Edwards DP, Carson DD (2006) Progesterone receptor isoforms A and B differentially regulate MUC1 expression in uterine epithelial cells. *Mol Endocrinol* **20**, 2278-2291.
- Brenner RM, Rudolph L, Matrisian L, Slayden OD (1996) Non-human primate models; artificial menstrual cycles, endometrial matrix metalloproteinases and s.c. endometrial grafts. *Hum Reprod* **11 Suppl 2**, 150-164.
- Bresnihan B (2002) Effects of anakinra on clinical and radiological outcomes in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* **61 Suppl 2**, ii74-77.
- Bruner KL, Eisenberg E, Gorstein F, Osteen KG (1999) Progesterone and transforming growth factor-beta coordinately regulate suppression of endometrial matrix metalloproteinases in a model of experimental endometriosis. *Steroids* **64**, 648-653.
- Bruner KL, Rodgers WH, Gold LI, Korc M, Hargrove JT, Matrisian LM, Osteen KG (1995) Transforming growth factor beta mediates the progesterone suppression of an epithelial metalloproteinase by adjacent stroma in the human endometrium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7362-7366.
- Burkitt HG, Young B, Heath JW (1993) Histologie Fonctionnelle Wheater. *Arnette, Paris, 3d edition*, 415.
- Buryskova M, Pospisek M, Grothey A, Simmet T, Burysek L (2004) Intracellular interleukin-1alpha functionally interacts with histone acetyltransferase complexes. *J Biol Chem* **279**, 4017-4026.
- Busfield SJ, Comrack CA, *et al.* (2000) Identification and gene organization of three novel members of the IL-1 family on human chromosome 2. *Genomics* **66**, 213-216.
- Butcher C, Steinkasserer A, Tejura S, Lennard AC (1994) Comparison of two promoters controlling expression of secreted or intracellular IL-1 receptor antagonist. *J Immunol* **153**, 701-711.
- Catterall JB, Carrere S, Koshy PJ, Degnan BA, Shingleton WD, Brinckerhoff CE, Rutter J, Cawston TE, Rowan AD (2001) Synergistic induction of matrix metalloproteinase 1 by interleukin-1alpha and oncostatin M in human chondrocytes involves signal transducer and activator of transcription and activator protein 1 transcription factors via a novel mechanism. *Arthritis Rheum* **44**, 2296-2310.
- Cauwe B, Van den Steen PE, Opdenakker G (2007) The biochemical, biological, and pathological kaleidoscope of cell surface substrates processed by matrix metalloproteinases. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **42**, 113-185.
- Cavaillon J (1991) Interleukine-1. Les cytokines. *édition Masson, Paris, Chap 4* 145-166.

- Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A, Chakraborti T (2003) Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem* **253**, 269-285.
- Chen JD, Evans RM (1995) A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* **377**, 454-457.
- Cheng SK, Olale F, Brivanlou AH, Schier AF (2004) Lefty blocks a subset of TGFbeta signals by antagonizing EGF-CFC coreceptors. *PLoS Biol* **2**, E30.
- Chung HW, Wen Y, Ahn JJ, Moon HS, Polan ML (2001) Interleukin-1beta regulates urokinase plasminogen activator (u-PA), u-PA receptor, soluble u-PA receptor, and plasminogen activator inhibitor-1 messenger ribonucleic acid expression in cultured human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* **86**, 1332-1340.
- Clark IM, Swingler TE, Sampieri CL, Edwards DR (2008) The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Int J Biochem Cell Biol* **40**, 1362-1378.
- Cole AA, Chubinskaya S, Schumacher B, Huch K, Szabo G, Yao J, Mikecz K, Hasty KA, Kuettner KE (1996) Chondrocyte matrix metalloproteinase-8. Human articular chondrocytes express neutrophil collagenase. *J Biol Chem* **271**, 11023-11026.
- Colotta F, Dower SK, Sims JE, Mantovani A (1994) The type II 'decoy' receptor: a novel regulatory pathway for interleukin 1. *Immunol Today* **15**, 562-566.
- Comper W (1996) Extracellular matrix. Molecular components and interactions. WD Comper edition. *Harwood academic publishers, The Netherlands*, **2**, 848.
- Conneely OM, Lydon JP (2000) Progesterone receptors in reproduction: functional impact of the A and B isoforms. *Steroids* **65**, 571-577.
- Conneely OM, Mulac-Jericevic B, Lydon JP (2003) Progesterone-dependent regulation of female reproductive activity by two distinct progesterone receptor isoforms. *Steroids* **68**, 771-778.
- Cork BA, Tuckerman EM, Li TC, Laird SM (2002) Expression of interleukin (IL)-11 receptor by the human endometrium in vivo and effects of IL-11, IL-6 and LIF on the production of MMP and cytokines by human endometrial cells in vitro. *Mol Hum Reprod* **8**, 841-848.
- Cornet PB, Galant C, Eeckhout Y, Courtoy PJ, Marbaix E, Henriët P (2005) Regulation of matrix metalloproteinase-9/gelatinase B expression and activation by ovarian steroids and LEFTY-A/endometrial bleeding-associated factor in the human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* **90**, 1001-1011.
- Cornet PB, Picquet C, *et al.* (2002) Regulation and function of LEFTY-A/EBAF in the human endometrium. mRNA expression during the menstrual cycle, control by progesterone, and effect on matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* **277**, 42496-42504.
- Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM (2002) Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science* **295**, 2387-2392.

- Critchley HO, Henderson TA, Kelly RW, Scobie GS, Evans LR, Groome NP, Saunders PT (2002) Wild-type estrogen receptor (ERbeta1) and the splice variant (ERbetacx/beta2) are both expressed within the human endometrium throughout the normal menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* **87**, 5265-5273.
- Cullinan EB, Kwee L, Nunes P, Shuster DJ, Ju G, McIntyre KW, Chizzonite RA, Labow MA (1998) IL-1 receptor accessory protein is an essential component of the IL-1 receptor. *J Immunol* **161**, 5614-5620.
- Curtis BM, Gallis B, Overell RW, McMahan CJ, DeRoos P, Ireland R, Eisenman J, Dower SK, Sims JE (1989) T-cell interleukin 1 receptor cDNA expressed in Chinese hamster ovary cells regulates functional responses to interleukin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 3045-3049.
- Dahmoun M, Boman K, Cajander S, Westin P, Backstrom T (1999) Apoptosis, proliferation, and sex hormone receptors in superficial parts of human endometrium at the end of the secretory phase. *J Clin Endocrinol Metab* **84**, 1737-1743.
- Davies S, Dai D, Feldman I, Pickett G, Leslie KK (2004) Identification of a novel mechanism of NF-kappaB inactivation by progesterone through progesterone receptors in Hec50co poorly differentiated endometrial cancer cells: induction of A20 and ABIN-2. *Gynecol Oncol* **94**, 463-470.
- de Ziegler D, Fanchin R, de Moustier B, Bulletti C (1998) The hormonal control of endometrial receptivity: estrogen (E2) and progesterone. *J Reprod Immunol* **39**, 149-166.
- Didierjean L, Salomon D, Merot Y, Siegenthaler G, Shaw A, Dayer JM, Saurat JH (1989) Localization and characterization of the interleukin 1 immunoreactive pool (IL-1 alpha and beta forms) in normal human epidermis. *J Invest Dermatol* **92**, 809-816.
- Dimitriadis E, White CA, Jones RL, Salamonsen LA (2005) Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation. *Hum Reprod Update* **11**, 613-630.
- Dinarello CA (1996) Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* **87**, 2095-2147.
- Dinarello CA (1997) Interleukin-1. *Cytokine Growth Factor Rev* **8**, 253-265.
- Dinarello CA, Ikejima T, Warner SJ, Orencole SF, Lonnemann G, Cannon JG, Libby P (1987) Interleukin 1 induces interleukin 1. I. Induction of circulating interleukin 1 in rabbits in vivo and in human mononuclear cells in vitro. *J Immunol* **139**, 1902-1910.
- Dower SK, Kronheim SR, Hopp TP, Cantrell M, Deeley M, Gillis S, Henney CS, Urdal DL (1986) The cell surface receptors for interleukin-1 alpha and interleukin-1 beta are identical. *Nature* **324**, 266-268.
- Dower SK, Sims JE, Stanton TH, Slack J, McMahan CJ, Valentine MA, Bomszyk K (1990) Molecular heterogeneity of interleukin-1 receptors. *Ann N Y Acad Sci* **594**, 231-239.
- Durum S, Hirano T, Vilcek J, Nicola N (2000) Cytokine reference. A compendium of cytokines and other mediators of host defense. *Academic press 2nd Edn*.
<http://apresslp.gvpi.net/apcyto/lpext.dll?f=templates&fn=main-h.htm&2.0>

- Egeblad M, Werb Z (2002) New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* **2**, 161-174.
- Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjöld M, Gustafsson JA (1997) Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab* **82**, 4258-4265.
- Fantuzzi G, Dinarello CA (1996) The inflammatory response in interleukin-1 beta-deficient mice: comparison with other cytokine-related knock-out mice. *J Leukoc Biol* **59**, 489-493.
- Fernandes MS, Pierron V, *et al.* (2005) Regulated expression of putative membrane progesterin receptor homologues in human endometrium and gestational tissues. *J Endocrinol* **187**, 89-101.
- Filardo EJ, Quinn JA, Frackelton AR, Jr., Bland KI (2002) Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. *Mol Endocrinol* **16**, 70-84.
- Frank GR, Brar AK, Jikihara H, Cedars MI, Handwerger S (1995) Interleukin-1 beta and the endometrium: an inhibitor of stromal cell differentiation and possible autoregulator of decidualization in humans. *Biol Reprod* **52**, 184-191.
- Freitas S, Meduri G, Le Nestour E, Bausero P, Perrot-Applanat M (1999) Expression of metalloproteinases and their inhibitors in blood vessels in human endometrium. *Biol Reprod* **61**, 1070-1082.
- Fuchs S, Skwara A, Bloch M, Dankbar B (2004) Differential induction and regulation of matrix metalloproteinases in osteoarthritic tissue and fluid synovial fibroblasts. *Osteoarthritis Cartilage* **12**, 409-418.
- Fukuda M, Azuma C, Kanai T, Koyama M, Kimura T, Saji F (1995) Interleukin-1 receptor antagonist expression in epithelial cells of human endometrium. *Int J Gynaecol Obstet* **49**, 305-310.
- Gaide Chevonnay HP, Cornet PB, Delvaux D, Lemoine P, Courtoy PJ, Henriot P, Marbaix E (2008) Opposite regulation of transforming growth factors-beta2 and -beta3 expression in the human endometrium. *Endocrinology* **149**, 1015-1025.
- Galant C, Berliere M, *et al.* (2004) Focal expression and final activity of matrix metalloproteinases may explain irregular dysfunctional endometrial bleeding. *Am J Pathol* **165**, 83-94.
- Galant C, Vekemans M, *et al.* (2000) Temporal and spatial association of matrix metalloproteinases with focal endometrial breakdown and bleeding upon progestin-only contraception. *J Clin Endocrinol Metab* **85**, 4827-4834.
- Gargett CE, Chan RW, Schwab KE (2007) Endometrial stem cells. *Curr Opin Obstet Gynecol* **19**, 377-383.

- Gellersen B, Brosens J (2003) Cyclic AMP and progesterone receptor cross-talk in human endometrium: a decidualizing affair. *J Endocrinol* **178**, 357-372.
- Gerard N, Caillaud M, Martoriati A, Goudet G, Lalmanach AC (2004) The interleukin-1 system and female reproduction. *J Endocrinol* **180**, 203-212.
- Giangrande PH, Kimbrel EA, Edwards DP, McDonnell DP (2000) The opposing transcriptional activities of the two isoforms of the human progesterone receptor are due to differential cofactor binding. *Mol Cell Biol* **20**, 3102-3115.
- Giangrande PH, Pollio G, McDonnell DP (1997) Mapping and characterization of the functional domains responsible for the differential activity of the A and B isoforms of the human progesterone receptor. *J Biol Chem* **272**, 32889-32900.
- Gilbert S (2006) Developmental biology. *Sinauer Associates* **ed 8**, 751.
<http://8e.devbio.com/>
- Giudice LC (1994) Growth factors and growth modulators in human uterine endometrium: their potential relevance to reproductive medicine. *Fertil Steril* **61**, 1-17.
- Giudice LC, Saleh W (1995) Growth factors in reproduction. *Trends Endocrinol Metab* **6**, 60-69.
- Goffin F, Munaut C, Frankenne F, Perrier D'Hauterive S, Beliard A, Fridman V, Nervo P, Colige A, Foidart JM (2003) Expression pattern of metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix-metalloproteinases in cycling human endometrium. *Biol Reprod* **69**, 976-984.
- Goldman S, Shalev E (2006) Difference in progesterone-receptor isoforms ratio between early and late first-trimester human trophoblast is associated with differential cell invasion and matrix metalloproteinase 2 expression. *Biol Reprod* **74**, 13-22.
- Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P, Chambon P (1986) Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* **320**, 134-139.
- Greenfeder SA, Nunes P, Kwee L, Labow M, Chizzonite RA, Ju G (1995) Molecular cloning and characterization of a second subunit of the interleukin 1 receptor complex. *J Biol Chem* **270**, 13757-13765.
- Grenfell S, Smithers N, Miller K, Solari R (1989) Receptor-mediated endocytosis and nuclear transport of human interleukin 1 alpha. *Biochem J* **264**, 813-822.
- Hall JM, McDonnell DP (1999) The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology* **140**, 5566-5578.
- Hanemaaijer R, Sorsa T, *et al.* (1997) Matrix metalloproteinase-8 is expressed in rheumatoid synovial fibroblasts and endothelial cells. Regulation by tumor necrosis factor-alpha and doxycycline. *J Biol Chem* **272**, 31504-31509.

- Hanstein B, Eckner R, DiRenzo J, Halachmi S, Liu H, Searcy B, Kurokawa R, Brown M (1996) p300 is a component of an estrogen receptor coactivator complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 11540-11545.
- Hasty KA, Pourmotabbed TF, Goldberg GI, Thompson JP, Spinella DG, Stevens RM, Mainardi CL (1990) Human neutrophil collagenase. A distinct gene product with homology to other matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* **265**, 11421-11424.
- Hayrabedyan S, Kyurkchiev S, Kehayov I (2005) Endoglin (cd105) and S100A13 as markers of active angiogenesis in endometriosis. *Reprod Biol* **5**, 51-67.
- Henriet P, Cornet PB, Lemoine P, Galant C, Singer CF, Courtoy PJ, Eeckhout Y, Marbaix E (2002) Circulating ovarian steroids and endometrial matrix metalloproteinases (MMPs). *Ann N Y Acad Sci* **955**, 119-138.
- Hickey M, Crewe J, Mahoney LA, Doherty DA, Fraser IS, Salamonsen LA (2006) Mechanisms of irregular bleeding with hormone therapy: the role of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors. *J Clin Endocrinol Metab* **91**, 3189-3198.
- Higgins GC, Wu Y, Postlethwaite AE (1999) Intracellular IL-1 receptor antagonist is elevated in human dermal fibroblasts that overexpress intracellular precursor IL-1 alpha. *J Immunol* **163**, 3969-3975.
- Hogquist KA, Nett MA, Unanue ER, Chaplin DD (1991) Interleukin 1 is processed and released during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 8485-8489.
- Hopwood D, Levison DA (1976) Atrophy and apoptosis in the cyclical human endometrium. *J Pathol* **119**, 159-166.
- Horai R (2005) [IL-1 receptor antagonist knockout mice]. *Nippon Rinsho* **63 Suppl 1**, 55-58.
- Horai R, Asano M, Sudo K, Kanuka H, Suzuki M, Nishihara M, Takahashi M, Iwakura Y (1998) Production of mice deficient in genes for interleukin (IL)-1alpha, IL-1beta, IL-1alpha/beta, and IL-1 receptor antagonist shows that IL-1beta is crucial in turpentine-induced fever development and glucocorticoid secretion. *J Exp Med* **187**, 1463-1475.
- Hoyland JA, Le Maitre C, Freemont AJ (2008) Investigation of the role of IL-1 and TNF in matrix degradation in the intervertebral disc. *Rheumatology (Oxford)* **47**, 809-814.
- Hu B, Wang S, Zhang Y, Feghali CA, Dingman JR, Wright TM (2003) A nuclear target for interleukin-1alpha: interaction with the growth suppressor necdin modulates proliferation and collagen expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 10008-10013.
- Huang HY, Chan SH, Yu HT, Wang HS, Lai CH, Soong YK (2006) Interleukin-18 system messenger RNA and protein expression in human endometrium during the menstrual cycle. *Fertil Steril* **86**, 905-913.
- Huang HY, Wen Y, Irwin JC, Kruessel JS, Soong YK, Polan ML (1998) Cytokine-mediated regulation of 92-kilodalton type IV collagenase, tissue inhibitor or metalloproteinase-1

- (TIMP-1), and TIMP-3 messenger ribonucleic acid expression in human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* **83**, 1721-1729.
- Huang HY, Wen Y, Kruessel JS, Raga F, Soong YK, Polan ML (2001) Interleukin (IL)-1beta regulation of IL-1beta and IL-1 receptor antagonist expression in cultured human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* **86**, 1387-1393.
- Hudelist G, Lass H, *et al.* (2005) Interleukin 1alpha and tissue-lytic matrix metalloproteinase-1 are elevated in ectopic endometrium of patients with endometriosis. *Hum Reprod* **20**, 1695-1701.
- Huising MO, Stet RJ, Savelkoul HF, Verburg-van Kemenade BM (2004) The molecular evolution of the interleukin-1 family of cytokines; IL-18 in teleost fish. *Dev Comp Immunol* **28**, 395-413.
- Iglesias M, Yen K, Gaiotti D, Hildesheim A, Stoler MH, Woodworth CD (1998) Human papillomavirus type 16 E7 protein sensitizes cervical keratinocytes to apoptosis and release of interleukin-1alpha. *Oncogene* **17**, 1195-1205.
- Jeziorska M, Nagase H, Salamonsen LA, Woolley DE (1996) Immunolocalization of the matrix metalloproteinases gelatinase B and stromelysin 1 in human endometrium throughout the menstrual cycle. *J Reprod Fertil* **107**, 43-51.
- Jones RL, Hannan NJ, Kaitu'u TJ, Zhang J, Salamonsen LA (2004) Identification of chemokines important for leukocyte recruitment to the human endometrium at the times of embryo implantation and menstruation. *J Clin Endocrinol Metab* **89**, 6155-6167.
- Kaiser P, Rothwell L, Avery S, Balu S (2004) Evolution of the interleukins. *Dev Comp Immunol* **28**, 375-394.
- Kamat BR, Isaacson PG (1987) The immunocytochemical distribution of leukocytic subpopulations in human endometrium. *Am J Pathol* **127**, 66-73.
- Kanda N, Watanabe S (2003) 17beta-estradiol inhibits oxidative stress-induced apoptosis in keratinocytes by promoting Bcl-2 expression. *J Invest Dermatol* **121**, 1500-1509.
- Kapuscinski J, Skoczylas B (1978) Fluorescent complexes of DNA with DAPI 4',6-diamidine-2-phenyl indole.2HCl or DCI 4',6-dicarboxyamide-2-phenyl indole. *Nucleic Acids Res* **5**, 3775-3799.
- Karagouni EE, Chryssikopoulos A, Mantzavinos T, Kanakas N, Dotsika EN (1998) Interleukin-1beta and interleukin-1alpha may affect the implantation rate of patients undergoing in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril* **70**, 553-559.
- Kariya M, Kanzaki H, Takakura K, Imai K, Okamoto N, Emi N, Kariya Y, Mori T (1991) Interleukin-1 inhibits in vitro decidualization of human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* **73**, 1170-1174.

- Kauma S, Matt D, Strom S, Eierman D, Turner T (1990) Interleukin-1 beta, human leukocyte antigen HLA-DR alpha, and transforming growth factor-beta expression in endometrium, placenta, and placental membranes. *Am J Obstet Gynecol* **163**, 1430-1437.
- Kavita U, Mizel SB (1995) Differential sensitivity of interleukin-1 alpha and -beta precursor proteins to cleavage by calpain, a calcium-dependent protease. *J Biol Chem* **270**, 27758-27765.
- Kawaguchi Y (1994) IL-1 alpha gene expression and protein production by fibroblasts from patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol* **97**, 445-450.
- Keller M, Rüegg A, Werner S, Beer H (2008) Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell* **132**, 818-831.
- Keller NR, Sierra-Rivera E, Eisenberg E, Osteen KG (2000) Progesterone exposure prevents matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) stimulation by interleukin-1alpha in human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* **85**, 1611-1619.
- Kelly RW, Illingworth P, Baldie G, Leask R, Brouwer S, Calder AA (1994) Progesterone control of interleukin-8 production in endometrium and chorio-decidual cells underlines the role of the neutrophil in menstruation and parturition. *Hum Reprod* **9**, 253-258.
- Kharfi A, Boucher A, Akoum A (2002) Abnormal interleukin-1 receptor type II gene expression in the endometrium of women with endometriosis. *Biol Reprod* **66**, 401-406.
- Khasigov PZ, Podobed OV, Ktsoeva SA, Gatagonova TM, Grachev SV, Shishkin SS, Berezov TT (2001) Matrix metalloproteinases of normal human tissues. *Biochemistry (Mosc)* **66**, 130-140.
- Kiili M, Cox SW, Chen HY, Wahlgren J, Maisi P, Eley BM, Salo T, Sorsa T (2002) Collagenase-2 (MMP-8) and collagenase-3 (MMP-13) in adult periodontitis: molecular forms and levels in gingival crevicular fluid and immunolocalisation in gingival tissue. *J Clin Periodontol* **29**, 224-232.
- Kilian PL, Kaffka KL, *et al.* (1986) Interleukin 1 alpha and interleukin 1 beta bind to the same receptor on T cells. *J Immunol* **136**, 4509-4514.
- Kniss DA, Zimmerman PD, Garver CL, Fertel RH (1997) Interleukin-1 receptor antagonist blocks interleukin-1-induced expression of cyclooxygenase-2 in endometrium. *Am J Obstet Gynecol* **177**, 559-567.
- Kobayashi Y, Yamamoto K, Saido T, Kawasaki H, Oppenheim JJ, Matsushima K (1990) Identification of calcium-activated neutral protease as a processing enzyme of human interleukin 1 alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 5548-5552.
- Kokorine I, Marbaix E, Henriët P, Okada Y, Donnez J, Eeckhout Y, Courtoy PJ (1996) Focal cellular origin and regulation of interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-1) are related to menstrual breakdown in the human endometrium. *J Cell Sci* **109** (Pt 8), 2151-2160.

- Kokorine I, Nisolle M, Donnez J, Eeckhout Y, Courtoy PJ, Marbaix E (1997) Expression of interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-1) is related to the activity of human endometriotic lesions. *Fertil Steril* **68**, 246-251.
- Kothapalli R, Buyuksal I, Wu SQ, Chegini N, Tabibzadeh S (1997) Detection of ebaf, a novel human gene of the transforming growth factor beta superfamily association of gene expression with endometrial bleeding. *J Clin Invest* **99**, 2342-2350.
- Krussel JS, Bielfeld P, Polan ML, Simon C (2003) Regulation of embryonic implantation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **110 Suppl 1**, S2-9.
- Kuida K, Lippke JA, Ku G, Harding MW, Livingston DJ, Su MS, Flavell RA (1995) Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* **267**, 2000-2003.
- Kumar S, Hanning CR, *et al.* (2002) Interleukin-1F7B (IL-1H4/IL-1F7) is processed by caspase-1 and mature IL-1F7B binds to the IL-18 receptor but does not induce IFN-gamma production. *Cytokine* **18**, 61-71.
- Kupper TS, Ballard DW, Chua AO, McGuire JS, Flood PM, Horowitz MC, Langdon R, Lightfoot L, Gubler U (1986) Human keratinocytes contain mRNA indistinguishable from monocyte interleukin 1 alpha and beta mRNA. Keratinocyte epidermal cell-derived thymocyte-activating factor is identical to interleukin 1. *J Exp Med* **164**, 2095-2100.
- Kurita T, Young P, Brody JR, Lydon JP, O'Malley BW, Cunha GR (1998) Stromal progesterone receptors mediate the inhibitory effects of progesterone on estrogen-induced uterine epithelial cell deoxyribonucleic acid synthesis. *Endocrinology* **139**, 4708-4713.
- Kurokawa R, Soderstrom M, Horlein A, Halachmi S, Brown M, Rosenfeld MG, Glass CK (1995) Polarity-specific activities of retinoic acid receptors determined by a co-repressor. *Nature* **377**, 451-454.
- Labied S, Galant C, Nisolle M, Ravet S, Munaut C, Marbaix E, Foidart JM, Frankenne F (2008) Differential elevation of matrix metalloproteinase expression in women exposed to levonorgestrel-releasing intrauterine system for a short or prolonged period of time. *Hum Reprod*, in press.
- Labow M, Shuster D, *et al.* (1997) Absence of IL-1 signaling and reduced inflammatory response in IL-1 type I receptor-deficient mice. *J Immunol* **159**, 2452-2461.
- Laird SM, Tuckerman EM, Saravelos H, Li TC (1996) The production of tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha) by human endometrial cells in culture. *Hum Reprod* **11**, 1318-1323.
- Lan L, Vinci JM, Melendez JA, Jeffrey JJ, Wilcox BD (1999) Progesterone mediates decreases in uterine smooth muscle cell interleukin-1alpha by a mechanism involving decreased stability of IL-1alpha mRNA. *Mol Cell Endocrinol* **155**, 123-133.
- Lang D, Knop J, Wesche H, Raffetseder U, Kurrle R, Boraschi D, Martin MU (1998) The type II IL-1 receptor interacts with the IL-1 receptor accessory protein: a novel mechanism of regulation of IL-1 responsiveness. *J Immunol* **161**, 6871-6877.

- Lawson C, Bourcier N, Al-Akoum M, Maheux R, Naud F, Akoum A (2008) Abnormal interleukin 1 receptor types I and II gene expression in eutopic and ectopic endometrial tissues of women with endometriosis. *J Reprod Immunol* **77**, 75-84.
- Lecce G, Meduri G, Ancelin M, Bergeron C, Perrot-Applanat M (2001) Presence of estrogen receptor beta in the human endometrium through the cycle: expression in glandular, stromal, and vascular cells. *J Clin Endocrinol Metab* **86**, 1379-1386.
- Lessey BA (2003) Two pathways of progesterone action in the human endometrium: implications for implantation and contraception. *Steroids* **68**, 809-815.
- Lewis AM, Varghese S, Xu H, Alexander HR (2006) Interleukin-1 and cancer progression: the emerging role of interleukin-1 receptor antagonist as a novel therapeutic agent in cancer treatment. *J Transl Med* **4**, 48.
- Li P, Allen H, *et al.* (1995) Mice deficient in IL-1 beta-converting enzyme are defective in production of mature IL-1 beta and resistant to endotoxic shock. *Cell* **80**, 401-411.
- Loffek S, Zigrino P, Angel P, Anwald B, Krieg T, Mauch C (2005) High invasive melanoma cells induce matrix metalloproteinase-1 synthesis in fibroblasts by interleukin-1alpha and basic fibroblast growth factor-mediated mechanisms. *J Invest Dermatol* **124**, 638-643.
- Lonnemann G, Engler-Blum G, Muller GA, Koch KM, Dinarello CA (1995) Cytokines in human renal interstitial fibrosis. II. Intrinsic interleukin (IL)-1 synthesis and IL-1-dependent production of IL-6 and IL-8 by cultured kidney fibroblasts. *Kidney Int* **47**, 845-854.
- Luheshi NM, Rothwell NJ, Brough D (2008) The dynamics and mechanisms of interleukin-1alpha and beta nuclear import. *Traffic*, in press.
- Maier JA, Statuto M, Ragnotti G (1994) Endogenous interleukin 1 alpha must be transported to the nucleus to exert its activity in human endothelial cells. *Mol Cell Biol* **14**, 1845-1851.
- Mainardi CL, Pourmotabbed TF, Hasty KA (1991) Inflammatory phagocytes and connective tissue degrading metalloproteinases. *Am J Med Sci* **302**, 171-175.
- Mandinova A, Soldi R, Graziani I, Bagala C, Bellum S, Landriscina M, Tarantini F, Prudovsky I, Maciag T (2003) S100A13 mediates the copper-dependent stress-induced release of IL-1alpha from both human U937 and murine NIH 3T3 cells. *J Cell Sci* **116**, 2687-2696.
- Marbaix E, Donnez J, Courtoy PJ, Eeckhout Y (1992) Progesterone regulates the activity of collagenase and related gelatinases A and B in human endometrial explants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 11789-11793.
- Marbaix E, Kokorine I, Donnez J, Eeckhout Y, Courtoy PJ (1996a) Regulation and restricted expression of interstitial collagenase suggest a pivotal role in the initiation of menstruation. *Hum Reprod* **11 Suppl 2**, 134-143.

