

# THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES

Spécialité : Développement

Ecole doctorale de rattachement : Gc2ID

Présentée par

**Mélanie COCQUEBERT**

Le 4 avril 2012

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES

## **Expression et régulation des sous-unités beta de l'hCG au cours de la différenciation du trophoblaste humain au premier trimestre de grossesse**

Directeur de thèse : Thierry FOURNIER

### JURY

Madame le Professeur Virginie Rouiller-Fabre	Président
Madame le Docteur Nadia Alfaidy	Rapporteur
Madame le Professeur Marie-Noëlle Dieudonné	Rapporteur
Monsieur le Professeur Jean-Michel Bidart	Examineur
Monsieur le Docteur Thierry Fournier	Directeur de thèse
Madame le Docteur Evain Brion, Directrice du laboratoire U767	Examineur



# Remerciements

Je tiens à remercier Madame le Docteur Evain-Brion pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, pour la confiance qu'elle m'a accordée et pour l'enthousiasme dont elle fait part. Je la remercie aussi pour m'avoir donné l'occasion de présenter mes résultats à des congrès internationaux.

Je remercie vivement Madame le Professeur Rouiller-Fabre pour avoir accepté de présider ce jury, Madame le Professeur Dieudonné et Madame le Docteur Alfaidy pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail et pour toute l'attention qu'elles y ont portée, Monsieur le Professeur Bidart pour avoir accepté de lire ma thèse et de faire partie des membres de ce jury.

Je remercie le Docteur Thierry Fournier pour avoir dirigé mes travaux, guidé mon travail, apporté son aide et donné l'opportunité d'encadrer deux étudiantes de Master. Je le remercie aussi pour les découvertes musicales qu'il m'a permis de faire, Aimée Mann et Ravid Goldschmidt pour ne citer qu'eux.

Je remercie du fond du cœur le Docteur Josette Badet pour sa disponibilité quasi immédiate à chaque demande, pour sa mémoire bibliographique impressionnante, malgré ses dires, pour son écoute sincère et pour ses multiples organisations spontanées de petits déjeuners "la brioche boulangère c'est bon pour le moral".

Je remercie le Docteur Nadine Segond pour m'avoir transmis son expertise en PCR quantitative, pour tous les échanges que nous avons eus au cours de ces 4 années de thèses qu'ils aient été scientifiques ou plus personnels, et enfin pour les chocolats, le gâteau à la broche, le thym et la ciboulette!

Merci au Docteur Jean Guibourdenche qui a réalisé tant de dosages avec parfois une légère pression... Merci pour tes conseils avisés et précis.

Merci au Docteur Lyria Aldaz-Carroll pour son aide sur l'hCG beta de type II, pour son éternelle bonne humeur et son sourire communicatif qui permettent de tenir et d'y croire.

Je remercie le Docteur Pascale Gerbaud pour ses réponses à toutes mes questions de Western blot (particulièrement avec le femto!), de co-immunoprécipitation et de cultures cellulaires. Merci également pour nos discussions extrascientifiques, souvent entre deux portes, mais aussi confortablement installées dans le 38.

Je remercie le Professeur Vassili Tsatsaris pour ses conseils en immunohistochimie et pour ses petites attentions à chaque passage au laboratoire.

Merci à Fatima Ferreira, Audrey Chissey, Françoise Aucouturier pour leur gentillesse, pour leur aide quotidienne au laboratoire, même si elle peut être invisible, et pour le partage du thé/café des lèves-tôt pimenté par les dernières pitreries de leurs enfants ou petits-enfants.



Je remercie Marie-Clémence Leguy pour ces deux années que nous avons passées ensemble dans le bureau et à la paillasse. Merci pour ton entrain, pour ta passion de la musique, et pour toutes nos discussions. Je te souhaite de savoir le plus vite possible ce que tu vas faire d'intéressant tous les jours! Petits clins d'œil à tes princes et tes grisini!

Je vous remercie Sarah, Alicia, Guillaume et Paul, pour avoir amené beaucoup beaucoup de rires dans ma dernière année de thèse, mais aussi des conseils pour la suite. Merci pour le break "thé de 5 heures" qui a souvent permis de redonner un second souffle à mes après-midis de rédaction. Mention spéciale à Paul qui m'a sauvé la vie deux fois : en me fournissant 10 Go de musique classique, nécessaire à la rédaction d'une thèse, et en allant me chercher la relieuse un soir où tout partait mal...

Merci Françoise Galland, Jean-Louis Frendo, Séverine Degrelle pour votre aide lorsque vous partagiez le quotidien du laboratoire avec nous. Votre départ physique n'a pas effacé les précieux conseils que vous aviez donnés à la jeune thésarde que j'étais.

Merci également à Padma Murthi, pour tous ses conseils scientifiques et de méthodes de travail, pour son humour permanent, ses multiples attentions à chaque fois que nos chemins se croisent, même de loin.

Merci à Amandine Durand et Vanessa Garnier pour avoir été des étudiantes si faciles à encadrer! Merci pour ces mois passés ensemble, je vous souhaite de réussir dans vos choix de vie.

Je remercie mes parents pour leur soutien inconditionnel tout au long de cette thèse. Merci à eux d'avoir essayé de retenir quelques mots clés pour expliquer mon sujet de thèse. Merci à ma mère pour toutes ses relectures du manuscrit. Merci à mon coach de père d'avoir toujours su être là aux bons moments.

Merci à ma sœur Pauline pour m'avoir suivie et soutenue tout au long de cette aventure. J'ai été ravie de partager avec elle la rédaction d'une thèse, même si la démarche, les objectifs et la longueur d'une thèse de science et d'une thèse de médecine sont différentes, on a trouvé beaucoup de points communs! Merci à toi, à Fabien et à votre merveilleuse fille Lilou de m'avoir permis de faire de chouettes pauses particulièrement ces quatre derniers mois.

Merci à Véronica, José, Aida, Aldo, Adeline et p'tite Véro de m'avoir soutenue pendant ma thèse, d'avoir respecté mes absences et de m'avoir nourrie de délicieuses empanadas! Maintenant nous attendons tous la même chose, connaître la p'tite bouille de mon futur neveu!

Merci à mes amies d'avoir su chacune à leur manière m'aider pendant ces 4 ans de thèses. Merci à internet, au téléphone, à la poste, au starbucks d'exister et de m'avoir permis de rester en contact rapproché avec elles, Marina, Sansan, Béné, Claire, Ludivine, Johanne, Vaité, Magali, Elodie et Laurence.

Enfin, je remercie encore et encore mon Enzo. Il a toujours été là, déjà pour le meilleur et pour le pire alors je n'ai qu'une chose à lui dire : OUI.



# Table des matières

<b>Remerciements .....</b>	<b>3</b>
<b>Table des matières.....</b>	<b>7</b>
<b>Liste des abréviations.....</b>	<b>15</b>
<b>Liste des figures et des tableaux.....</b>	<b>21</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>25</b>
<b>Prologue .....</b>	<b>27</b>
<b>I - Le placenta humain.....</b>	<b>31</b>
A.    Le développement du placenta humain.....	31
1)    Le stade pré-lacunaire .....	31
2)    Le stade lacunaire.....	31
3)    Le stade villositaire .....	33
4)    Mise en place de la circulation fœtale.....	33
B.    La vascularisation utéro-placentaire.....	37
1)    Mise en place de la circulation maternelle.....	37
2)    Le remodelage des artères utérines .....	39
2-a) Le remodelage indépendant de l'invasion trophoblastique .....	39
2-b) Le remodelage vasculaire induit par des facteurs sécrétés par le cytotrophoblaste extravilloux invasif.....	41
2-c) Le remodelage induit par une interaction directe entre le cytotrophoblaste extravilloux et les composants de la paroi artérielle.....	43
C.    Le cytotrophoblaste extravilloux.....	47
1)    Les cytotrophoblastes extravilloux prolifératifs.....	49
1-a) Les molécules d'adhérence et les intégrines.....	49
1-b) Les protéases matricielles .....	51

1-c) Les facteurs de croissance, cytokines et autres.....	53
2) Les cytotrophoblastes extravilleux invasifs .....	55
2-a) Les intégrines et les protéases matricielles .....	55
2-b) Les autres facteurs modifiés.....	57
3) Les cellules géantes .....	61
4) Les cytoplastes extravilleux endovasculaires .....	61
5) L'invasion trophoblastique.....	63
5-a) Rôle des bouchons trophoblastiques.....	65
5-b) Régulation de l'invasion trophoblastique.....	65
5-b-i) Les molécules d'adhérence .....	67
5-b-ii) La balance entre les sécrétions trophoblastiques et déciduales.....	69
5-b-iii) Les facteurs de croissance et cytokines à l'interface fœto-maternelle.....	71
5-b-iv) Les hormones .....	75
5-b-v) Rôle de l'oxygène.....	79
5-b-vi) Le rôle de PPAR $\gamma$ dans l'invasion trophoblastique.....	83
D. Les cytotrophoblastes villeux.....	85
1) Différenciation morphologique .....	85
2) Le processus de fusion .....	89
2-a) les protéines de la fusion trophoblastique.....	91
2-b) La régulation de la fusion trophoblastique.....	95
3) Fonction endocrine .....	97
3-a) Les hormones stéroïdes .....	97
3-b) Les hormones polypeptidiques .....	99
3-b-i) l'hormone chorionique gonadotrope humaine ou hCG.....	99
3-b-ii) Hormone lactogène placentaire ou hPL .....	101
3-b-iii) La GH placentaire (hormone de croissance placentaire).....	101
3-b-vi) La leptine.....	103

4)	Adaptation à la pression partielle en oxygène.....	103
E.	Les facteurs qui contrôlent la différenciation trophoblastique.....	107
1)	Les facteurs de transcription .....	107
1-a)	Maintien de la prolifération des cytotrophoblastes. ....	107
1-b)	Différenciation vers le phénotype invasif.....	109
1-c)	Différenciation vers la syncytialisation. ....	109
1-d)	Rôle des facteurs de transcription à homéodomaine dans la régulation du développement placentaire. ....	113
1-d-i)	DLX4.....	113
1-d-ii)	HLX .....	115
1-d-iii)	DLX3 .....	115
2)	Le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$ .....	115
2-a)	Structures des PPARs.....	117
2-b)	les ligands des PPARs.....	119
2-c)	le mécanisme d'action des PPARs.....	119
2-d)	PPAR $\gamma$ et le développement placentaire .....	123
3)	Résumé des facteurs de transcription impliqués dans la régulation de la différenciation trophoblastique.....	125
F.	Les modèles d'études du placenta humain.....	127
1)	Les explants de villosités.....	127
2)	Cultures primaires .....	129
2-a)	Cytotrophoblastes extravilleux.....	129
2-b)	Cytotrophoblastes villeux .....	131
3)	Les lignées cellulaires trophoblastiques.....	131
3-a)	Les lignées cellulaires tumorales. ....	131
3-b)	Les lignées cellulaires immortalisées .....	133
<b>II - L'hormone chorionique gonadotrope humaine ou hCG.....</b>		<b>135</b>

A.	Les gènes de l'hCG .....	135
1)	La sous-unité alpha.....	135
2)	La sous-unité bêta.....	137
B.	La protéine.....	139
1)	La glycosylation des deux sous-unités de l'hCG .....	141
2)	Rôle des glycosylations de l'hCG dans son activité biologique .....	143
3)	Sécrétion de l'hCG .....	145
3-a)	Sécrétion de l'hCG totale, de la sous-unité alpha et de la sous-unité beta libre .....	145
3-b)	L'hCG-H.....	147
4)	Métabolisme de l'hCG .....	149
C.	La régulation de l'expression de l'hCG .....	151
1)	Les facteurs de transcription Sp .....	151
2)	Les facteurs de transcription AP-2 .....	153
3)	Rôle des facteurs de transcription Sp et AP-2 dans la régulation de l'expression de l'hCG dans les trophoblastes villeux .....	153
4)	Autres facteurs régulant l'expression de l'hCG dans les trophoblastes villeux.....	155
D.	Le récepteur de l'hCG .....	157
E.	Le rôle physiologique de l'hCG .....	161
1)	Rôle de l'hCG dans l'implantation embryonnaire .....	161
2)	Les effets de l'hCG sur l'immunité.....	163
3)	hCG et angiogenèse.....	163
4)	hCG et différenciation trophoblastique .....	165
<b>III - Les pathologies de la grossesse.....</b>		<b>167</b>
A.	La pré-éclampsie .....	167
1)	Définition clinique.....	167
2)	Physiopathologie .....	169
2-a)	Le défaut d'invasion trophoblastique .....	169

2-b) Dysfonction placentaire .....	173
2-c) La maladie endothéliale maternelle .....	173
5) Génétique .....	175
6) Traitement .....	177
B. Le retard de croissance intra-utérin (RCIU).....	179
<b>IV - Les objectifs de travail .....</b>	<b>183</b>
<b>Résultats 1<sup>ère</sup> partie .....</b>	<b>187</b>
<b>I - Contexte et présentation de la publication.....</b>	<b>189</b>
<b>COMPARATIVE EXPRESSION OF HCG BETA GENES IN VILLOUS TROPHOBLAST FROM EARLY AND LATE FIRST-TRIMESTER HUMAN PLACENTAS .....</b>	<b>193</b>
<b>II - Localisation et expression des facteurs de transcription régulant l'hCG au cours du premier trimestre de la grossesse. ....</b>	<b>195</b>
A. Matériels et méthodes.....	197
B. Expression des facteurs de transcription de la famille AP-2 et Sp <i>in situ</i> avant et après réoxygénation de la chambre intervillieuse.....	201
1) Localisation des facteurs de transcription de la famille AP-2 et Sp <i>in situ</i> .....	201
2) Expression des facteurs de transcription de la famille AP-2 et Sp dans les villosités placentaires totales du premier trimestre précoce ou tardif. ....	203
C. Expression des facteurs de transcription de la famille AP-2 et Sp <i>in vitro</i> au cours de la différenciation du trophoblaste vilieux avant et après oxygénation de la chambre intervillieuse. ....	203
1) Expression d'AP-2 $\alpha$ , AP-2 $\beta$ , AP-2 $\gamma$ , Sp1 et Sp3 au cours de la différenciation du cytotrophoblaste vilieux <i>in vitro</i> .....	203
2) Expression d'AP-2 $\alpha$ , AP-2 $\beta$ , AP-2 $\gamma$ , Sp1 et Sp3 dans le cytotrophoblaste vilieux <i>in vitro</i> avant et après oxygénation de la chambre intervillieuse. ....	211
<b>III - Dérégulation de l'expression de l'hCG beta de type I et de type II dans la pré-éclampsie et le RCIU.....</b>	<b>213</b>
<b>IV - Discussion .....</b>	<b>213</b>