- Marbaix E, Kokorine I, Henriët P, Donnez J, Courtoy PJ, Eeckhout Y (1995) The expression of interstitial collagenase in human endometrium is controlled by progesterone and by oestradiol and is related to menstruation. *Biochem J* **305** (Pt 3), 1027-1030.
- Marbaix E, Kokorine I, Moulin P, Donnez J, Eeckhout Y, Courtoy PJ (1996b) Menstrual breakdown of human endometrium can be mimicked in vitro and is selectively and reversibly blocked by inhibitors of matrix metalloproteinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 9120-9125.
- March CJ, Mosley B, *et al.* (1985) Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. *Nature* **315**, 641-647.
- Markee J (1940) Menstruation in intraocular endometrial transplants in the rhesus monkey. *Contr Embryol Carnegie Instn* **177**, 211-308.
- Martin L (1980) Estrogens, anti-estrogen and the regulation of cell proliferation in the female reproductive tract *in vivo*. *McLachlan JA edition. Estrogens in the environment. Elsevier/North-Holland, NY*, 103-130.
- Martin MU, Falk W (1997) The interleukin-1 receptor complex and interleukin-1 signal transduction. *Eur Cytokine Netw* **8**, 5-17.
- Martoriati A, Duchamp G, Gerard N (2003) In vivo effect of epidermal growth factor, interleukin-1beta, and interleukin-1RA on equine preovulatory follicles. *Biol Reprod* **68**, 1748-1754.
- Masuda H, Maruyama T, *et al.* (2007) Noninvasive and real-time assessment of reconstructed functional human endometrium in NOD/SCID/gamma c(null) immunodeficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 1925-1930.
- McDowell TL, Symons JA, Duff GW (2005) Human interleukin-1 alpha gene expression is regulated by Sp1 and a transcriptional repressor. *Cytokine* **30**, 141-153.
- McMahan CJ, Slack JL, *et al.* (1991) A novel IL-1 receptor, cloned from B cells by mammalian expression, is expressed in many cell types. *Embo J* **10**, 2821-2832.
- McMahon GA, Garfinkel S, Prudovsky I, Hu X, Maciag T (1997) Intracellular precursor interleukin (IL)-1alpha, but not mature IL-1alpha, is able to regulate human endothelial cell migration in vitro. *J Biol Chem* **272**, 28202-28205.
- Merhi-Soussi F, Berti M, Wehrle-Haller B, Gabay C (2005) Intracellular interleukin-1 receptor antagonist type 1 antagonizes the stimulatory effect of interleukin-1 alpha precursor on cell motility. *Cytokine* **32**, 163-170.
- Milne SA, Critchley HO, Drudy TA, Kelly RW, Baird DT (1999) Perivascular interleukin-8 messenger ribonucleic acid expression in human endometrium varies across the menstrual cycle and in early pregnancy decidua. *J Clin Endocrinol Metab* **84**, 2563-2567.
- Mire-Sluis A, Thorpe R (1998) Cytokines. *Academic press, San Diego*, 1-17.

- Mote PA, Balleine RL, McGowan EM, Clarke CL (2000) Heterogeneity of progesterone receptors A and B expression in human endometrial glands and stroma. *Hum Reprod* **15 Suppl 3**, 48-56.
- Mulac-Jericevic B, Mullinax RA, DeMayo FJ, Lydon JP, Conneely OM (2000) Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. *Science* **289**, 1751-1754.
- Munger JS, Harpel JG, Gleizes PE, Mazzeri R, Nunes I, Rifkin DB (1997) Latent transforming growth factor-beta: structural features and mechanisms of activation. *Kidney Int* **51**, 1376-1382.
- Murphy G, McAlpine CG, Poll CT, Reynolds JJ (1985) Purification and characterization of a bone metalloproteinase that degrades gelatin and types IV and V collagen. *Biochim Biophys Acta* **831**, 49-58.
- Murphy G, Nagase H (2008) Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol Aspects Med* **29**, 290-308.
- Muzio M, Ni J, Feng P, Dixit VM (1997) IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science* **278**, 1612-1615.
- Narayanan S, Glasser A, Hu YS, McDermott AM (2005) The effect of interleukin-1 on cytokine gene expression by human corneal epithelial cells. *Exp Eye Res* **80**, 175-183.
- Nickel W (2005) Unconventional secretory routes: direct protein export across the plasma membrane of mammalian cells. *Traffic* **6**, 607-614.
- Nisolle M, Alvarez ML, Colombo M, Foidart JM (2007) [Pathogenesis of endometriosis]. *Gynecol Obstet Fertil* **35**, 898-903.
- Noel A, Jost M, Maquoi E (2008) Matrix metalloproteinases at cancer tumor-host interface. *Semin Cell Dev Biol* **19**, 52-60.
- Noyes RW, Hertig AT, Rock J (1975) Dating the endometrial biopsy. *Am J Obstet Gynecol* **122**, 262-263.
- O'Brien JE, Peterson TJ, Tong MH, Lee EJ, Pfaff LE, Hewitt SC, Korach KS, Weiss J, Jameson JL (2006) Estrogen-induced proliferation of uterine epithelial cells is independent of estrogen receptor alpha binding to classical estrogen response elements. *J Biol Chem* **281**, 26683-26692.
- O'Neill LA, Dinarello CA (2000) The IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily: crucial receptors for inflammation and host defense. *Immunol Today* **21**, 206-209.
- Ogura Y, Sutterwala FS, Flavell RA (2006) The inflammasome: first line of the immune response to cell stress. *Cell* **126**, 659-662.

- Okada H, Nakajima T, Sanezumi M, Ikuta A, Yasuda K, Kanzaki H (2000a) Progesterone enhances interleukin-15 production in human endometrial stromal cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* **85**, 4765-4770.
- Okada S, Okada H, Sanezumi M, Nakajima T, Yasuda K, Kanzaki H (2000b) Expression of interleukin-15 in human endometrium and decidua. *Mol Hum Reprod* **6**, 75-80.
- Onate SA, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW (1995) Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* **270**, 1354-1357.
- Osteen KG, Rodgers WH, Gaire M, Hargrove JT, Gorstein F, Matrisian LM (1994) Stromal-epithelial interaction mediates steroidal regulation of metalloproteinase expression in human endometrium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 10129-10133.
- Osteen KG, Sierra-Rivera E, Keller NR, Fox DB (1997) Interleukin-1 alpha opposes progesterone-mediated suppression of MMP-7. A possible role of this cytokine during human implantation. *Ann N Y Acad Sci* **828**, 137-145.
- Overall CM, Lopez-Otin C (2002) Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat Rev Cancer* **2**, 657-672.
- Overall CM, Wrana JL, Sodek J (1991) Transcriptional and post-transcriptional regulation of 72-kDa gelatinase/type IV collagenase by transforming growth factor-beta 1 in human fibroblasts. Comparisons with collagenase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase gene expression. *J Biol Chem* **266**, 14064-14071.
- Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z (2007) Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 221-233.
- Paulesu L, Jantra S, Ietta F, Brizzi R, Bigliardi E (2008) Interleukin-1 in reproductive strategies. *Evol Dev* **10**, 778-788.
- Peluso JJ, Pappalardo A, Losel R, Wehling M (2006) Progesterone membrane receptor component 1 expression in the immature rat ovary and its role in mediating progesterone's antiapoptotic action. *Endocrinology* **147**, 3133-3140.
- Pollock AS, Turck J, Lovett DH (2003) The prodomain of interleukin 1alpha interacts with elements of the RNA processing apparatus and induces apoptosis in malignant cells. *Faseb J* **17**, 203-213.
- Prange-Kiel J, Rune GM, Zwirner M, Wallwiener D, Kiesel L (2001) Regulation of estrogen receptor alpha and progesterone receptor (isoform A and B) expression in cultured human endometrial cells. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **109**, 231-237.
- Prudovsky I, Bagala C, Tarantini F, Mandinova A, Soldi R, Bellum S, Maciag T (2002) The intracellular translocation of the components of the fibroblast growth factor 1 release complex precedes their assembly prior to export. *J Cell Biol* **158**, 201-208.
- Prudovsky I, Mandinova A, *et al.* (2003) The non-classical export routes: FGF1 and IL-1alpha point the way. *J Cell Sci* **116**, 4871-4881.

- Prudovsky I, Tarantini F, *et al.* (2008) Secretion without Golgi. *J Cell Biochem* **103**, 1327-1343.
- Rajalingam D, Kacer D, Prudovsky I, Kumar TK (2007) Molecular cloning, overexpression and characterization of human interleukin 1alpha. *Biochem Biophys Res Commun* **360**, 604-608.
- Rannou F, Francois M, Corvol MT, Berenbaum F (2006) Cartilage breakdown in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* **73**, 29-36.
- Rasweiler JJt (1991) Spontaneous decidual reactions and menstruation in the black mastiff bat, *Molossus ater*. *Am J Anat* **191**, 1-22.
- Rasweiler JJt, de Bonilla H (1992) Menstruation in short-tailed fruit bats (*Carollia* spp.). *J Reprod Fertil* **95**, 231-248.
- Rawdanowicz TJ, Hampton AL, Nagase H, Woolley DE, Salamonsen LA (1994) Matrix metalloproteinase production by cultured human endometrial stromal cells: identification of interstitial collagenase, gelatinase-A, gelatinase-B, and stromelysin-1 and their differential regulation by interleukin-1 alpha and tumor necrosis factor-alpha. *J Clin Endocrinol Metab* **79**, 530-536.
- Rodgers WH, Matrisian LM, Giudice LC, Dsupin B, Cannon P, Svitek C, Gorstein F, Osteen KG (1994) Patterns of matrix metalloproteinase expression in cycling endometrium imply differential functions and regulation by steroid hormones. *J Clin Invest* **94**, 946-953.
- Rosenwasser LJ (1998) Biologic activities of IL-1 and its role in human disease. *J Allergy Clin Immunol* **102**, 344-350.
- Rossi M, Sharkey AM, Vigano P, Fiore G, Furlong R, Florio P, Ambrosini G, Smith SK, Petraglia F (2005) Identification of genes regulated by interleukin-1beta in human endometrial stromal cells. *Reproduction* **130**, 721-729.
- Rotello RJ, Lieberman RC, Lepoff RB, Gerschenson LE (1992) Characterization of uterine epithelium apoptotic cell death kinetics and regulation by progesterone and RU 486. *Am J Pathol* **140**, 449-456.
- Roux-Lombard P (1998) The interleukin-1 family. *Eur Cytokine Netw* **9**, 565-576.
- Rubartelli A, Cozzolino F, Talio M, Sitia R (1990) A novel secretory pathway for interleukin-1 beta, a protein lacking a signal sequence. *Embo J* **9**, 1503-1510.
- Salamonsen LA, Lathbury LJ (2000) Endometrial leukocytes and menstruation. *Hum Reprod Update* **6**, 16-27.
- Salamonsen LA, Woolley DE (1999) Menstruation: induction by matrix metalloproteinases and inflammatory cells. *J Reprod Immunol* **44**, 1-27.
- Santana P, Llanes L, *et al.* (1996) Interleukin-1 beta stimulates sphingomyelin hydrolysis in cultured granulosa cells: evidence for a regulatory role of ceramide on progesterone and prostaglandin biosynthesis. *Endocrinology* **137**, 2480-2489.

- Sarih M, Souvannavong V, Brown SC, Adam A (1993) Silica induces apoptosis in macrophages and the release of interleukin-1 alpha and interleukin-1 beta. *J Leukoc Biol* **54**, 407-413.
- Schindler R, Clark BD, Dinarello CA (1990) Dissociation between interleukin-1 beta mRNA and protein synthesis in human peripheral blood mononuclear cells. *J Biol Chem* **265**, 10232-10237.
- Schultz ES, Chapiro J, *et al.* (2002) The production of a new MAGE-3 peptide presented to cytolytic T lymphocytes by HLA-B40 requires the immunoproteasome. *J Exp Med* **195**, 391-399.
- Sharkey A (1998) Cytokines and implantation. *Rev Reprod* **3**, 52-61.
- Shi W, Mognetti B, Campana A, Bischof P (1995) Metalloproteinase secretion by endometrial leukocyte subsets. *Am J Reprod Immunol* **34**, 299-310.
- Shupnik MA (1996) Gonadal hormone feedback on pituitary gonadotropin genes. *Trends Endocrinol Metab* **7**, 272-276.
- Simon C, Frances A, Lee BY, Mercader A, Huynh T, Remohi J, Polan ML, Pellicer A (1995) Immunohistochemical localization, identification and regulation of the interleukin-1 receptor antagonist in the human endometrium. *Hum Reprod* **10**, 2472-2477.
- Simon C, Frances A, Piquette GN, el Danasouri I, Zurawski G, Dang W, Polan ML (1994) Embryonic implantation in mice is blocked by interleukin-1 receptor antagonist. *Endocrinology* **134**, 521-528.
- Simon C, Mercader A, Gimeno MJ, Pellicer A (1997) The interleukin-1 system and human implantation. *Am J Reprod Immunol* **37**, 64-72.
- Simon C, Piquette GN, Frances A, Polan ML (1993a) Localization of interleukin-1 type I receptor and interleukin-1 beta in human endometrium throughout the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* **77**, 549-555.
- Simon C, Piquette GN, Frances A, Westphal LM, Heinrichs WL, Polan ML (1993b) Interleukin-1 type I receptor messenger ribonucleic acid expression in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Fertil Steril* **59**, 791-796.
- Singer CF, Kronsteiner N, *et al.* (2002) Interleukin-1 system and sex steroid receptor gene expression in human endometrial cancer. *Gynecol Oncol* **85**, 423-430.
- Singer CF, Marbaix E, Kokorine I, Lemoine P, Donnez J, Eeckhout Y, Courtoy PJ (1997) Paracrine stimulation of interstitial collagenase (MMP-1) in the human endometrium by interleukin 1alpha and its dual block by ovarian steroids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 10341-10345.

- Singer CF, Marbaix E, Lemoine P, Courtoy PJ, Eeckhout Y (1999a) Local cytokines induce differential expression of matrix metalloproteinases but not their tissue inhibitors in human endometrial fibroblasts. *Eur J Biochem* **259**, 40-45.
- Singer CF, Marbaix E, Lemoine P, Eeckhout Y, Courtoy PJ (1999b) Interleukin-1 receptor-ligand interactions modulate interstitial collagenase-1 production by human endometrial fibroblasts. *Mol Hum Reprod* **5**, 240-245.
- Sjogren A, Holmes PV, Hillensjo T (1991) Interleukin-1 alpha modulates luteinizing hormone stimulated cyclic AMP and progesterone release from human granulosa cells in vitro. *Hum Reprod* **6**, 910-913.
- Slack J, McMahan CJ, Waugh S, Schooley K, Spriggs MK, Sims JE, Dower SK (1993) Independent binding of interleukin-1 alpha and interleukin-1 beta to type I and type II interleukin-1 receptors. *J Biol Chem* **268**, 2513-2524.
- Snijders MP, de Goeij AF, Debets-Te Baerts MJ, Rousch MJ, Koudstaal J, Bosman FT (1992) Immunocytochemical analysis of oestrogen receptors and progesterone receptors in the human uterus throughout the menstrual cycle and after the menopause. *J Reprod Fertil* **94**, 363-371.
- Song J, Rutherford T, Naftolin F, Brown S, Mor G (2002) Hormonal regulation of apoptosis and the Fas and Fas ligand system in human endometrial cells. *Mol Hum Reprod* **8**, 447-455.
- Steinkasserer A, Spurr NK, Cox S, Jeggo P, Sim RB (1992) The human IL-1 receptor antagonist gene (IL1RN) maps to chromosome 2q14-q21, in the region of the IL-1 alpha and IL-1 beta loci. *Genomics* **13**, 654-657.
- Sternberg S (1997) Histology for pathologists, Second edition. *Lippincott and Raven publishers, NY, Philadelphia*, 879-928.
- Sternlicht MD, Werb Z (2001) How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**, 463-516.
- Stevenson FT, Bursten SL, Fanton C, Locksley RM, Lovett DH (1993) The 31-kDa precursor of interleukin 1 alpha is myristoylated on specific lysines within the 16-kDa N-terminal propiece. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 7245-7249.
- Stevenson FT, Turck J, Locksley RM, Lovett DH (1997) The N-terminal propiece of interleukin 1 alpha is a transforming nuclear oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 508-513.
- Stocker W, Grams F, Baumann U, Reinemer P, Gomis-Ruth FX, McKay DB, Bode W (1995) The metzincins--topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralsins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. *Protein Sci* **4**, 823-840.
- Stylianou E, Saklatvala J (1998) Interleukin-1. *Int J Biochem Cell Biol* **30**, 1075-1079.
- Sudo M, Kobayashi Y, Watanabe N (2005) Presence of a cytoplasmic retention sequence within the human interleukin-1alpha precursor. *Zoolog Sci* **22**, 891-896.

- Symons JA, Eastgate JA, Duff GW (1991) Purification and characterization of a novel soluble receptor for interleukin 1. *J Exp Med* **174**, 1251-1254.
- Tabibzadeh S (1995) Signals and molecular pathways involved in apoptosis, with special emphasis on human endometrium. *Hum Reprod Update* **1**, 303-323.
- Tabibzadeh S, Kong QF, Babaknia A, May LT (1995) Progressive rise in the expression of interleukin-6 in human endometrium during menstrual cycle is initiated during the implantation window. *Hum Reprod* **10**, 2793-2799.
- Tabibzadeh S, Sun XZ (1992) Cytokine expression in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Hum Reprod* **7**, 1214-1221.
- Takatsuna H, Kato H, *et al.* (2003) Identification of TIFA as an adapter protein that links tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) to interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase-1 (IRAK-1) in IL-1 receptor signaling. *J Biol Chem* **278**, 12144-12150.
- Tanaka T, Umesaki N, Mizuno K, Chang L, Ohtaki S, Ogita S (1998) Enhancement of apoptotic susceptibility by interleukin-1 beta in human endometrial epithelial cells. *Gynecol Endocrinol* **12**, 315-319.
- Tang YT, Hu T, Arterburn M, Boyle B, Bright JM, Emtage PC, Funk WD (2005) PAQR proteins: a novel membrane receptor family defined by an ancient 7-transmembrane pass motif. *J Mol Evol* **61**, 372-380.
- Tao XJ, Tilly KI, Maravei DV, Shifren JL, Krajewski S, Reed JC, Tilly JL, Isaacson KB (1997) Differential expression of members of the bcl-2 gene family in proliferative and secretory human endometrium: glandular epithelial cell apoptosis is associated with increased expression of bax. *J Clin Endocrinol Metab* **82**, 2738-2746.
- Tardif G, Reboul P, Dupuis M, Geng C, Duval N, Pelletier JP, Martel-Pelletier J (2001) Transforming growth factor-beta induced collagenase-3 production in human osteoarthritic chondrocytes is triggered by Smad proteins: cooperation between activator protein-1 and PEA-3 binding sites. *J Rheumatol* **28**, 1631-1639.
- Tibbetts TA, Conneely OM, O'Malley BW (1999) Progesterone via its receptor antagonizes the pro-inflammatory activity of estrogen in the mouse uterus. *Biol Reprod* **60**, 1158-1165.
- van Rietschoten JG, Verzijlbergen KF, Gringhuis SI, van der Pouw Kraan TC, Bayley JP, Wierenga EA, Jones PA, Kooter JM, Verweij CL (2006) Differentially methylated alleles in a distinct region of the human interleukin-1alpha promoter are associated with allele-specific expression of IL-1alpha in CD4+ T cells. *Blood* **108**, 2143-2149.
- Vassilev V, Pretto CM, Cornet PB, Delvaux D, Eeckhout Y, Courtoy PJ, Marbaix E, Henriët P (2005) Response of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases messenger ribonucleic acids to ovarian steroids in human endometrial explants mimics their gene- and phase-specific differential control in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* **90**, 5848-5857.
- Vekemans M (1995) Use of long-acting contraceptives. *Lancet* **346**, 1165.

- Vincenti MP, Brinckerhoff CE (2007) Signal transduction and cell-type specific regulation of matrix metalloproteinase gene expression: can MMPs be good for you? *J Cell Physiol* **213**, 355-364.
- von Wolff M, Stieger S, Lumpp K, Bucking J, Strowitzki T, Thaler CJ (2002) Endometrial interleukin-6 in vitro is not regulated directly by female steroid hormones, but by pro-inflammatory cytokines and hypoxia. *Mol Hum Reprod* **8**, 1096-1102.
- von Wolff M, Thaler CJ, Strowitzki T, Broome J, Stolz W, Tabibzadeh S (2000) Regulated expression of cytokines in human endometrium throughout the menstrual cycle: dysregulation in habitual abortion. *Mol Hum Reprod* **6**, 627-634.
- Watkins LR, Hansen MK, Nguyen KT, Lee JE, Maier SF (1999) Dynamic regulation of the proinflammatory cytokine, interleukin-1beta: molecular biology for non-molecular biologists. *Life Sci* **65**, 449-481.
- Watson JM, Lofquist AK, Rinehart CA, Olsen JC, Makarov SS, Kaufman DG, Haskill JS (1995) The intracellular IL-1 receptor antagonist alters IL-1-inducible gene expression without blocking exogenous signaling by IL-1 beta. *J Immunol* **155**, 4467-4475.
- Wehling M, Losel R (2006) Non-genomic steroid hormone effects: membrane or intracellular receptors? *J Steroid Biochem Mol Biol* **102**, 180-183.
- Werman A, Werman-Venkert R, White R, Lee JK, Werman B, Krelin Y, Voronov E, Dinarello CA, Apte RN (2004) The precursor form of IL-1alpha is an intracrine proinflammatory activator of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 2434-2439.
- Wesche H, Neumann D, Resch K, Martin MU (1996) Co-expression of mRNA for type I and type II interleukin-1 receptors and the IL-1 receptor accessory protein correlates to IL-1 responsiveness. *FEBS Lett* **391**, 104-108.
- Wessendorf JH, Garfinkel S, Zhan X, Brown S, Maciag T (1993) Identification of a nuclear localization sequence within the structure of the human interleukin-1 alpha precursor. *J Biol Chem* **268**, 22100-22104.
- West-Mays JA, Strissel KJ, Sadow PM, Fini ME (1995) Competence for collagenase gene expression by tissue fibroblasts requires activation of an interleukin 1 alpha autocrine loop. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 6768-6772.
- Widmaier E, Raff H, Strang K (2004) Physiologie humaine. Les mécanismes du fonctionnement de l'organisme. *Vander, Sherman, Luciano. Edition Maloine, Paris*, 658-687.
- Wolf JS, Chen Z, Dong G, Sunwoo JB, Bancroft CC, Capo DE, Yeh NT, Mukaida N, Van Waes C (2001) IL (interleukin)-1alpha promotes nuclear factor-kappaB and AP-1-induced IL-8 expression, cell survival, and proliferation in head and neck squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res* **7**, 1812-1820.

- Wood LC, Elias PM, Calhoun C, Tsai JC, Grunfeld C, Feingold KR (1996) Barrier disruption stimulates interleukin-1 alpha expression and release from a pre-formed pool in murine epidermis. *J Invest Dermatol* **106**, 397-403.
- Yen S (1991) The human menstrual cycle: neurocrine regulation. *Yen S and Jaffe R, eds. Reproductive endocrinology. Physiology, pathophysiology and clinical management. Third edition. Saunders W. B. Company, Philadelphia., 273-308.*
- Yin H, Morioka H, Towle CA, Vidal M, Watanabe T, Weissbach L (2001) Evidence that HAX-1 is an interleukin-1 alpha N-terminal binding protein. *Cytokine* **15**, 122-137.
- Yuan W, Varga J (2001) Transforming growth factor-beta repression of matrix metalloproteinase-1 in dermal fibroblasts involves Smad3. *J Biol Chem* **276**, 38502-38510.
- Zhang J, Salamonsen LA (2002) In vivo evidence for active matrix metalloproteinases in human endometrium supports their role in tissue breakdown at menstruation. *J Clin Endocrinol Metab* **87**, 2346-2351.
- Zucker S, Cao J, Chen WT (2000) Critical appraisal of the use of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer treatment. *Oncogene* **19**, 6642-6650.

Chapitre VII : Publications

Articles originaux avec procédure d'évaluation

Production of interleukin-1 α by human endometrial stromal cells is triggered during menses and dysfunctional bleeding and is induced in culture by epithelial interleukin-1 α released upon ovarian steroids withdrawal.

Chrystel M. Pretto, Héloïse P. Gaide Chevronnay, Patricia B. Cornet, Christine Galant, Denis Delvaux, Pierre J. Courtoy, Etienne Marbaix et Patrick Henri  t.

Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2008, 93: 4126–4134.

Response of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases messenger ribonucleic acids to ovarian steroids in human endometrial explants mimics their gene- and phase-specific differential control *in vivo*.

Vassil Vassilev, Chrystel M. Pretto, Patricia B. Cornet, Denis Delvaux, Yves Eeckhout, Pierre J. Courtoy, Etienne Marbaix et Patrick Henri  t.

Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2005, 90: 5848–5857.

Article de revue sans facteur d'impact

Régulation de l'activité des métalloprotéases matricielles dans l'endomètre humain.

Héloïse Gaide Chevronnay, Chrystel Pretto, Vassil Vassilev, Patrick Henriët et Etienne Marbaix.

Reproduction Humaine et Hormones, 2006, 16: 278-286.

Production of Interleukin-1 α by Human Endometrial Stromal Cells Is Triggered during Menses and Dysfunctional Bleeding and Is Induced in Culture by Epithelial Interleukin-1 α Released upon Ovarian Steroids Withdrawal

Chrystel M. Pretto, Héloïse P. Gaide Chevonnay, Patricia B. Cornet, Christine Galant, Denis Delvaux, Pierre J. Courtoy, Etienne Marbaix,* and Patrick Henriët*

Cell Biology Unit (C.M.P., H.P.G.C., P.B.C., D.D., P.J.C., E.M., P.H.), de Duve Institute, and Department of Pathology (P.B.C., C.G., D.D., E.M.), Université catholique de Louvain, B-1200 Bruxelles, Belgium

Context: Endometrial breakdown during menstruation and dysfunctional bleeding is triggered by the abrupt expression of matrix metalloproteinases (MMPs), including interstitial collagenase (MMP-1). The paracrine induction of MMP-1 in stromal cells via epithelium-derived IL-1 α is repressed by ovarian steroids. However, the control by estradiol (E) and progesterone (P) of endometrial IL-1 α expression and bioactivity remains unknown.

Objective and Design: Variations of endometrial IL-1 α mRNA and protein along the menstrual cycle and during dysfunctional bleeding were determined using RT-PCR, *in situ* hybridization, and immunolabeling. The mechanism of EP control was analyzed using culture of explants, laser capture microdissection, and purified cells. Data were compared with expression changes of IL-1 β and IL-1 receptor antagonist.

Results: IL-1 α is synthesized by epithelial cells throughout the cycle but E and/or P prevents its release. In contrast, endometrial stromal cells produce IL-1 α only at menses and during irregular bleeding in areas of tissue breakdown. Stromal expression of IL-1 α , like that of MMP-1, is repressed by P (alone or with E) but triggered by epithelium-derived IL-1 α released upon EP withdrawal.

Conclusions: Our experiments in cultured endometrium suggest that IL-1 α released by epithelial cells triggers the production of IL-1 α by stromal cells in a paracrine amplification loop to induce MMP-1 expression during menstruation and dysfunctional bleeding. All three steps of this amplification cascade are repressed by EP. (*J Clin Endocrinol Metab* 93: 4126–4134, 2008)

The human endometrium is a unique model of ordered tissue remodeling in the adult, resulting in periodic shedding at menstruation. Alterations in remodeling control lead to frequent and irregular hemorrhages referred to as dysfunctional bleeding. In this tissue, the global hormonal control is modulated by local regulators. Sequential exposure to the two ovarian steroids, estradiol (E) and progesterone (P), stimulates growth and differentiation required for blastocyst implantation; if no implanta-

tion occurs, the fall of ovarian steroids triggers menstruation. The proinflammatory cytokine IL-1 has emerged as a key mediator of endometrial remodeling in response to changes of ovarian steroids concentration (1). The IL-1 system comprises two major agonists secreted by nonconventional mechanisms, IL-1 α and IL-1 β , their physiological antagonist, IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra), and shared receptors, IL-1RI and IL-1RII. This system controls both implantation and menstrual tissue degradation.

0021-972X/08/\$15.00/0

Printed in U.S.A.

Copyright © 2008 by The Endocrine Society

doi: 10.1210/jc.2007-2636 Received November 28, 2007. Accepted July 9, 2008.

First Published Online July 15, 2008

* E.M. and P.H. are equal senior authors.

Abbreviations: E, Estradiol; ER, E receptor; ESC, endometrial stromal cell; IL-1Ra, IL-1 receptor antagonist; MMP, matrix metalloproteinase; P, progesterone; PR, P receptor.

The expression of matrix metalloproteinases (MMPs), including interstitial collagenase (MMP-1), is dramatically increased at the onset of menstruation (2, 3). Menstrual-like tissue lysis is reproduced in endometrial explants when deprived of ovarian steroids and is prevented by EP or MMP inhibitors (4). Several lines of evidence involve IL-1 α in menstrual MMP production by endometrial stromal cells (ESCs). First, IL-1 α stimulates MMP-1 expression by purified ESCs (5). Second, release of both IL-1 α and MMP-1 occurs early in explants from menstrual samples, but later in nonmenstrual explants cultured without EP (6). Third, menstrual MMPs first appear in foci of ESCs surrounding glands, suggesting a paracrine stimulation by epithelial cells (7). Fourth, in coculture of purified endometrial epithelial and stromal cells, secretion of collagenase by ESCs requires paracrine stimulation by epithelial cell-derived IL-1 α (6). A similar opposite control by IL-1 α (induction) and EP (repression) was reported for stromal MMP-3 (8). Fifth, MMPs and IL-1 α are both abundantly released in several pathologies of the female genital tract including dysfunctional endometrial bleeding (9, 10), endometriosis (11, 12), and tumors (13–15).

Taken together, these observations clearly suggest that regulation of IL-1 α bioavailability modulates in time and space the global hormonal control of human endometrium shedding and bleeding. However, little is known on the control of IL-1 α expression in the cycling endometrium, including its cellular origin (epithelial *vs.* stromal) and the influence of EP. Previous studies quantifying IL-1 α protein led to contradictory results (12, 16) or were limited to culture media, which do not allow discriminating between effects on gene expression and cytokine release (6).

To decipher the control of IL-1 α bioavailability in the human endometrium, IL-1 α mRNA and protein were quantified and localized throughout normal cycle and during irregular bleeding episodes. The effects of ovarian steroids were analyzed in explants. Because IL-1 α effects are influenced by competing ligands, the expression profiles of IL-1 β and IL-1Ra were compared. Striking differences in the effects of EP on epithelial and stromal IL-1 α were further analyzed in purified cell culture.