<b>Résultats 2<sup>ème</sup> partie .....</b>	<b>225</b>
<b>I - Contexte et présentation de la publication : .....</b>	<b>227</b>
<b>EXPRESSION AND REGULATION BY PPAR<math>\gamma</math> OF HCG <math>\alpha</math>- AND <math>\beta</math>-SUBUNITS: COMPARISON BETWEEN VILLOUS AND INVASIVE EXTRAVILLOUS TROPHOBLASTIC CELLS .....</b>	<b>231</b>
<b>II – Comparaison de l’expression et de la régulation de l’hCG beta de type I et de type II entre les cytotrophoblastes vilieux et extravilleux.....</b>	<b>233</b>
A. Régulation de la sous-unité beta de l’hCG de type I ou de type II par le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$ .....	233
1) Matériels et méthodes.....	233
2) Résultats .....	235
2-a) Comparaison de l’expression des gènes de l’hCG beta de type I et de type II entre les cytotrophoblastes vilieux et extravilleux.....	235
2-b) Régulation différentielle des gènes de type I et II de la sous-unité beta de l’hGC par le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$ .....	237
3) Discussion .....	239
B. Etude des facteurs de transcription exprimés dans les deux types de cytotrophoblastes au cours de leur différenciation.....	243
1) Matériels et méthodes.....	243
1-a) Culture cellulaire.....	243
1-b) Array « facteurs de transcription humains » .....	245
1-b-i) Extraction d’ARN .....	245
1-b-ii) Array « <i>facteurs de transcription humains</i> » .....	245
1-c) <i>Reverse Transcription</i> , PCR et Q-PCR relative en temps réel .....	247
1-d) Immunohistochimie.....	247
1-e) Co- immunoprécipitation .....	249
1-e) immunocytochimie.....	249
2) Résultats .....	251

2-a) Expression d'un panel de facteurs de transcriptions dans les trophoblastes villeux et extravilleux. ....	251
2-a-i) Résultats de l' <i>array</i> « facteurs de transcription humains » .....	251
2-a-ii) Analyse et discussion des résultats.....	253
2-b) Régulation des facteurs de transcription de la famille AP-2 ou Sp par le PPAR $\gamma$ dans les trophoblastes villeux et extravilleux. ....	261
2-c) Expression placentaire du facteur de transcription HNF4 $\alpha$ .....	261
2-d) Localisation cytotrophoblastique de PPAR $\gamma$ au premier trimestre de grossesse. ....	265
2-e) Régulation de l'hCG par l'AMP $_c$ .....	269
3) Discussion des résultats .....	269
<b>Discussion et Perspectives .....</b>	<b>279</b>
<b>I - Expression trophoblastique de l'hCG au premier trimestre de grossesse avant et après l'oxygénation de la chambre intervillieuse. ....</b>	<b>283</b>
<b>II - Régulation de l'hCG dans les trophoblastes villeux et extravilleux.....</b>	<b>289</b>
<b>III - L'hCG beta de type I et de type II dans la pré-éclampsie et le retard de croissance intra-utérin .....</b>	<b>295</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>299</b>
<b>Liste de publications et de communications .....</b>	<b>303</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>307</b>



## Liste des abréviations

15-dPGJ <sub>2</sub>	15-Deoxy-Delta-12,14-prostaglandine J <sub>2</sub>
16α OH DHEAS	16α-hydroxydéhydroépiandrostérone
8 CPT	3',5'-cyclic monophosphate
AA	Acide aminé
AC	Adénylate cyclase
ADAM 12	<i>A Disintegrin And Metalloproteinase domain 12</i>
AdipoR	<i>Adiponectin Receptor</i>
ADM	Adrenomedulline
ADN/DNA	Acide Désoxy-Ribonucléique
AKAP	<i>A-Kinase-anchoring protein</i>
Alf1	<i>Alpha-tubulin folding protein 1</i>
alpa-ACT	<i>Alpha-1-antichymotrypsin</i>
AMP <sub>c</sub>	Adénosine Mono-Phosphate cyclique
Ang-1	Angiopoïétine
ANRT	<i>Aryl hydrocarbon Nuclear Receptor Translocator</i>
AP-2	<i>Activating Protein</i>
AR	<i>Androgen receptor</i>
ARN / RNA	Acide Ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
BET	Bromure d'Ethidium
bHLH	<i>basic helix loop helix</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
C/EBP	<i>CCAAT/Enhancer-Binding Proteins</i>
CBP	<i>CREB Binding Protein</i>
CCNB1	cycline B1
CCR1	<i>C-C chemokine receptor type 1</i>

CD8 ou 4	« <i>Cluster</i> » de différenciation 8 ou 4
CDK	<i>Cyclin Dependent Kinase</i>
CK7	Cytokeratine 7
CO	monoxyde de carbone
CO <sub>2</sub>	dioxyde de carbone
CP-M	Carboxypeptidase-M
CRE	<i>cAMP Responsive Element</i>
CREB	<i>cAMP Response Element-Binding</i>
CSF	<i>Colony Stimulating Factor</i>
CTEV	Cytotrophoblaste extravilleux
CTV	Cytotrophoblaste villeux
Cx	Connexine
Cy3	Cyanine 3
DAG	Di-Acyl Glycerol
DBD	<i>DNA Binding Domain</i>
EcR	<i>Ecdysone Receptor</i>
EDTA	<i>Ethylene Diamine Tetra Acetic acid</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EG-VEGF	<i>Endocrine Gland-derived Vascular Endothelial Growth Factor</i>
eNOS	NO synthase de type endothéliale
ER	<i>Estrogen Receptor</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
ERR	<i>Estrogen Related receptor</i>
ET	Endothéline
ETR	<i>Endothelin Receptor</i>
FAS	<i>Apoptosis Stimulating Fragment</i>
FAS-L	FAS-Ligand
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FITC	<i>Fluorescein Iso ThioCyanate</i>

FOXF1	<i>Forkhead box F1</i>
FSH	<i>Follicle-Stimulating Hormone</i>
FXR	<i>Farnesoid X Receptor</i>
Gal	galactose
GATA	<i>Globin transcription factor</i>
GCM	<i>Glial cell missing gene</i>
GlcNac	N-acétylglucosamine
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i>
GnRH	<i>Gonadotropin Releasing Hormone</i>
GPCR	<i>G protein coupled receptors</i>
GR	<i>Glucocorticoid receptor</i>
HAT	<i>Histone Acetyl Transferase</i>
hCG	<i>human Chorionic Gonadotropin hormone</i>
hCG-H	<i>human Chorionic Gonadotropin hormone hyperglycosylated</i>
HDAC	Histone deacetylase
HEB	<i>E protein with a bhlh domain</i>
HELLP	<i>Hemolysis, Elevated Liver enzymes, and Low Platelet count</i>
HETE	<i>8(S) Hydroxy Eicosa Tetraenoic acid</i>
HIF	<i>Hypoxia Inducible Factor</i>
HLA	<i>Human Leucocyte Antigen</i>
Hlx	<i>HOX-like-gene</i>
HNF	<i>Hepatocyte Nuclear Factor</i>
HODE	<i>Hydroxy Octa Decadienoic acid</i>
hPL	<i>human Placental Lactogen hormone</i>
HRE	<i>Hypoxia Responsive Element</i>
HSD	hydroxystéroïde-déshydrogénase
HSP	<i>Heat shock protein</i>
ICAM	<i>InterCellular Adhesion Molecule</i>
Id2	Inhibitor of DNA binding 2
IGF	<i>Insulin-like Growth Factor</i>

IGF-2R	Récepteur de type 2 des IGFs
IGFBP	<i>Insulin-like Growth Factor Binding Protein</i>
IL	Interleukine
IP3	Inositol triphosphate
ITA	<i>Invasive Trophoblast Antigen</i>
JRE	<i>Junctional Regulatory Element</i>
KDR	<i>Kinase insert Domain Receptor</i>
KIR	<i>Killer Immunoglobulin-like Receptor</i>
LBD	<i>Ligand Binding Domain</i>
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LH	<i>Luteinizing Hormone</i>
LH/CG-R	<i>Luteinizing Hormone/Chorionic Gonadotropin Receptor</i>
LIF	<i>Leukemia Inhibitory Factor</i>
LXR	<i>Liver X Receptor</i>
Man	Mannose
MCAM	<i>Melanoma cell adhesion molecule</i>
Mdm2	<i>Mouse double minute 2</i>
MFSD2A	<i>Major Facilitator Superfamily Domain containing 2A</i>
MIP	<i>Macrophage Inflammatory Protein</i>
MMP	<i>Matrix Metalloproteinase</i>
MR	<i>Minerallo-corticoid receptor</i>
MT-MMP	<i>Membrane Type-MMP</i>
N <sub>2</sub>	dioxyde d'azote
NCAM	<i>Neural Cell Adhesion Molecule</i>
NeuroD	<i>Neurogenic differentiation factor</i>
NO	Monoxyde d'azote
NRF2	<i>Nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
O <sub>2</sub>	dioxygène
P450scc	<i>cytochrome P450 side chain cleavage</i>

PAI	<i>Plasminogen Activator Inhibitor</i>
PAPP-A	Protéine plasmatique associée à la grossesse
PBP	<i>PPAR Binding Protein</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PECAM	<i>Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule</i>
PGC-1	<i>PPAR<math>\gamma</math> Coactivator-1</i>
pGH	<i>placental Growth Hormone</i>
PGR	<i>Progesterone Receptor</i>
PHD	<i>Prolyl Hydroxylase</i>
PIP2	Phosphatidyl Inositol 4,5-biphosphate
PKA	Protéine Kinase A
PKC	Protéine Kinase C
PLC	Phospholipase C
PIGF	<i>Placental Growth Factor</i>
PPAR	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor</i>
PpO <sub>2</sub>	Pression partielle en dioxygène
PPRE	<i>PPAR Response Element</i>
PRIP/RAP250	<i>Interacting Protein/Receptor Activating Protein</i>
RANTES	<i>Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted</i>
RAR	<i>Retinoic Acid Receptor</i>
RB	<i>Retinoblastoma protein</i>
RCIU	Retard de Croissance Intra Utérin
RDR	<i>D mammalian rétrovirus receptor</i>
RE	Reticulum Endoplasmique
RIPA	<i>RadioImmuno Precipitation Assay</i>
RNAPol	<i>RNAPolymerase</i>

ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
rpm	rotation par minute
RT-PCR	<i>Reverse transcription Polymerase Chain Reaction</i>
RXR	<i>Retinoid X Receptor</i>
SA	Semaine d'aménorrhée
S-DHEA	sulfate de déhydroépiandrostérone
sFlt1	<i>Soluble fms-like tyrosine kinase-1 / Récepteur soluble au VEGF</i>
SOD	Superoxyde dismutase
Sp	<i>Selective Promotor Factor</i>
SRC-1	<i>Steroid Receptor Coactivator-1</i>
ST	Syncytiotrophoblaste
Stra13	<i>Stimulated by retinoic acid 13 homolog</i>
TA	Tension Artérielle
TEF5	<i>Transcription enhancer factor 5</i>
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
THR	<i>Thyroid Receptor</i>
TIMP	<i>Tissue Inhibitor Matrix Metalloproteinase</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
Tris	Trishydroxyméthylaminométhane
TSE	<i>Trophoblast Specific Element</i>
TSH	<i>Tyroid-Stimulating Hormone</i>
UBF	<i>Upstream Binding Factor</i>
uNK	<i>uterin Natural Killer</i>
uPA	<i>urokinase type Plasminogen Activator</i>
VCAM	<i>Vascular Endothelial Cell Adhesion Molecule</i>
VDR	<i>Vitamine D<sub>3</sub> Receptor</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGFR	<i>VEGF Receptor</i>
VHL	Von Hippel Lindeau
ZO-1	<i>Zona occludens-1 protein</i>

# Liste des figures et des tableaux

Figure 1 : Le placenta humain.

Figure 2 : Représentation schématique des étapes du développement du placenta humain.

Figure 3 : La villosité chorale ancrée

Figure 4 : La villosité chorale flottante

Figure 5 : Evolution du diamètre des artères spiralées utérines au cours de la grossesse.

Figure 6 : Structure du placenta et de la circulation sanguine placentaire

Figure 7 : Le remodelage des artères utérines.

Figure 8 : Schéma récapitulatif des facteurs régulant le remodelage vasculaire utérin.

Figure 9 : La voie de différenciation des cytotrophoblastes extravilleux.

Figure 10: Les marqueurs du cytotrophoblaste extravilleux.

Figure 11 : Les marqueurs du cytotrophoblaste extravilleux.

Figure 12 : Trajets possibles des cytotrophoblastes endovasculaires.

Figure 13: Oxygénation de la chambre intervillieuse.

Figure 14 : Schéma récapitulatif de la balance entre les sécrétions trophoblastiques et l'environnement utérin, régulant l'invasion trophoblastique.

Figure 15: Régulation du facteur HIF-1.

Figure 16 : PPAR $\gamma$  et l'invasion trophoblastique.

Figure 17 : La voie de différenciation du cytotrophoblaste villeux.

Figure 18 : Schéma représentant un agencement possible des différentes protéines impliquées dans la fusion cellulaire des cytotrophoblastes villeux humains.

Figure 19 : Schéma de la synthèse des hormones stéroïdes par le placenta.

Figure 20: Visualisation de la liaison d'une protéine à homéodomaine à l'ADN.

Figure 21 : Le PPAR $\gamma$ .

Figure 22 : Les ligands de PPAR $\alpha$  et  $\beta/\delta$ .

Figure 23 : Les ligands naturels, agonistes synthétiques et les antagonistes de PPAR $\gamma$ .

Figure 24 : Mécanisme d'action des PPARs.

Figure 25 : Les facteurs de transcription décrits comme impliqués dans la différenciation trophoblastique.

Figure 26 : Les modèles d'études du placenta humain.

Figure 27 : Structure tridimensionnelle de l'hormone chorionique gonadotrope humaine.

Figure 28 : Les gènes des sous-unités de l'hCG.

Figure 29 : Structure des sous-unités de l'hormone chorionique gonadotrope humaine et de ses glycosylations.

Figure 30 : Schéma de la synthèse et de la maturation des N-Glycanes de l'hCG.

Figure 31 : Localisation des sites de glycosylation sur les séquences protéiques des sous-unités alpha et beta de type II de l'hCG.

Figure 32 : Cinétique de la sécrétion de l'hCG et de ses sous-unités pendant la grossesse.

Figure 33 : Hétérogénéité des O-glycosylation de l'hCG.

Figure 34 : Cinétique de la sécrétion de l'hCG et de l'hCG-H au premier et deuxième trimestre de la grossesse.

Figure 35 : Représentation des différentes formes d'hCG et de ses métabolites dans le placenta, le sang et les urines.

Figure 36 : Caractéristiques des membres de la famille Sp.

Figure 37 : Les facteurs de transcriptions de la famille AP-2.

Figure 38 : Le récepteur de l'hCG (LH/CG).

Figure 39 : Western Blot du récepteur de l'hCG (LH/CG).

Figure 40 : Représentation schématique des voies de signalisation activées par le récepteur LH/CG après fixation de son ligand (ici hCG).

Figure 41 : Schéma simplifié de la physiopathologie de la prééclampsie.

Figure 42 : Schéma simplifié des anomalies vasculaires de l'arbre villositaire initiales à un RCIU d'origine utéroplacentaire.

Figure 43 : Localisation des facteurs de transcription AP-2 $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , Sp1 et Sp3 sur des coupes en paraffine de placenta humain du premier trimestre précoce (8-9 SA) ou tardif (12-14 SA).

Figure 44 : Comparaison de l'expression des gènes des facteurs de transcription de la famille AP-2 ou Sp entre des tissus placentaires du premier trimestre précoce (8-9 SA) ou tardif (12-14 SA).

Figure 45 : Localisation et expression d'AP-2 $\alpha$  au cours de la différenciation du trophoblaste villositaire issus de placentas du premier trimestre précoce (8-9 SA) ou tardif (12-14 SA).

Figure 46 : Localisation et/ou expression d'AP-2 $\gamma$  et d'AP-2 $\beta$  au cours de la différenciation du trophoblaste villositaire issus de placentas du premier trimestre précoce (8-9 SA) ou tardif (12-14 SA).

Figure 47 : Localisation et expression de Sp1 et de Sp3 au cours de la différenciation du trophoblaste villositaire issus de placentas du premier trimestre précoce (8-9 SA) ou tardif (12-14 SA).

Figure 48 : Détection par Western Blot des facteurs de transcription AP-2 $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , Sp1 et Sp3 dans des extraits nucléaires de trophoblastes villeux mononucléés (2h) ou fusionnés (72h) issus de placentas du premier trimestre précoce (8-9 SA) ou tardif (12-14 SA).

Figure 49 : Comparaison de l'expression des gènes des facteurs de transcription de la famille AP-2 ou Sp1 entre les cytotrophoblastes villeux mononucléés issus de placentas du premier trimestre précoce (8-9 SA) ou tardif (12-14 SA).

Figure 50 : Comparaison de l'expression des gènes des facteurs de transcription de la famille AP-2 ou Sp1 entre les syncytiotrophoblastes issus de placentas du premier trimestre précoce (8-9 SA) ou tardif (12-14 SA).

Figure 51 : Expression des gènes de la sous-unité  $\beta$  de l'hCG dans des villosités choriales de placentas à terme (Cs), de RCIU ou de prééclampsie (PE).

Figure 52 : Comparaison de l'expression des gènes de la sous-unité  $\beta$  de type I ou de type II entre les trophoblastes villeux et extravilleux.

Figure 53 : Effet de PPAR $\gamma$  sur l'expression des gènes de la sous-unité  $\beta$  de l'hCG dans les cytotrophoblastes villeux et extravilleux.

Figure 54 : Tableaux résumés des résultats significatifs de l'*array* « facteurs de transcription ».

Figure 55 : Tableaux résumés des résultats significatifs de l'*array* « facteurs de transcription ».

Figure 56 : Effet de l'activation ou l'inhibition de PPAR $\gamma$  sur l'expression des gènes des facteurs de transcription de la famille AP-2 dans les cytotrophoblastes villeux et extravilleux.

Figure 57 : Effet de l'activation ou l'inhibition de PPAR $\gamma$  sur l'expression des gènes des facteurs de transcription de la famille Sp dans les cytotrophoblastes villeux et extravilleux.

Figure 58 : Expression et localisation d'HNF4 $\alpha$  dans le placenta du premier trimestre de grossesse.

Figure 59 : Expression et localisation d'HNF4 $\alpha$  dans les lignées trophoblastiques JEG-3 et BeWo.

Figure 60 : Immunolocalisation de PPAR $\gamma$  et RXR $\alpha$  *in situ* et étude de leurs interactions par co-immunoprécipitation.

Figure 61 : Effet d'un analogue de l'AMP $_c$  sur l'expression des gènes de la sous-unité  $\beta$  de l'hCG dans les cytotrophoblastes villeux.

Figure 62 : Effet d'un analogue de l'AMP $_c$  sur l'expression du facteur de transcription Sp1 dans les trophoblastes villeux.

Tableau n° 1 : Séquences différentes entre l'hCG beta de type I et de type II

Tableau n° 2 : Anticorps primaires

Tableau n° 3 : Anticorps secondaires

Tableau n° 4 : Caractéristiques cliniques des échantillons



## *Introduction*



# Prologue

Le placenta est un organe transitoire indispensable pour le maintien de la grossesse et le développement du fœtus. Il se met en place dès le 8<sup>ème</sup> jour après la fécondation, alors que le blastocyste a épuisé ses réserves nutritives. Il constitue une interface entre le fœtus et l'endomètre décidualisé qui assure à la fois un rôle de barrière et les fonctions d'échanges gazeux et nutritifs essentielles à la croissance fœtale.

Le placenta humain est caractérisé par une fonction endocrine intense et une invasion profonde de l'endomètre utérin. Ces deux caractéristiques fondamentales font du placenta humain (et de celui des primates supérieurs) un modèle unique dans tout le règne animal et résultent d'une différenciation cellulaire originale. En effet, le placenta est composé de deux types de trophoblastes qui dérivent du trophoctoderme. Les cytotrophoblastes de type villositaire assurent les fonctions d'échanges et représentent le tissu endocrine du placenta qui sécrète notamment l'hormone chorionique gonadotrope (hCG). Les cytotrophoblastes de type extravillous sont responsables de l'implantation du placenta dans l'endomètre décidualisé et sont impliqués dans la mise en place de la vascularisation utéro-placentaire. L'invasion trophoblastique est contrôlée dans le temps et dans l'espace puisqu'elle a lieu de la 3<sup>ème</sup> à la 14<sup>ème</sup> semaine d'aménorrhée (SA), s'arrête au tiers supérieur du myomètre et est spécifiquement dirigée vers les artères utérines. Les cytotrophoblastes extravillous (CTEV) jouent un rôle important dans le remodelage des artères spiralées utérines où ils prennent la place des cellules endothéliales. Il est également capital qu'ils colonisent la lumière de ces artères où ils forment des bouchons trophoblastiques, assurant ainsi un environnement en oxygène adapté au développement placentaire précoce. Un défaut d'invasion, de formation des bouchons trophoblastiques et de remodelage de ces artères sont à l'origine de certaines complications majeures de la grossesse spécifiques à l'espèce humaine : la pré-éclampsie et le retard de croissance intra-utérin.

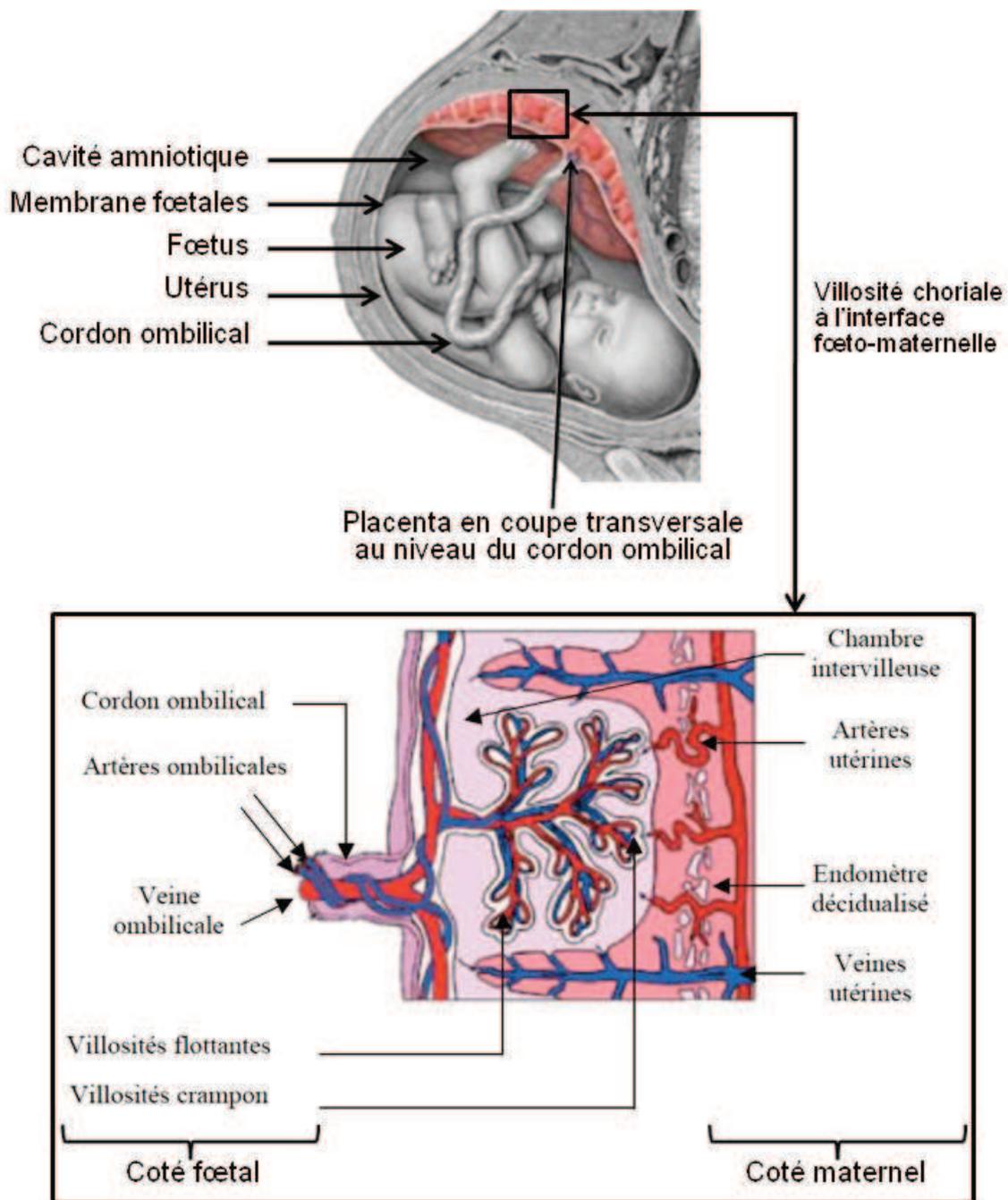
Des travaux antérieurs, effectués en partie au laboratoire, ont permis de mettre en évidence l'implication de l'hétérodimère PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$  (*Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  / retinoid X receptor*) dans la régulation de la différenciation trophoblastique. En effet, son activation, par l'agoniste du PPAR $\gamma$ , dans des cultures primaires ou dans des lignées favorise la fusion des trophoblastes villositaires alors qu'elle inhibe l'invasion trophoblastique. Plus récemment, il a été montré au laboratoire *in situ* et *in vitro* que les cytotrophoblastes



extravilleux invasifs (CTEV<sub>i</sub>) expriment et secrètent de l'hCG. De plus, cette hCG présente des caractéristiques particulières par rapport à celle produite par les trophoblastes villeux : elle a un profil glycanique différent et elle stimule l'invasion des CTEV indépendamment du récepteur LH/CG (*Luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor*) (Handschuh et coll, 2007).

Au cours de ces travaux, nous avons étudié plus en détail l'expression de ces hCG différentes dans les deux types de trophoblastes au premier trimestre de la grossesse avant et après l'oxygénation de la chambre intervillieuse. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'expression des différents gènes de la sous-unité beta de l'hCG et au deux protéines qu'ils codent. Sachant que l'hétérodimère PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$  régule la différenciation trophoblastique et que l'hCG participe également à cette régulation, nous nous sommes aussi intéressés à la régulation de l'hCG par l'hétérodimère PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$  dans les deux sous populations de trophoblastes. Puis plus généralement nous avons voulu savoir quels facteurs de transcription étaient spécifiquement exprimés dans les trophoblastes villeux et extravilleux au premier trimestre de grossesse et potentiellement impliqués dans la régulation des gènes de l'hCG.

L'introduction de cette thèse comportera quatre parties. Dans la première seront présentés le développement placentaire et les modèles cellulaires qui permettent de l'étudier. La seconde partie abordera plus en détails l'hormone chorionique gonadotrope humaine, sa synthèse, sa régulation et son rôle physiologique. Les pathologies de la grossesse associées à un défaut d'invasion trophoblastique précoce ou à un environnement en oxygène anormal, seront décrites dans une troisième partie. Pour terminer, la quatrième partie sera consacrée à la présentation des objectifs de mon travail.



**Figure 1 : Le placenta humain.** D'après *The McGraw-Hill Companies, 1997*

Le fœtus, situé dans la cavité amniotique, est relié au placenta par le cordon ombilical. Les membranes sont constituées de chorion lisse qui recouvre l'amnios et qui isole le fœtus de la cavité utérine. Le placenta est constitué de villosités choriales qui flottent au niveau de la chambre intervillieuse dans le sang maternel provenant des artères utérines.