Patients and Methods

Tissues and cells

The superficial layer of human endometrium was collected by gentle scraping from hysterectomy specimens of 120 patients not treated with ovarian steroids or from biopsies of nine irregularly bleeding patients (four under hormonal treatment) after informed consent. The Ethical Committee of our university approved the study. The tissue was divided into three parts. One part was fixed in 4% formaldehyde and embedded in paraffin for histological analysis and dating along the menstrual cycle. The theoretical 28-d cycle, starting with onset of menstrual bleeding (d 1), was divided into proliferative (d 6–14), secretory (d 15–27), and menstrual (d 28–5) phases. Another part was frozen at –20 C for ELISA or at –80 C in lysis buffer (SV Total RNA Isolation System; Promega, Madison, WI) for RNA extraction. The remaining tissue was cultured as explants or purified cells.

Explants were cultured for 24 h in DMEM (Life Technologies, Merelbeke, Belgium) supplemented with 0.3 μ M 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin, alone as control vector or carrying 1 nM 17 β -estradiol and 100 nM P (EP; Sigma-Aldrich, Bornem, Belgium). In some experiments, 8 μ M cycloheximide (Sigma-Aldrich) was present throughout culture. After

culture, explants were 1) fixed or frozen as above or 2) embedded in Tissue-Tek O.C.T tissue-freezing medium (Sakura, Zoeterwoude, The Netherlands) and frozen in liquid nitrogen-cooled isopentane for laser capture microdissection.

Endometrial epithelial and stromal cells were isolated by digestion with 1 mg/ml bacterial collagenase (type IA; Sigma-Aldrich), filtration through a 300- μ m mesh, and retention (epithelial strips) or passage through a 30- μ m filter (ESCs). Both cell types were adapted to culture (see figure legends) in DMEM-F12 medium with 10% fetal bovine serum supplemented with EP, 100 U/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin (Life Technologies). Epithelial cells were further cultured for 24 h without serum and with Complete proteases inhibitors (1 tablet/50ml; Roche, Mannheim, Germany) in wells coated with 25 μ g/ml type IV collagen (Sigma-Aldrich). ESCs were further cultured for 24 h 1) with or without 100 pg/ml recombinant human IL-1 α or 2) with medium conditioned by epithelial cells, supplemented either with 5 μ g/ml mouse monoclonal antibody neutralizing IL-1 α (clone 4414,141; both from R&D Systems, Minneapolis, MN) or with 5 μ g/ml irrelevant mouse monoclonal antibody (clone RPC5; Ancell, Bayport, MN). During these last 24 h of culture, epithelial cells and ESCs were subjected to maintenance or withdrawal of E and/or P.

The presence of E receptor- α (ER α) and of both P receptor (PR) isoforms PRA and PRB was examined by immunohistochemistry in cultured explants and cells (supplementary figure 1).

mRNA quantification

Total RNA was purified and reverse transcribed as described (17). Real-time PCR was performed as reported for β -actin (3) or using the qPCR Core kit (Eurogentec, Seraing, Belgium) with a MyiQ Single-Color Real-time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA) and pairs of appropriate primers crossing over at least two exons (Life Technologies) (Table 1). After a 5-min step at 95 C, cDNA was amplified through 40 two-step cycles at 95 C and 60 C, for 30 sec each, and SYBR Green fluorescence was measured. Data were analyzed using MyiQ System Software (version 1.0.410; Bio-Rad). Purified amplicons were used as quantification standards after cloning in pCR4-TOPO vector (Life Technologies). Each PCR experiment, run in duplicate, was validated as reported (3), including a single melting temperature after progressive amplicon heating. Values were normalized to β -actin mRNA levels, which do not vary during the menstrual cycle (17).

Laser capture microdissection

Laser capture microdissection was performed on the PALM MicroBeam System (P.A.L.M. Microlaser Technologies, Bernried, Germany) as described (18). Typically, 20 slides were prepared per sample and about 50 microdissected glands or ESC foci were pooled separately. Extracted RNA was linearly amplified with the two-cycle amplification kit (Affymetrix, Santa Clara, CA), and 400 ng resulting cRNA was reverse transcribed with Thermoscript RT-PCR System (Life Technologies) using 3 μ M forward primers for β -actin 2, IL-1 α , IL-1 β , and IL-1Ra (Table 1).

Protein and DNA quantification

Tissue samples, explants, and cells were homogenized in PBS containing 1% Tween 20 (PBS-Tween; Merck, Darmstadt, Germany). Total protein amounts were measured using bicinchoninic acid (Sigma), and DNA content was measured by spectrophotometry at 460 nm in the presence of 0.5 μ g/ml diamino-2-phenyl-indole (Sigma). Concentrations of IL-1 α , IL-1 β , and IL-1Ra were measured by ELISA using Quantikine Immunoassays (R&D Systems). For controlled extracellular proteolysis experiments, explants were incubated with a protease mixture (9 mg/ml Liberase Blendzyme 4; Roche) at 37 C for 30 min, after which proteolysis-resistant material was collected by centrifugation, washed, and homogenized in PBS-Tween supplemented with the Complete proteases inhibitors at 4-fold the recommended concentration. To assess cell integrity, the 20S proteasome subunit was quantified by ELISA (19).

TABLE 1. List of oligonucleotide sequences

	Sequence
Primers for quantitative PCR	
IL-1 α	
Forward	5'-TTCGAGCCAATGATCAGTACC-3'
Reverse	5'-AGCACCCATGTCAAATTTC-3'
IL-1 β	
Forward	5'-ACCTGTCCTGCGTGTGAAAG-3'
Reverse	5'-ATGTACCAGTTGGGGAAGT-3'
IL-1Ra	
Forward	5'-CTCATGCTCTGTTCTTGGGAAT-3'
Reverse	5'-AGGTCAGTGATGTAACAGCCTC-3'
β -Actin	
Forward	5'-AGCCTCGCCTTTGCCGA-3'
Reverse	5'-TCAGCCCTGGTGCCCTG-3'
TaqMan probe	5'-FAM-CCGCCGCCCGTCCACACCCGCC-TAMRA-3'
Primers for quantitative PCR of microdissected samples	
β -Actin 2	
Forward	5'-GCTTGACTCAGGATTTAAAACTGG-3'
Reverse	5'-GGGACTTCCTGTAAACAATGCATCTC-3'
Probes for IL-1 α mRNA <i>in situ</i> hybridization: antisense ^a	5'-GAACATTATATGTTAGTGTGGTTCAACTCTTACAAAGAGTG-3'

^aThe control sense probe contained the antiparallel sequence.

Histological analysis

Immunostaining was performed by indirect peroxidase detection, as described (20), using mouse anti-IL-1 α (clone 4414,141; 3.3 μ g/ml), anticytokeratins (clones AE1/AE3, 1.5 μ g/ml; DakoCytomation, Glostrup, Denmark) or nonrelevant mouse antibody, clone E13 (Argene Biosoft, Varhiles, France) or clone RPC5, as negative control. For cell type identification, serial sections were double immunolabeled for IL-1 α (as above) and for CD10 (clone 56C6, 2 μ g/ml; Biocare Medical, Concord, CA), CD45 (clones PD7/26 and 2B11, 1 μ g/ml; DakoCytomation), CD56 (clone 1B6, 0.9 μ g/ml; Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK) or CD68 (clone PG-M1, 5 μ g/ml; DakoCytomation) using alkaline phosphatase-coupled secondary antibody as described (20). Collagen fibers were stained with silver (4). *In situ* hybridization of IL-1 α mRNA was performed as reported (3), using oligonucleotides described in Table 1. Hybridization temperature was adjusted to 40 C. The absence of signal using a control sense probe was verified in every experiment.

Statistical analyses

Statistical significance was tested using Kruskal-Wallis ANOVA followed by Wilcoxon two-sample or matched-pair test, as appropriate. Differences were considered significant for $P < 0.05$.

Results

Quantification of IL-1 α , IL-1 β , and IL-1Ra in the cycling human endometrium and cultured explants

IL-1 α , IL-1 β , and IL-1Ra mRNA was measured by real-time RT-PCR and normalized to β -actin mRNA (3, 17, 20) in 78 endometrial samples collected throughout the menstrual cycle (Fig. 1, A, E, and I). Corresponding proteins were quantified in 39 of these and 15 other samples (Fig. 1, C, G, and K). mRNAs and proteins were detected in all samples, except for IL-1 β protein, which was below detection limit in eight of 24 secretory and nine of 19 proliferative endometria, despite similar ELISA sensitivity for both IL-1R agonists.

All profiles in the cycling human endometrium were comparable, with highest average levels at menstrual phase. Kruskal-

Wallis test revealed changes in the mRNA levels of all three cytokines and in IL-1 α protein. *Post hoc* Wilcoxon test confirmed a moderate increase from secretory to menstrual phase for IL-1 α mRNA (2.7-fold) and IL-1Ra mRNA (4.3-fold) and significant decrease from menstrual to proliferative phase (between 2.3- and 20-fold) for the three mRNAs and IL-1 α protein. IL-1 β mRNA increased from proliferative to secretory phase (5.6-fold).

Altogether, changes along the menstrual cycle were thus moderate, arguing against a major global control by ovarian steroids. This was tested by culturing explants from 10 secretory and 10 proliferative endometria with or without combined EP for 24 h. In the absence of EP, IL-1 α and IL-1 β amounts increased upon culture to reach values in the upper range of, or even above, corresponding noncultured samples (Fig. 1, B, D, F, and H), but IL-1Ra was comparable before and after culture (Fig. 1, J and L). EP addition slightly inhibited ($\sim$ 2-fold) the increase of IL-1 α protein and IL-1 β mRNA and protein in proliferative cultures. Thus, both *in vivo* and *ex vivo* data indicated that ovarian steroids are global minor repressors of IL-1 α and IL-1 β expression in total endometrial tissues.

Differential control of IL-1 α expression by ovarian steroids in epithelial and stromal cells

To identify cell-type-specific control of IL-1 α and IL-1 β expression, glands and stroma were separated by laser capture microdissection from three proliferative explant cultures and analyzed by quantitative RT-PCR (Fig. 1, M–O). In the absence of hormones, mRNA amounts of IL-1 α and IL-1Ra were comparable in stroma and glands, but those of IL-1 β were much lower in glands (>25 -fold), reaching the limit of detection. EP strongly repressed IL-1 α mRNA in the stroma ($\sim$ 14-fold) but not in glands. IL-1Ra mRNA was at similar levels in both cell types, without consistent regulation by EP.

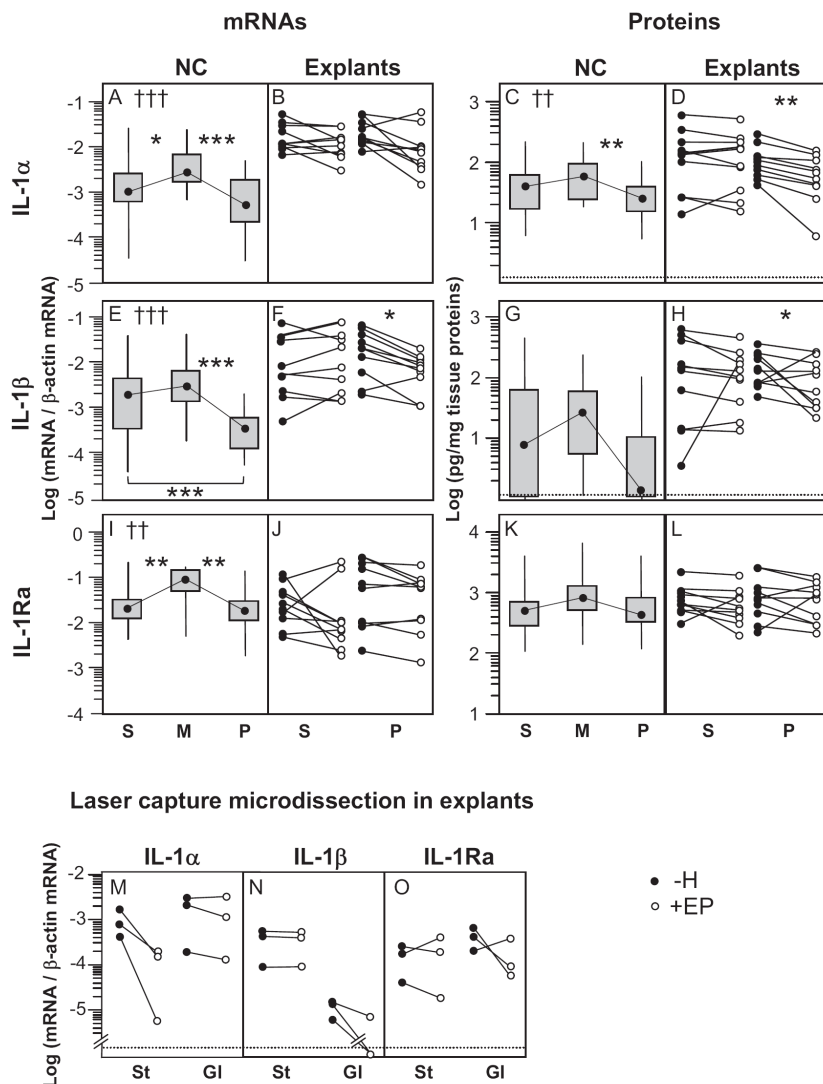


FIG. 1. Variations of IL-1 α , IL-1 β , and IL-1Ra mRNA and protein amounts in the cycling human endometrium, effects of EP addition in explants, and differential expression by stroma and glands. Expression of IL-1 α (A–D and M), IL-1 β (E–H and N), and IL-1Ra (I–L and O) was examined in human endometrial samples collected at the different phases of the menstrual cycle (A, C, E, G, I, and K) and in explants cultured for 24 h in the absence (●) or presence (○) of 1 nM E and 100 nM P (EP) (B, D, F, H, J, and L–O). A–L, Amounts of target mRNAs (A, B, E, F, I, and J) and proteins (C, D, G, H, K, and L) were measured in total lysates, normalized to β -actin mRNA and total proteins, respectively, and presented on logarithmic scales. Noncultured (NC) endometria [for mRNA and proteins: 35 and 24 from secretory phase (S); 15 and 11 from menstrual phase (M), and 28 and 19 from proliferative phase (P)] are presented as box plots showing 25th and 75th percentiles, medians (dots), and minimal and maximal values (vertical bars). For Kruskal-Wallis test: ††, $P < 0.005$; †††, $P < 0.001$; for Wilcoxon tests: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.005$; ***, $P < 0.001$. M–O, Explants from three proliferative endometria were microdissected to isolate stromal areas (St) or glands (Gl) after 24 h of culture in the absence (●) or presence (○) of EP. Amounts of target mRNAs were measured, normalized, and presented as for total explants. Dotted line, detection threshold.

Localization of IL-1 α mRNA and protein in the cycling endometrium and during dysfunctional bleeding

Cellular origin and cell-type-specific control of IL-1 α expression were further explored in noncultured endometria by *in situ* hybridization (Fig. 2, A–D) and immunohistochemistry (Fig. 2, E–H). IL-1 α mRNA and protein were detected in epithelial cells of all samples, irrespective of the cycle phase. In contrast, the stromal compartment showed no signal during proliferative and secretory phases but was strongly and diffusely labeled in all menstrual samples. Immunohistochemical identification of

ESCs clearly indicated that most IL-1 α -producing cells were fibroblasts (Fig. 2, I–L), but contribution by hematopoietic cells could not be excluded.

Because increased IL-1 α release was previously observed during dysfunctional endometrial bleeding (9), we also immunolocalized IL-1 α in biopsies collected during irregular bleeding episodes from nine patients. Silver staining allowed us to distinguish preserved (Fig. 2M) and degraded areas (Fig. 2O). Contrasting with comparable epithelial staining in preserved and degraded areas, a strong menstrual-like IL-1 α signal was detected in degraded stromal areas of all samples tested (Fig. 2P) but was absent in adjacent preserved areas (Fig. 2N).

Ovarian steroids not only repress IL-1 α expression by ESCs but also prevent IL-1 α release by epithelial cells

The hypothesis that cyclic changes in ovarian steroids are responsible for the cell-type-specific control of IL-1 α was addressed by explant cultures (Fig. 3, A–D). As in noncultured samples, epithelial cells were stained for both IL-1 α mRNA and protein in all explants, irrespective of hormone addition. By contrast, and in agreement with results on microdissected explants, IL-1 α mRNA and protein labeling in ESCs was weak or undetectable in explants cultured with EP but was strong in explants cultured without EP. To address whether EP could regulate epithelial IL-1 α bioavailability by controlling its release into the extracellular space, nonmenstrual explants were cultured in the presence of the translation inhibitor cycloheximide so as to block IL-1 α synthesis and restrict the analysis to the fate of IL-1 α present in cells before culture (Fig. 3, E–J). Epithelial IL-1 α immunostaining was preserved when EP were combined with cycloheximide (Fig. 3E) but totally disappeared in explants cultured with cycloheximide alone (Fig. 3F), suggesting that IL-1 α was released and/or degraded in the absence of hormones. Excellent preservation of cytokeratin staining argued against damage of epithelial cells by these treatments (Fig. 3, G and H). Surprisingly, in remarkable contrast with immunostaining, total IL-1 α contents measured by ELISA in lysates of cycloheximide-treated explants were identical regardless of EP addition (Fig. 3I). Moreover, IL-1 α amounts measured in conditioned media (not shown) did not increase in the absence of EP (both means = 1.1% of IL-1 α assayed in tissue; $n = 11$).

These data suggested inadequate retention or insufficient detection of extracellular IL-1 α when using immunohistochemistry. To further discriminate between intracellular and extracellular IL-1 α , extracellular matrix and mingled proteins were degraded by subjecting explants to limited protease digestion after their culture in the presence of cycloheximide with or without EP. Amounts of preserved IL-1 α protein were measured, normalized to a cytosolic protein (the 20S proteasome subunit) to correct for cell damage by proteolysis, and compared with values in lysates of nonproteolysed explants (Fig. 3J). Although IL-1 α /20S proteasome ratios were similar in total lysates and protease-resistant fractions when explants were cultured in the presence of EP, thus faithfully reflecting intracellular IL-1 α , no detectable IL-1 α was recovered after limited proteolysis of explants cultured without EP, despite comparable levels of the 20S proteasome reference. Taken together, this set of experimental evidence indicated that EP prevent IL-1 α release from endometrial epithelial cells.

Ovarian steroids withdrawal triggers IL-1 α release by purified epithelial cells

To directly address whether EP withdrawal induces IL-1 α release, purified endometrial epithelial cells were adapted to culture with EP and then further cultured for 24 h with EP or after withdrawal of E, P, or both. Inhibitors of proteases were added to the medium to prevent degradation of released IL-1 α . Responses to hormonal modifications were consistent despite large variations between cultures in IL-1 α mRNA and protein amounts (see range in legend to Fig. 4), which prompted us to normalize data to a reference condition. Complete or selective hormone withdrawal did not change IL-1 α mRNA (Fig. 4A) or total (cells plus medium) IL-1 α protein amounts (Fig. 4B). In striking contrast, removal of both E and P induced a major release of IL-1 α from epithelial cells (13-fold increase; Fig. 4B). Either E or P was sufficient to prevent this release.

Induction of stromal IL-1 α production by epithelium-derived IL-1 α

We finally examined whether IL-1 α released from epithelial cells was responsible for the induction of

IL-1 α expression by ESCs, initiating an amplification loop that would increase MMP production. First, purified ESCs were adapted for 8 d to culture with EP and then subjected for 24 h to withdrawal of E and/or P, with or without addition of recombinant IL-1 α (Fig. 4C). Although EP withdrawal alone caused no significant change in IL-1 α mRNA amounts, combination with IL-1 α addition increased median IL-1 α mRNA levels by 2.7-fold. A similar increase was observed when maintaining E but not P (alone or combined with E). To further determine whether epithelium-derived IL-1 α could actually induce such IL-1 α amplification, ESCs adapted in the presence of EP were further cultured for 24 h with medium conditioned by EP-deprived epithelial cells (containing ~15 pg/ml IL-1 α). Just before addition to ESCs, this medium was supplemented or not with combined or separated E and P or with anti-IL-1 α blocking antibody (Fig. 4, D and E). A median 4.7-fold increase in IL-1 α mRNA levels was measured when the conditioned medium was not supplemented with EP (Fig. 4D). This increase was totally blocked by P alone but was not affected by E alone. Addition of anti-IL-1 α blocking antibody prevented this response almost to the same extent as EP maintenance. These effects were paralleled by changes in MMP-1 expression (Fig. 4E): median MMP-1 mRNA levels in ESCs increased by 7-fold by omit-

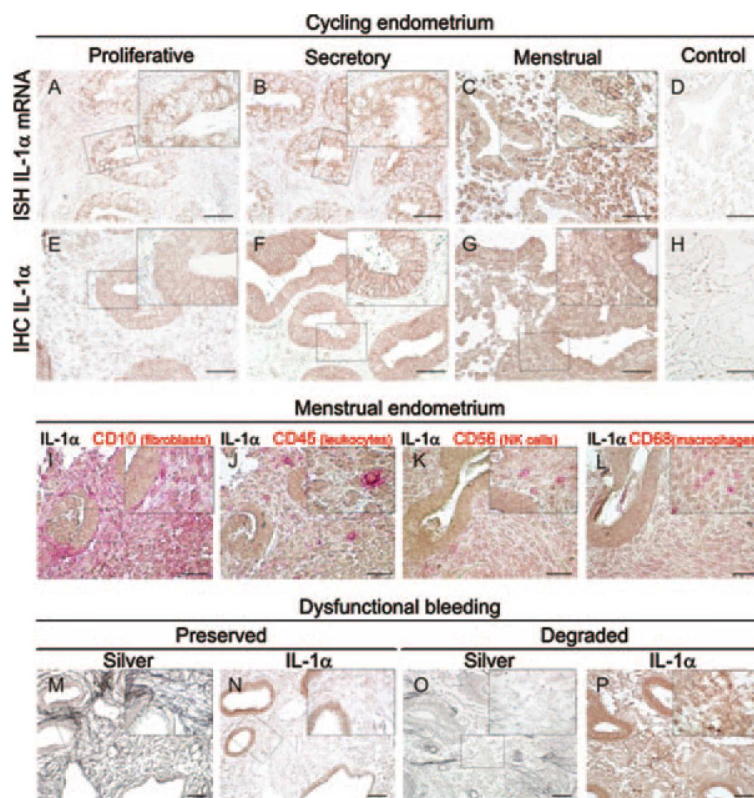


FIG. 2. Cellular localization of IL-1 α mRNA and protein in the cycling human endometrium and during dysfunctional bleeding. Endometrial samples were collected throughout the proliferative (A and E, $n = 10$), secretory (B and F, $n = 15$), and menstrual (C, D, and G–L, $n = 10$) phases or during dysfunctional bleeding episodes (M–P, $n = 9$). Representative patterns of *in situ* hybridization (ISH) of IL-1 α mRNA (A–C) and immunohistochemical localization (IHC) of IL-1 α protein (E–G, I–L, N, and P) are presented. Corresponding negative controls on sections adjacent to C and G are shown in D and H, respectively. Semiserial sections of another menstrual endometrium (representative of three) were double immunostained for IL-1 α (brown signal) and (red signal) CD10 (I, fibroblasts), CD45 (J, leukocytes), CD56 (K, NK cells), or CD68 (L, macrophages). In M–P, one section from a representative dysfunctional bleeding endometrium was silver stained to show neighboring preserved (M) and degraded (O) areas, and the adjacent section was analyzed by IL-1 α IHC (N and P, respectively). All insets show 4-fold higher magnifications of boxed areas (except in K and L, which are other fields of the same sections). Bars, 50 μ m.

ting EP in the conditioned medium. This increase was abrogated by anti-IL-1 α blocking antibody and inhibited to a large extent by P alone but not by E alone.

Discussion

The three IL-1R ligands, IL-1 α , IL-1 β , and IL-1Ra, are well expressed in the cycling human endometrium, except IL-1 β protein, which was below detection level in 40% of nonmenstrual endometria. Altogether, IL-1Ra is about 10-fold more abundant than IL-1 α and IL-1 β . Furthermore, IL-1Ra shows a 3- to 10-fold higher affinity for IL-1RI than IL-1 α and IL-1 β and efficiently blocks IL-1 activity *in vitro* (21). Hence, the system seems under tight control. However, up to 100- to 1000-fold excess of IL-1Ra is required to suppress the bioactivity of IL-1 agonists during disease (22). Thus, the local control of IL-1 activity by IL-1Ra remains to be clarified.

Although the three IL-1R ligands peak at menses, differences with the other phases and global effects of EP addition in explant cultures are modest as compared with other mediators of endometrium remodeling, such as LEFTY-A/Endometrial Bleeding-Associated Factor, or effectors such as MMP-1 and MMP-3 (3, 17). However, further discrimination of the two major cellular compartments by laser capture microdissection, which confirms preferential IL-1 β expression by endometrial stroma compared with glands (23), evidences an ESC-specific control by EP for IL-1 α , but not for IL-1 β or IL-1Ra expression. Preferential linear amplification of the 3'-end of mRNAs likely explains the approximately 100-fold lower mRNA levels detected in microdissected compartments compared with total extracts. *In situ* hybridization and immunolocalization further demonstrate that IL-1 α expression in ESCs is repressed during the proliferative and secretory phases but induced at menses as well as in breaking-down areas during dysfunctional bleeding episodes. Thus, differential IL-1 α expression in ESCs was masked in total tissue analyses, due to EP-insensitive IL-1 α contribution by epithelial cells. To the best of our knowledge, a differential regulation of IL-1 α expression in two major compartments of a given tissue has not been previously reported. Although IL-1 α belongs to a family of cytokines produced by immune cells (21), it is essentially expressed by resident cells in the endometrium. Our data do not exclude that hematopoietic cells infiltrating the endometrium at the late secretory phase may release IL-1 α , but the abundant ESCs that produce IL-1 α during menstruation and

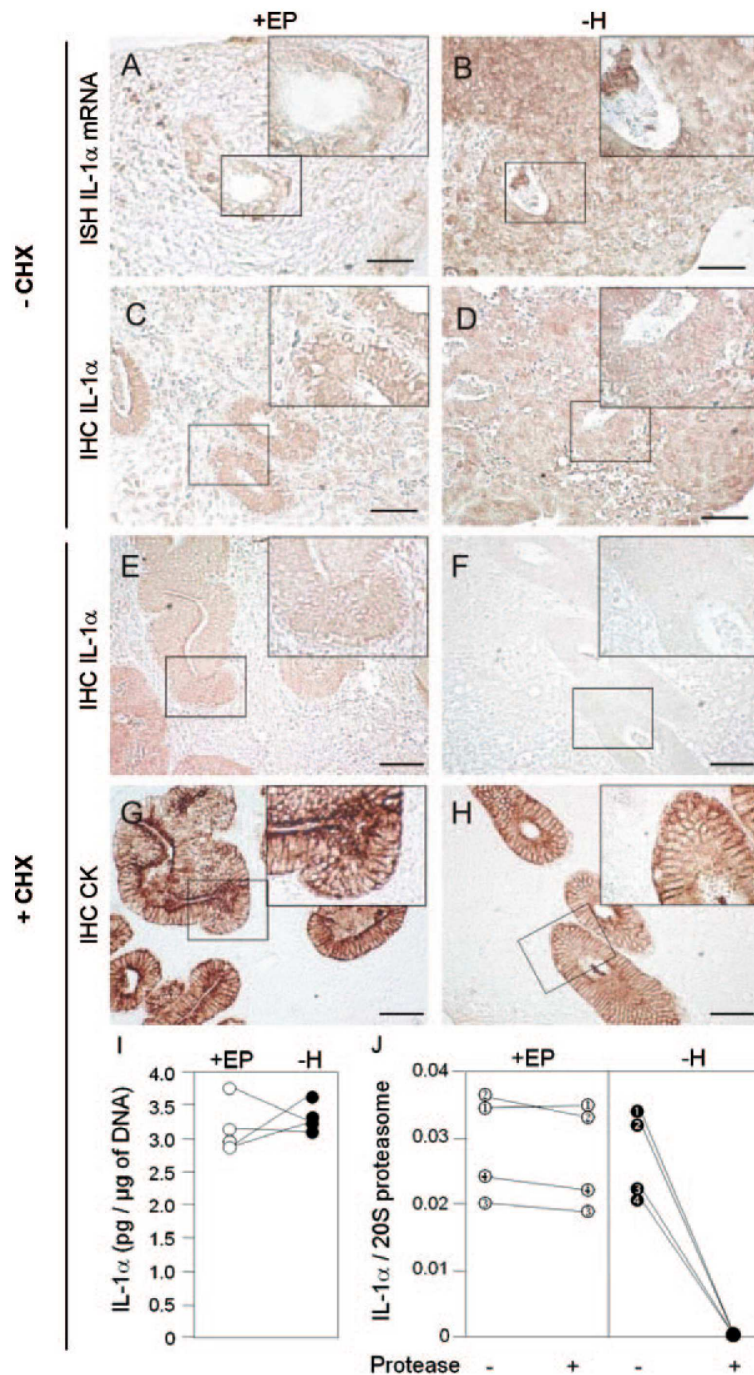


FIG. 3. Localization of IL-1 α mRNA and protein in cultured explants and differential effects of EP on epithelial and stromal IL-1 α . A–H, Localization of IL-1 α . Representative fields of *in situ* hybridization (ISH) of IL-1 α mRNA (A and B, $n = 2$ proliferative and 4 secretory) and immunohistochemical localization (IHC) of IL-1 α (C–F, $n = 5$ proliferative and 7 secretory) or cytokeratins (CK; in G and H, adjacent sections to E and F) in endometrial explants cultured for 24 h with (A, C, E, and G) or without EP (B, D, F, and H) and in the absence (A–D) or presence (E–H) of 8 μ M cycloheximide (CHX). All insets show 4-fold higher magnifications of the boxed areas. Bars, 50 μ m. I–J, IL-1 α ELISA. Nonmenstrual explants were cultured in the presence of cycloheximide, with (○) or without (●) EP as in E and F. In I, IL-1 α was immunoassayed in explant lysates, and values were normalized according to DNA amounts. In J, half of the explants were subjected to limited protease digestion at the end of culture (+). IL-1 α was immunoassayed in their protease-resistant fraction and compared with lysates of nondigested explants (–), after normalization to the 20S proteasome subunit in the same samples to correct for proteolysis-induced cell damages.