## I - Le placenta humain

### A. Le développement du placenta humain

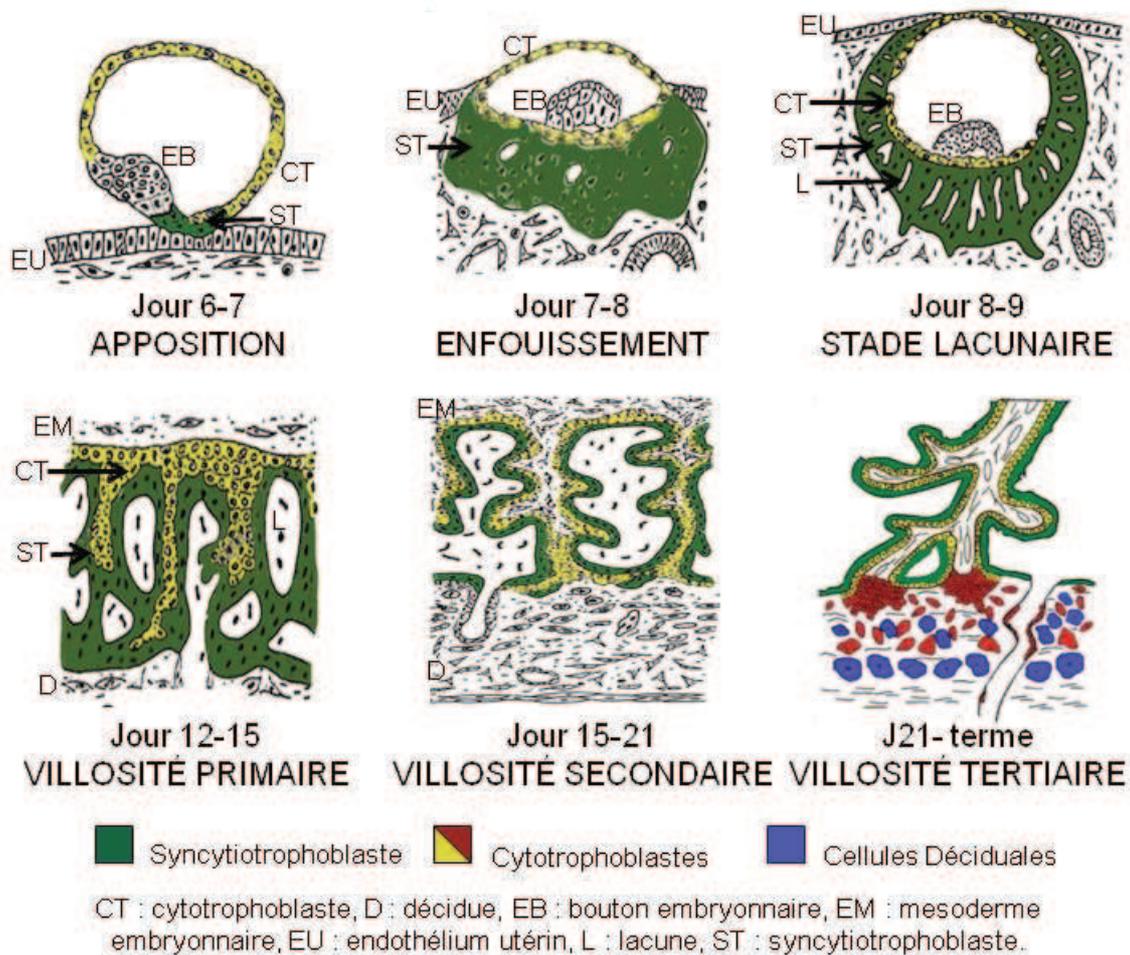
Le placenta humain est un organe transitoire qui permet le développement du fœtus grâce à sa fonction d'échange. Il est composé de villosités choriales et il est caractérisé par une invasion majeure du trophoblaste le conduisant au contact du sang maternel. La placentation humaine est de type hémomonochoriale (Cf. Figure 1). Le développement du placenta se divise en trois stades : prélacunaire, lacunaire et vilieux (Cf. Figure 2).

#### 1) Le stade pré-lacunaire

Six jours après la fécondation, le blastocyste composé de la masse cellulaire interne et délimité par le trophoctoderme, s'accôle à la muqueuse utérine maternelle : c'est la phase d'apposition. Les pinopodes (micro-protrusions de la membrane apicale de l'épithélium utérin) et les microvillosités du trophoctoderme permettent un attachement physique entre le blastocyste et l'endomètre. C'est au point de contact que se différencie, à partir du trophoctoderme, une assise cellulaire interne constituée de cytotrophoblastes et une assise cellulaire externe le syncytiotrophoblaste (ST) (Cf. Figure 2). Ce dernier possède une activité protéolytique intense. Il pénètre l'épithélium utérin et envahit l'endomètre ce qui va permettre l'enfouissement du blastocyste : c'est la nidation.

#### 2) Le stade lacunaire

Vers le 8<sup>ème</sup> jour après la fécondation, des vacuoles apparaissent dans cette masse syncytiale. Ces vacuoles forment progressivement des lacunes qui délimitent des travées de syncytium.



**Figure 2 : Représentation schématique des étapes du développement du placenta humain. D'après Berniske et Kaufmann, 2000**

Six jours après la fécondation, le blastocyste entre en contact avec l'endothélium utérin (apposition) et le placenta se met en place. Le syncytiotrophoblaste, grâce à son activité protéolytique intense, permet l'enfouissement du blastocyste dans l'endomètre maternel. Du 12<sup>ème</sup> jour au 21<sup>ème</sup> jour après la fécondation, trois stades villositaires se succèdent permettant d'aboutir à la villosité choriale définitive qui représentera l'unité fonctionnelle et structurale du placenta

### 3) Le stade villeux

A partir du 12<sup>ème</sup> jour, les cytotrophoblastes proliférant à partir de la masse cellulaire interne, vont envahir les travées de syncytium formant ainsi les villosités chorales primaires. En parallèle, les lacunes syncytiales se remplissent d'un exsudat de sang maternel et deviennent des lacs sangui-maternel. Deux semaines après la fécondation, ces villosités primaires sont envahies par des cellules provenant du mésenchyme allantoïdien d'origine embryonnaire, qui vont alors former l'axe mésenchymateux de la villosité chorale. Les villosités sont alors appelées secondaires. L'apparition des capillaires fœtaux, d'origine mésodermique, dans l'axe mésenchymateux détermine l'obtention de la structure tertiaire de la villosité au 21<sup>ème</sup> jour après la fécondation.

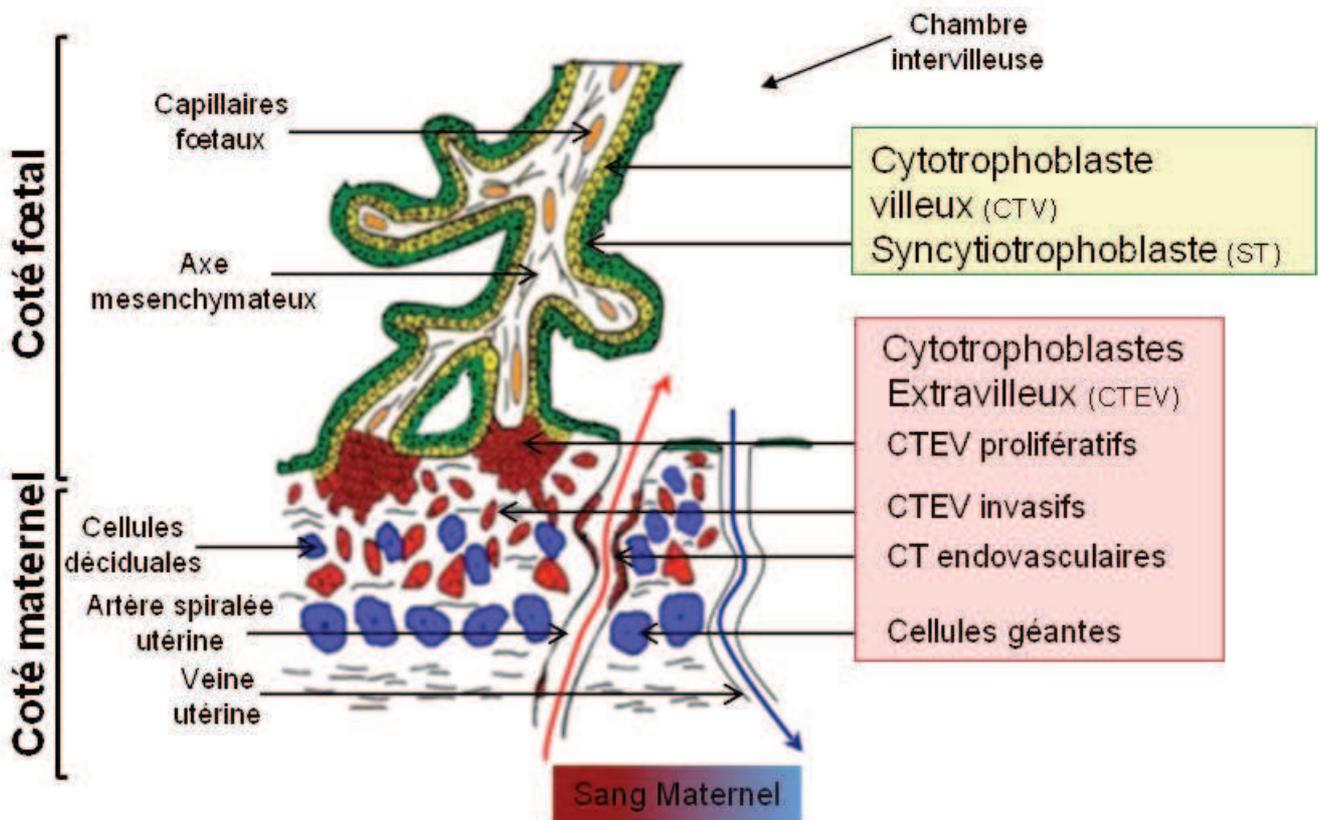
### 4) Mise en place de la circulation fœtale

Les premiers signes de vasculogenèse apparaissent donc au 21<sup>ème</sup> jour après la fécondation par la différenciation des précurseurs de cellules endothéliales, les angioblastes. Cette différenciation est induite par le VEGF-A (*Vascular Endothelial Growth Factor-A*), produit entre autre par les trophoblastes, qui agit via deux récepteurs VEGFR-1 (*VEGF Receptor*, aussi appelé *Fms-like tyrosine kinase-1* ou *flt-1*) ou VEGFR-2 (aussi appelé *Kinase insert domain receptor* ou *KDR*). Le VEGF-A est également un puissant activateur de la prolifération des cellules endothéliales. Le placenta produit du PIGF (*Placental growth factor*), un puissant inducteur de la formation de nouveaux vaisseaux, ainsi que de l'angiopoïétine (Ang-1). (Kaufmann et coll, 2004 ; Demir et coll, 2005)

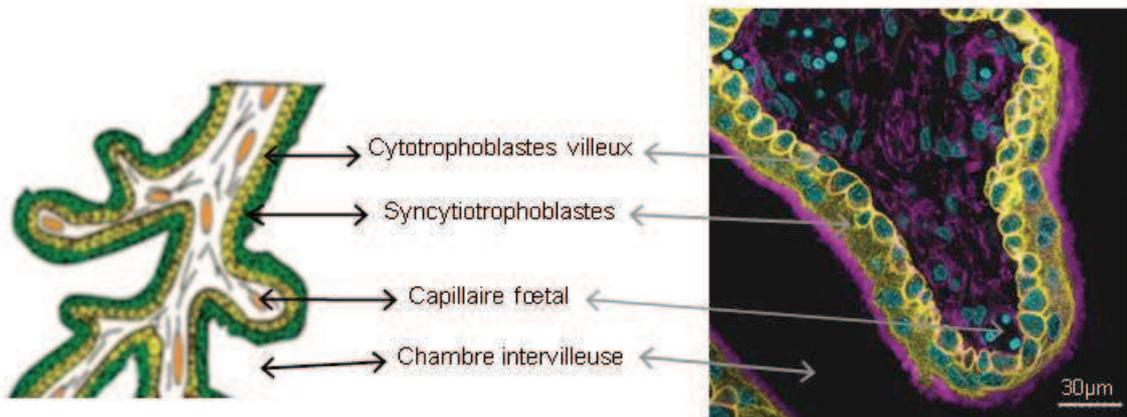
La circulation fœto-placentaire est mise en place dès le 23<sup>ème</sup> jour après la fécondation. Le cordon ombilical, individualisé dès quatre semaines après la fécondation, comprend deux artères qui mènent le sang de l'embryon vers le placenta et une veine qui ramène le sang ayant circulé dans les villosités chorales, vers le cœur de l'embryon.

La villosité chorale apparait dans sa structure définitive dès la troisième semaine après la fécondation (*Cf.* Figures 3 et 4). Elle représente l'unité structurale et fonctionnelle du





**Figure 3 : La villosité choriale ancrée**

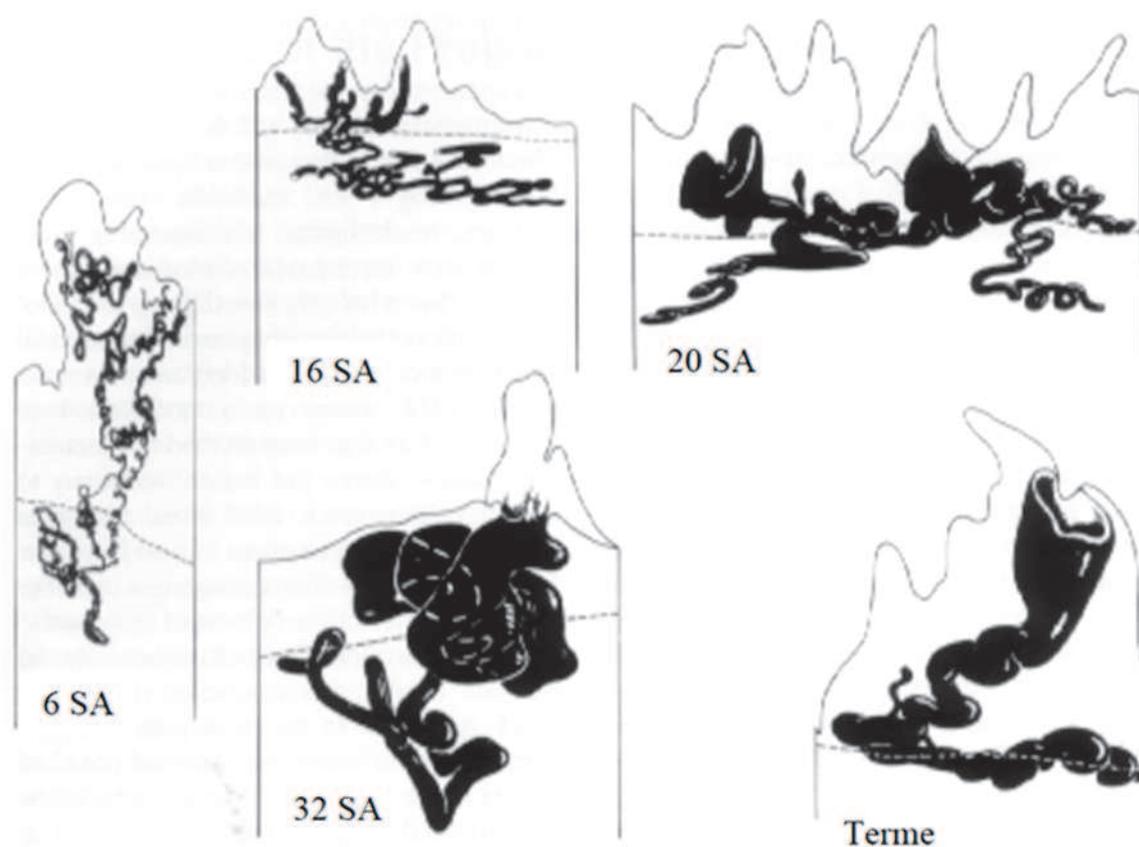


Jaune : cytokératine 7,  
Violet : actine, Bleu : ADN

**Figure 4 : La villosité choriale flottante**

Immunohistofluorescence (coupe épaisse de villosités choriales incluses en agarose) couplée à la microscopie confocale. Visualisation du marquage de la cytokératine 7 (marqueur spécifique des trophoblastes dans le placenta), de l'actine et des noyaux.