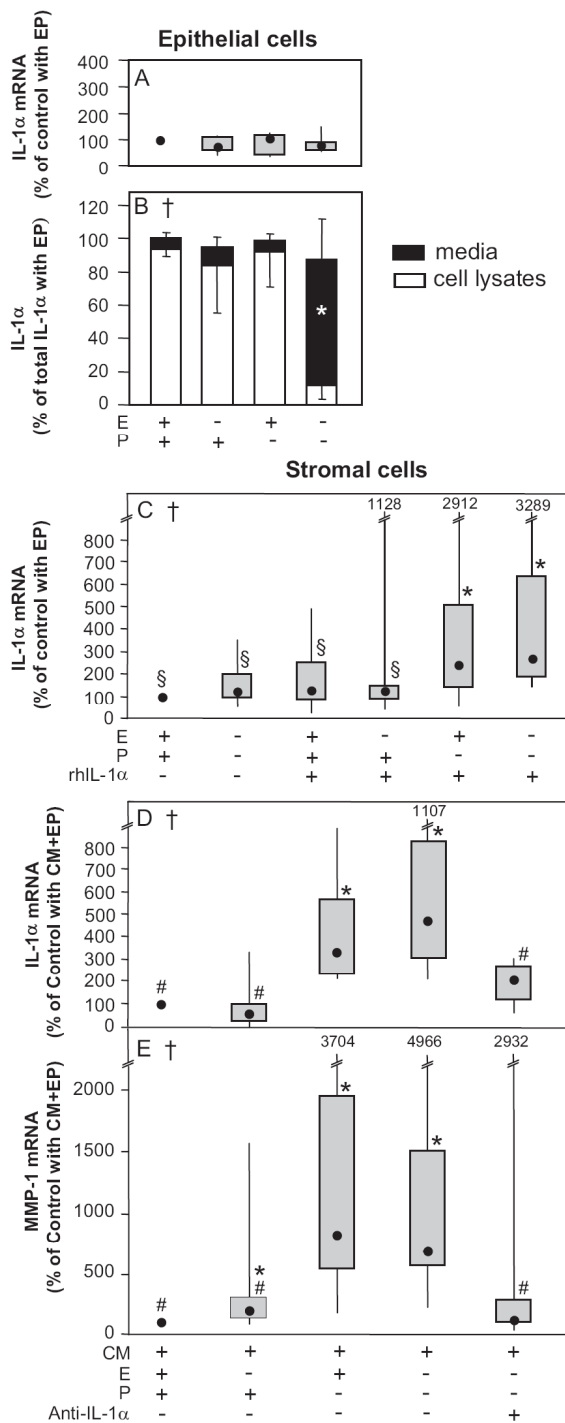


FIG. 4. Regulation of IL-1 α in purified epithelial and stromal cells. A and B, Purified epithelial cells ($n = 5$) were first cultured for 3 d in the presence of EP and then further cultured for 24 h with proteases inhibitors and with EP, P, E, or without ovarian steroids. In A, IL-1 α mRNA amounts were measured, normalized to β -actin mRNA, and compared with controls with EP. Relative to β -actin mRNA, IL-1 α mRNA amounts in the control condition ranged from 2×10^{-3} to 2×10^{-2} . Data (percentage of the control with EP) are presented as box plots showing 25th and 75th percentiles and medians (dots) together with minimal and maximal values (vertical bars). In B, amounts of IL-1 α were measured by ELISA in cell lysates (open areas) or conditioned media (filled areas) and are presented as percentages (means $\pm$ sd) of total IL-1 α content (cells plus medium) in cultures with EP (corresponding to 12–84 pg IL-1 α /μg DNA). C–E, Purified ESCs ($n = 7$) were first cultured for 8 d in the presence of EP. In C, cells were further cultured for 24 h with or without 100 pg/ml recombinant human IL-1 α

dysfunctional bleeding best overlap with labeling for a fibroblastic marker.

The second major finding is that IL-1 α expression by ESCs is turned on by epithelial cell-derived IL-1 α released upon EP withdrawal. This observation is fully compatible with, but calls for an elaboration of, our previous model of dual repression by EP of IL-1 α -mediated endometrial breakdown: EP blocking both IL-1 α production and MMP-1 expression by IL-1 α -stimulated fibroblasts (6). Although *in vivo* demonstration is still required, we now further suggest that MMP-1 is actually under a triple control (Fig. 5). Before menstruation, EP protect tissue against proteolysis by blocking altogether epithelial IL-1 α release, fibroblastic IL-1 α expression, and MMP-1 production. Conversely, upon EP withdrawal, paracrine induction of stromal MMP-1 expression by epithelial-derived IL-1 α is amplified through a paracrine and possibly autocrine stromal IL-1 α loop (24, 25), resulting in rapid expansion of tissue breakdown at menstruation and dysfunctional bleeding episodes.

Although the role of constitutive IL-1 α synthesis by epithelial cells during nonmenstrual phases of the cycle is unclear, intracellular IL-1 α accumulation during the secretory phase could provide a powerful and rapid mechanism to initiate menstrual response by preparing its release upon EP withdrawal, an effect amplified by an autocrine loop by ESCs. Release of preexisting IL-1 α pools is rarely considered but was observed upon barrier disruption in murine epidermis (26). IL-1 α release could result from apoptosis (27), which occurs in late secretory and menstrual endometrium, when ovarian steroids concentration decreases (28). Like in endometrium, skin epithelial cells (keratinocytes) constitutively express IL-1 α (29). However, release is restricted to wound healing (30) and initiation of local inflammation (31). As for ESCs, IL-1 α is not expressed in skin fibroblasts except during systemic sclerosis (32).

The mechanisms underlying differential regulation of IL-1 α expression in epithelial and stromal cells are not clear yet. E and P regulate gene expression by cognate nuclear receptors, ERs and PRs, or through nongenomic mechanisms (33). Although variations of endometrial expression of the nuclear receptors along the menstrual cycle have been reported (34, 35), we could detect ER α and PRs in glands and ESCs as well as in purified cells of both types, suggesting that these nuclear receptors are responsible for the hormonal control of IL-1 α synthesis and/or release. Although withdrawal of both steroids was required for IL-1 α release by epithelial cells, P, but not E, was sufficient to block the increase in IL-1 α expression by ESCs due to recombinant IL-1 α or induced by medium conditioned by epithelial cells. Subtle

and with or without E and/or P. Alternatively, in D and E, cells were further cultured for 24 h with medium conditioned by purified epithelial cells cultured without EP for 3 d (CM). Before addition to ESCs, this medium was supplemented with a blocking anti-IL-1 α antibody (anti-IL-1 α +) or an irrelevant antibody for negative control (anti-IL-1 α -) and with or without E and/or P. At the end of the culture, IL-1 α (C and D) and MMP-1 (E) mRNAs were measured, normalized, and presented as in A, with out-of-range maxima indicated as numbers. In the control (100%) conditions, relative IL-1 α mRNA amounts ranged from 3×10^{-4} to 7×10^{-3} in C and from 1×10^{-4} to 2×10^{-2} in D, and relative MMP-1 mRNA amounts ranged from 3×10^{-3} to 2×10^{-1} in E. For Kruskal-Wallis test: †, $P < 0.05$; for Wilcoxon test: *, $P < 0.05$, compared with condition with EP (without recombinant IL-1 α in C); §, $P < 0.05$, compared with condition with rIL-1 α alone; #, $P < 0.05$, compared with condition with CM alone.

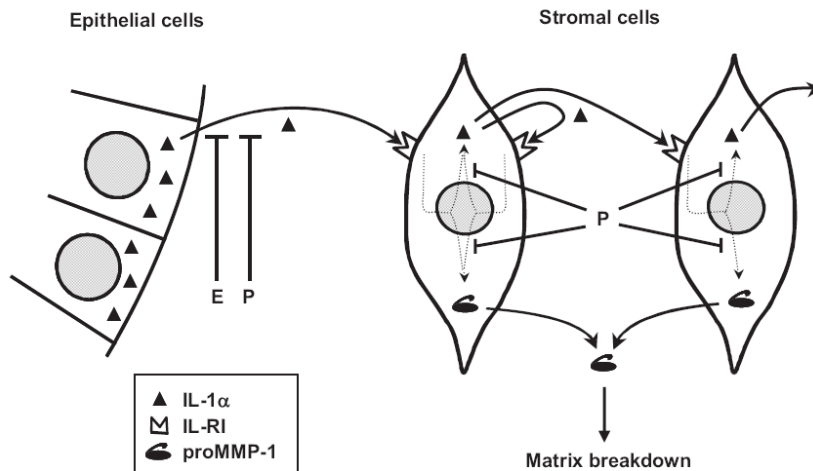


FIG. 5. Proposed model of the three-step cascade leading to pro-MMP-1 expression in the bleeding human endometrium through regulation of IL-1 α and of its control by ovarian steroids. First, upon withdrawal of both E and P, epithelial cells release constitutively expressed IL-1 α . Second, epithelial-derived IL-1 α triggers stromal IL-1 α expression that further induces a paracrine and possibly autocrine amplification loop of stromal IL-1 α production. Third, IL-1 α induces pro-MMP-1 expression by stromal cells. The release of epithelial IL-1 α is inhibited either by E or P, whereas only P, alone or combined with E, blocks stromal expression of both IL-1 α and pro-MMP-1.

differences in the relative ratios of ER and PR isoforms could explain this differential response (34–36). Additional experiments addressing variations of stimulatory signals and IL-1 α mRNA stability are necessary to clarify the underlying mechanisms (37). In conclusion, our data demonstrate that two populations of resident endometrial cells, epithelial and stromal cells, both play an important role in the production of IL-1 α that triggers MMP-1 expression and tissue breakdown, not only at menses but also during dysfunctional bleeding episodes. Moreover, a paracrine amplification loop emerges as a potent mechanism to spread signaling leading to tissue breakdown. These data open new perspectives for therapies targeting IL-1 α bioactivity, as illustrated by the successful use of recombinant IL-1Ra in rheumatoid arthritis (38). A better understanding of the mechanisms underlying differential IL-1 α expression by epithelial and stromal cells and controlling its release deserves further attention.

Acknowledgments

We thank Drs. J. Donnez, B. Vandermeersch, and J.-C. Verougstraete and their colleagues for providing endometrial tissues; Drs. Y. Guiot, B. Guillaume, and B. Van den Eynde for providing access to laser capture microdissection or proteasome assay; and P. Camby, D. Dubois, M. Stevens, and Y. Marchand for technical help and secretarial assistance.

Address all correspondence and requests for reprints to: Patrick Henriët, CELL Unit, de Duve Institute, UCL-75.41, 75 avenue Hippocrate, B-1200 Bruxelles, Belgium. E-mail: patrick.henriet@uclouvain.be.

This work was supported by Fonds Spécial de Recherche de Université catholique de Louvain; Fonds de la Recherche Scientifique Médicale; Concerted Research Actions, Communauté Française de Belgique; and Interuniversity Attraction Poles Program. P.H. is Research Associate and P.B.C. was Research Fellow at the Fonds de la Recherche Scientifique (FNRS/F.R.S.). C.M.P. and H.P.G.C. are recipients of fellowships from the Fonds pour la Formation à la Recherche dans l'Industrie et dans l'Agriculture (FRIA).

Disclosure Statement: All authors have nothing to declare.

References

- Kelly RW, King AE, Critchley HO 2001 Cytokine control in human endometrium. *Reproduction* 121: 3–19
- Goffin F, Munaut C, Frankenne F, Perrier D'Hauterive S, Beliard A, Fridman V, Nervo P, Colige A, Foidart JM 2003 Expression pattern of metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix-metalloproteinases in cycling human endometrium. *Biol Reprod* 69:976–984
- Vassilev V, Pretto CM, Cornet PB, Delvaux D, Eeckhout Y, Courtoy PJ, Marbaix E, Henriët P 2005 Response of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases messenger ribonucleic acids to ovarian steroids in human endometrial explants mimics their gene- and phase-specific differential control *in vivo*. *J Clin Endocrinol Metab* 90:5848–5857
- Marbaix E, Kokorine I, Moulin P, Donnez J, Eeckhout Y, Courtoy PJ 1996 Menstrual breakdown of human endometrium can be mimicked in vitro and is selectively and reversibly blocked by inhibitors of matrix metalloproteinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:9120–9125
- Rawdanowicz TJ, Hampton AL, Nagase H, Woolley DE, Salmons LA 1994 Matrix metalloproteinase production by cultured human endometrial stromal cells: identification of interstitial collagenase, gelatinase-A, gelatinase-B, and stromelysin-1 and their differential regulation by interleukin-1 α and tumor necrosis factor- α . *J Clin Endocrinol Metab* 79:530–536
- Singer CF, Marbaix E, Kokorine I, Lemoine P, Donnez J, Eeckhout Y, Courtoy PJ 1997 Paracrine stimulation of interstitial collagenase (MMP-1) in the human endometrium by interleukin 1 α and its dual block by ovarian steroids. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:10341–10345
- Kokorine I, Marbaix E, Henriët P, Okada Y, Donnez J, Eeckhout Y, Courtoy PJ 1996 Focal cellular origin and regulation of interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-1) are related to menstrual breakdown in the human endometrium. *J Cell Sci* 109:2151–2160
- Keller NR, Sierra-Rivera E, Eisenberg E, Osteen KG 2000 Progesterone exposure prevents matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) stimulation by interleukin-1 α in human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 1611–1619
- Galant C, Vekemans M, Lemoine P, Kokorine I, Twagirayezu P, Henriët P, Picquet C, Rigot V, Eeckhout Y, Courtoy PJ, Marbaix E 2000 Temporal and spatial association of matrix metalloproteinases with focal endometrial breakdown and bleeding upon progestin-only contraception. *J Clin Endocrinol Metab* 85:4827–4834
- Galant C, Berliere M, Dubois D, Verougstraete JC, Charles A, Lemoine P, Kokorine I, Eeckhout Y, Courtoy PJ, Marbaix E 2004 Focal expression and final activity of matrix metalloproteinases may explain irregular dysfunctional endometrial bleeding. *Am J Pathol* 165:83–94
- Sillem M, Prifti S, Koch A, Neher M, Jauckus J, Runnebaum B 2001 Regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors in uterine endometrial cells of patients with and without endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 95:167–174
- Hudelist G, Lass H, Keckstein J, Walter I, Wieser F, Wenzl R, Mueller R, Czerwenka K, Kubista E, Singer CF 2005 Interleukin 1 α and tissue-lytic matrix metalloproteinase-1 are elevated in ectopic endometrium of patients with endometriosis. *Hum Reprod* 20:1695–1701
- Pantschenko AG, Pushkar I, Miller LJ, Wang YP, Anderson K, Peled Z, Kurtzman SH, Kreutzer DL 2003 In vitro demonstration of breast cancer tumor cell sub-populations based on interleukin-1/tumor necrosis factor induction of interleukin-8 expression. *Oncol Rep* 10:1011–1017
- Singer CF, Kronsteiner N, Marton E, Walter I, Kubista M, Czerwenka K, Schreiber M, Tschugguel W, Wieser F, Kubista E 2002 Interleukin-1 system and sex steroid receptor gene expression in human endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 85:423–430
- Loffek S, Zigrino P, Angel P, Anwald B, Krieg T, Mauch C 2005 High invasive melanoma cells induce matrix metalloproteinase-1 synthesis in fibroblasts by interleukin-1 α and basic fibroblast growth factor-mediated mechanisms. *J Invest Dermatol* 124:638–643

16. Tabibzadeh S, Sun XZ 1992 Cytokine expression in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Hum Reprod* 7:1214–1221
17. Cornet PB, Picquet C, Lemoine P, Osteen KG, Bruner-Tran KL, Tabibzadeh S, Courtoy PJ, Eeckhout Y, Marbaix E, Henriot P 2002 Regulation and function of LEFTY-A/EBAF in the human endometrium. mRNA expression during the menstrual cycle, control by progesterone, and effect on matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 277:42496–42504
18. Gaide Chevonnay HP, Cornet PB, Delvaux D, Lemoine P, Courtoy PJ, Henriot P, Marbaix E 2008 Opposite regulation of transforming growth factors- β 2 and - β 3 expression in the human endometrium. *Endocrinology* 149:1015–1025
19. Schultz ES, Chapiro J, Jurquin C, Claverol S, Burlet-Schiltz O, Warnier G, Russo V, Morel S, Levy F, Boon T, Van den Eynde BJ, van der Bruggen P 2002 The production of a new MAGE-3 peptide presented to cytolytic T lymphocytes by HLA-B40 requires the immunoproteasome. *J Exp Med* 195:391–399
20. Cornet PB, Galant C, Eeckhout Y, Courtoy PJ, Marbaix E, Henriot P 2005 Regulation of matrix metalloproteinase-9/gelatinase B expression and activation by ovarian steroids and LEFTY-A/endometrial bleeding-associated factor in the human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 90:1001–1011
21. Dinarello CA 1996 Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 87:2095–2147
22. Arend WP, Welgus HG, Thompson RC, Eisenberg SP 1990 Biological properties of recombinant human monocyte-derived interleukin 1 receptor antagonist. *J Clin Invest* 85:1694–1697
23. Simon C, Piquette GN, Frances A, Polan ML 1993 Localization of interleukin-1 type I receptor and interleukin-1 β in human endometrium throughout the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 77:549–555
24. Dinarello CA, Ikejima T, Warner SJ, Orencole SF, Lonnemann G, Cannon JG, Libby P 1987 Interleukin 1 induces interleukin 1. I. Induction of circulating interleukin 1 in rabbits in vivo and in human mononuclear cells in vitro. *J Immunol* 139:1902–1910
25. Fini ME, Strissel KJ, Girard MT, Mays JW, Rinehart WB 1994 Interleukin 1 α mediates collagenase synthesis stimulated by phorbol 12-myristate 13-acetate. *J Biol Chem* 269:11291–11298
26. Wood LC, Elias PM, Calhoun C, Tsai JC, Grunfeld C, Feingold KR 1996 Barrier disruption stimulates interleukin-1 α expression and release from a pre-formed pool in murine epidermis. *J Invest Dermatol* 106:397–403
27. Hogquist KA, Nett MA, Unanue ER, Chaplin DD 1991 Interleukin 1 is processed and released during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:8485–8489
28. Dahmoun M, Boman K, Cajander S, Westin P, Backstrom T 1999 Apoptosis, proliferation, and sex hormone receptors in superficial parts of human endometrium at the end of the secretory phase. *J Clin Endocrinol Metab* 84:1737–1743
29. Kupper TS, Ballard DW, Chua AO, McGuire JS, Flood PM, Horowitz MC, Langdon R, Lightfoot L, Gubler U 1986 Human keratinocytes contain mRNA indistinguishable from monocyte interleukin 1 α and - β mRNA. Keratinocyte epidermal cell-derived thymocyte-activating factor is identical to interleukin 1. *J Exp Med* 164:2095–2100
30. Robertson FM, Pellegrini AE, Ross MS, Oberszyn AS, Boros LG, Bijur GN, Sabourin CL, Oberszyn TM 1995 Interleukin-1 α gene expression during wound healing. *Wound Repair Regen* 3:473–484
31. Groves RW, Mizutani H, Kieffer JD, Kupper TS 1995 Inflammatory skin disease in transgenic mice that express high levels of interleukin 1 α in basal epidermis. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:11874–11878
32. Kawaguchi Y 1994 IL-1 α gene expression and protein production by fibroblasts from patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol* 97:445–450
33. Wehling M, Losel R 2006 Non-genomic steroid hormone effects: membrane or intracellular receptors? *J Steroid Biochem Mol Biol* 102:180–183
34. Mote PA, Balleine RL, McGowan EM, Clarke CL 1999 Colocalization of progesterone receptors A and B by dual immunofluorescent histochemistry in human endometrium during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 84:2963–2971
35. Nisolle M, Casanas-Roux F, Wyns C, de Menten Y, Mathieu PE, Donnez J 1994 Immunohistochemical analysis of estrogen and progesterone receptors in endometrium and peritoneal endometriosis: a new quantitative method. *Fertil Steril* 62:751–759
36. Conneely OM, Mulac-Jericevic B, Lydon JP 2003 Progesterone-dependent regulation of female reproductive activity by two distinct progesterone receptor isoforms. *Steroids* 68:771–778
37. Lan L, Vinci JM, Melendez JA, Jeffrey JJ, Wilcox BD 1999 Progesterone mediates decreases in uterine smooth muscle cell interleukin-1 α by a mechanism involving decreased stability of IL-1 α mRNA. *Mol Cell Endocrinol* 155:123–133
38. Bresnihan B 2002 Effects of anakinra on clinical and radiological outcomes in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 61(Suppl 2):ii74–77

Response of Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases Messenger Ribonucleic Acids to Ovarian Steroids in Human Endometrial Explants Mimics Their Gene- and Phase-Specific Differential Control *in Vivo*

Vassil Vassilev, Chrystel M. Pretto, Patricia B. Cornet, Denis Delvaux, Yves Eeckhout, Pierre J. Courtoy, Etienne Marbaix, and Patrick Henriët

Cell Biology Unit (V.V., C.M.P., P.B.C., D.D., Y.E., P.J.C., E.M., P.H.), Christian de Duve Institute of Cellular Pathology, and Department of Pathology (E.M.), Université Catholique de Louvain, B-1200 Bruxelles, Belgium

Context: Cyclic remodeling and breakdown of the extracellular matrix, a unique feature of the human endometrium, depends on matrix metalloproteinases (MMPs). These enzymes are globally controlled by estradiol and progesterone or their withdrawal, but various MMPs and their tissue inhibitors (TIMPs) show distinct responses.

Objective and Design: To clarify the role of ovarian steroids in the differential regulation of MMP-1, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-10, TIMP-1, TIMP-2, and TIMP-3 mRNAs, we compared their variations in the cycling endometrium *in vivo* with their response to hormone addition or withdrawal in corresponding explants.

Results: Different patterns were identified *in vivo* according to the time frame (secretory *vs.* perimenstrual increase), sharpness (peak *vs.* progressive increase or decrease), and magnitude of the changes. *In*

vivo ratios between early/midsecretory and perimenstrual phases ranged from more than 1000 (MMP-1, MMP-3, and MMP-10) to less than 10 (TIMPs). Differential response to ovarian steroids of the various MMPs and TIMPs mRNAs tested in cultured explants matched the same ranking and varied according to the phase at sampling. Remarkably, ovarian steroids repressed MMPs and TIMP-1 and TIMP-2 but, in secretory explants, increased TIMP-3 mRNA. Finally, *in situ* hybridization evidenced the major contribution of fibroblasts to the increase in MMP-8 mRNA at menstruation or in explants cultured without hormones.

Conclusions: Both phase- and gene-specific modulators finely tune in space, time, and amplitude the global control of MMPs and TIMPs mRNAs by estradiol and progesterone in the cycling human endometrium. (*J Clin Endocrinol Metab* 90: 5848–5857, 2005)

MATRIX METALLOPROTEINASES (MMPs) play a key role in physiological and pathological extracellular matrix (ECM) remodeling, as illustrated in the human endometrium during normal menstruation and dysfunctional uterine bleeding (1–3). In addition, the cycling human endometrium offers a unique physiological example of alternative regulation of tissue breakdown and reconstruction. It is now established that ovarian steroids (estrogens and especially progesterone) control the production and activity of MMPs through a network of local regulators, including cytokines (reviewed in Refs. 4–6). This network would preserve endometrial integrity during the proliferative and secretory phases, then cause at menstruation an abruptly amplified, yet spatially constrained degradation of the functional layer (7).

Menstrual-like ECM breakdown by MMPs and its global control by the ovarian steroids have been reproduced in endometrial explants (1, 8). Both in the menstrual endome-

trium *in vivo* and in explants from nonmenstrual endometria cultured without added hormones, various MMPs were found to be selectively produced by foci of stromal cells in areas of tissue breakdown. Addition of combined estradiol and progesterone to the explants blocked both MMPs release in the medium and ECM degradation (9, 10).

In previous studies, the mRNA expression pattern of several MMPs and their physiological tissue inhibitors (TIMPs) was determined in the cycling human endometrium *in vivo* by *in situ* hybridization (11, 12), Northern blotting (13), and RT-PCR (14, 15). Several MMP genes, including those of collagenase-1 (MMP-1), collagenase-2 (MMP-8), stromelysin-1 (MMP-3), and matrilysin-1 (MMP-7), as well as genes encoding TIMP-1, TIMP-2, and TIMP-3, were maximally expressed around menstruation. However, their expression profile significantly differed during the other phases of the cycle, leading to the distinction of several groups. MMP-1, MMP-8, and MMP-3 mRNAs were reported to be restricted to the menstrual phase, in contrast with MMP-7 mRNA, which remained abundant during the proliferative phase. TIMP-3 showed cyclic variations and reached maximal levels during the late secretory phase, unlike TIMP-1 and TIMP-2, which were reported to be expressed at high, but rather constant levels throughout the cycle.

Altogether, these observations pointed to a differential

First Published Online July 28, 2005

Abbreviations: AP-1, Activator protein 1; ECM, extracellular matrix; MMP, matrix metalloproteinase; TIMP, tissue inhibitor of metalloproteinases; NS, not significant; SSC, sodium saline citrate.

JCEM is published monthly by The Endocrine Society (<http://www.endo-society.org>), the foremost professional society serving the endocrine community.

modulation of gene expression under the overall control by ovarian steroids. We recently used RT-PCR to investigate the control by these hormones of selected gene expression in endometrial explant cultures, by comparison with the corresponding cyclic variations in the endometrium *in vivo* (16, 17). These studies not only provided precise measurements of the effects of estradiol and progesterone on mRNA amounts in the cultured explants but (more importantly) evidenced differences in the response to culture and ovarian steroids according to the phase of the cycle at sampling, especially for the TGF- β -related cytokine, Lefty-A (16). This prompted us to extend this combined approach to further dissect the respective contribution of ovarian steroids and specific modulators to the regulation of menstruation-associated MMPs and their inhibitors.

In the present study, we first measured mRNA amounts of MMP-1, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-10, TIMP-1, TIMP-2, and TIMP-3 in a collection of 59 endometrial samples representative of the whole menstrual cycle, to determine the chronology and to quantify the amplitude of their cyclic variations. This first part of the analysis complements previous studies by: 1) the precise timing of samples along the menstrual cycle; 2) the use of a highly sensitive, quantitative, and standardized technique allowing the calculation of ranges of variation; and 3) the analysis of all individual results, not only of sample groups. The variable contribution of combined estradiol and progesterone to individual gene regulation was next determined by comparing mRNA levels *in vivo* to those measured in corresponding explants cultured for 24 h in the absence or presence of the ovarian steroids. Finally, because MMP-8 could originate from stromal fibroblasts or infiltrating neutrophils, we localized its mRNA by *in situ* hybridization in endometria *in vivo* and in cultured explants.

Patients and Methods

Tissue collection and explant culture

The study was approved by the Ethical Committee of the Université Catholique de Louvain, in accordance with the Declaration of Helsinki of the World Medical Association. Normal endometrial tissue was obtained from 52 hysterectomy specimens and seven biopsies sampled at various phases of the menstrual cycle as described (16). Briefly, endometrium was gently scraped with a sterile surgical blade from hysterectomy specimens and put in ice-cold PBS; biopsies were immediately collected in ice-cold PBS. Part of the endometrial tissue was fixed in 4% formaldehyde, and another part was quickly frozen at -80°C in lysis buffer (SV Total RNA Isolation System; Promega Corp., Leiden, The Netherlands). Tissue was dated according to its histological appearance (18) and the clinical recording of the last menstrual period. An ideal menstrual cycle of 28 d was divided into five phases: proliferative (d 6–14), early secretory (d 15–18), midsecretory (d 19–22), late secretory (d 23–27), and perimenstrual (d 28–5). All patients were premenopausal (range, 25–55 yr old; median, 44 yr old), were not on hormonal treatment, underwent surgery for conditions unrelated to endometrial pathologies or to endometriosis, or had a biopsy for routine investigation of infertility. They gave informed consent.

The collection and culture of endometrial explants was performed as previously described (16). Briefly, tissue samples were cut in pieces of about 1 mm/side with a sterile surgical blade and placed in tissue culture inserts (Millipore Corp., Bedford, MA). DMEM (Life Technologies, Inc., Merelbeke, Belgium), devoid of serum and phenol red, was placed in the lower chamber and renewed daily (300 μl or 1.2 ml in 12-mm and 30-mm inserts, respectively). Medium was without hormonal addition, or supplemented with water-soluble complexes of 1 nM 17β -estradiol and 100

nM progesterone in 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (+EP; Sigma-Aldrich Corp., Bornem, Belgium). The encapsulating 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (Sigma-Aldrich) was added at 0.3 μM in the culture medium devoid of ovarian steroids. We previously reported that this system allows us to maintain explants in good conditions for up to 3 d and that the effects of estradiol and progesterone can be reversed during culture (1). After collection, all media were supplemented with 0.05 vol of 1 M Tris-HCl buffer (pH 7.5); 1% (vol/vol) Triton X-100; 0.1 M CaCl_2 ; and 60 mM NaN_3 and kept frozen at -20°C until biochemical analysis. At the end of the culture, explants were fixed or frozen at -80°C in lysis buffer until RNA extraction.

RNA extraction and reverse transcription

After extraction of total RNA using the SV Total RNA Isolation System (Promega), 200 ng was reverse-transcribed by using the Thermoscript RT-PCR System (Life Technologies, Inc., Paisley, UK) as described (16).

Oligonucleotide primers used for PCR amplification

Sequences of the specific oligonucleotide primers and Taqman probes used for the real-time PCR amplifications are listed in Table 1. Customized primers were obtained from Life Technologies or BioSource International (Camarillo, CA).

Preparation of standards for real-time PCR

Standards for quantitative PCR amplification were prepared by cloning purified DNA products, obtained after PCR amplification with the

TABLE 1. Primers and probes used for quantitative PCR

	Sequence (5'–3')
MMP-1	
Forward	GCAAACACATCTGACCTACAGG
Reverse	TCTCAATGGCATGGTCCAC
Probe	FAM-CACGCCAGATTGCAAGA-TAMRA
MMP-3	
Forward	TGTATCTTGCCGGTCATT
Reverse	TGTGACAAGGTGCAAGCT
Probe	FAM-GGCATTCAATGGGCTGCTGC-TAMRA
MMP-7	
Forward	TGGACGGATGGTAGCAGT
Reverse	CAGAGGAATGTCCATACC
Probe	FAM-GCTGCAACTCATGAACCTGGCCA-TAMRA
MMP-8	
Forward	GGTTTTATGTTAACCCCAAG
Reverse	GCTGTGGGGTATAGTTTC
Probe	FAM-CCCAAGTGGGAACGCACT-TAMRA
MMP-10	
Forward	ACTGAAGAAGATGAGCCTTGC
Reverse	TGCAATTCAAAAGCAAGTGAA
TIMP-1	
Forward	GGCTTCACCAAGACCTACA
Reverse	TTGCAGGGGATGGATAAA
Probe	FAM-GGCTGTGAGGAATGCAC-TAMRA
TIMP-2	
Forward	TGGACTCTGGAACGACAT
Reverse	TCTCAGGCCCTTTGAACAT
Probe	FAM-TGGCAACCCTATCAAGAG-TAMRA
TIMP-3	
Forward	GGTGGGGAAGAAGCTGGT
Reverse	TTGGTGAAGCCTCGGTAC
Probe	FAM-GCCCTTCGGCACGCTGGT-TAMRA
β -Actin	
Forward	AGCCTCGCCTTTTGCCGA
Reverse	TCACGCCCTGGTGCTG
Probe	FAM-CCGCCGCCCGTCCACACCCGCC-TAMRA

FAM (carboxyfluorescein) and TAMRA (carboxytetramethylrhodamine) are fluorescent dyes, TAMRA being used as a quencher. MMP-10 mRNA was quantified with SYBR-green staining, in the absence of Taqman probe.

appropriate primers, into the pCR II-TOPO vector (TOPO TA cloning kit; Life Technologies). Plasmids were amplified in *Escherichia coli* XL-1 blue competent bacteria (Stratagene, Amsterdam, The Netherlands), purified, and quantified by spectrophotometry. Known amounts (1 μ g) of plasmids were stored at -20°C as aliquots that were thawed only once and used immediately.

Real-time PCR

Real-time PCR was performed according to the manufacturer's recommendations, with the LightCycler-FastStart DNA Master for Hybridization Probes or for SYBR-Green (Roche Boehringer Mannheim Diagnostics, Mannheim, Germany), as appropriate, using a LightCycler (Roche Boehringer) or a MyIQ thermocycler (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, for MMP-8 mRNA measurements). Aliquots of the RT products were subjected to PCR in a total vol of 20 μ l, with 500 nM adequate paired primers, 200 nM Taqman probe (when applicable), and MgCl_2 at the optimized concentration for each target gene (2 mM for β -actin, 3 mM for TIMP-1 and TIMP-3, and 4 mM for MMP-1, MMP-3, MMP-7, MMP-8, and TIMP-2). A control PCR without template DNA was performed in each experiment. A standard curve was generated from serial 10-fold dilutions of the purified plasmid containing the appropriate cDNA. Real-time PCRs were performed as follows. After an initial denaturation at 95°C for 10 min, DNA was amplified by 40–45 cycles of 20 sec at 95°C , and either 15 sec at 60°C for MMPs and TIMPs or 20 sec at 67°C for β -actin. MMP-8 cDNA was amplified through 40 cycles of 20 sec at 95°C and 30 sec at 65°C . Data were analyzed by using the LightCycler Software (version 3.5, Roche Boehringer) or the MyIQ System Software (version 1.0.410, Bio-Rad). Regression analyses of the threshold cycle values of the standard dilution series were used to determine the amplification efficiency. The absolute number of molecules in the experimental samples was determined by extrapolating the threshold cycle values from the standard curves. We considered that a PCR experiment was valid when: 1) no amplification was detected in the control without DNA template; 2) the slope of the logarithmic standard curve was around -3.3 (range, -3.1 to -3.5), to ensure full efficiency of the PCR [calculated as $(10^{-1/\text{slope}})]$; and 3) the amplification curve of the samples was parallel to those of the standards. The β -actin values were used for standardization.

In situ hybridization

Part of the endometrial tissues and of explants was fixed in freshly prepared, phosphate-buffered 4% formaldehyde (pH 7.4), and embedded in paraffin. Five-micrometer-thick sections were deparaffinized, rehydrated, and treated for 30 min at 37°C with 1 μ g/ml proteinase-K (Sigma-Aldrich) in 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) and 50 mM EDTA. Sections were then acetylated for 10 min in 0.25% acetic anhydride and 0.1 M triethanolamine (pH 8.0), and prehybridized for 1 h at 50°C in the hybridization mixture containing 40% (vol/vol) formamide, 50% (wt/vol) dextran sulfate, 2% (vol/vol) Denhardt's solution, and $2\times$ sodium saline citrate (SSC) ($1\times$ SSC = 150 mM NaCl and 15 mM sodium citrate) in a humidified chamber. A mixture of two MMP-8 specific oligonucleotide probes [5'-AGGTA-GAATGGATACAGTGATGGGAAA-3' and 5'-CCTTACTTCTAAC-CAAAATCTAGTTC-3' derived from (19) and (20), respectively] or of two control oligonucleotides with the complementary sequence was prepared by fluorescein-deoxyuridine 5'-triphosphate labeling of the 3'-ends (Gene Images 3'-oligolabeling module; Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). The sections were then hybridized overnight at 50°C with the hybridization mixture supplemented with 1.5 ng/ μ l labeled probes and washed with decreasing concentrations of SSC ($4\times$, $2\times$, and $0.1\times$). All washes were carried out at room temperature for 2×10 min. After inactivation of endogenous peroxidase with 0.3% H_2O_2 for 30 min at room temperature, nonspecific binding sites were blocked by incubating slides for 1 h in Tris buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, containing 10% normal goat serum and 1% BSA). The histological sections were incubated for 1 h at room temperature with 8 μ g/ml rabbit anti-fluorescein antibodies (DakoCytomation, Glostrup, Denmark). After two washes in deionized water and two washes in 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), slides were incubated for 1 h at room temperature with peroxidase-conjugated dextran molecules carrying antirabbit secondary antibodies (Envision; DakoCytomation). The peroxidase activity was revealed by incubating the slides for 10 min at room temperature with 0.5 mg/ml diaminobenzidine in 50 mM Tris-HCl (pH 7.4).

Immunolabeling

Histological sections were immunolabeled by mouse monoclonal antibodies specific for CD10 (clone 56C6, 2 μ g/ml; BIOCARE MEDICAL, Walnut Creek, CA); CD45 (a mixture of clones PD7/26 and 2B11, 1 μ g/ml; DakoCytomation), cytokeratin (clone CAM5.2, 1 μ g/ml; Becton Dickinson and Co., San Jose, CA), or CD68 (clone KP-1, 4.5 μ g/ml; DakoCytomation). For controls, the primary antibody was replaced by a mixture of nonrelevant antibodies raised against epitopes present in immature melanosomes (Pan Melanoma Cocktail, 4.5 μ g/ml; BIOCARE MEDICAL). After removal of paraffin and inactivation of endogenous peroxidases with 0.3% H_2O_2 for 30 min at room temperature, slides were transferred in 10 mM sodium citrate buffer (pH 5.8) and incubated into a water bath at 98°C for 75 min to unmask the antigenic sites, except for cytokeratin. After blocking of the nonspecific binding sites by incubating the slides for 30 min into 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) containing 10% normal goat serum and 1% BSA, sections were incubated overnight at 4°C with the primary antibody. Washes and staining were performed as for *in situ* hybridization, using peroxidase-conjugated dextran molecules carrying antimouse secondary antibodies (Envision; DakoCytomation).

Statistical analysis

Statistical significance was tested using the Wilcoxon rank-sum two-sample test or the Wilcoxon signed-rank matched-pairs test, as appropriate. Differences were interpreted as significant for $P < 0.05$ and assigned the following symbols: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.005$; ***, $P < 0.001$; NS, not significant.

Results

Variations of MMPs and TIMPs relative mRNA amounts in the cycling endometrium in vivo

We first analyzed *in vivo* variations of mRNA amounts normalized to that of β -actin (hereafter referred to as relative mRNA amounts). As shown in Fig. 1, these values could vary considerably between patients, even for a given phase of the cycle, as best illustrated for MMP-1, MMP-3, MMP-8, and MMP-10 (notice the logarithmic scale, up to 5 logs between extremes during the proliferative phase). On the other hand, individual values for MMP-7, TIMP-1, TIMP-2, and TIMP-3 mRNAs showed much less variation (generally within 1 log for TIMPs).

Along the menstrual cycle, mRNA amounts of all studied genes culminated around menstruation, with some gene products, such as those of MMP-7 and MMP-10, being 10–100 times more abundant than that of β -actin, assuming equal amplification efficiency during the early uncontrollable steps of the PCR. However, the time frame, sharpness, and amplitude of the cyclic changes in mRNA expression varied significantly between genes. Some similarities were observed between groups of mRNAs, but grouping was not fully consistent for these three criteria.

With respect to time frame as first criterion, TIMP-3 was maximally expressed before menstruation, then its mRNA declined at the beginning of menses. Other gene products increased throughout the secretory phase and culminated at menstruation (best illustrated for MMP-10, a behavior shared by TIMP-1 and TIMP-2). Still other gene products peaked in the perimenstrual phase (MMP-7) or essentially appeared at that phase (MMP-1, MMP-3, and MMP-8). This chronology will be analyzed in more detail in the following section. Second, with respect to the rapidity of changes, some relative mRNA levels increased either sharply (MMP-1, MMP-3, MMP-8, MMP-7, and also TIMP-3) or progressively (MMP-

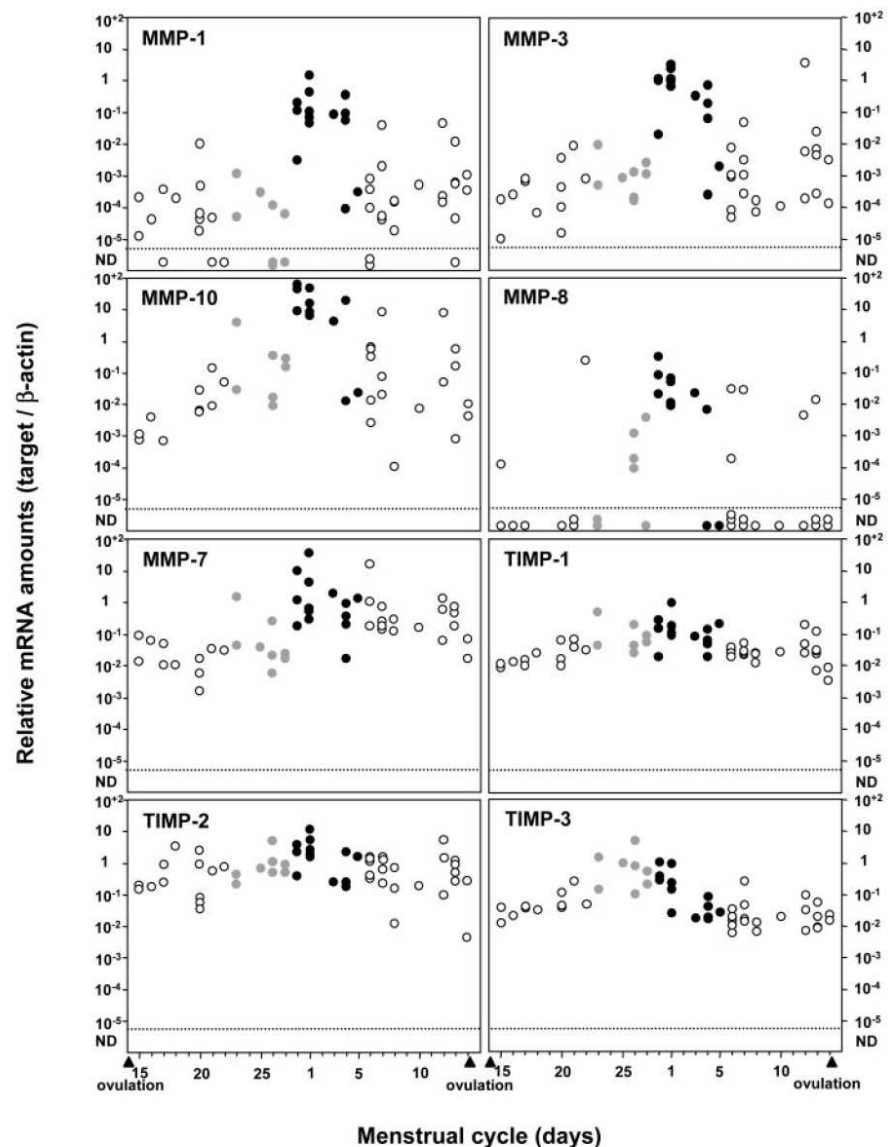


FIG. 1. Expression of MMPs and TIMPs mRNAs in the cycling human endometrium. Endometrial samples were dated according to histological criteria and clinical information. Dating begins by the clinical occurrence of vaginal bleeding, but the graph starts with d 15 (1 d after ovulation in the idealized cycle), to emphasize the perimenstrual phase (from d 28–5). Perimenstrual samples are represented by black-filled symbols and late secretory endometria by gray symbols. The amount of mRNA molecules of MMP-1, MMP-3, MMP-10, MMP-8, MMP-7, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, and β -actin was quantified by RT-PCR. The relative mRNA amounts (ratios of MMPs or TIMPs to β -actin) are presented on the same logarithmic scale. For panel ranking, see Fig. 2. Not detected values (ND) are represented below the dotted line.

10, TIMP-1, and TIMP-2). Third, with respect to level of expression, some mRNAs showed low minimal amounts and a large range of cyclic variation (MMP-1, MMP-3, MMP-10, and MMP-8); one gene product (MMP-7) showed high minimal amounts and an intermediate range of cyclic variation, and still others showed high minimal amounts and limited cyclic variation (TIMP-1, TIMP-2, and TIMP-3).

Thus, although several genes shared some characteristics, there was no unequivocal gene grouping. Therefore, the chronology and the amplitude of the *in vivo* variations in mRNA amounts will hereafter be presented separately.

Chronology of the various mRNA changes *in vivo*

The chronology of the changes for the various mRNAs will now be described, starting at ovulation, to focus on changes preceding, during, and after menstruation. MMP-10 and TIMP-1 relative mRNA levels progressively increased throughout the secretory phase. TIMP-2 expression pattern

was similar, although changes were not significant. Relative mRNA levels of TIMP-3 increased more sharply, at the transition between the early/mid- and the late secretory phases. MMP-10 further increased at the end of the secretory phase, to peak during menses. In contrast with these secretory changes, MMP-1, MMP-3, MMP-7, and MMP-8 rose abruptly at the start of the perimenstrual phase, or just before for MMP-8.

After this general pre- or early menstrual increase in MMPs and TIMPs gene expression, mRNA levels quickly returned to minimal levels during (for TIMP-3) or at the end of the menstrual phase (for all other gene products, except for MMP-7 mRNA, which slowly decreased during the proliferative phase). Thus, TIMP-3 mRNA clearly stood out among all tested gene products for its decrease between early (d 28–1) and late (d 4–5) perimenstrual phase. MMP-1, MMP-3, MMP-10, and MMP-8 mRNAs were most dispersed in proliferative endometria.

Amplitude of the various mRNA changes in vivo

To correlate the amplitude of the changes in the various mRNA levels with the cyclic variations in circulating estradiol and progesterone concentrations, individual values were then pooled in the four following populations so that medians could be compared: early and midsecretory (increasing concentrations of both steroids), late secretory (decreasing concentrations of both steroids), perimenstrual (minimal steroid concentration), and proliferative (essentially impregnation by estradiol). Table 2 compares the median levels between all consecutive cycle phases, with the significance of changes. Whereas MMP-10 mRNA gradually increased during the secretory phase, sharp and strong (over 2 logs) increases in MMP-1, MMP-3, and MMP-8 mRNAs occurred at the beginning of menstruation (see perimenstrual/late secretory ratio), with reciprocal decreases at its end (proliferative/perimenstrual ratio). The amplitude of perimenstrual increase and postovulatory decrease of MMP-7 mRNA, and that of late secretory increase and menstrual decrease of TIMP-3 mRNA, was intermediate (around 20 times). Finally, TIMP-1 and TIMP-2 increases and decreases were smaller than 1 log. For all but TIMP-3 mRNAs (see in particular MMP-7), medians were lower in early/midsecretory than in proliferative endometria, suggesting a general inhibition of all but one of the genes studied upon increase in circulating progesterone (acting in combination with estradiol), and an opposite stimulatory effect on TIMP-3.

For a ranking, Fig. 2 is focused on the changes in relative mRNA amounts between endometria with the highest concentration of ovarian steroids (early/midsecretory phase) and those with the lowest concentration (perimenstrual phase). The early/midsecretory median was over 3 logs lower than the perimenstrual one for MMP-1, MMP-3, and MMP-10 (and most likely MMP-8, because the early/midsecretory median for MMP-8 was below the level of detection). On the opposite, MMP-9 (see Ref. 17), MMP-7 and especially TIMP-1, TIMP-2, and TIMP-3 mRNA levels were much more stable throughout the cycle: their early/midsecretory medians were, respectively, less than 2 logs and less than 1 log lower than the perimenstrual ones, reflecting, in part, the persistence of high mRNA amounts in nonperimenstrual samples (0.1–0.01, relative to β -actin mRNA).

Altogether, the differences between analyzed mRNAs in the time frame, sharpness, and amplitude of their cyclic

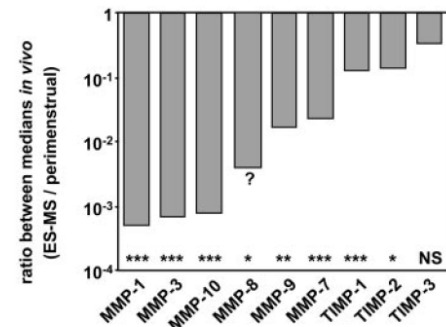


FIG. 2. Changes in MMPs and TIMPs mRNA amounts between early/midsecretory and perimenstrual endometria *in vivo*. Ratios of median relative mRNA amounts for MMPs and TIMPs in early/midsecretory (ES-MS) endometria, compared with perimenstrual endometria, are presented on a logarithmic scale. Values for MMP-9 mRNA were derived from Ref. 17, with new additional samples, and are presented solely for the purpose of comparison. Genes are ranked according to increasing ratio values. The ratio for MMP-8 was calculated between late secretory and perimenstrual medians because the ES-MS median is under the limit of detection. The actual ratio is thus less than 4×10^{-3} , as indicated by the question mark. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.005$; ***, $P < 0.001$.

variations *in vivo* pointed to a differential modulation of their overall control by ovarian steroids, thanks to additional gene- and phase-specific factors.

Effects of ovarian steroids on the relative mRNA amounts in endometrial explants

The hypothesis of such modulators was tested by measuring mRNAs amounts after culture of explants collected from the different phases, in the presence or absence of ovarian steroids for 24 h (Fig. 3). For each gene and patient, relative mRNA amounts measured in explants were compared with corresponding values in the noncultured sample from the same patient. To parallel the *in vivo* analysis, paired ratios were then grouped for proliferative, early/midsecretory, or late secretory samples (Table 3). Perimenstrual endometria were not used for this analysis because they were previously shown not to respond to ovarian steroids (9).

As summarized in Table 3A, relative mRNA amounts of all tested genes increased upon 24 h of culture without added ovarian steroids (filled symbols in Fig. 3) to reach values similar to noncul-

TABLE 2. Changes in median relative mRNA amounts between consecutive cycle phases *in vivo*

Ratios of medians	MMP-1	MMP-3	MMP-10	MMP-8	MMP-7	TIMP-1	TIMP-2	TIMP-3
Late secretory/early & midsecretory	1.2 NS	2.1 NS	22 ^a	>1 NS	1.9 NS	3.4 ^a	2.9 NS	17 ^b
Perimenstrual/late secretory	1600 ^b	680 ^b	56 ^c	240 ^c	24 ^a	2.3 NS	3.1 NS	0.18 ^c
Proliferative/perimenstrual	0.003 ^b	0.002 ^b	0.006 ^a	<0.004 ^c	0.36 NS	0.20 ^b	0.31 NS	0.14 ^a
Early & midsecretory/proliferative	0.20 NS	0.46 NS	0.14 ^c	NA NS	0.06 ^b	0.64 NS	0.35 NS	2.33 ^b

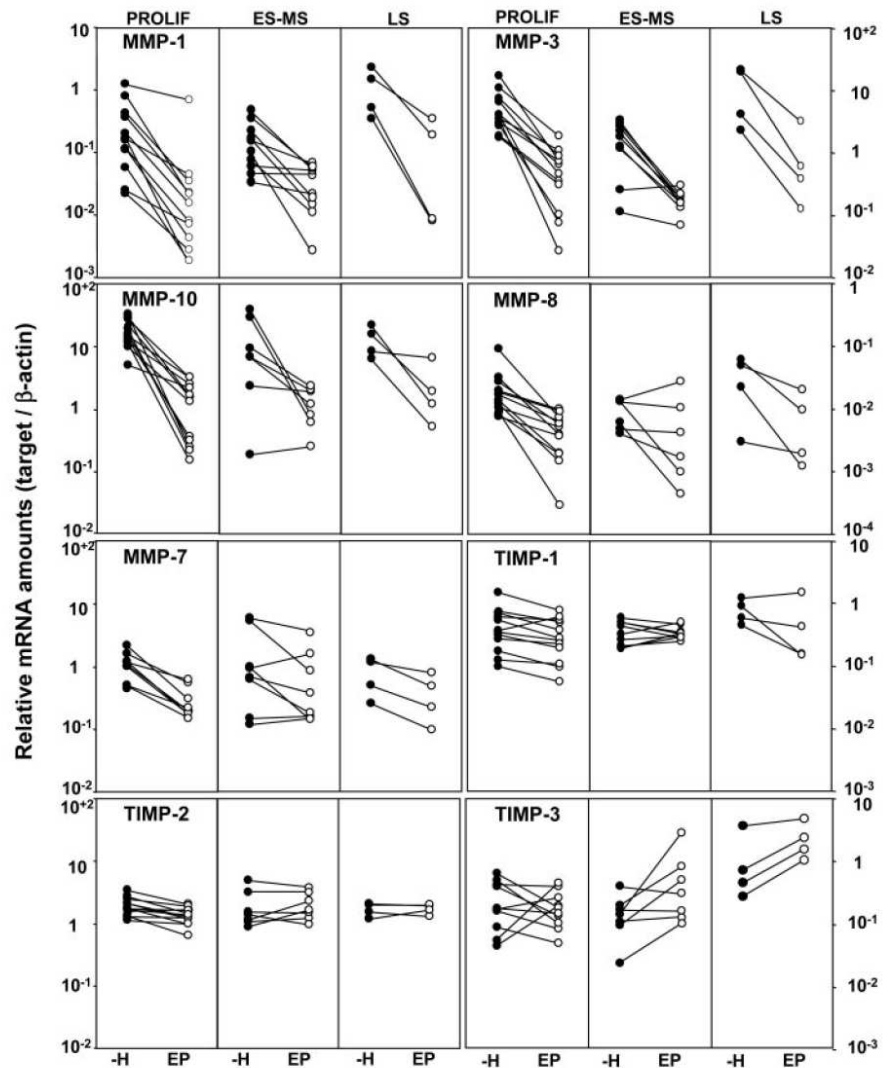
Values above 1 indicate an increase; values below 1 indicate a decrease. Ratios including one undetected median are under- or overestimated as indicated by the > or < signs. NA, Not applicable, because both medians for MMP-8 were not detectable. For statistical tests, a minimal value (10^{-6}) was assigned to undetectable MMP-8 mRNA. For columns ranking, see Fig. 2.

^a $P < 0.005$.

^b $P < 0.001$.

^c $P < 0.05$.

FIG. 3. Effects of ovarian steroids on MMPs and TIMPs mRNA concentration in endometrial explant culture. Relative mRNA amounts were measured in explants from proliferative (PROLIF), early/midsecretory (ES-MS), and late secretory (LS) endometria after culture for 24 h in the absence (–H, filled symbols) or in the presence of 1 nM estradiol and 100 nM progesterone (EP, open symbols). Notice that logarithmic scales for the various mRNAs are used with constant spacing for 1-log increments but with variable ranges.



tured menstrual samples (compare with corresponding filled symbols in Fig. 1). This induction was spectacular, exceeding 2 logs for MMP-10 and MMP-8 mRNAs and reaching 4 logs for MMP-1 and MMP-3 mRNAs, but was less pronounced (around 1 log) for MMP-7 and the three TIMPs mRNAs.

Surprisingly, all relative mRNA amounts also increased upon explant culture in the presence of estradiol and progesterone (albeit to a much lesser extent than in the absence of the hormones, except for TIMP-3; compare A and B in Table 3) and irrespective of the analyzed phase. This observation indicates that the mere addition of ovarian steroids, although sufficient to prevent ECM breakdown (1, 10), did not fully reproduce, in the explants, their *in vivo* inhibitory effect on gene expression.

In general, when comparing paired values in treated and untreated cultured explants, ovarian steroids significantly repressed the expression of all MMPs, as well as that of TIMP-1 and TIMP-2, but not of TIMP-3 (Fig. 4). This inhibition was most prominent in proliferative and late secretory explants and less pronounced or absent (for TIMP-1 and TIMP-2) in early/midsecretory explants (Table 3C). The more limited repression by

the ovarian steroids at that phase was essentially due to the lower values reached upon culture in the absence of hormones, when compared with proliferative explants.

TIMP-3 was a noticeable exception. In proliferative explants, it was not significantly inhibited by the ovarian steroids. Moreover, TIMP-3 mRNA levels were significantly increased by the addition of the steroids in nine of 11 secretory samples. This unique induction by ovarian steroids *in vitro* is in agreement with our *in vivo* observation that TIMP-3 mRNA level was the only case of a higher median for early/midsecretory than for proliferative biopsies (see Table 2). Future work is needed to verify whether this induction is due to estradiol, progesterone, or their combination.

Cellular origin of MMP-8 mRNA

Because MMP-8 was originally reported to be exclusively produced by neutrophils, the occasional detection of MMP-8 mRNA in a minority of nonperimenstrual samples *in vivo* could reflect the presence of infiltrating inflammatory cells. Moreover, inflammatory cells are abundant at menstruation,

TABLE 3. Effect of 24-h explant culture and ovarian steroids on mRNA amounts

Phase of collection	MMP-1	MMP-3	MMP-10	MMP-8	MMP-7	TIMP-1	TIMP-2	TIMP-3
A								
Proliferative	>340	2600	280	>36	6	11	6	6
Early & midsecretory	>2800	5900	1800	>60	150	13	5	2.2
Late secretory	>14000	14000	170	>43	11	7	2.4	1.7
B								
Proliferative	>28	220	15	>7	1.4	8	4	5
Early & midsecretory	>510	840	360	>16	11	16	5	6
Late secretory	>700	950	24	>9	5	3	2.5	5
C								
Proliferative	0.082 ^a	0.082 ^a	0.055 ^a	0.21 ^a	0.26 ^b	0.71 ^c	0.71 ^b	0.83 ^{NS}
Early/midsecretory	0.19	0.14	0.20	0.28	0.53	1.0	1.1	2.9
Late secretory	0.049	0.070	0.14	0.22	0.45	0.48	1.0	2.8
Secretory (all)	0.13 ^a	0.11 ^c	0.18 ^c	0.25 ^c	0.50 ^c	0.83 ^{NS}	1.1 ^{NS}	2.9 ^c

The table shows the geometric mean ratios of target relative mRNA amounts in paired samples. A, Explants cultured without addition of ovarian steroids reported to noncultured samples. B, Explants cultured with the ovarian steroids reported to noncultured samples. C, Effects of hormone addition: ratio between explants cultured with and without addition of ovarian steroids. As in Table 2, undetected mRNAs were considered at the detection level and assigned the minimal relative amount (10^{-6}) for the purpose of calculation; means including such values are indicated by the > sign.

^a $P < 0.001$.

^b $P < 0.005$.

^c $P < 0.05$.

when we noted the systematic occurrence of large amounts of MMP-8 mRNA. However, neutrophil MMP-8 is synthesized during cell maturation in bone marrow and stored in specific granules until release in inflammatory sites, where neutrophils are not expected to contain large amounts of MMP-8 mRNA (21). MMP-8 was more recently shown to be also produced by mononuclear fibroblast-like cells, for example articular chondrocytes and rheumatoid synovial membrane fibroblasts *in vivo* (22, 23) and odontoblasts in organ culture (24). The large increase in MMP-8 mRNA upon culture of nonperimenstrual explants, where inflammatory cells are barely detected, rather suggested a similar production of MMP-8 by resident endometrial cells, such as stromal fibroblasts. We therefore determined the cellular origin of

MMP-8 mRNA by combining *in situ* hybridization with immunolabeling for cell type markers in adjacent serial sections (Fig. 5).