*Dr Bruno SAUBAMEA, René LAI KUEN, Service Commun d'Imagerie Cellulaire et Moléculaire*



**Figure 5 : Evolution du diamètre des artères spiralées utérines au cours de la grossesse. D'après Ramsey et Harris, 1966.**

Représentation de la dilatation des artères spiralées utérines en fonction du nombre de semaines d'aménorrhée (SA). La frontière entre l'endomètre et le myomètre est symbolisée par un trait pointillé.

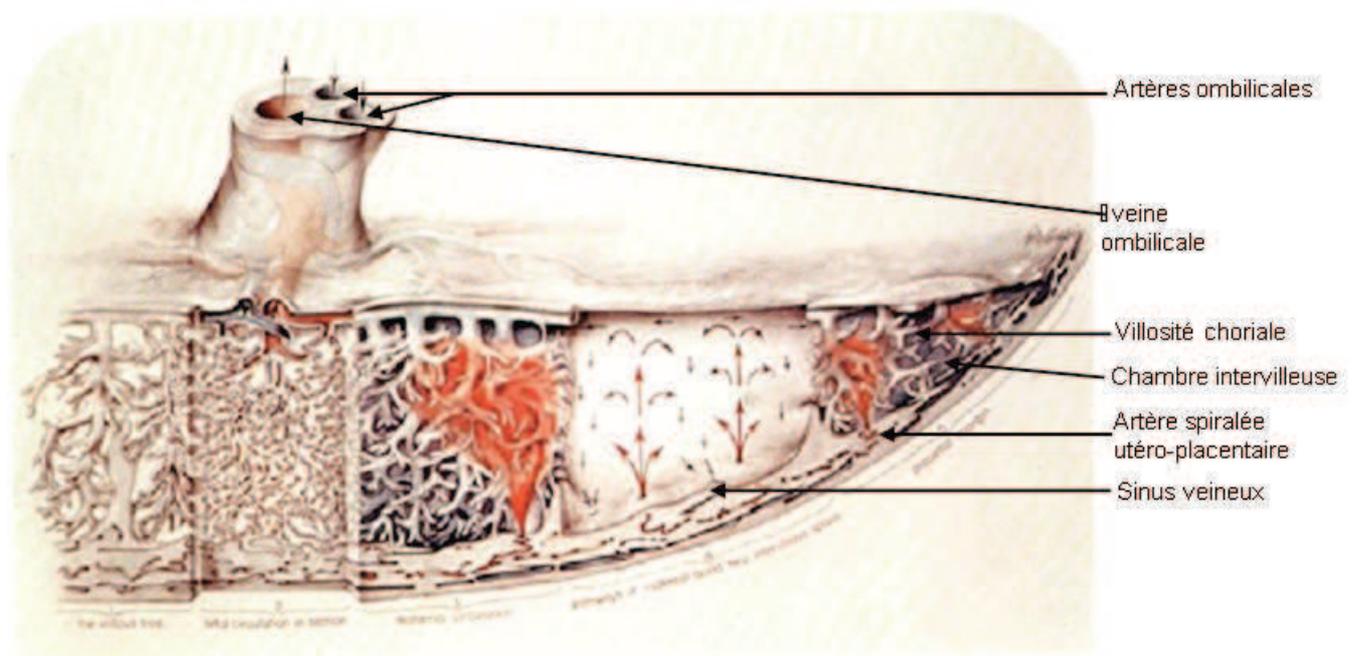
placenta. Elle est constituée d'un axe mésenchymateux composé de fibroblastes et de macrophages (cellules de Hofbauer) traversé par les capillaires fœtaux. Cet axe est recouvert par une monocouche de cytotrophoblastes villositaires qui forment par fusion cellulaire le syncytiotrophoblaste. A l'interface fœto-maternelle, au niveau de l'ancrage des villosités tertiaires dans la *decidua basalis*, se trouvent les cytotrophoblastes extravilloux qui seront responsables de l'invasion trophoblastique et du remodelage artériel. Ces deux types de cytotrophoblastes, dont la différenciation et les fonctions sont spécifiques à l'espèce humaine, seront détaillés ci-après.

Contrairement à la villosité chorale, le placenta n'atteint sa structure définitive que vers la fin du premier trimestre. A terme, le placenta est un disque de 20 cm de diamètre et de 3 cm d'épaisseur qui pèse environ 500 g. Il est composé d'une vingtaine de cotylédons séparés par les septa. Il peut schématiquement être divisé en deux parties : la plaque chorale, composée des villosités flottantes dans l'espace intervilloux et située vers le fœtus, et la plaque basale, composée des villosités ancrées dans l'endomètre maternel.

## B. La vascularisation utéro-placentaire

### 1) Mise en place de la circulation maternelle

En 1754, John Hunter a mis en évidence pour la première fois que les circulations maternelle et fœtale ne communiquaient pas. A partir d'expériences d'injection de cires de couleurs différentes dans la veine et les artères utérines d'utérus gravidés de femmes enceintes accidentées, Hunter a pu montrer trois faits nouveaux : 1) les artères maternelles traversent la décidue avec un trajet spiralé, 2) elles se jettent dans une structure spongieuse non composée de vaisseaux sanguins, première description de la chambre intervillouse et, 3) les circulations maternelle et fœtale ne sont pas continues (Hunter, 1774). Il faudra ensuite attendre le début du XX<sup>ème</sup> siècle pour obtenir le schéma de vascularisation utéro-placentaire connu actuellement.



**Figure 6 : Structure du placenta et de la circulation sanguine placentaire**

Le sang maternel arrive par les artères spiralées utéro-placentaires qui s'ouvrent dans la chambre intervillieuse. Après avoir irrigué les villosités chorioniques, il regagne l'organisme maternel par les sinus veineux. Le sang foetal arrive par les deux artères ombilicales et repart par la veine ombilicale.

Dès l'implantation de l'embryon, il y a une angiostimulation : vasodilatation de l'endomètre, enrichissement de la densité vasculaire et formation d'un réseau pérítrophoblastique serré entourant le sac gestationnel. Les artères utérines se divisent pour donner les artères arquées, qui vont secondairement donner les artères radiaires. Ces artères traversent le myomètre avant de se transformer en artères spiralées au niveau de l'endomètre. Des artères radiaires naissent également des artères basales qui vascularisent l'endomètre profond. Les travaux de Ramsey et Harris ont permis de mieux comprendre les modifications des artères de l'utérus au cours de la grossesse (Ramsey et coll, 1966). Ils ont reconstitué le trajet des artères utéro-placentaires à différents stades de la grossesse, à l'aide d'injection d'encre de chine dans des utérus gravides avant fixation. Ils ont ainsi montré l'extraordinaire dilatation de la portion terminale de ces vaisseaux, permettant l'augmentation du débit sanguin utéro placentaire nécessaire au bon développement fœtal (*Cf. Figure 5*). Cette dilatation est obtenue grâce à un remodelage intense de ces artères utérines, remodelage qui résulte pour une grande partie de l'invasion trophoblastique.

A terme, le sang maternel traverse le myomètre via les artères utéro-placentaires remodelées et entre dans la chambre intervillieuse à une pression de 70 à 80 mmHg, qui chute à 10-30 mmHg au niveau de la plaque chorale. Le débit sanguin utéro-placentaire est de 600 mL / min au troisième trimestre de grossesse. La majorité de cet apport sanguin utérin (90%) est destiné à la perfusion de la chambre intervillieuse, où ont lieu les échanges entre la mère et le fœtus. Le sang est repris par les sinus veineux qui s'ouvrent largement dans la chambre intervillieuse puis par les veines utérines (*Cf. Figure 6*).

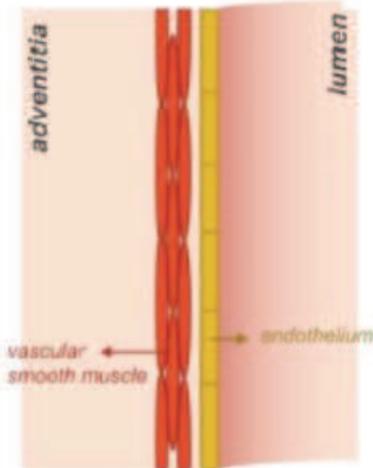
## 2) Le remodelage des artères utérines

(*Cf. Figure 7*)

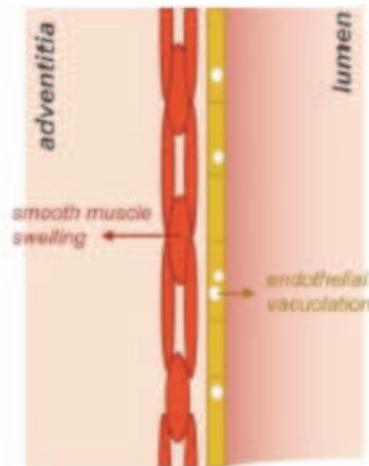
### 2-a) Le remodelage indépendant de l'invasion trophoblastique

Au milieu du XX<sup>ème</sup> siècle, il a été mis en évidence que les artères spiralées utérines subissaient des altérations morphologiques bien avant l'arrivée des trophoblastes extravillieux dans ces vaisseaux. (Boyd et Hamilton, 1967 ; Ramsey et coll, 1966). Les modifications initiales des artères utéro-placentaires consistent en une désorganisation généralisée

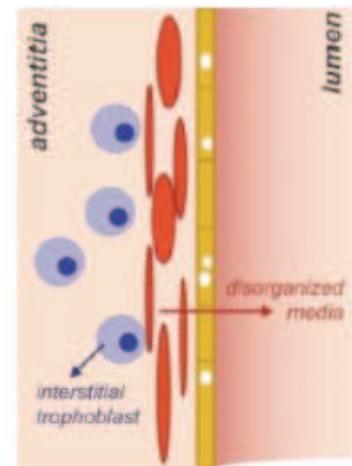
En dehors de la grossesse



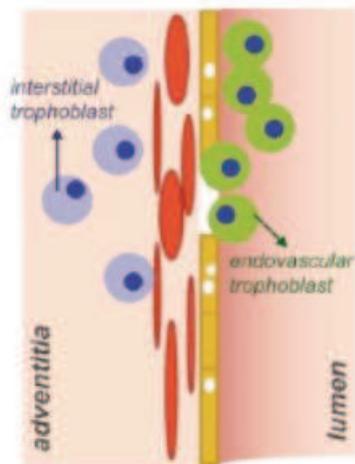
Étape 1 : remodelage vasculaire indépendant de l'invasion trophoblastique



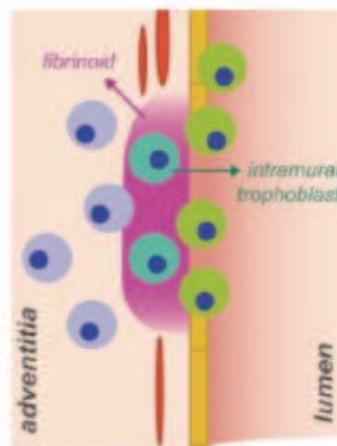
Étape 2 : remodelage vasculaire induit par les cytotrophoblastes invasifs



Étape 3 : migration des cytotrophoblastes extravilleux



Étape 4 : Incorporation des cytotrophoblastes endovasculaires



Étape 5 : Réparation vasculaire

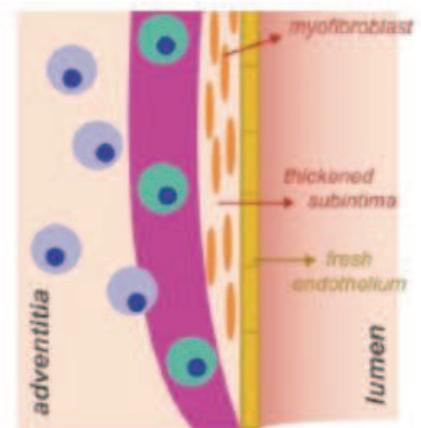


Figure 7 : Le remodelage des artères utérines. D'après Pijnenborg et coll. 2006.

Le remodelage vasculaire débute avant l'invasion des cytotrophoblastes extravilleux par une vacuolisation endothéliale, une désorganisation de la couche de cellules musculaires lisses et une dilatation luminale. Secondairement les cytotrophoblastes extravilleux vont permettre un remodelage de la paroi artérielle avec destruction des cellules musculaires lisses. Enfin, les cytotrophoblastes endovasculaires s'entourent de fibrine et des myofibroblastes apparaissent.

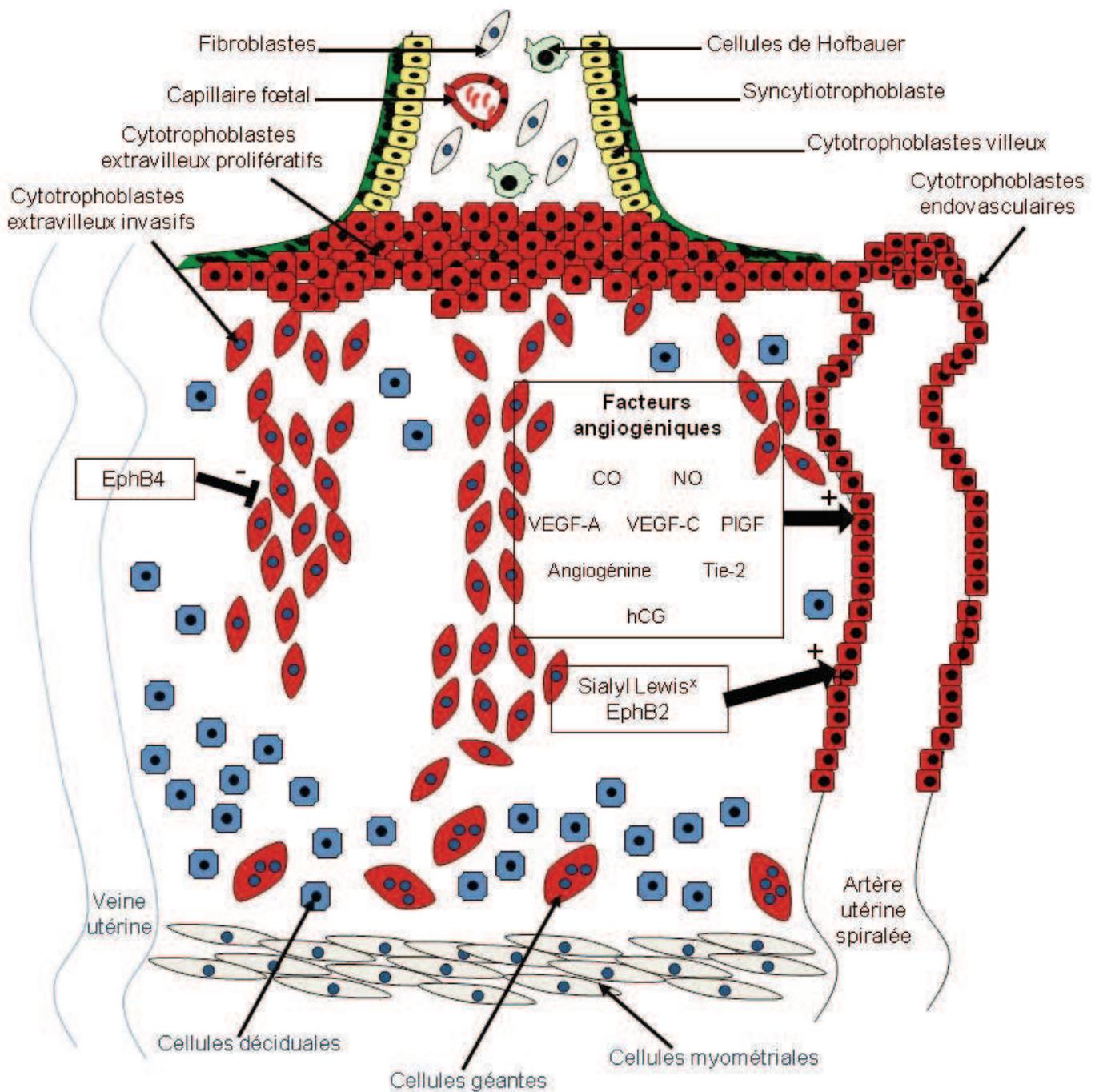
caractérisée par une vacuolisation endothéliale, une désorganisation de la couche de cellules musculaires lisses combinée à l'expression de VCAM-1 (*Vascular endothelial cell adhesion molecule-1*) et à une dilatation luminale (Craven et coll, 1998). Ces modifications seraient dues à l'activation du système rénine-angiotensine décidual ou à des facteurs hormonaux circulants maternels (Morgan et coll, 1998 ; Craven et coll, 1998).