A strong signal for MMP-8 mRNA was found to colocalize with stromal fibroblasts in menstrual endometria *in vivo* (compare Fig. 5, A–C, with D–F) as well as in proliferative explants cultured 24 h in the absence of hormones (compare Fig. 5, N with O). Conversely, MMP-8 mRNA signal was dramatically reduced, if not undetectable, in proliferative endometria before culture (Fig. 5M) or after 24 h of explant culture in the presence of the ovarian steroids (Fig. 5Q). Leukocytes were present in all samples tested, in higher proportions in menstrual endometria (Fig. 5, G–I) than in nonperimenstrual endometria, before (not shown) or after explant culture in the absence (Fig. 5P) or presence (Fig. 5S) of ovarian steroids. Although it cannot be ruled out that neutrophils release MMP-8 in the menstruating endometrium, our *in situ* hybridization data clearly demonstrate that stromal fibroblasts are the major cell type expressing MMP-8 mRNA in noncultured menstrual endometria as well as in explants cultured in the absence of ovarian steroids. Fibroblast-derived MMP-8 is directly produced *in situ*, as a rapid response to ovarian steroids withdrawal, exactly as the other fibroblast-derived MMPs MMP-1 and MMP-3.

Discussion

During the reproductive life, human endometrium expresses many MMPs and TIMPs, which are involved in the menstrual and abnormal breakdown of the tissue (1–4, 25). However, some MMPs are also variably expressed during the nonmenstrual phases of the cycle (11, 15), at which time their physiological role is less clear, although they are likely to participate to several key features of the proliferative and secretory phases, such as reepithelialization and tissue regeneration, angiogenesis, and stromal decidualization. For such roles, MMPs expression and activation could be more

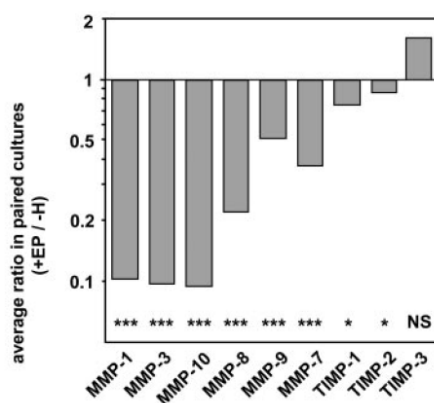
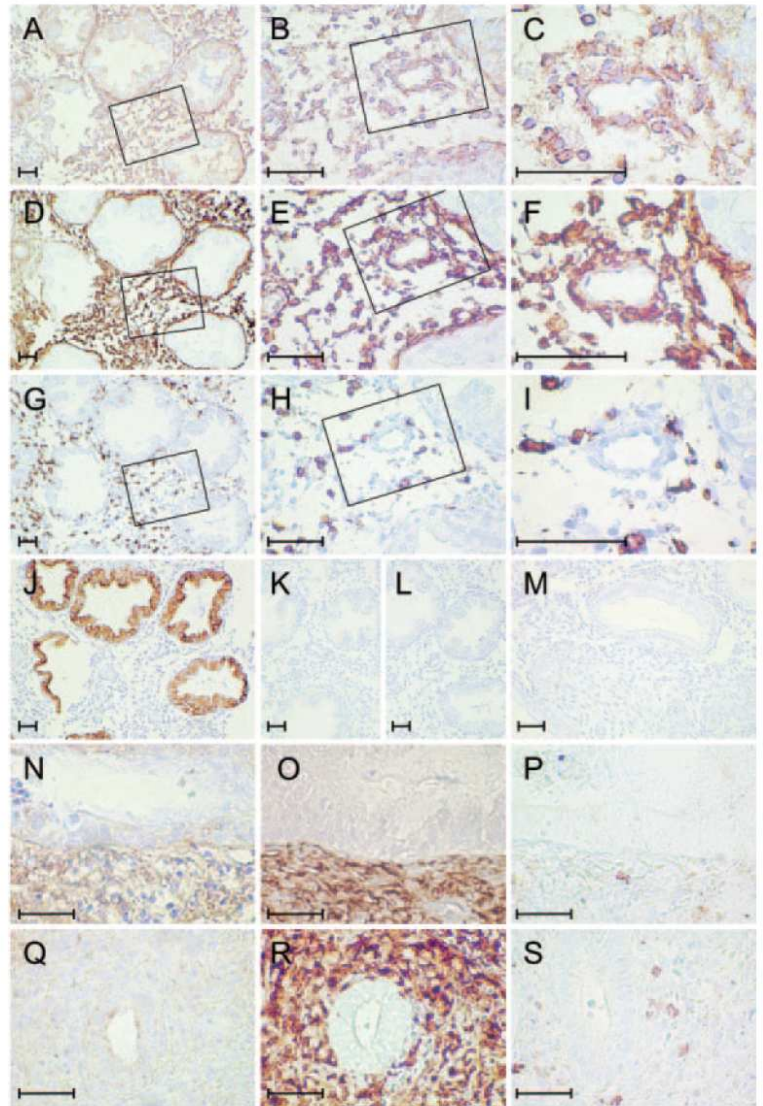


FIG. 4. Effect of ovarian steroids on mRNA amounts. The figure shows the geometric mean ratios of relative mRNAs amounts for MMPs and TIMPs in explants cultured in the presence (+EP), compared with the absence (–H), of added ovarian steroids. Explants are from endometria sampled at all proliferative and secretory phases of the cycle. For the purpose of comparison, values are presented on a logarithmic scale and ranked as in Fig. 2. Values for MMP-9 are derived from Ref. 17, with new additional samples. *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$.

FIG. 5. Cellular origin of MMP-8 mRNA. Cellular localization of MMP-8 mRNA *in vivo* and in explant culture. MMP-8 antisense (A–C, M, N, Q) or sense control (K) probes were hybridized to serial sections of: a noncultured menstrual endometrium (A–L), a noncultured proliferative endometrium (M), and a proliferative endometrium cultured for 24 h in the absence (N–P) or presence (Q–S) of estradiol and progesterone. Immunolabeling for CD10 (fibroblasts, D–F, O, R), CD45 (leukocytes, G–I, P, S), cytokeratin (epithelial cells, J), CD68 (macrophages, L), or epitopes present in immature melanosomes (negative control, not shown) was performed in adjacent sections. B–C, E–F, and H–I show progressive enlargements of areas in A, D, and G, respectively. Notice that most cells expressing MMP-8 mRNA are also labeled for CD10. Bars, 50 μ m.



limited in time and in space than at menstruation. In contrast, TIMPs are expected to be largely expressed during nonmenstrual phases to prevent inappropriate lysis of the tissue. In particular, TIMP-3 is thought to limit invasion of the decidualized mucosa by trophoblast at implantation (25). The purpose of this study was to test whether a differential response of MMPs and TIMPs to ovarian steroids in the cycling human endometrium could explain their different time course and expression levels. This hypothesis was investigated by quantitative RT-PCR in a well-characterized collection of human endometrial samples and in corresponding explants cultured with or without addition of ovarian steroids.

Our measurements in the noncultured samples are in excellent agreement with reported expression patterns (Refs. 11 and 15, and reviewed in Ref. 4) and nicely correlate with those observed for MMP-1, MMP-3, and MMP-7 mRNAs upon withdrawal of a progesterone-releasing implant in ovariectomized monkeys (26). Moreover, these results provide new important information on the cyclic variations of

these genes. The precise timing of samples along the menstrual cycle led to the discrimination between abrupt (within 1 or 2 d) and progressive changes in mRNA expression. The use of a highly sensitive technique with a large dynamic range evidenced the striking contrast between weakly (TIMPs) and strongly inhibited genes (MMP-1, MMP-3, and MMP-10). High levels of TIMPs mRNAs, maintained throughout the cycle and steadily increasing during the secretory phase, suggest that the corresponding proteins were abundantly produced before menses but overwhelmed by MMPs at menstruation. Moreover, high levels of TIMP-3 during the implantation window are in support of its proposed key role at this early stage of embryonic development (27, 28). Conversely, the physiological relevance of the very low mRNA amounts of most MMPs detected in nonmenstrual endometrial extracts remains to be clarified. For example, MMP-1 and MMP-3 mRNAs were previously detected by *in situ* hybridization in a minority (about 1 of 4) of proliferative endometria (11). The absence of detection in the other samples could result from the lower sensitivity of *in situ*

hybridization, compared with RT-PCR, or indicate the existence of MMP-expressing cell foci outside the analyzed fields.

The distinctive behavior of MMP-10 and MMP-7 deserves comment. Very high values for MMP-10 mRNA in late secretory samples, to further increase as a menstrual peak, agree with an *in situ* hybridization study showing the occurrence of MMP-10 mRNA in stromal foci of late secretory endometria and throughout the stroma at menstruation (11). MMP-10 therefore appears as a special case of menstruation-associated MMP, with steadily increasing expression throughout the secretory phase, to reach particularly high levels at menses. Finally, we confirm that MMP-7 mRNA is still expressed at high levels during the early proliferative phase (almost as abundant as during menses) and does not decrease as much as MMP-1 and MMP-3 mRNAs during the secretory phase (15, 29, 30).

We feel that the comparison between quantitative changes in expression profiles *in vivo* and in cultured explants from the same samples upon hormone addition or withdrawal is a major contribution of this study. Comparison of Figs. 2 and 4 shows that the relative extent of changes between the various mRNAs identified in the cycling human endometrium *in vivo* matched that resulting from the presence or absence of ovarian steroids in the cultured explants, especially proliferative ones. Although the control by ovarian steroids in explants was quantitatively less effective than *in vivo*, a parallel was evident, suggesting that the differential hormone control on MMPs and TIMPs is directly modulated through gene-specific coactivators and/or corepressors and does not depend on other circulatory factors or on extended priming by ovarian steroids.

However, there were differences in the hormonal control of TIMP-3 mRNA, compared with the other mRNAs, between proliferative and late secretory endometria. Because both phases are characterized by low concentrations of progesterone, this suggests the involvement of phase-specific factors that could locally regulate gene expression in endometria primed by estradiol and progesterone, by analogy to other decidualization markers such as prolactin and IGF binding protein-1. Increased TIMP-3 expression was previously observed as a result of progesterone-induced *in vitro* decidualization of human endometrial stromal cells (31). This predicts important differences between two comparisons in the endometrial explants: proliferative endometria cultured for 24 h in the presence of high concentrations of progesterone combined with estradiol are subject to abrupt hormonal addition and would lack secretory phase-specific factors that require prolonged priming by progesterone; conversely, secretory explants cultured in the absence of ovarian steroids are subject to severe hormone withdrawal but could still retain endogenous hormones and/or express the secretory phase-specific factors. Differences in MMP production by endometrial stromal cells on ovarian steroids addition or withdrawal have been previously reported (32, 33).

The similarity in hormone response within each of the four groups: 1) MMP-1, MMP-3, and MMP-10; 2) MMP-9 and MMP-7; 3) TIMP-1 and TIMP-2 *vs.* (4) TIMP-3 pointed to common transcriptional controls. We tested this possibility *in silico* by using the Genomatix GEMS launcher software tool,

to compare the proximal promoters (–500 to +100 base pairs) of MMPs and TIMPs genes included in this study (settings by default: core matrix similarity 0.75, optimized matrix similarity, and transcription factors sites common to 90% of the input sequences). This *in silico* analysis revealed that, besides the presence of a TATA-box, genes encoding MMP-1, MMP-3, MMP-10, MMP-8, and MMP-7 contain several common binding sequences, including activator protein 1 (AP-1), CCAAT/enhancer-binding protein (CEBP) and E26 transformation specific (Ets) transcription factors. These sequences are, however, organized in a different order in the promoters of MMP-1, MMP-3, and MMP-10, as compared with those of MMP-8 and MMP-7, thereby opening the possibility for a differential tuning between these genes. In contrast, genes encoding MMP-9 and TIMP-3 contain no consensus TATA-box and none or few of the above-mentioned binding sequences.

Of note, no progesterone receptor consensus sequence seems to be present in any of the genes studied. This is entirely consistent with the recent report that suppression by progesterone of genes containing AP-1 binding sequences occurs through indirect inhibitory interaction with Jun and Fos (34). In support of this hypothesis, significant progesterone inhibition in proliferative explants was found in all genes containing AP-1 binding site(s) (all tested genes except TIMP-3). The TIMP-3 promoter contains several binding sites for Sp1 and nuclear factor 1 (NF1) (35), which factors mediate progesterone receptor A-induced activation of ADAMTS-1 promoter (36).

In conclusion, the comparison of the effects of the ovarian steroids on MMPs and TIMPs mRNAs in cultured explants with corresponding *in vivo* variations confirms that these hormones are powerful quantitative brakes and reveals their need to act in concert with additional gene-specific and/or phase-specific local factors. This network prevents a general proteolytic activity but allows a local ECM remodeling in nonmenstrual tissues and ensures adequate sequential production of the multiple partners involved in massive menstrual tissue breakdown. Local factors can operate as inhibitors amplifying the response to ovarian steroids, or as inducers turned on upon ovarian steroids withdrawal. These two hypotheses are not mutually exclusive, and multiple regulatory pathways must coexist, for example to account for the maintenance of high expression of MMP-7 during the proliferative phase.

Acknowledgments

We thank Drs. Y. Christiane, M. Donnay, J. Donnez, E. Longueville, V. Malvaux, J. C. Verougstraete, and their colleagues for providing endometrial tissues; Dr. P. Goubau for providing access to laboratory equipment; and P. Camby, D. Dubois, A. Noel, and Y. Marchand for skillful technical help or expert secretarial assistance.

Received April 8, 2005. Accepted July 14, 2005.

Address all correspondence and requests for reprints to: Etienne Marbaix, Cell Biology Unit, Christian de Duve Institute of Cellular Pathology, Université Catholique de Louvain, avenue Hippocrate, 75, B-1200 Bruxelles, Belgium. E-mail: marbaix@cell.ucl.ac.be.

This work was supported by grants from the Belgian “Fonds de la Recherche Scientifique Médicale” (3.4555.02 to E.M.), from the “Fonds Spécial de Recherche” of the Université Catholique de Louvain (to V.V. and E.M.), from Interuniversity Attraction Poles and Concerted Re-

search Actions (to P.J.C.), and from Organon (to E.M.). P.B.C. was a Research Fellow and P.H. is a Research Associate of the Belgian "Fonds National de la Recherche Scientifique". C.M.P. is recipient of a fellowship from the Belgian "Fonds pour la formation à la Recherche dans l'Industrie et dans l'Agriculture".

References

- Marbaix E, Kokorine I, Moulin P, Donnez J, Eeckhout Y, Courtoy PJ 1996 Menstrual breakdown of human endometrium can be mimicked *in vitro* and is selectively and reversibly blocked by inhibitors of matrix metalloproteinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:9120–9125
- Galant C, Vekemans M, Lemoine P, Galant C, Singer CF, Courtoy PJ, Eeckhout Y, Marbaix E 2000 Temporal and spatial association of matrix metalloproteinases with focal endometrial breakdown and bleeding upon progestin-only contraception. *J Clin Endocrinol Metab* 85:4827–4834
- Galant C, Berliere M, Dubois D, Verougstraete JC, Charles A, Lemoine P, Kokorine I, Eeckhout Y, Courtoy PJ, Marbaix E 2004 Focal expression and final activity of matrix metalloproteinases may explain irregular dysfunctional endometrial bleeding. *Am J Pathol* 165:83–94
- Henriet P, Cornet PB, Lemoine P, Galant C, Singer CF, Courtoy PJ, Eeckhout Y, Marbaix E 2002 Circulating ovarian steroids and endometrial matrix metalloproteinases (MMPs). *Ann NY Acad Sci* 955:119–138
- Osteen KG, Bruner-Tran KL, Ong D, Eisenberg E 2002 Paracrine mediators of endometrial matrix metalloproteinase expression: potential targets for progestin-based treatment of endometriosis. *Ann NY Acad Sci* 955:139–146
- Osteen KG, Igarashi TM, Bruner-Tran KL 2003 Progesterone action in the human endometrium: induction of a unique tissue environment which limits matrix metalloproteinase (MMP) expression. *Front Biosci* 8:d78–d86
- Kokorine I, Marbaix E, Henriet P, Okada Y, Donnez J, Eeckhout Y, Courtoy PJ 1996 Focal cellular origin and regulation of interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-1) are related to menstrual breakdown in the human endometrium. *J Cell Sci* 109:2151–2160
- Marbaix E, Donnez J, Courtoy PJ, Eeckhout Y 1992 Progesterone regulates the activity of collagenase and related gelatinases A and B in human endometrial explants. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:11789–11793
- Marbaix E, Kokorine I, Henriet P, Donnez J, Courtoy PJ, Eeckhout Y 1995 The expression of interstitial collagenase in human endometrium is controlled by progesterone and by oestradiol and is related to menstruation. *Biochem J* 305:1027–1030
- Marbaix E, Kokorine I, Donnez J, Eeckhout Y, Courtoy PJ 1996 Regulation and restricted expression of interstitial collagenase suggest a pivotal role in the initiation of menstruation. *Hum Reprod* 11(Suppl 2):134–143
- Rodgers WH, Matrisian LM, Giudice LC, Dsupin B, Cannon P, Svitek C, Gorstein F, Osteen KG 1994 Patterns of matrix metalloproteinase expression in cycling endometrium imply differential functions and regulation by steroid hormones. *J Clin Invest* 94:946–953
- Maatta M, Soini Y, Liakka A, Autio-Harmainen H 2000 Localization of MT1-MMP, TIMP-1, TIMP-2, and TIMP-3 messenger RNA in normal, hyperplastic, and neoplastic endometrium. Enhanced expression by endometrial adenocarcinomas is associated with low differentiation. *Am J Clin Pathol* 114:402–411
- Hampton AL, Salmons LA 1994 Expression of messenger ribonucleic acid encoding matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors is related to menstruation. *J Endocrinol* 141:R1–R3
- Cox KE, Piva M, Sharpe-Timms KL 2001 Differential regulation of matrix metalloproteinase-3 gene expression in endometriotic lesions compared with endometrium. *Biol Reprod* 65:1297–1303
- Goffin F, Munaut C, Frankenne F, Perrier D'Hauterive S, Beliard A, Fridman V, Nervo P, Collige A, Foidart JM 2003 Expression pattern of metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix-metalloproteinases in cycling human endometrium. *Biol Reprod* 69:976–984
- Cornet PB, Picquet C, Lemoine P, Osteen KG, Bruner-Tran KL, Tabibzadeh S, Courtoy PJ, Eeckhout Y, Marbaix E, Henriet P 2002 Regulation and function of LEFTY-A/EBAF in the human endometrium. mRNA expression during the menstrual cycle, control by progesterone, and effect on matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 277:42496–42504
- Cornet PB, Galant C, Eeckhout Y, Courtoy PJ, Marbaix E, Henriet P 2005 Regulation of matrix metalloproteinase-9/gelatinase B expression and activation by ovarian steroids and LEFTY-A/EBAF in the human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 90:1001–1011
- Noyes RW, Hertig AT, Rock J 1950 Dating the endometrial biopsy. *Fertil Steril* 1:3–25
- Chubinskaya S, Huch K, Mikecz K, Cs-Szabo G, Hasty KA, Kuettner KE, Cole AA 1996 Chondrocyte matrix metalloproteinase-8: up-regulation of neutrophil collagenase by interleukin-1 β in human cartilage from knee and ankle joints. *Lab Invest* 74:232–240
- Molloy KJ, Thompson MM, Jones JL, Schwalbe EC, Bell PR, Naylor AR, Loftus IM 2004 Unstable carotid plaques exhibit raised matrix metalloproteinase-8 activity. *Circulation* 110:337–343
- Mainardi CL, Pourmotabbed TF, Hasty KA 1991 Inflammatory phagocytes and connective tissue degrading metalloproteinases. *Am J Med Sci* 302:171–175
- Cole AA, Chubinskaya S, Schumacher B, Huch K, Szabo G, Yao J, Mikecz K, Hasty KA, Kuettner KE 1996 Chondrocyte matrix metalloproteinase-8. Human articular chondrocytes express neutrophil collagenase. *J Biol Chem* 271:11023–11026
- Hanemaaijer R, Sorsa T, Kontinen YT, Ding Y, Sutinen M, Visser H, van Hinsbergh VW, Helaakoski T, Kainulainen T, Ronka H, Tschesche H, Salo T 1997 Matrix metalloproteinase-8 is expressed in rheumatoid synovial fibroblasts and endothelial cells. Regulation by tumor necrosis factor- α and doxycycline. *J Biol Chem* 272:31504–31509
- Palosaari H, Wahlgren J, Larmas M, Ronka H, Sorsa T, Salo T, Tjaderhane L 2000 The expression of MMP-8 in human odontoblasts and dental pulp cells is down-regulated by TGF- β 1. *J Dent Res* 79:77–84
- Hulbooy DL, Rudolph LA, Matrisian LM 1997 Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function. *Mol Hum Reprod* 3:27–45
- Rudolph-Lowe LA, Slayden OD, Matrisian LM, Brenner RM 1998 Matrix metalloproteinase expression in Macaca mulatta endometrium: evidence for zone-specific regulatory tissue gradients. *Biol Reprod* 59:1349–1359
- Gao F, Chen XL, Wei P, Gao HJ, Liu YX 2001 Expression of matrix metalloproteinase-2, tissue inhibitors of metalloproteinase-1, -3 at the implantation site of rhesus monkey during the early stage of pregnancy. *Endocrine* 16:47–54
- Jokima V, Oksjoki S, Kujari H, Vuorio E, Anttila L 2002 Altered expression of genes involved in the production and degradation of endometrial extracellular matrix in patients with unexplained infertility and recurrent miscarriages. *Mol Hum Reprod* 8:1111–1116
- Kao LC, Tulac S, Lobo S, Imani B, Yang JP, Germeyer A, Osteen K, Taylor RN, Lessey BA, Giudice LC 2002 Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation. *Endocrinology* 143:2119–2138
- Borthwick JM, Charnock-Jones DS, Tom BD, Hull ML, Teirney R, Phillips SC, Smith SK 2003 Determination of the transcript profile of human endometrium. *Mol Hum Reprod* 9:19–33
- Higuchi T, Kanzaki H, Nakayama H, Fujimoto M, Hatayama H, Kojima K, Iwai M, Mori T, Fujita J 1995 Induction of tissue inhibitor of metalloproteinase 3 gene expression during *in vitro* decidualization of human endometrial stromal cells. *Endocrinology* 136:4973–4981
- Salmons LA, Butt AR, Hammond FR, Garcia S, Zhang J 1997 Production of endometrial matrix metalloproteinases, but not their tissue inhibitors, is modulated by progesterone withdrawal in an *in vitro* model for menstruation. *J Clin Endocrinol Metab* 82:1409–1415
- Lockwood CJ, Krikun G, Hausknecht VA, Papp C, Schatz F 1998 Matrix metalloproteinase and matrix metalloproteinase inhibitor expression in endometrial stromal cells during progestin-initiated decidualization and menstruation-related progestin withdrawal. *Endocrinology* 139:4607–4613
- Dai D, Litman ES, Schonteich E, Leslie KK 2003 Progesterone regulation of activating protein-1 transcriptional activity: a possible mechanism of progesterone inhibition of endometrial cancer cell growth. *J Steroid Biochem Mol Biol* 87:123–131
- Wick M, Haronen R, Mumberg D, Burger C, Olsen BR, Budarf ML, Apte SS, Muller R 1995 Structure of the human TIMP-3 gene and its cell cycle-regulated promoter. *Biochem J* 311:549–554
- Doyle KM, Russell DL, Sriraman V, Richards JS 2004 Coordinate transcription of the ADAMTS-1 gene by luteinizing hormone and progesterone receptor. *Mol Endocrinol* 18:2463–2478

RÉGULATION DE L'ACTIVITÉ DES MÉTALLOPROTÉASES MATRICIELLES DANS L'ENDOMÈTRE HUMAIN

Héloïse GAIDE CHEVRONNAY*, Chrystel PRETTO*,
Vassil VASSILEV*, Patrick HENRIET*
et Etienne MARBAIX*

Article reçu le 1^{er} juin 2005 et accepté définitivement le 10 octobre 2005

■ RÉSUMÉ

Les métalloprotéases matricielles (MMPs) sont des enzymes-clés impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire de l'endomètre menant à l'élimination de la couche fonctionnelle lors des menstruations. L'activité de ces puissantes enzymes est étroitement régulée à différents niveaux durant tout le cycle menstruel. Bien qu'un contrôle global par les stéroïdes ovariens s'exerce sur l'expression des ARNm des MMPs, aussi bien *in vivo* qu'en culture d'explant, celles-ci répondent de manière variable, suggérant l'intervention de modulateurs additionnels, dont des cytokines tels que l'IL-1 α , Lefty-A et les TGF- β s. Les MMPs étant produites sous forme latente, leur activation constitue un

deuxième niveau de régulation. L'activité des MMPs est également contrôlée par des inhibiteurs tissulaires spécifiques, les TIMPs. Enfin, la concentration de l'activité à la membrane cellulaire suite à la liaison à des récepteurs spécifiques ainsi que la dégradation lysosomiale après endocytose constituent des degrés de régulation supplémentaires récemment mis en évidence. Cette revue détaille les différents niveaux de contrôle de l'activité des MMPs. La compréhension de ces mécanismes permettra de mieux cibler les traitements des saignements dysfonctionnels, un problème majeur en gynécologie.

■ SUMMARY

The matrix metalloproteinases (MMPs) are key enzymes involved in extracellular matrix breakdown leading to the menstrual shedding of the endometrial functionalis. The activity of

these powerful enzymes is tightly regulated at several levels throughout the menstrual cycle. Although the expression of MMPs mRNA is globally controlled by ovarian steroids, not only *in vivo* but also in explant culture, their variable response suggests the implication of additional modulators, e.g. cytokines such as IL-1 α , Lefty-A and the TGF- β s. Since the MMPs are produced as latent enzymes, a second level of regulation appears to be their activation. The MMPs activity is also controlled by specific inhibitors, named TIMPs. Finally, the binding of MMPs to specific receptors that focuses their activity at the cellular membrane and also their lysosomal degradation after endocytosis are additional levels of regulation that have just emerged. This review focuses on the different levels of control of MMPs activity. The unravelling of these mechanisms will allow to propose more rational treatments for dysfunctional bleeding, a major problem in gynaecology.

■ MOTS-CLÉS

Métalloprotéases matricielles
Cytokines
Endomètre
Régulation

■ KEY WORDS

Matrix metalloproteinases
Cytokines
Endometrium
Regulation

* Unité de Biologie Cellulaire, Christian de Duve Institute of Cellular Pathology et Faculté de Médecine de l'Université catholique de Louvain, B-1200 Bruxelles, Belgique.

Les métalloprotéases matricielles (MMPs) sont une famille d'enzymes comprenant plus d'une vingtaine de membres qui se caractérisent par une structure générale similaire (Figure 1). Ces enzymes sont capables de dégrader pratiquement tous les constituants de la matrice extracellulaire. En outre, elles régulent la prolifération et la différenciation cellulaires et tissulaires en libérant ou activant des cytokines et facteurs de croissance trappés dans la matrice extracellulaire (effet matricrine) ou exposés à la membrane plasmique des cellules (effet autocrine ou paracrine) [18].

Les MMPs sont produites sous forme latente, un propeptide masquant le site actif du domaine catalytique. Le clivage du propeptide dégage le site actif et permet à la MMP de dégrader ses substrats. Toutefois, l' α_2 -macroglobuline et les inhibiteurs tissulaires de MMPs (TIMPs) se lient au domaine catalytique et empêchent cette dégradation. L'activité des MMPs est donc régulée à plusieurs niveaux (Figure 2) : outre les étapes de contrôle qui concernent l'expression des ARN messagers et des protéines, l'activation des formes latentes et la production d'inhibiteurs, des régulations addi-

tionnelles ont été récemment mises en évidence. En effet, l'activité des MMPs peut aussi être concentrée à la surface cellulaire suite à leur liaison à la membrane plasmique ou elle peut être abolie par leur dégradation lysosomiale après endocytose.

L'endomètre humain est un tissu qui exprime de nombreuses MMPs [10, 14, 23] parmi lesquelles la collagénase-1 (MMP-1), les gélatinases A et B (MMP-2 et -9), les stromélysines-1, -2 et -3 (MMPs-3, -10 et -11), les matrilysines-1 et -2 (MMPs-7 et -26), et des MMPs accrochées à la membrane cellulaire, dites de type membranaire (MT-MMP) dont la MT1-MMP (MMP-14). Les MMPs sont impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire de l'endomètre au cours de la menstruation, comme cela a pu être montré dans des cultures d'explants [16]. La plupart des MMPs ont été décrites comme exprimées essentiellement, voire exclusivement, au cours de la phase menstruelle du cycle, avec toutefois la notable exception de la MMP-26 dont l'expression est maximale en période péri-ovulatoire [9, 20]. *In vitro*, la progestérone réprime l'expression et/ou l'activité de la plupart des MMPs endométriales [11, 15]. Toutefois, les mêmes MMPs sont exprimées et activées lors de saignements endométriaux dysfonctionnels, qui paradoxalement surviennent souvent sous traitement progestatif [7, 8, 17]. Nous avons dès lors tenté de mieux comprendre les mécanismes par lesquels la progestérone régule l'activité des MMPs.

Figure 1 : Structure générale des métalloprotéases matricielles.

Les MMPs sont des protéines qui partagent une organisation structurale similaire : après un peptide signal à leur extrémité N-terminale, responsable de la sécrétion de la protéine, un propeptide recouvre partiellement le domaine catalytique qui lui fait suite, masquant le site actif (schématisé par un triangle vert dans lequel se trouve l'ion Zn^{2+} responsable de leur dénomination) et empêchant de ce fait l'activité enzymatique. L'accès du substrat au site actif est rendu possible lorsque le propeptide est écarté du domaine catalytique par des agents chaotropes ou des dérivés oxygénés produits lors d'inflammation, ou est clivé par des enzymes. Les gélatinases possèdent des domaines additionnels au sein du domaine catalytique. Hormis les matrilysines (MMP-7 et -26), les MMPs possèdent à leur extrémité C-terminale 4 domaines similaires à l'hémopexine qui interviennent dans la reconnaissance du substrat. Ces domaines sont connectés au domaine catalytique par une région charnière. En outre, les MMPs de type membranaire sont accrochées à la membrane plasmique soit par un domaine transmembranaire auquel fait suite un domaine cytosolique, soit par une ancre glycosyl-phosphatidylinositol.

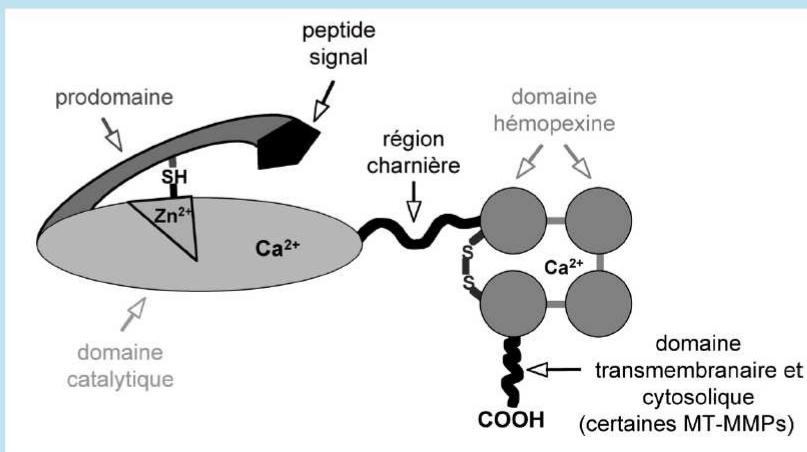
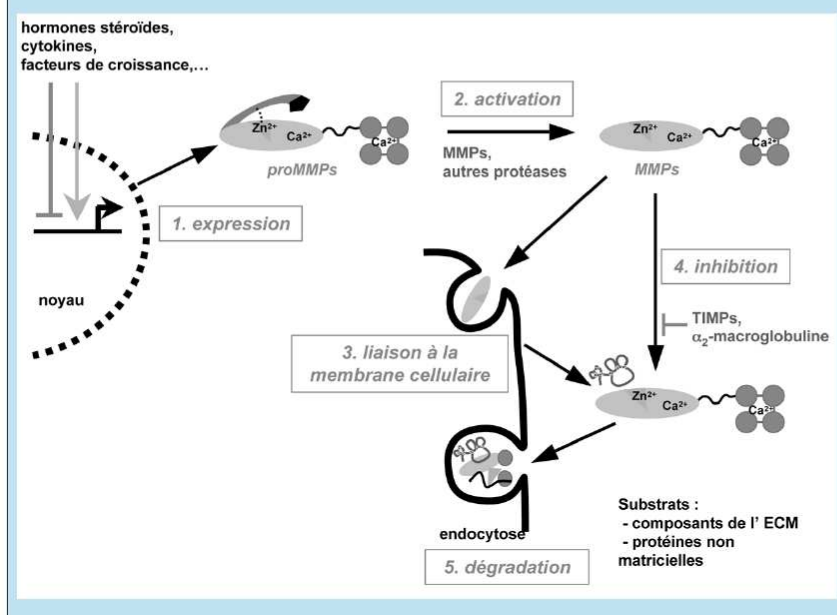


Figure 2 : Différents niveaux de régulation de l'activité des métalloprotéases matricielles.

L'activité des MMPs est contrôlée au niveau (1) de leur expression, notamment par des hormones stéroïdes et des cytokines ; (2) de leur activation, réalisée par clivage du propeptide par différentes protéases dont des MMPs ; (3) de leur liaison à la membrane plasmique qui permet de concentrer les MMPs à la surface cellulaire ; (4) de leur inhibition par l' α_2 -macroglobuline et les inhibiteurs tissulaires de MMPs (TIMPs, schématisés en bleu au-dessus du site actif) ; et (5) de leur endocytose suivie de dégradation lysosomiale.



■ RÉGULATION DE L'EXPRESSION DES MMPs DANS L'ENDOMÈTRE AU COURS DU CYCLE ET DANS DES EXPLANTS EN CULTURE

À cette fin, le niveau d'expression de l'ARNm de plusieurs MMPs a été déterminé dans une cinquantaine d'endomètres prélevés aux différentes phases du cycle menstruel, par réaction en chaîne à la polymérase en temps réel après transcription inverse (RT-PCR quantitative) [5, 26]. Cette technique très sensible permet de quantifier l'abondance relative d'un ARNm par rapport à un ARNm de référence, en l'occurrence celui de la β -actine qui ne varie guère au cours du cycle

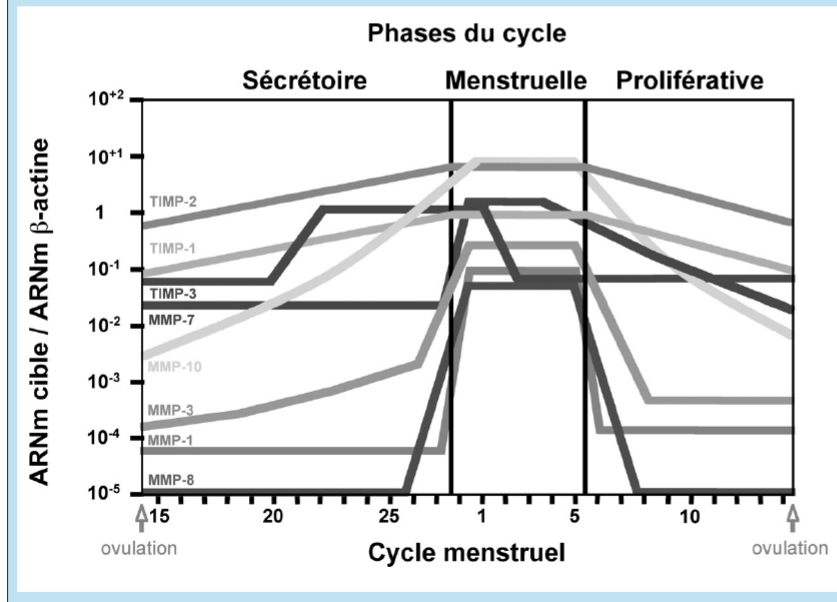
menstruel. Si la comparaison entre ARNm de différents gènes peut être sujette à caution parce que dépendant de conditions d'amplification qui peuvent varier, la RT-PCR quantitative permet en tout cas de déterminer avec précision la variation d'expression d'un même gène au cours du cycle menstruel. Les profils d'expression obtenus se distinguent par leur rapidité, leur amplitude et leur moment d'apparition au cours du cycle (Figure 3). Ainsi, les MMPs-1, -3, -8 et -10 sont exprimées en début de phase sécrétoire à des taux 1 000 fois moindres qu'en phase périmenstruelle, alors que les ARNm des MMPs-7 et -9 ne sont qu'une cinquantaine de fois moins abondants. Par ailleurs, l'augmentation d'expression des MMPs est

abrupte lors de la transition entre phase sécrétoire et phase menstruelle, sauf pour la MMP-10, et dans une moindre mesure la MMP-3, dont l'expression augmente de manière progressive au cours de la phase sécrétoire. Enfin, les taux d'ARNm diminuent brutalement lors de la transition entre phase menstruelle et phase proliférative, sauf pour la MMP-7 dont l'expression s'amoindrit très progressivement tout au long de la phase proliférative. Bien que globalement effondrée par rapport à la phase menstruelle, l'abondance relative d'ARNm des autres MMPs est très variable d'un endomètre prolifératif à l'autre indiquant que l'inhibition d'expression est moins forte en phase proliférative qu'en phase sécrétoire, en accord avec un rôle prépondérant de la progestérone dans cette inhibition.

Ces observations sont reproduites *in vitro*, puisque l'association d'œstradiol et de progestérone réprime l'expression des MMPs dans des explants endométriaux mais à un niveau différent d'un gène à l'autre et en fonction de la phase du cycle au cours de laquelle le tissu a été prélevé [26]. De manière remarquable, le profil de répression par les stéroïdes ovariens dans les explants est superposable à celui observé *in vivo* entre le début de phase sécrétoire et la phase menstruelle, même si l'amplitude de l'inhibition est nettement moindre. Ces résultats démontrent clairement que les MMPs répondent de manière variable au contrôle hormonal, notamment à la répression progestative, ce qui implique l'intervention de modulateurs supplémentaires, spécifiques de chaque gène et/ou de la phase du cycle.

Figure 3 : Représentation schématique des profils d'expression de l'ARNm de MMPs et de TIMPs dans l'endomètre humain au cours du cycle menstruel.

Les ARNm des différents MMPs et TIMPs indiqués ont été quantifiés par RT-PCR en temps réel et normalisés par l'ARNm de la β -actine. Les rapports sont présentés sur une échelle logarithmique (adapté de [26]).



■ EXPRESSION DE LA COLLAGÉNASE-2 (MMP-8) DANS L'ENDOMÈTRE

De manière inattendue, ces investigations ont révélé une augmentation considérable de l'expression de l'ARNm de la collagénase-2 (ou collagénase de neutrophile, MMP-8), non seulement au cours de la menstruation mais même dans des explants d'endomètre cultivés en l'absence de stéroïdes ovariens [26]. La MMP-8 a longtemps été considérée comme provenant exclusivement de polynucléaires neutrophiles. Exprimée lors de la maturation de ces leucocytes dans la moelle osseuse, la MMP-8 est stockée dans leurs granules spécifiques dont elle est relarguée lors de leur arrivée sur les sites inflammatoires. Les neutrophiles sont abondants dans l'endomètre mens-

truel et peuvent donc être la source de quantités importantes de MMP-8. Bien que l'activité transcriptionnelle des neutrophiles puisse être réenclenchée sur les sites inflammatoires [19], il semble toutefois improbable que ce phénomène soit à lui seul responsable de l'augmentation spectaculaire de l'ARNm de MMP-8 en phase menstruelle, et il ne peut en tout cas pas en rendre compte dans les explants prélevés en dehors de cette phase. Nous avons donc tenté d'identifier les cellules exprimant la MMP-8 par hybridation *in situ* à l'aide d'oligonucléotides marqués à leur extrémité 3'. Cet examen a révélé la présence de l'ARNm de la MMP-8 dans les cellules stromales d'endomètre menstruel et d'explants cultivés sans stéroïdes ovariens (Figure 4). Le type cellulaire a pu être identifié en démontrant sur des coupes sériées que les cellules exprimant

la MMP-8 sont reconnues par l'anticorps anti-CD10, un marqueur des cellules stromales, mais pas par l'anticorps anti-CD45, un marqueur des leucocytes, ni par l'anticorps anti-CD68, un marqueur de macrophages. Les mêmes cellules stromales de l'endomètre expriment donc deux collagénases distinctes, les MMP-1 et -8, dont les ARNm sont préférentiellement détectés dans les cellules bordant les glandes (Figure 4), suggérant l'intervention de facteurs paracrines d'origine épithéliale dans l'induction de ces MMPs [13].

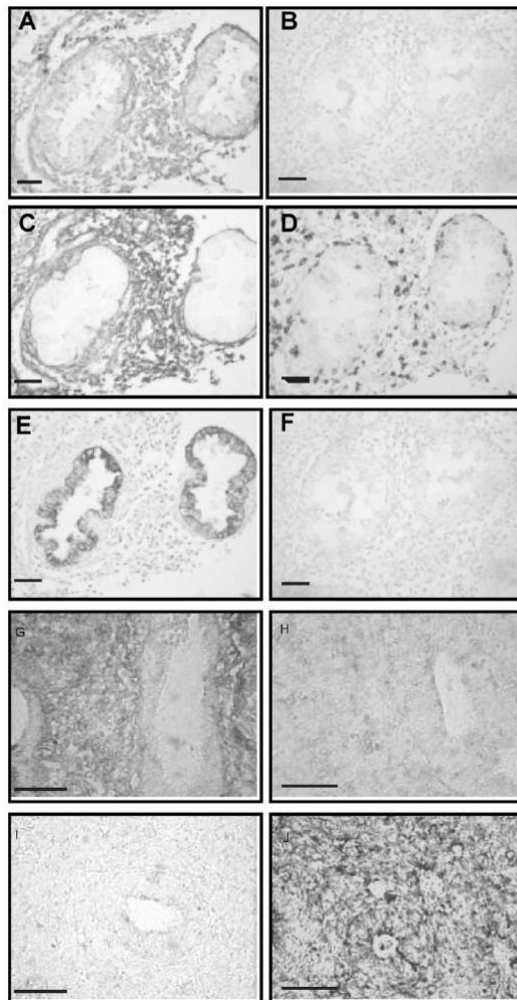
■ CYTOKINES IMPLIQUÉES DANS LA RÉGULATION DES MÉTALLOPROTÉASES MATRICIELLES : IL-1 α , LEFTY-A ET TGF β

De fait, des expériences de co-culture montrent que les cellules épithéliales endométriales libèrent de l'interleukine-1 α (IL-1 α) qui induit l'expression de MMP-1 par les cellules stromales [24]. Cette observation suggère un rôle important de l'IL-1 α dans l'induction des MMPs menstruelles. Toutefois, il reste à comprendre comment cette protéine dépourvue de peptide signal parvient à quitter les cellules épithéliales pour stimuler les cellules stromales avoisinantes.

Lefty-A est une autre cytokine impliquée dans l'induction des MMPs. En effet, cette protéine de la superfamille des facteurs de croissance transformant (TGF)- β voit son niveau d'ARNm augmenter de manière spectaculaire en fin de cycle menstruel, dans les jours qui précèdent l'induction des MMPs menstruelles (Figure 5) [4, 5]. Cette induction est probablement due à la

Figure 4: Identification des cellules exprimant la MMP-8 et le TIMP-3 dans l'endomètre humain menstruel et dans des explants cultivés avec ou sans stéroïdes ovariens.

Des sections sériées d'endomètre menstruel (A-F) et d'explants provenant d'un endomètre prolifératif (G-J) ont été hybridées avec des oligonucléotides complémentaires de l'ARNm de la MMP-8 (A, G, I) ou du TIMP-3 (H, J). Une section sériée de l'endomètre menstruel a été hybridée avec des oligonucléotides identiques à la séquence de l'ARNm de la MMP-8, comme contrôle négatif (B). Les autres sections ont été incubées avec des anticorps reconnaissant spécifiquement le CD10, un marqueur des cellules stromales de l'endomètre (C), le CD45, un marqueur des leucocytes (D), la cytokeratine 19, un marqueur des cellules épithéliales (E), ou le CD68, un marqueur des macrophages (F). Les explants ont été cultivés pendant 24 h sans addition de stéroïdes ovariens (G-H) ou en présence d'œstradiol et de progestérone (I-J). Notez que les cellules exprimant l'ARNm de la MMP-8 sont marquées par l'anticorps anti-CD10, et le contraste dans l'expression de la MMP-8 et du TIMP-3 par des explants d'endomètre en réponse à la stimulation œstro-progestative. Chaque barre correspond à 50 µm.



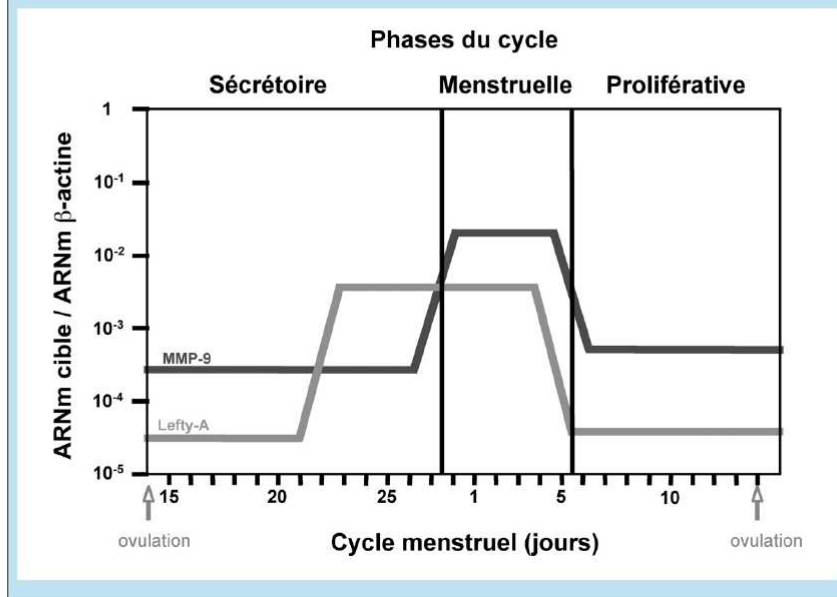
chute de la concentration sérique de progestérone puisque cette dernière inhibe l'expression de Lefty-A dans des explants alors que l'œstradiol est sans effet. De plus, Lefty-A stimule la production de MMP-3, -7 et -9 par des explants et cet effet est bloqué par la combinaison d'œstradiol et de progestérone.

Le TGF- β par contre, pourtant membre de la même superfamille, agit comme intermédiaire de la progestérone pour inhiber l'expression des MMPs, en particulier de la MMP-7 produite par les cellules épithéliales et de la MMP-3 produite par les cellules stromales [1, 2]. Le TGF- β existe sous trois isoformes, les TGF- β 1, - β 2 et - β 3, codées par des gènes distincts mais agissant de manière similaire en se fixant au récepteur des TGF- β s de type II. Ce dernier recrute le récepteur de type I et phosphoryle son domaine kinase, ce qui induit ensuite une signalisation intracellulaire par phosphorylation de protéines Smads. Les TGF- β s sont sécrétés sous forme de précurseurs latents qui se fixent à des constituants de la matrice extracellulaire ou à des intégrines [25]. Ils doivent être libérés de cet accrochage et activés pour pouvoir exercer leur effet.

En principe, chacune des trois isoformes de TGF- β est susceptible de jouer le rôle d'intermédiaire pour transmettre l'effet inhibiteur de la progestérone. Intuitivement, on pourrait supposer que la progestérone stimule l'expression de cette isoforme. Or, la régulation de l'expression de l'ARNm des TGF- β s dans l'endomètre a déjà fait l'objet de nombreuses études, mais les résultats publiés sont soit discordants, soit obtenus à l'aide de méthodes peu quantitatives. Nous avons donc

Figure 5 : Représentation schématique des profils d'expression de l'ARNm de Lefty-A et de la MMP-9 dans l'endomètre humain au cours du cycle menstruel.

Les ARNm de Lefty-A et de la MMP-9 ont été quantifiés par RT-PCR en temps réel et normalisés par l'ARNm de la β -actine. Les rapports sont présentés sur une échelle logarithmique. Remarquez le décalage temporel entre l'augmentation d'expression de l'ARNm de la cytokine et celui de la MMP (adapté de [5]).



investigué par RT-PCR quantitative l'expression de l'ARNm des isoformes de TGF- β et de leur récepteur de type I au cours du cycle menstruel et exploré leur régulation par les stéroïdes ovariens en culture d'explants. Alors que l'expression des TGF- β 1, - β 3 et de leur récepteur de type I ne varie guère au cours du cycle, bien qu'augmentant légèrement en phase menstruelle, celle du TGF- β 2 s'accroît fortement en milieu et fin de phase sécrétoire et lors de la menstruation. Si l'augmentation des taux d'ARNm de TGF- β 2 lorsque la concentration de progestérone est maximale peut suggérer que cette cytokine joue un rôle de médiateur de l'effet inhibiteur de la progestérone, la persistance de taux élevés lorsque la concentration de progestérone chute en fin de phase sécrétoire et

lors de la phase menstruelle est plus difficilement compatible avec cette fonction. De plus, en culture d'explants, la progestérone inhibe partiellement son expression au lieu de la stimuler, alors que cette expression est largement accrue dans les explants cultivés sans stéroïdes ovariens. La progestérone, seule ou combinée à l'œstradiol, inhibe aussi l'expression du TGF- β 3 qui n'est pas stimulée en l'absence des stéroïdes contrairement à celle du TGF- β 2. Enfin, la progestérone et l'œstradiol ont peu d'effet sur le TGF- β 1 et le récepteur de type I. Ces résultats indiquent donc ici aussi une régulation différentielle de ces gènes par la progestérone, et l'implication de facteurs additionnels responsables de l'augmentation d'expression du TGF- β 2 en phase sécrétoire. Par ailleurs, des mécanismes alternatifs régulant la

biodisponibilité des TGF- β s en les libérant de la matrice extracellulaire et/ou en les activant pourraient aussi intervenir pour rendre compte de leur effet inhibiteur sur l'expression des MMPs.

■ L'ACTIVITÉ DE LA MMP-9 EST ESSENTIELLEMENT CONTRÔLÉE AU NIVEAU DE SON ACTIVATION

Les MMPs étant produites sous forme latente, leur activation est un autre niveau possible de régulation de leur activité. La gélatinase B (MMP-9) en est un excellent exemple dans l'endomètre. En effet, l'expression de cette MMP est moins bien inhibée que celle d'autres MMPs au cours des phases proliférative et sécrétoire du cycle par comparaison avec la phase menstruelle (Figure 3) [5]. De plus, l'association d'œstradiol et de progestérone inhibe moins l'expression de cet ARNm que celle d'autres MMPs dans des explants en culture. Pourtant, les examens immunohistochimiques montrent que la MMP-9 est particulièrement abondante dans des foyers de cellules stromales pendant la phase menstruelle, alors qu'elle est détectée sans variation cyclique dans les autres types cellulaires. De même, elle est synthétisée préférentiellement par les cellules stromales dans les explants cultivés sans stéroïdes ovariens, mais non dans ceux cultivés en présence d'œstradiol et de progestérone. Cette observation a été effectuée en cultivant les explants en présence de monensine, un ionophore qui empêche la sécrétion des protéines et entraîne donc l'accumulation

des protéines synthétisées dans l'appareil de Golgi. L'expression de la MMP-9 pourrait être nettement mieux contrôlée par la progestérone dans les cellules stromales que dans les autres types cellulaires, modulant donc l'impression de faible régulation déduite des résultats obtenus par analyse globale du tissu.

Quoiqu'il en soit, la MMP-9 est présente dans le tissu endométrial tout au long du cycle menstruel mais uniquement sous forme latente [5, 22]. Par contre, la forme active de MMP-9 n'est décelée que lors de la menstruation indiquant que l'étape d'activation est critique dans le contrôle de l'activité de cette protéase dans l'endomètre. En culture d'explants, la progestérone empêche l'activation de la proMMP-9 [14]. L'utilisation d'inhibiteurs et d'anticorps bloquant spécifiques a permis de démontrer que l'activation de la proMMP-9 dans les explants cultivés sans progestérone est due à la stromélysine-1 (MMP-3), dont l'expression et l'activité sont drastiquement inhibées par la progestérone [26]. Il existe donc une cascade amplificatrice menant à la production de MMP-9 active via l'expression de MMP-3, sous le contrôle strict de la progestérone.

■ LES TIMPS CONTRÔLENT L'ACTIVITÉ DES MMPS

À quelques rares exceptions près, les TIMPs sont capables d'inhiber l'activité de toutes les MMPS. Nous avons analysé le profil d'expression des TIMPs-1, -2 et -3 au cours du cycle menstruel (Figure 3). Les ARNm des TIMPs-1 et -2 culminent lors de la menstruation, où ils sont

environ 10 fois plus abondants qu'en début de phase sécrétoire, tandis que l'ARNm du TIMP-3 est à son niveau maximal en fin de phase sécrétoire où il est une vingtaine de fois plus abondant qu'en début de phase sécrétoire, puis décroît lors de la menstruation. Le profil d'expression du TIMP-4 est toutefois différent et ressemble à celui de la matrilysine-2 (MMP-26), culminant en milieu de cycle [21]. Au total, l'expression des TIMPs-1, -2 et -3 est donc beaucoup plus stable que celle des MMPS au cours du cycle menstruel. Ces profils d'expression suggèrent que les TIMPs sont produits en abondance tout au long du cycle pour inhiber toute activité MMP intempestive lors des phases proliférative et sécrétoire, mais qu'ils sont débordés par l'augmentation rapide et majeure d'expression des MMPS lors de la menstruation, d'autant plus que l'expression des MMPS est initialement focale. Le même phénomène de débordement peut expliquer la dégradation de la matrice extracellulaire qui survient lors d'épisodes de saignement dysfonctionnel, phénomène facilité par la diminution d'expression du TIMP-1 concomitante à l'augmentation focale d'expression des MMPS [8].

En culture d'explants, l'œstradiol et la progestérone influencent peu l'expression des TIMPs, mais néanmoins de manière variable en fonction des phases du cycle : s'ils inhibent légèrement l'expression des TIMPs-1 et -2 dans les explants prolifératifs, ils sont sans effet sur les explants sécrétoires ; par contre, ils stimulent légèrement l'expression du TIMP-3, mais uniquement dans les explants

sécrétoires. Les expériences d'hybridation *in situ* montrent d'ailleurs que, contrairement à celui de la MMP-8, l'ARNm du TIMP-3 est détecté de manière très abondante dans des explants cultivés en présence des stéroïdes ovariens (Figure 4). De nouveau, ces résultats impliquent l'intervention de co-facteurs spécifiques des gènes et des phases du cycle dans la régulation de l'expression des TIMPs.

■ LIAISON À LA MEMBRANE CELLULAIRE ET ENDOCYTOSE DES MMPS

Deux autres niveaux de régulation de l'activité des MMPS ont été récemment identifiés. D'une part, les MMPS peuvent se lier à des récepteurs sur la membrane plasmique des cellules et être ainsi concentrées à des sites où leur activité est accrue [12]. Nos résultats préliminaires montrent qu'il en est de même pour la MMP-7 à la surface des cellules épithéliales de l'endomètre. D'autre part, certaines MMPS, en particulier la MMP-2, sont endocytées par le récepteur LRP (low density lipoprotein receptor-related protein) puis dégradées dans les lysosomes. Ce mécanisme, démontré pour le complexe MMP-2•TIMP-2 dans des fibroblastes tumoraux [6], pourrait être d'une importance majeure dans le contrôle de l'activité des MMPS dans l'endomètre comme il l'est pour assurer l'épuration du complexe uPA-PAI1 (activateur du plasminogène de type urokinase – inhibiteur de type 1 des activateurs du plasminogène) [3].

■ CONCLUSION

L'activité des MMPs endométriales est donc sous le contrôle global de la progestérone, mais elle est régulée à plusieurs niveaux depuis l'expression des protéases et leur activation jusqu'à leur endocytose et leur dégradation lysosomiale, éventuellement sous forme d'un complexe avec leurs inhibiteurs, les TIMPs, en passant par leur concentration à la membrane plasmique de cellules et l'inhibition de leur site actif par les TIMPs. Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués à chacune de ces étapes, notamment des interactions entre récepteur des stéroïdes ovariens et voie de signalisation des cytokines ou autres agents modulateurs dans la régulation de l'expression des MMPs, est requise pour tenter de comprendre comment une répression aussi stricte de l'activité des MMPs par la progestérone peut être perdue lors de l'apparition de saignements dysfonctionnels. ●

■ BIBLIOGRAPHIE

- [1] BRUNER KL, EISENBERG E, GORSTEIN F, OSTEEN KG. Progesterone and transforming growth factor-, coordinately regulate suppression of endometrial matrix metalloproteinases in a model of experimental endometriosis. *Steroids*, 1999, 64, 648-653.
- [2] BRUNER KL, RODGERS WH, GOLD LI, KORC M, HARGROVE JT, MATRISIAN LM, OSTEEN KG. Transforming growth factor, mediates the progesterone suppression of an epithelial metalloproteinase by adjacent stroma in the human endometrium. *Proc. Natl. Acad. U.S.A.*, 1995, 92, 7362-7366.
- [3] CASSLÉN B, NORDENGREN J, GUSTAVSSON B, NILBERT M, LUND LR. Progesterone stimulates degradation of urokinase plasminogen activator (u-PA) in endometrial stromal cells by increasing its inhibitor and surface expression of the u-PA receptor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1995, 80, 2776-2784.
- [4] CORNET PB, PICQUET C, LEMOINE P, OSTEEN KG, BRUNER-TRAN KL, TABIBZADEH S, COURTOY PJ, ECKHOUT Y, MARBAIX E, HENRIET P. Regulation and function of LEFTY-A/EBAF in the human endometrium. mRNA expression during the menstrual cycle, control by progesterone, and effect on matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.*, 2002, 277, 42496-42504.
- [5] CORNET PB, GALANT C, ECKHOUT Y, COURTOY PJ, MARBAIX E, HENRIET P. Regulation of matrix metalloproteinase-9/gelatinase B expression and activation by ovarian steroids and LEFTY-A/EBAF in the human endometrium. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2005, 90, 1001-1011.
- [6] EMONARD H, BELLON G, TROEBERG L, BERTON A, ROBINET A, HENRIET P, MARBAIX E, KIRKEGAARD K, PATTHY L, ECKHOUT Y, NAGASE H, HORNEBECK W, COURTOY PJ. Low density lipoprotein receptor-related protein mediates endocytic clearance of Pro-MMP-2•TIMP-2 complex through a thrombospondin-independent mechanism. *J. Biol. Chem.*, 2004, 279, 54944-54951.
- [7] GALANT C, VEKEMANS M, LEMOINE P, KOKORINE I, TWAGIRAYEZU P, HENRIET P, PICQUET C, RIGOT V, ECKHOUT Y, COURTOY PJ, MARBAIX E. Temporal and spatial association of matrix metalloproteinases with focal endometrial breakdown and bleeding upon progestin-only contraception. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2000, 85, 4827-4834.
- [8] GALANT C, BERLIÈRE M, DUBOIS D, VEROUGSTRAETE JC, CHARLES A, LEMOINE P, KOKORINE I, ECKHOUT Y, COURTOY PJ, MARBAIX E. Focal expression and final activity of matrix metalloproteinases may explain irregular dysfunctional endometrial bleeding. *Am. J. Pathol.*, 2004, 165, 83-94.
- [9] GOFFIN F, MUNAUT C, FRANKENNE F, PERRIER D'HAUTERIVE S, BELIARD A, FRIDMAN V, NERVO P, COLIGE A, FOIDART JM. Expression pattern of metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in cycling human endometrium. *Biol. Reprod.*, 2003, 69, 976-984.
- [10] HAMPTON AL, SALAMONSEN LA. Expression of messenger ribonucleic acid encoding matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors is related to menstruation. *J. Endocrinol.*, 1994, 141, R1-R3.
- [11] HENRIET P, CORNET PB, LEMOINE P, GALANT C, SINGER CF, COURTOY PJ, ECKHOUT Y, MARBAIX E. Circulating ovarian steroids and endometrial matrix metalloproteinases (MMPs). *Annals N. Y. Acad. Sci.*, 2002, 955, 119-138.
- [12] KIOI M, YAMAMOTO K, HIGASHI S, KOSHIKAWA N, FUJITA K, MIYAZAKI K. Matrilysin (MMP-7) induces homotypic adhesion of human colon cancer cells and enhances their metastatic potential in nude mouse model. *Oncogene*, 2003, 22, 8662-8670.
- [13] KOKORINE I, MARBAIX E, HENRIET P, OKADA Y, DONNEZ J, ECKHOUT Y, COURTOY PJ. Focal cellular origin and regulation of interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-1) are related to menstrual breakdown in the human endometrium. *J. Cell Sci.*, 1996, 109, 2151-2160.
- [14] MARBAIX E, DONNEZ J, COURTOY P.J, ECKHOUT Y. Progesterone regulates the activity of collagenase and related gelatinases A and B in human endometrial explants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1992, 89, 11789-11793.
- [15] MARBAIX E, KOKORINE I, HENRIET P, DONNEZ J, COURTOY PJ, ECKHOUT Y. The expression of interstitial collagenase in human endometrium is controlled by progesterone and by oestradiol and is related to menstruation. *Biochem. J.*, 1995, 305, 1027-1030.
- [16] MARBAIX E, KOKORINE I, MOULIN P, DONNEZ J, ECKHOUT Y, COURTOY PJ. Menstrual breakdown of human endometrium can be mimicked in vitro and is selectively and reversibly blocked by inhibitors of matrix metalloproteinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1996, 93, 9120-9125.
- [17] MARBAIX E, VEKEMANS M, GALANT C, RIGOT V, LEMOINE P, DUBOIS D, PICQUET C, HENRIET P, TWAGIRAYEZU P, SUFI S, ECKHOUT Y, COURTOY PJ. Circulating sex hormones and endometrial stromelysin-1 (matrix metalloproteinase-3) at the start of bleeding episodes in levonorgestrel-implant users. *Hum. Reprod.*, 2000, 15 suppl. 3, 120-134.