## 2-b) Le remodelage vasculaire induit par des facteurs sécrétés par le cytotrophoblaste extravilleux invasif

Avant que les artères utérines ne soient envahies par les CTEV invasifs, ces derniers sécrètent des facteurs qui permettent d'amorcer la dilatation des artères. Ce remodelage associe un amincissement de la média à un dépôt de fibrinoïdes au sein de la paroi artérielle (Kaufmann et coll, 2003). Certaines études suggèrent que la sécrétion de vasodilatateurs tels que le monoxyde d'azote (NO) et le monoxyde de carbone (CO) pourraient être produits par les cellules avoisinant les artères et ainsi contribuer à leur dilatation (Lyall et coll, 1999 ; Myatt et coll, 1991 ; Pijnenborg et coll, 1983). Il existe des résultats contradictoires concernant l'expression de la NO synthase de type endothéliale (eNOS) dans les CTEV prolifératifs et invasifs (Lyall et coll, 1999; Martin et Conrad, 2000). Cependant, si les CTEV expriment la eNOS, ceci suggère que le NO produit pourrait modifier le tonus voire la structure des artères spiralées, mais il faut noter qu'il n'existe pas de preuve directe de cet effet.

En revanche, la perfusion placentaire de l'inhibiteur de l'hème oxygénase (enzyme responsable de la production de CO) entraîne une vasoconstriction dose-dépendante (Bainbridge et coll, 2002 ; Lyall et coll, 2000). Ces données révèlent le rôle vasodilatateur du CO dans la circulation fœto-maternelle, et suggèrent que le CO produit par les CTEV invasifs, qui expriment fortement l'hème oxygénase (Lyall et coll, 2000), pourrait contribuer à la dilatation des artères spiralées en début de grossesse (*Cf.* Figure 7).

Par ailleurs, le cytotrophoblaste extravilleux invasif sécrète un répertoire de molécules angiogéniques dont la plus connue est le VEGF-A. Notons que le VEGF-A est exprimé aussi bien par les cytotrophoblastes villosités qu'extravilleux (Clark et coll, 1998). Il pourrait donc jouer un rôle soit paracrine (s'il est sécrété par les cytotrophoblastes extravilleux) soit



**Figure 8 : Schéma récapitulatif des facteurs régulant le remodelage vasculaire utérin.**

endocrine (s'il est sécrété par les cytotrophoblastes villosités) sur l'angiogenèse utéro-placentaire. Le cytotrophoblaste extravilloux sécrète également du VEGF-C, du PlGF, de l'angiogénine et exprime Tie-2 (récepteur de l'angiopoïétine). Tous ces facteurs sont susceptibles de participer à la vasodilatation des artères spiralées (Cf. Figure 8). Enfin, il a été montré que l'hCG possède des propriétés angiogéniques similaires à celles du VEGF (Zygmunt et coll, 2002 ; Islami et coll, 2003) et que le récepteur LH/CG est présent sur les cellules endothéliales utérines (Toth et coll, 1994). L'administration *in vivo* d'hCG réduit la résistance vasculaire dans l'utérus et réduit *in vitro* la production d'eicosanoïdes (les prostaglandines, les prostacyclines, les thromboxanes et les leucotriènes), molécules dérivant des acides gras oméga 3 ou 6 (acide arachidonique), puissants vasoconstricteurs du mur vasculaire (Toth et coll, 2001). *In vitro*, l'hCG promeut l'angiogenèse en favorisant la migration des cellules endothéliales utérines et leur capacité à former des structures capillaires (Berndt et coll, 2006). Les auteurs montrent également que l'ajout d'hCG sur des cultures endothéliales endométriales augmente le développement des vaisseaux.

Tous ces éléments suggèrent que les facteurs trophoblastiques sont directement impliqués dans des processus d'angiogenèse utérine et de remodelage des vaisseaux utérins indépendamment de l'invasion de la paroi des vaisseaux par les CTEV.

#### 2-c) Le remodelage induit par une interaction directe entre le cytotrophoblaste extravilloux et les composants de la paroi artérielle

La troisième étape du remodelage vasculaire utéro-placentaire est l'infiltration des artères par les CTEV. Plusieurs études histologiques ont montré la nécessité d'une interaction directe entre les CTEV et les constituants des artères lors de ce remodelage (Brosens et coll, 1967; Pijnenborg et coll, 1983). Il s'en suit une dégénérescence de la couche de cellules musculaires lisses qui sont remplacées par un dépôt de fibrinoïde (Cf. Figure 7). Les cellules endothéliales sont alors remplacées par les cytotrophoblastes endovasculaires. En parallèle, il y a une dégradation des fibres d'élastine de la paroi des vaisseaux. Ces modifications permettront une dilatation des vaisseaux à un diamètre plusieurs fois supérieur au diamètre initial (Benirschke et coll, 2006).

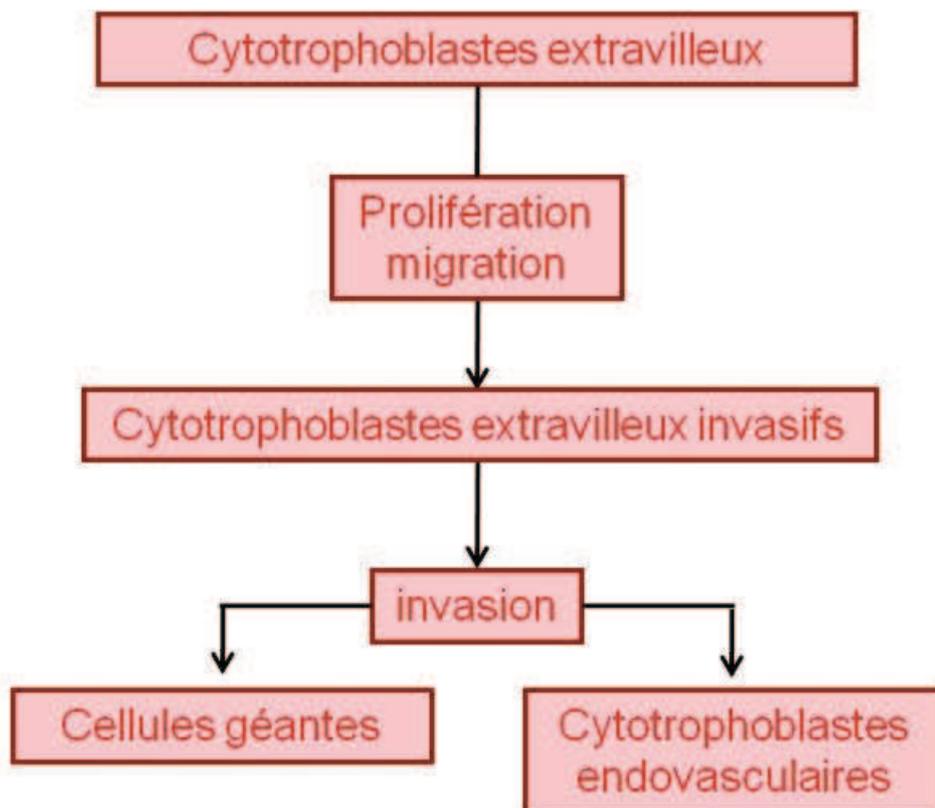
L'explication du remplacement des cellules musculaires lisses par les cytotrophoblastes fait toujours débat : les cellules musculaires lisses meurent et sont



remplacées pas les trophoblastes extravilleux, ou bien elles subissent une différenciation moléculaire et structurale temporaire tant que les trophoblastes extravilleux sont présents (Nanaev et coll, 1995 ; Pijnenborg et coll, 2006). Selon Pijnenborg et coll, l'hypothèse la plus vraisemblable serait l'association d'une extravasation des cytotrophoblastes constituant les plugs de la lumière vasculaire vers la paroi artérielle avec l'intravasation des cytotrophoblastes invasifs depuis la décidue dans la paroi artérielle. Ces hypothèses sont en accord avec des observations *in vivo* et *in vitro*. En effet, l'équipe de Pijnenborg a observé *in situ* des dépôts de fibrine autour des cytotrophoblastes endovasculaires (Pijnenborg et coll, 1983) et d'autres auteurs ont montré la capacité de ces cellules à envahir une artère *in vitro* par l'induction de l'apoptose des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses (Cartwright et coll, 2002a).

De plus, il a été montré que les cytotrophoblastes extravilleux sont capables d'induire l'apoptose des cellules musculaires lisses. Lors de co-culture entre des cellules musculaires lisses, qui expriment FAS (*Apoptosis Stimulating Fragment*), et des cytotrophoblastes extravilleux primaires ou immortalisés, exprimant le ligand de FAS (FAS-L), Harris et coll ont observé l'apoptose des cellules musculaires lisses artérielles. Cette apoptose est évitée en présence d'anticorps anti-FAS-L (Harris et coll, 2006). Les cytotrophoblastes endovasculaires expriment par ailleurs des structures Sialyl Lewis<sup>x</sup> à leur surface (Burrows et coll, 1994), carbohydrates qui lient les E- et P-sélectines exprimées par l'endothélium. Ceci pourrait expliquer l'attachement des cytotrophoblastes endovasculaires aux cellules endothéliales mais aussi à la matrice extracellulaire de la paroi artérielle. De plus, il semble que l'expression d'éphrines spécifiques (ligands membranaires qui agissent de façon autocrine ou paracrine immédiate) puisse expliquer pourquoi les cytotrophoblastes endovasculaires ignorent les veines pour ne remodeler exclusivement que les artères. En effet, les artères expriment l'éphrineB2 dont le récepteur EphB2 est exprimé par les cytotrophoblastes extravilleux invasifs. Or les veines expriment le récepteur EphB4 qui inhibe l'expression de chémokines indispensables à la migration cellulaire (Red-Horse et coll, 2005) (*Cf.* Figure 8).

Pendant que s'effectuent ces transformations, les lumières artérielles restent obstruées par des bouchons trophoblastiques et la chambre intervillieuse ne contient pas de sang mais un infiltrat sans élément figuré sanguin maternel. Ce n'est qu'à partir de 12 semaines d'aménorrhée que s'établit une véritable circulation placentaire maternelle au fur et à mesure que les bouchons trophoblastiques disparaissent.



**Figure 9 : La voie de différenciation des cytotrophoblastes extravilloux.**

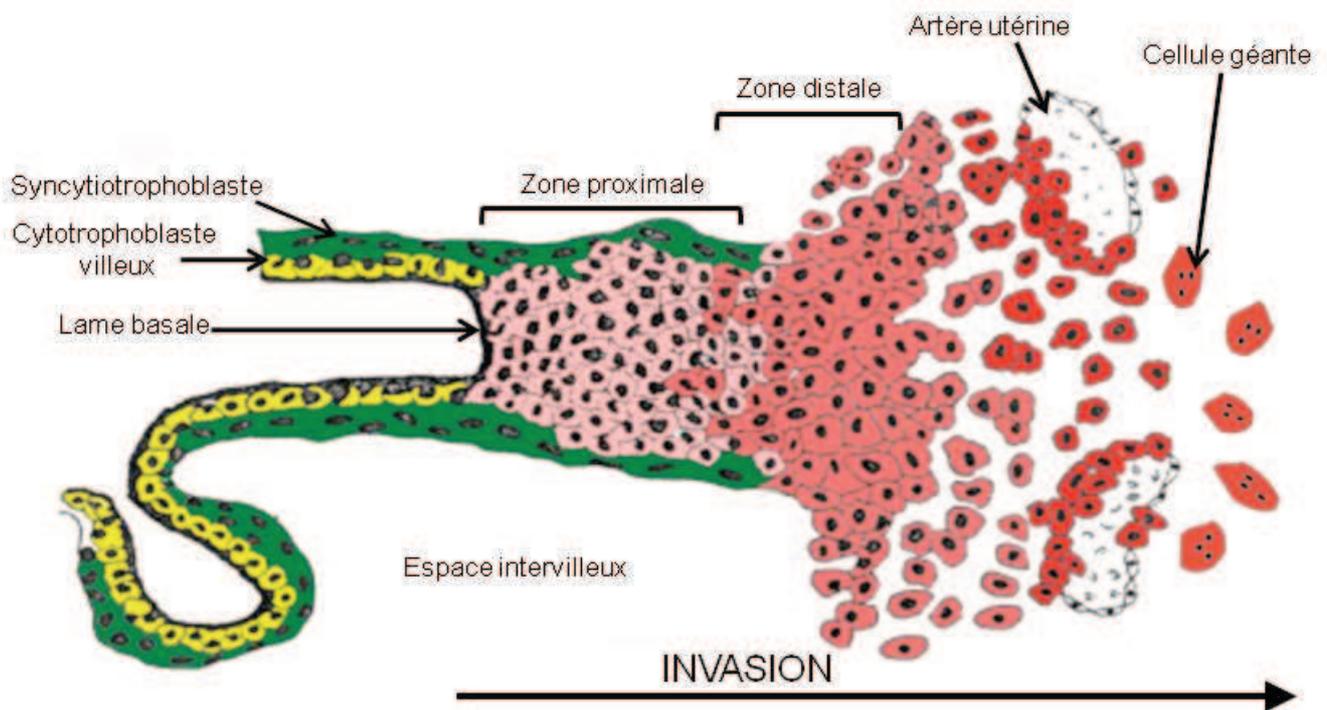
### C. Le cytotrophoblaste extravilleux

(Cf. Figure 9)

Au premier trimestre de grossesse, le placenta humain est caractérisé par une invasion profonde, mais contrôlée, de l'endomètre utérin par les cytotrophoblastes extravilleux. Ils sont situés à la base des villosités crampons qui s'ancrent dans l'endomètre maternel à l'interface fœto-maternel. L'origine de ces cellules n'est pas connue. Elles pourraient provenir d'une cellule progénitrice dont l'existence n'a pas encore été démontrée, commune ou non avec les cytotrophoblastes villositaires.