- [18] MOTT JD, WERB Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2004, 16, 558-564.
- [19] NAGAOKA I, HIROTA S. Increased expression of matrix metalloproteinase-9 in neutrophils in glycogen-induced peritoneal inflammation of guinea pigs. *Inflamm. Res.*, 2000, 49, 55-62.
- [20] PILKA R, WHATLING C, DOMANSKI H, HANSSON S, ERIKSSON P, CASSLÉN B. Epithelial expression of matrix metalloproteinase-26 is elevated at mid-cycle in the human endometrium. *Mol. Hum. Reprod.*, 2003, 9, 271-277.
- [21] PILKA R, DOMANSKI H, HANSSON S, ERIKSSON P, CASSLÉN B. Endometrial TIMP-4 mRNA is high at mid-cycle and in hyperplasia, but down-regulated in malignant tumours. Coordinated expression with MMP-26. *Mol. Hum. Reprod.*, 2004, 10, 641-650.
- [22] RIGOT V, MARBAIX E, LEMOINE P, COURTOY PJ, EECKHOUT Y. *In vivo* perimenstrual activation of progelatinase B (proMMP-9) in the human endometrium and its dependence on stromelysin 1 (MMP-3) *ex vivo*. *Biochem. J.*, 2001, 358, 275-280.
- [23] RODGERS WH, MATRISIAN LM, GIUDICE LC, DSUPIN B, CANNON P, SVITE C, GORSTEIN F, OSTEEEN KG. Patterns of matrix metalloproteinase expression in cycling endometrium imply differential functions and regulation by steroid hormones. *J. Clin. Invest.*, 1994, 94, 946-952.
- [24] SINGER CF, MARBAIX E, KOKORINE I, LEMOINE P, DONNEZ J, EECKHOUT Y, COURTOY P. Paracrine stimulation of interstitial collagenase (MMP-1) in the human endometrium by interleukin 1: its dual block by ovarian steroid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1994, 91, 10341-10345.
- [25] TAIPALE J, KESKI-OJA J. Growth factors in the extracellular matrix. *FASEB J.*, 1997, 11, 51-59.
- [26] VASSILEV V, PRETTO CM, CORNICI PB, DELVAUX D, EECKHOUT Y, COURTOY PJ, MARBAIX E, HENRIET P. Response of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases mRNAs to ovarian steroids in human endometrial explants mimics their gene- and phase-specific differential control *in vivo*. *Clin. Endocrinol. Metab.*, 2000, 52, 5848-5857.

Annexes

Séquences des ADNc des gènes étudiés :

- β -actine
- IL-1 α
- IL-1 β
- IL-1Ra
- MMP-1
- MMP-8

Dans ces séquences sont mis en évidence :

- les exons de couleurs alternées **noire** et **bleue**
- Les codons **start** et **stop** de traduction
- les amorces sens et antisens pour PCR en temps réel
- les sondes pour **hybridation *in situ***

β-actine

```

1  cccagcacc  caaggcgggc  aacgccaaaa  ctctccctcc  tcctcttctc  caatnctcgc
61  tctcgctctt  tttttttttc  gcaaaaggag  gggagagggg  gtaaaaaaat  gctgcaactgt
121  cggcgaagcc  ggtgagtgc  cggcgcgggg  ccaatcgctg  gcgccgttcc  gaaagttgcc
181  ttttatggct  cgagcggccg  cggcgcgccg  ctataaaacc  caccggcgcg  acgcgccacc
241  accgccgaga  ccgctccgc  cccgcgagca  cagagcctcg  cctttgccga  tccgccgccc
301  gtccacacc  gccgccaggt  aagcccggcc  agccgaccgg  ggcatgcggc  cgcggcccct
361  tcgcccgtgc  agagccgccg  tctgggcgc  agcggggggc  gcatgggggg  ggaaccggac
421  cgccgtgggg  ggcgcgggag  aagcccctgg  gcctccggag  atggggggaca  cccacgcca
481  gttcggaggc  gcgaggccgc  gctcggcagg  cgcgctccgg  gggtgccgct  ctcggggcgg
541  gggcaaccgg  cggggtcttt  gtctgagccg  ggctcttgcc  aatggggatc  gcaggggtgg
601  cgcggcgtag  cccccgccag  gcccggtggg  ggctggggcg  ccatgcgcgt  gcgcgctggt
661  cctttgggcg  ctaactgcgt  gcgcgccggg  aattggcgct  aattgcggct  gcggcccggg
721  actcaaggcg  ctaattgcgg  ctgcgttctg  gggcccgggg  tgccgcggcc  cgggcccggg
781  cgaaggcggg  ctcggtcgga  aggggtgggg  tcgcccgggc  tcccgggcgc  ttgcgcactt
841  cctgcccag  ccgccggccg  cccgaggggt  tggccgctgc  gtgcgcgcgc  gcgaccggcg
901  ctgtttgaac  cgggcggagg  cggggctggc  gcccggttgg  gagggggttg  gggcctggct
961  tcctgcccg  cgccgcgggg  acgcctccga  ccagtgtttg  ccttttatgg  taataacgcg
1021  ccggcccggc  ttcctttatc  cccaatcggt  cgcgcgccgg  cgccccctag  cggcctaagg
1081  actcggcgcg  ccggaagtgg  ccagggcggg  ggcgacttcg  gctcacagcg  cgcccggcta
1141  ttctcgcagc  tcaccatgga  tgatgatata  gccgcgctcg  tcgtcgacaa  cggctccggc
1201  atgtgcaagg  ccggcttcgc  gggcgacgat  gccccccggg  ccgtcttccc  ctccatcggt
1261  gggcgcccca  ggcaccaggg  cgtgatgggt  ggcaggggtc  agaaggattc  ctatgtgggc
1321  gacgaggccc  acagcaagag  aggcatactc  accctgaagt  accccatcga  gcacggcatc
1381  gtcaccaact  gggacgacat  ggacaaaatc  tggcaccaca  ccttctacaa  tgagctgctg
1441  gtggctcccg  aggagcacc  cgtgctgctg  accgaggccc  ccctgaaccc  caaggccaac
1501  cgcgagaaga  tgaccaggt  gagtggcctc  atgtttgaga  ccttcaacac  cccagccatg
1561  tacgttgcta  tccaggctgt  gctatccctg  tacgcctctg  gccgtaccac  tggcatcggt
1621  atggactccg  gtgacgggg  caccacact  gtgccatct  acgaggggta  tgccctcccc
1681  catgccatcc  tgcgtctgga  cctggctggc  ccggacctga  ctgactacct  catgaagatc
1741  ctcaccgagc  gcggctacag  cttcaccacc  acggccgagc  gggaaatcgt  gcgtgacatt
1801  aacgagaagc  tgtgctacgt  cgccctggac  ttcgagcaag  agatggccac  ggctgcttcc
1861  agctcctccc  tggagaagag  ctacgagctg  cctgacggcc  aggtcatcac  cattggcaat
1921  gagcggttcc  gctgccctga  ggcactcttc  cagccatgga  gtcctgtggc  atccacgaaa
1981  ctaccttcaa  ctccatcatg  aagtgtgacg  tggacatccg  caaagacctg  tacgccaaca
2041  cagtgtgtgc  tggcggcacc  accatgtacc  ctggcattgc  cgacaggatg  cagaacgaga
2101  tcactgccct  ggcaccagc  acaatgaaga  tcaaggatcat  tgctcctcct  gagcgcaagt
2161  actccgtgtg  gatcggcggc  tccatcctgg  cctcgtgtgc  caccttccag  cagatgtgga
2221  tcagcaagca  ggactatgac  gagtccggcc  cctccatcgt  ccaccgcaa  tgcttctag

```


IL-1 α

```

1 accaggcaac accattgaag gtcatatgt aaaaatccat gccttccttt ctcccaatct
61 ccattcccaa acttagccac tggcttctgg ctgaggcctt acgcatacct cccggggcctt
121 gcacacacct tcttctacag aagacacacc ttgggcatac cctacagaag accaggcttc
181 tctctgggtcc ttggtagagg gctactttac tgtaacaggg ccagggtgga gagttctctc
241 ctgaagctcc atccccctcta taggaaatgt gttgacaata ttcagaagag taagaggatc
301 aagacttctt tgtgctcaaa taccactgtt ctcttctcta ccctgcccta accaggagct
361 tgtcacccca aactctgagg tgatttatgc cttaatcaag caaacttccc tcttcagaaa
421 agatggctca ttttccctca aaagttgcca ggagctgcca agtattctgc caattcaccc
481 tggagcacia tcaacaaatt cagccagaac acaactacag ctactattag aactattatt
541 attataaaat tcctctccaa atctagcccc ttgacttcgg atttcacgat ttctcccttc
601 ctctagaaaa cttgataagt ttcccgcgct tccctttttc taagactaca tgtttgtcat
661 cttataaagc aaaggggtga ataaatgaac caaatcaata acttctggaa tatctgcaaa
721 caacaataat atcagctatg ccatctttca ctatttttagc cagtatcgag ttgaatgaac
781 atagaaaaat acaaaaactga attcttccct gtaaattccc cgttttgacg acgcacttgt
841 agccacgtag ccacgcctac ttaagacaat tacaaaaggc gaagaagact gactcaggct
901 taagctgcca gccagagagg gagtcatttc attggcggtt gagtcagcaa agaagtcaag
961 atggccaaag ttccagacat gtttgaagac ctgaagaact gttacagtga aaatgaagaa
1021 gacagttcct ccattgatca tctgtctctg aatcagaaat ccttctatca tgtaagctat
1081 ggcccactcc atgaaggctg catggatcaa tctgtgtctc tgagtatctc tgaaacctct
1141 aaaacatcca agcttacctt caaggagagc atggtggtag tagcaaccaa cggaagggtt
1201 ctgaagaaga gacggttgag tttaagccaa tccatcactg atgatgacct ggaggccatc
1261 gccaatgact cagaggaaga aatcatcaag cctaggtcag caccttttag cttcctgagc
1321 aatgtgaaat acaactttat gaggatcatc aaatacgaat tcacctgaa tgacgccctc
1381 aatcaaagta taattcgagc caatgatcag tacctcacgg ctgctgcatt acataatctg
1441 gatgaagcag tgaaatttga catgggtgct tataagtcac caaaggatga tgctaaaatt
1501 accgtgattc taagaatctc aaaaactcaa ttgtatgtga ctgcccgaag tgaagacca
1561 ccagtgtctg tgaaggagat gcctgagata cccaaaacca tcacaggtag tgagaccaac
1621 ctctctttct tctgggaaac tcacggcact aagaactatt tcacatcagt tgcccatcca
1681 aacttgttta ttgccacaaa gcaagactac tgggtgtgct tggcaggggg gccaccctct
1741 atcactgact ttcagatact ggaaaaccag gcgtaggtct ggagtctcac ttgtctcact
1801 tgtgcagtgt tgacagttca tatgtaccat gtacatgaag aagctaaatc ctttactgtt
1861 agtcattttg tgagcatgta ctgagccttg taattctaaa tgaatgttta cactctttgt
1921 aagagtggaa ccaacactaa catataatgt tgttatttaa agaaccacct atattttgca
1981 tagtaccaat catttttaatt attattcttc ataacaattt taggaggacc agagctactg
2041 actatggcta ccaaaaagac tctaccata ttacagatgg gcaaattaag gcataagaaa
2101 actaagaaat atgcacaata gcagttgaaa caagaagcca cagacctagg atttcatgat
2161 ttcatittcaa ctgtttgcct tctactttta agttgctgat gaactcttaa tcaaatagca
2221 taagttttct ggacctcagt ttatcatatt tcaaaatgga gggaataata cctaagcctt
2281 cctgccgcaa cagtttttta tgctaatacag ggaggtcatt ttggtaaaat acttcttgaa
2341 gccgagcctc aagatgaagg caaagcacga aatgttattt tttaattatt atttatatat
2401 gtatttataa atatatatta gataattata atatactata ttatgggaa ccccttcac
2461 ctctgagtgt gaccaggcat cctccacaat agcagacagt gtttctggg ataagtaagt
2521 ttgatttcat taatacaggg cattttgggt caagttgtgc ttatcccata gccaggaaac
2581 tctgcattct agtacttggg agacctgtaa tcatataata aatgtacatt aattaccttg
2641 agccagtaat tgggtccgatc tttagactct ttgccattaa acttacctgg gcattcttgt
2701 ttcaattcca cctgcaatca agtcctacaa gctaaaatta gatgaactca actttgacaa
2761 ccatgagacc actgttatca aaactttctt ttctggaatg taatcaatgt ttcttctagg
2821 ttctaaaaat tgtgatcaga ccataatgtt acattattat caacaatagt gattgataga
2881 gtgttatcag tcataactaa ataaagcttg caacaaaatt ctctgacaaa aaaaaaaaaa
2941 aaa

```


IL-1 β

```

1  accaaacctc ttcgaggcac aaggcacaac aggtgctctt gggattctct tcagccaatc
61  ttcattgctc aagtgtctga agcagccatg gcagaagtac ctgagctcgc cagtgaatg
121 atggcttatt acagtggcaa tgaggatgac ttgttctttg aagctgatgg ccctaaacag
181 atgaagtgtc cttccagga cctggacctc tgccctctgg atggcggcat ccagctacga
241 atctccgacc accactacag caagggttc aggcaggccg cgtcagttgt tgtggccatg
301 gacaagctga ggaagatgct ggttccctgc ccacagacct tccaggagaa tgacctgagc
361 accttctttc cttcatctt tgaagaagaa cctatcttct tcgacacatg ggataacgag
421 gcttatgtgc acgatgcacc tgtacgatca ctgaaactgca cgctccggga ctcacagcaa
481 aaaagcttgg tgatgtctgg tccatatgaa ctgaaagctc tccacctcca gggacaggat
541 atggagcaac aagtgggtgt ctccatgtcc ttgtacaag gagaagaaag taatgacaaa
601 atacctgtgg cttgggcct caaggaaaag aatctgtacc tgtcctgcgt gttgaaagat
661 gataagccca ctctacagct ggagagtgtg gatcccaaaa attacccaaa gaagaagatg
721 gaaaagcgat ttgtcttcaa caagatagaa atcaataaca agctggaatt tgagtctgcc
781 cagttcccca actggtacat cagcacctct caagcagaaa acatgcccggt cttcctggga
841 gggaccaaag gcggccagga tataactgac ttcaccatgc aatttgtgtc ttcctaaaga
901 gagctgtacc cagagagtcc tgtgctgaat gtggactcaa tccctagggc tggcagaaag
961 ggaacagaaa ggtttttgag tacggctata gcctggactt tcctgttgtc tacaccaatg
1021 cccaactgcc tgccttaggg tagtgctaag aggatctcct gtccatcagc caggacagtc
1081 agctctctcc tttcagggcc aatccccagc cttttgttg agccaggcct ctctcacctc
1141 tcctactcac ttaaagcccg cctgacagaa accacggcca catttggttc taagaaaccc
1201 tctgtcattc gctcccacat tctgatgagc aaccgcttcc ctatttattt atttatttgt
1261 ttgtttgttt tattcattgg tctaatttat tcaaaggggg caagaagtag cagtgtctgt
1321 aaaagagcct agtttttaat agctatggaa tcaattcaat ttggactggg gtgctctctt
1381 taaatcaagt cttttaatta agactgaaaa tatataagct cagattattt aaatgggaat
1441 atttataaat gagcaaatat catactgttc aatggttctg aaataaactt cactgaag

```

IL-1Ra

```

1  atttctttat aaaccacaac tctgggcccc caatggcagt ccactgcctt gctgcagtca
61  cagaatggaa atctgcagag gcctccgcag tcacctaatc actctcctcc tcttcctggt
121 ccattcagag acgatctgcc gacctcttgg gagaaaatcc agcaagatgc aagccttcag
181 aatctgggat gtttaaccaga agaccttcta tctgaggaac aaccaactag ttgctggata
241 cttgcaagga ccaaattgtca atttagaaga aaagatagat gtggtaccca ttgagcctca
301 tgctctgttc ttgggaatcc atggagggaa gatgtgcctg tcctgtgtca agtctgggtga
361 tgagaccaga ctccagctgg aggcagttaa catcactgac ctgagcgaga acagaaaagca
421 ggacaagcgc ttgccttca tccgctcaga cagcggcccc accaccagtt ttgagtctgc
481 cgcttcccc gggtgggttc tctgcacagc gatggaagct gaccagcccc tcagcctcac
541 caatatgcct gacgaaggcg tcatggtcac caaattctac ttccaggagg acgagtagta
601 ctgcccaggc ctgcctgttc ccattcttgc atggcaagga ctgcagggac tgccagtccc
661 cctgccccag ggctcccggc tatgggggca ctgaggacca gccattgagg ggtggaccct
721 cagaaggcgt cacaagaacc tggtcacagg actctgcctc ctcttcaact gaccagcctc
781 catgctgcct ccagaatggt ctttctaata tgtgaatcag agcacagcag cccctgcaca
841 aagcccttcc atgtcgcttc tgcattcagg atcaaaccctc gaccacctgc ccaacctgct
901 ctctctttgc cactgcctct tcctccctca ttccaccttc ccatgccctg gatccatcag
961 gccacttgat gacccccaac caagtggctc ccacaccctg ttttacaataa aagaaaagac
1021 cagtccatga gggagggttt taagggtttg tggaaaatga aaattaggat ttcattgattt
1081 ttttttttca gtccccgtga aggagagccc ttcatttgga gattatgttc tttcggggag
1141 aggctgagga cttaaaatat tcctgcattt gtgaaatgat ggtgaaagta agtggtagct
1201 tttcccttct ttttcttctt tttttgtgat gtcccaactt gtaaaaatta aaagttagtg
1261 tactatgtta gcccataat ttttttttcc cttttaaaac acttccataa tctggactcc
1321 tctgtccagg cactgctgcc cagcctccaa gctccatctc cactccagat tttttacagc
1381 tgcctgcagt actttacctc ctatcagaag tttctcagct cccaaggctc tgagcaaatg
1441 tggctcctgg gggttctttc ttctctgtct gaaggaataa attgctcctt gacattgtag
1501 agcttctggc acttggagac ttgtatgaaa gatggctgtg cctctgcctg tctccccac
1561 cgggctggga gctctgcaga gcaggaaaca tgactcgat atgtctcagg tccctgcagg
1621 gccaagcacc tagcctcgct cttggcaggt actcagcgaa tgaatgctgt atatgttggg
1681 tgcaaagtcc cctacttcct gtgacttcag ctctgtttta caataaaatc ttgaaaatgc
1741 ctaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

```

MMP-1

```

1  gggatattgg agtagcaaga ggctgggaag ccatcactta ccttgcactg agaaagaaga
61  caaaggccag tatgcacagc tttcctccac tgctgctgct gctgttctgg ggtgtggtgt
121  ctcacagctt cccagcgact ctagaacac aagagcaaga tgtggactta gtccagaaat
181  acctggaaaa atactacaac ctgaagaatg atgggaggca agttgaaaag cggagaaata
241  gtggcccagt ggttgaaaaa ttgaagcaaa tgcaggaatt ctttgggctg aaagtgactg
301  ggaaaccaga tgctgaaacc ctgaaggtga tgaagcagcc cagatgtgga gtgccctgatg
361  tggctcagtt tgtcctcact gaggggaacc ctcgctggga gcaaacacat ctgacctaca
421  ggattgaaaa ttacacgcca gatttgccaa gagcagatgt ggaccatgcc attgagaaaag
481  ctttccaact ctggagtaat gtcacacctc tgacattcac caaggctctt gaggggtcaag
541  cagacatcat gatattcttt gtcaggggag atcatcggga caactctcct tttgatggac
601  ctggaggaaa tcttgctcat gcttttcaac caggcccagg tattggaggg gatgctcatt
661  ttgatgaaga tgaaaggtgg accaacaatt tcagagagta caacttacat cgtgttgctg
721  ctcatgaact cggccattct cttggactct cccattctac tgatatcggg gctttgatgt
781  accctagcta caccttcagt ggtgatgttc agctagctca ggatgacatt gatggcatcc
841  aagccatata tggacgttcc caaaatcctg tccagcccac cggcccacaa accccaaaag
901  cgtgtgacag taagctaacc tttgatgcta taactacgat tccggggagaa gtgatgttct
961  ttaaagacag attctacatg cgcacaaatc ctttctaccc ggaagttgag ctcaatttca
1021 tttctgtttt ctggccacaa ctgccaaatg ggcttgaagc tgcttacgaa tttgccgaca
1081 gagatgaagt ccggtttttc aaagggaata agtactgggc tgttcagggc cagaatgtgc
1141 tacacggata cccaaggac atctacagct ctttggctt ccctagaact gtgaagcata
1201 tcgatgctgc tctttctgag gaaaacactg gaaaaaccta cttctttgtt gctaacaaat
1261 actggaggta tgatgaatat aaacgatcta tggatccagg ttatcccaaa atgatagcac
1321 atgactttcc tgggaattggc cacaaagttg atgcagtttt catgaaagat ggatttttct
1381 atttctttca tggacaaga caatacaaat ttgatcctaa aacgaagaga attttgactc
1441 tccagaaagc taatagctgg ttcaactgca ggaaaaat tg aacattacta atttgaatgg
1501 aaaacacatg gtgtgagtcc aaagaagggtg ttttctgaa gaactgtcta ttttctcagt
1561 catttttaac ctctagagtc actgatacac agaataaat cttatttata cctcagtttg
1621 catatttttt tactatttag aatgtagccc ttttgtact gatataattt agttccacaa
1681 atgggtgggt caaaaagtca agtttgtggc ttatggattc atataggcca gagttgcaaa
1741 gatcttttcc agagtatgca actctgacgt tgatcccaga gacagcttc agtgacaaac
1801 atatcctttc aagacagaaa gagacaggag acatgagtct ttgccggagg aaaagcagct
1861 caagaacaca tgtgcagtca ctggtgtcac cctggatagg caagggataa ctcttctaac
1921 acaaaaataag tgttttatgt ttggaataaa gtcaaccttg tttctactgt ttt

```

MMP-8

```

1  gacacatgat gctgtgaacg tcaggggtgct cgccagggaa gggccctacc cagagggaca
61  gaaagaaagc caggaggggt agagtttgaa gagaagatca tgttctccct gaagacgctt
121 ccatttctgc tcttactcca tgtgcagatt tccaaggcct ttctgtatc ttctaaagag
181 aaaaatacaa aaactgttca ggactacctg gaaaagtctt accaattacc aagcaaccag
241 tatcagtcta caaggaagaa tggcactaat gtgatcggtg aaaagcttaa agaaatgcag
301 cgattttttg ggttgaatgt gacggggaag ccaaatgagg aaactctgga catgatgaaa
361 aagcctcgct gtggagtgcc tgacagtggt ggttttatgt taaccccagg aaaccccaag
421 tgggaacgca ctaacttgac ctacaggatt cgaactata ccccacagct gtcagaggct
481 gaggtagaaa gagctatcaa ggatgccttt gaactctgga gtgttgcatc acctctcatc
541 ttcaccagga tctcacaggg agaggcagat atcaacattg ctttttacca aagagatcac
601 ggtgacaatt ctccatttga tggacccaat ggaatccttg ctcatgcctt tcagccaggc
661 caaggtattg gaggagatgc tcattttgat gccgaagaaa catggaccaa cacctccgca
721 aattacaact tgtttcttgt tgctgctcat gaatttggcc attctttggg gctcgctcac
781 tcctctgacc ctggtgcctt gatgtatccc aactatgctt tcagggaaac cagcaactac
841 tcactccctc aagatgacat cgatggcatt caggccatct atggactttc aagcaaccct
901 atccaaccta ctggaccaag cacacccaaa ccctgtgacc ccagtttgac atttgatgct
961 atcaccacac tccgtggaga aatacttttc tttaaagaca ggtacttctg gagaaggcat
1021 cctcagctac aaagagtcga aatgaatttt atttctctat tctggccatc ccttccaact
1081 ggtatacagg ctgcttatga agattttgac agagacctca ttttcctatt taaaggaac
1141 caatactggg ctctgagtgg ctatgatatt ctgcaagggt atcccaagga tatatcaaac
1201 tatggcttcc caagcagcgt ccaagcaatt gacgcagctg ttttctacag aagtaaaaca
1261 tacttctttg tcaatgacca attctggaga tatgataacc aaagacaatt catggagcca
1321 ggttatccca aaagcatatc agggtgcctt ccaggaatag agagtaaagt tgatgcagtt
1381 ttccagcaag aacatttctt ccatgtcttc agtggacca gatattacgc atttgatctt
1441 attgctcaga gagttaccag agttgcaaga ggcaataaat ggcttaactg tagatatggc
1501 tgaagcaaaa tcaaatgtgg ctgtatccac tttcagaatg ttgaagggaa gttcagcaag
1561 cattttctgt acattgtgtc ctgcttatac ttttctcaat attaagtcac tgtttcccat
1621 cactgtatcc attctacctg tcctccgtga aaatatgttt ggaatattcc actatttgca
1681 gaggcttatt cagttcttac acattccatc ttacattagt gattccatca aagagaagga
1741 aagtaagcct ttttgtcacc tcaatattta ctatttcaat acttacatat ctgacttcta
1801 ggattttattg ttatattact tgcttatctg acttcataca tcctcagttt tcttaaaatg
1861 tcctatgtat atcttctaca tgcaatttag aactagattt tggttagaag taaggattat
1921 aaacaaccta gacagtaccc ttggccttta cagaaaatat ggtgctgttt tctacccttg
1981 gaaagaaatg tagatgatat gtttcgtggg ttgaatttg tcccccataa aagatatgtt
2041 gaagttctaa ccccagggtac ccatgaatgt gagcttacca gggtctttgc agatgtaatt
2101 agttaagtta aggtgagatc acactgaatt agggtagggc ctaaatccat tatgactgtt
2161 gttcttataa gaagaagaga ggcatagtca cctaggggag gaggccgtat gaagacagag
2221 gcagagattg gagtgacgca tctccaagcc aaggaattcc aaggactgta agccaccagt
2281 agaagctttg aagaggcaag gaaggattcc ctccaatagc cttcaagtgt gacctgctg
2341 acacctgcag aattcggact tctatcctcc aaaaccgtga gggaataaat ttcctttgtt
2401 ttaagccacc aactttgcaa tactttgtta cagcaaccct agacatgagg tactagacac
2461 agtacatcta cacatatgaa aatgaatcaa cacagaatgc agaagtagaa cccttgctaa
2521 ggactactgg gcatcttccc aggacagcag ccaaaagaga accaccactt cctctcctgc
2581 ctcctccttg ctctctccta gagtccaaac ccaaatgggc cagttggatc tgatgttcgt
2641 cagttcttta cttctatttc ctggggtact caggagggca cacactatag ataacttggg
2701 ttagctgcat aaaattcaat gtctcattaa gttgcattaa actgagctta gatgtgtaag
2761 tttgctaacg gatggggttt tttgtaaga actataggat ttatgggacc aagtctagcg
2821 agtccagata tcaaaatcat tataatgtta tatttgctgt tattagaata taatatagct
2881 tattatacaa taaatatgta gactgtaaaa tatatttctc actagtacct cctattttct
2941 ttctctgttg aagtttttaa atcccacaga taattaaatt ggcaccttta tgcttggtca
3001 aaaattaaaa taatctatta aataagttca aattaaagat ttttacttca aatgac

```

Imprimerie CIACO
(Louvain-la-Neuve, Belgique, tél +32.10.47.55.35)
Avril 2009