Les cytotrophoblastes extravilleux forment tout d'abord des colonnes de cellules polarisées, agrégées les unes aux autres, reposant sur une lame basale. La colonne proximale est composée de cellules prolifératives quittant progressivement le cycle cellulaire au niveau distale de la colonne pour se différencier en cytotrophoblastes extravilleux invasifs qui envahissent la décidue et colonisent l'endomètre jusqu'au tiers supérieur du myomètre (Cf. Figure 9). Ces phénomènes de prolifération et d'invasion sont des caractéristiques partagées avec les cellules malignes (Fischer et Damsky, 1993). En effet, l'acquisition du phénotype invasif s'accompagne d'une modification d'expression des protéines d'adhérence intercellulaires, des protéines d'adhérence à la matrice extracellulaire et de remaniements du cytosquelette. Ces cellules sécrètent également des métalloprotéases, enzymes de la dégradation de la matrice extracellulaire. Elles expriment à leur surface des molécules du système HLA (*Human leucocyte antigen*) non classiques (HLA-C, -E, -G) et échappent ainsi à la surveillance immunitaire maternelle (*uterin natural killer* (uNK), lymphocyte T CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup>) (Tafuri A et coll, Science 1995, 270-630) alors que le placenta qui a le même caryotype que le fœtus correspond à une greffe semi-allogénique du fait de la présence d'antigènes d'origine paternelle.

Néanmoins, contrairement à l'invasion tumorale, l'invasion trophoblastique est dûment contrôlée dans l'espace et dans le temps par l'environnement utérin. Les cellules déciduales, cellules stromales de l'endomètre se différenciant après l'ovulation sous l'effet de la progestérone et des œstrogènes, participent activement à cette régulation. Ces cellules sécrètent des facteurs solubles qui modulent la synthèse des protéases et des protéines



	<b>CTEV prolifératifs</b>	<b>CTEV invasifs</b>	<b>CTEV endo-vasculaires</b>	<b>Cellules géantes</b>
<b>Marqueurs du cycle cellulaire</b>	Ki67, PCNA, Cyclines D1, A et B, CDK4, mdm2		p26, p27, p57, p53	
<b>Molécules d'adhésion</b>	E-Cadhérine Connexine-40		VE-Cadhérine	
			MCAM	
			PCAM-1 VECAM-1 ICAM-1 NCAM	Connexine 43
	Syncytine 1			
<b>Intégrines</b>	Ephrine B1, EphB4	Ephrine B2	Ephrine B1 et B2	
	$\alpha 3 \beta 1, \alpha 6 \beta 4, \alpha v \beta 6$	$\alpha 5 \beta 1, \alpha 1 \beta 1, \alpha v \beta 1, \alpha v \beta 3, \alpha 4 \beta 1$		
<b>protéases</b>	MMP-3,9 TIMP1,2 MT-MMP1	MMP-1,2,3,7,9 TIMP-1,2,3 MT-MMP1,2	MMP-1,2 MT-MMP1,2	
	CD 26		uPA, PAI-1	
			CP-M	

**Figure 10: Les marqueurs du cytotrophoblaste extravilloux.**

matricielles (Bischof et coll, 2000a) limitant l'invasion trophoblastique au tiers supérieur du myomètre où les cytotrophoblastes extravilleux adoptent un phénotype particulier de cellules géantes polyploïdes. De plus, l'invasion trophoblastique est spécifiquement orientée vers les artères spiralées utérines. Les cytotrophoblastes extravilleux n'envahissent pas les veines mais uniquement les parois artérielles où ils participent à leur remodelage par la destruction des cellules musculaires lisses et des cellules endothéliales. Ils prennent alors la place des cellules endothéliales et deviennent des cytotrophoblastes endovasculaires. Ils colonisent également la lumière des artères spiralées utérines où ils forment des bouchons trophoblastiques, ou plugs. Ils obstruent la lumière de ces artères et ne permettent que le passage d'un exsudat du sang maternel dans la chambre intervillieuse.

### 1) Les cytotrophoblastes extravilleux prolifératifs

Le caractère prolifératif du cytotrophoblaste extravilleux, situé à la base de la villosité crampon au niveau de la colonne proximale, a été démontré par immunohistochimie montrant *in situ* l'expression de marqueurs du cycle cellulaire comme Ki67, PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen*) (Genbacev et coll, 2000), les cyclines D1, A et B, le CDK4 (*Cyclin dependent kinase 4*) (Genbacev et coll, 2000) et Mdm2 (*Mouse double minute 2*) qui inhibe l'action proapoptotique de p53 (Haupt et coll 1996) (*Cf.* Figure 10). Des expériences d'incorporation de thymidine tritiée *in vitro* ont confirmé le caractère prolifératif de ces cellules (Kaufmann et Castellucci, 1997).

#### 1-a) Les molécules d'adhérence et les intégrines (*Cf. Figure 10*)

Les cytotrophoblastes extravilleux de la colonne proximale interagissent entre eux grâce à l'expression de molécules d'adhérence intercellulaires telles que la E-cadhérine (Zhou et coll, 1997) et la connexine 40 (Winterhager et coll, 1999), protéine transmembranaire qui compose les canaux des jonctions communicantes. Ces jonctions permettent le passage des



ions et des seconds messagers et jouent donc un rôle fondamental dans la communication intercellulaire. Les cytotrophoblastes extravilleux prolifératifs expriment également l'éphrine B1 et son récepteur l'EphB4 (Red-Horse et coll, 2005). La présence de syncytine 1, protéine membranaire codée par le rétrovirus endogène HERV-W, est mise en évidence dans le cytotrophoblaste extravilleux dès la colonne proximale (Malassine et coll, 2005).

Les cytotrophoblastes extravilleux prolifératifs expriment également des protéines d'interaction avec la matrice extracellulaire sur laquelle ils reposent. Il s'agit de récepteurs de l'adhérence cellulaire, c'est-à-dire des récepteurs transmembranaires nommés intégrines. Elles sont constituées de deux sous-unités associées de façon non covalentes : la chaîne  $\alpha$  qui fixe des cations divalents et la chaîne  $\beta$  qui possède un domaine riche en cystéine. L'association d'une sous-unité  $\alpha$  avec une sous-unité  $\beta$  particulière définit la spécificité de reconnaissance de l'intégrine à une des composantes de la matrice extracellulaire. Ainsi, les cytotrophoblastes extravilleux prolifératifs au contact direct avec la lame basale expriment l'intégrine  $\alpha v \beta 6$  (récepteur de la vitronectine) (Zhou et coll, 1997), l' $\alpha 3 \beta 1$  (récepteur de la laminine) (Damsky et coll, 1992) et l'intégrine l' $\alpha 6 \beta 4$  (un des récepteurs de la laminine 5) (Aplin, 1993).

#### 1-b) Les protéases matricielles

Les cytotrophoblastes extravilleux prolifératifs produisent des métalloprotéases matricielles ou MMPs qui forment une famille de protéases impliquées dans la dégradation de toutes les protéines de la matrice extracellulaire, aussi bien interstitielle que de la membrane basale, mais aussi de protéines non matricielles comme les facteurs de croissance. Elles agissent par clivage de la protéine en peptides ou en acides aminés, soit au niveau de sites spécifiques, soit à l'une ou l'autre des extrémités de la chaîne protéique. Pour agir, ces enzymes nécessitent d'être activées par un ion divalent comme le calcium ou le zinc. Dans l'espèce humaine il existe 22 MMPs qui sont classées en cinq grands groupes selon leurs structures primaires et de leurs spécificités de substrat : les collagénases, les gélatinases, les stromélysines, les MT-MMPs (*Membrane Type-MMP*) qui sont liées à la membrane et les MMPs non classifiées. L'activité des MMPs est régulée par des inhibiteurs appelés TIMPs (*Tissue Inhibitor Matrix Metalloprotéinases*). Les cytotrophoblastes extravilleux prolifératifs sécrètent de la MMP-3 (stromélysine-1) qui dégrade la fibronectine, la laminine et le

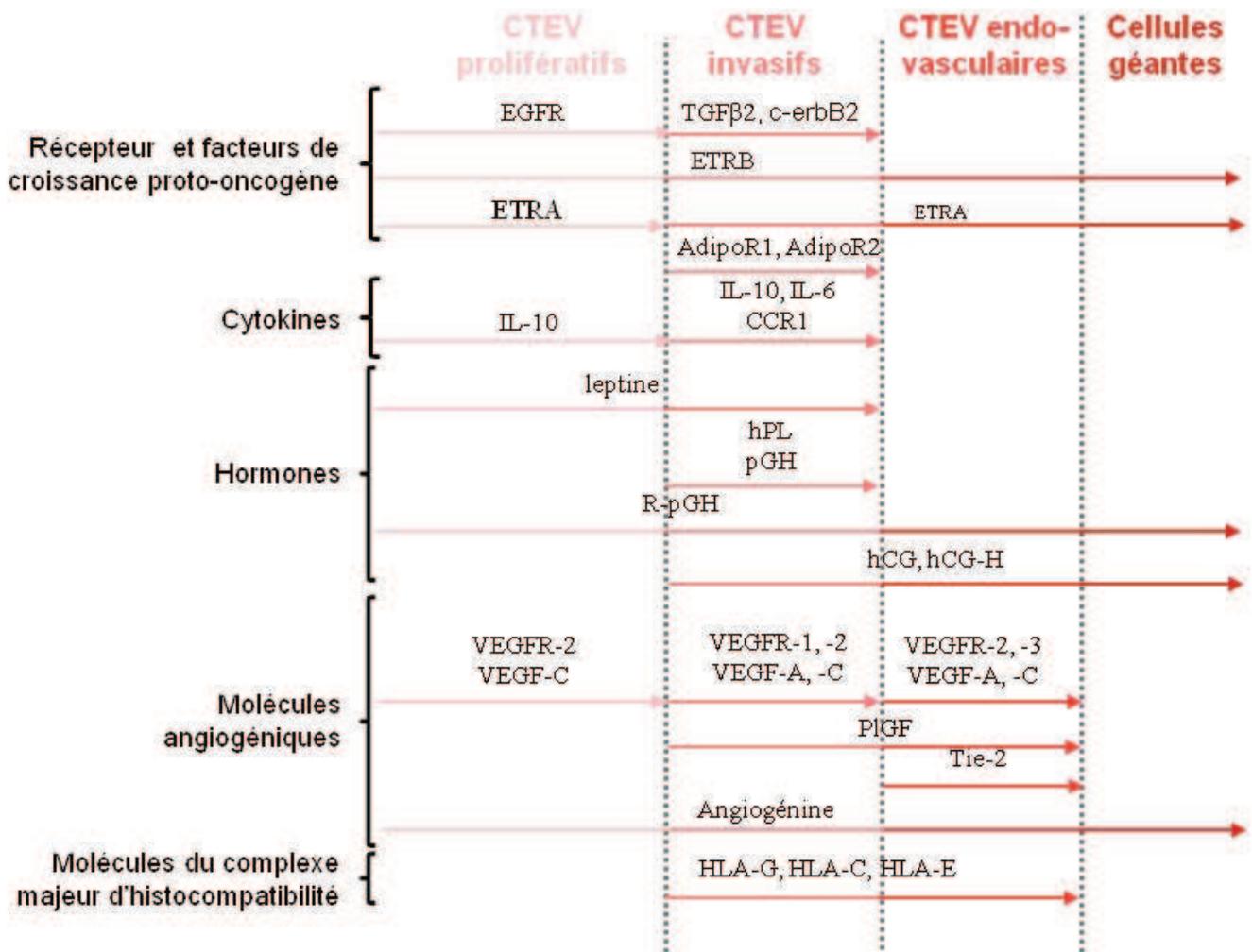
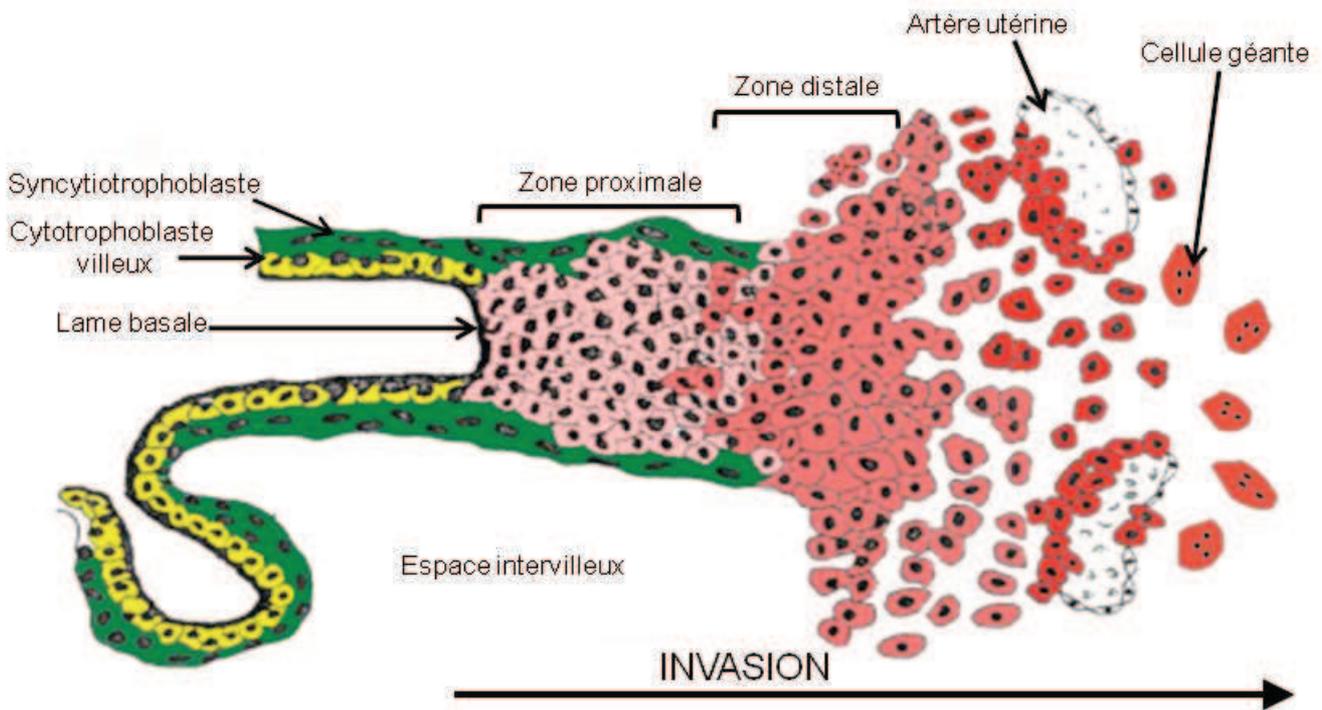


Figure 11 : Les marqueurs du cytotrophoblaste extravilloux.

collagène (Huppertz et coll, 1998) et la MMP-9 (gélatinase B) qui dégrade le collagène IV (Polette et coll, 1994). Ils expriment également les activateurs des MMPs liés à la membrane comme la MT-MMP1 (Hurskainen et coll, 1998) et des inhibiteurs des MMPs tels que le TIMP-1 (Huppertz et coll, 1998) et le TIMP-2 (Ruck et coll, 1996).

Les cytotrophoblastes extravilleux prolifératifs expriment également la dipeptidyl peptidase IV (CD26) qui est une aminopeptidase membranaire exclusivement exprimée dans la colonne proximale (Sato et coll, 2002) (Cf. Figure 10).

### 1-c) Les facteurs de croissance, cytokines et autres

Enfin, les cytotrophoblastes extravilleux prolifératifs expriment le récepteur de l'EGF (*Epidermal Growth Factor*) (Muhlhauser et coll, 1993), la leptine (Castellucci et coll, 2000) et l'interleukine-10 (IL-10) (Szony et coll, 1999). La présence du VEGF-C et du récepteur VEGFR-2 a été mise en évidence *in situ* par Zhou et coll (Zhou et coll, 2002). L'angiogénine, (Pavlov et coll, 2003) puissant facteur angiogénique, et le récepteur de la pGH (*placental growth hormone*)(Lacroix et coll, 2005), ont été mis en évidence dans les cytotrophoblastes extravilleux à tous les stades de leur différenciation.

Il avait été mis en évidence que l'endothéline-1(ET-1) stimulait *in vitro* la prolifération et l'invasion des trophoblastes extravilleux (Cervar et coll, 1996). Très récemment la même équipe a étudié le profil de répartition de ses récepteurs ETR-A (*Endothelin Recepto-A*) et ETR-B au niveau de la colonne de cytotrophoblastes extravilleux. Elle a ainsi montré que ETR-A et ETR-B étaient exprimés dans toute la colonne avec cependant une large prédominance de ETR-A dans les cytotrophoblastes extravilleux de la colonne proximale (CTEV prolifératifs) contrairement à ETR-B exprimé équitablement entre les cellules de la colonne proximale et distale (CTEV invasifs) (Cervar-Zivkovic et coll, 2011). Une autre équipe a également mis en évidence très récemment, l'expression *in situ* de la fibuline-5, une glycoprotéine de la matrice extracellulaire sécrétée, par les cytotrophoblastes extravilleux prolifératifs de la colonne proximale. (Gauster et coll, 2011) (Cf. Figure 11).



## 2) Les cytotrophoblastes extravilleux invasifs

Au niveau de la colonne distale, les cytotrophoblastes extravilleux sortent du cycle cellulaire. On peut l'observer *in situ* par l'absence de marquage pour Ki67 (Handsuh et coll, 2007a) contrairement aux cytotrophoblastes extravilleux présents au niveau de la colonne proximale. De plus, il a été mis en évidence *in situ* l'expression d'inhibiteurs des cyclines cellulaires tels que p16, p27 et p57 (Genbacev et coll, 2000) ainsi que le suppresseur de tumeur p53 (Cohen et coll, 2006). Les cytotrophoblastes se différencient en cytotrophoblastes extravilleux invasifs au phénotype mésenchymateux. Deux études montrent que les cytotrophoblastes extravilleux utilisent l'endoréplication à la place de la mitose lors de l'acquisition de leur phénotype invasif (Weier et coll, 2005; Zybina et coll, 2002). Il semble que leur progression profonde dans la décidue s'accompagne d'une augmentation de l'endoréplication (Weier et coll, 2005). Le changement phénotypique d'un caractère épithélial à un aspect mésenchymateux s'accompagne de plusieurs modifications fonctionnelles (Cf. Figure 10).

### 2-a) Les intégrines et les protéases matricielles

En quittant le cycle cellulaire, les cytotrophoblastes extravilleux vont exprimer de nouvelles intégrines et MMPs. Ils dégradent activement l'environnement matriciel et envahissent profondément la décidue. En effet, les cytotrophoblastes extravilleux de la colonne distale expriment l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  qui est le récepteur de la fibronectine et qui est associée à la motilité cellulaire et à la transition vers un phénotype mésenchymateux. Ce processus de "*switch* des intégrines" se poursuit plus profondément dans la décidue où les cytotrophoblastes extravilleux invasifs expriment d'autres intégrines telles que l' $\alpha 1\beta 1$  (récepteur de la laminine et du collagène I et IV), l' $\alpha v\beta 1$  et l' $\alpha v\beta 3$  (récepteurs de la vitronectine) (Burrows et coll, 1993 ; Damsky et coll, 1992 ; Irving et coll, 1995a ; Zhou et coll, 1997). Concernant l'expression des MMPs, elle aussi est totalement remaniée. En effet, la capacité à envahir une matrice extracellulaire des cytotrophoblastes extravilleux est médiée par leur production de MMPs. C'est un phénomène crucial car il permet non seulement à la cellule de progresser physiquement dans la décidue mais surtout de libérer une grande



quantité de facteurs de croissance immobilisés dans la matrice tels que le TGF $\alpha$  (*Transforming growth factor  $\alpha$* ), le TGF $\beta$ , les IGFs (*Insulin-like growth factor*) et les FGFs (Egeblad et Werb, 2002 ; Visse et Nagase, 2003). Ils produisent en particulier des collagénases de type IV (MMP-1 et MMP-2), pouvant dégrader le collagène IV (Huppertz et coll, 1998 ; Polette et coll, 1994), mais aussi la fibronectine, la laminine, l'élastine, l'entactine, les protéoglycanes et la gélatine (protéines de la matrice extracellulaire ou de la lame basale) (Woessner, 1991). Ils produisent aussi la MMP-1 (collagénase interstitielle) qui dégrade le collagène I et III abondants dans l'endomètre, la MMP-7 (matrylisin) (Vettraino et coll, 1996) et les MT-MMP-1 et -2 qui catalysent la conversion de la proMMP-2 en sa forme active et seraient des régulateurs importants de son activité (Bjorn et coll, 2000 ; Hurskainen et coll, 1998). Plus tardivement au cours de l'invasion, les MMP-3 et -9 sont de nouveau exprimées. Les cytotrophoblastes extravilloux invasifs expriment également les inhibiteurs des MMPs, tels que les TIMP-1, -2 et -3. Ils sécrètent aussi des protéines matricielles comme la fibronectine, la laminine et le collagène de type IV (Korhonen et Virtanen, 1997 ; Xu et coll, 2001).

D'autres protéases sont produites par les cytotrophoblastes extravilloux invasifs comme l'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA) ainsi que son récepteur et l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène, le PAI-1 (Hu et coll, 1999) (Cf. Figure 10).

## 2-b) Les autres facteurs modifiés

Lors de la transition du phénotype prolifératif au phénotype invasif, les cytotrophoblastes extravilloux cessent d'exprimer les molécules d'adhérence, comme la connexine-40, la E-cadhérine et le récepteur de l'EGF. Simultanément, la VE-cadhérine (Zhou et coll, 1997), le proto-oncogène c-erbB2 (Muhlhauser et coll, 1993), le TGF $\beta$ 2 (Tarrade et coll, 2001b), la MCAM (*Melanoma Cell Adhesion Molecule*) (Shih et Kurman, 1996) et l'éphrine B2 (Red-Horse et coll, 2005) sont exprimés. Ce processus de différenciation s'accompagne également de l'expression de plusieurs autres molécules.

Les cytotrophoblastes invasifs sécrètent de l'hPL (*human placental lactogen hormone*) et de la leptine et expriment le récepteur à la leptine (Castellucci et coll, 2000). *In vitro* les



cytotrophoblastes invasifs n'expriment pas l'adiponectine mais par contre ils expriment deux de ses récepteurs, AdipoR1 et AdipoR2 (*Adiponectin Receptor 1 or 2*), dans des proportions différentes. Le taux d'ARN<sub>m</sub> d'AdipoR1 est 20 fois plus élevé que celui d'AdipoR2. Des résultats identiques ont été mis en évidence sur du tissu placentaire du premier trimestre total (Benaitreau et coll, 2010). Les récepteurs VEGFR-1 et -2 et leurs ligands le VEGF-C et le VEGF-A ont été mis en évidence *in situ* ainsi que le facteur de croissance placentaire PlGF (Zhou et coll, 2002). Il a été montré l'apparition de l'endogline, glycoprotéine capable de lier le TGFβ, au moment du "switch" α6β4 vers α5β1 (St-Jacques et coll, 1994). L'expression d'une peptidase située à la surface cellulaire, la carboxypeptidase-M (CP-M) a également été mise en évidence *in situ*, faiblement dans les cytotrophoblastes extravilloux de la colonne distale mais fortement dans les cytotrophoblastes extravilloux interstitiels ou endovasculaires. La CP-M est une peptidase à zinc qui catalyse la suppression des acides aminés basiques à l'extrémité C-terminale des peptides, ce qui les module ou les inactive. Le rôle précis de cette enzyme dans la différenciation des trophoblastes extravilloux n'a pas encore été élucidé. En revanche, il a été montré *in vitro* dans la lignée JEG-3 que cette enzyme favoriserait leur capacité à envahir (Nishioka et coll, 2003). Le rôle des cytokines sur l'acquisition du phénotype invasif par les cytotrophoblastes extravilloux a aussi été étudié. Il a été mis en évidence *in situ* qu'ils exprimaient le CCR1 (*C-C chemokine receptor 1*) majoritairement au niveau de la colonne distale et que dans la décidue ses ligands RANTES (*Regulated upon activation, normal T-cell expressed, and secreted*) et MIP1α (*Macrophage inflammatory protein 1 α*) étaient présents. *In vitro*, sur des cultures d'explants, les auteurs ont montré que ces ligands stimulaient la migration des cytotrophoblastes extravilloux (Sato et coll, 2003). Les cytotrophoblastes extravilloux invasifs expriment également un répertoire unique de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité : HLA-G, HLA-C et HLA-E (King et coll, 2000 ; Loke et King, 2000) qui sont en partie responsables de l'échappement du cytotrophoblaste extravilloux au contrôle immunitaire maternel car elles permettent aux cellules d'éviter la reconnaissance par les cellules uNK. Enfin récemment, il a été mis en évidence *in situ* et *in vitro* que les cytotrophoblastes extravilloux expriment et sécrètent de l'hCG et de l'hCG hyperglycosylée (hCG-H) (Guibourdenche et coll, 2010) dès qu'ils sont sortis du cycle cellulaire et que cette hCG-H stimule leur invasion (Handsuh et coll, 2007b) (*Cf.* Figure 11).



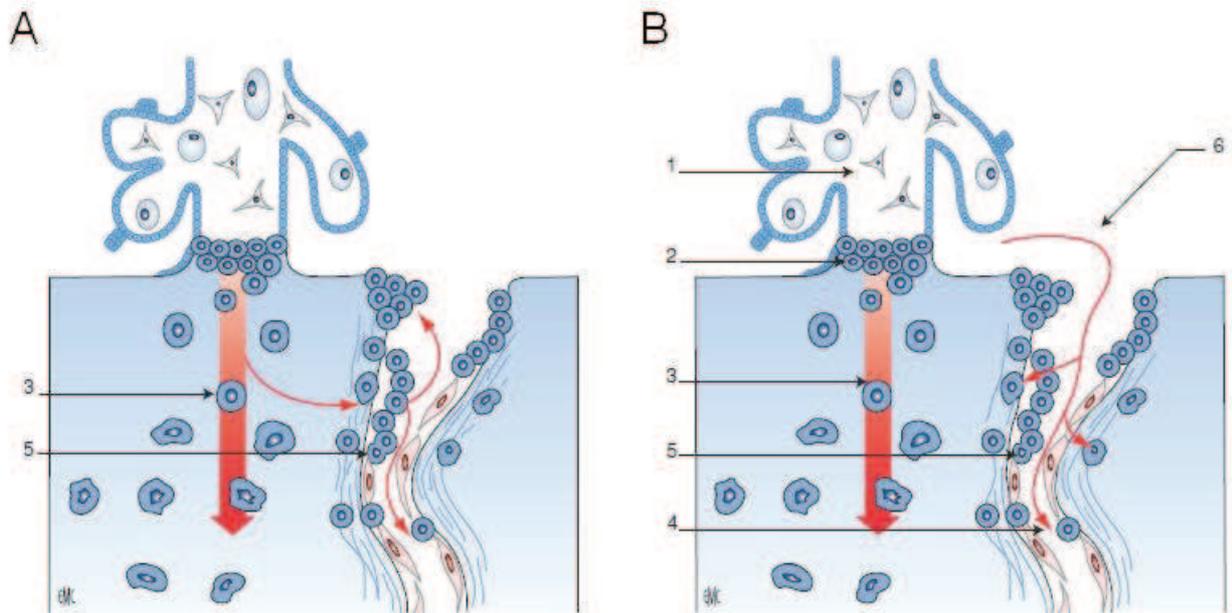
### 3) Les cellules géantes

Les cytotrophoblastes extravilleux qui envahissent profondément la décidue jusqu'au premier tiers du myomètre atteignent leur stade terminal de différenciation sous la forme de cellules géantes, bi ou tri-nucléées. A l'heure actuelle, il n'est toujours pas établi si ces cellules résultent d'un processus de fusion et/ou d'endoréplication. La co-expression de la connexine 43 (al-Lamki et coll, 1999) et de la syncytine-1 (Malassine et coll, 2005) dans ces cellules est en faveur d'un mécanisme de fusion. Cependant, d'autres études ont montré que l'endoréplication est un mécanisme largement décrit dans les cytotrophoblastes extravilleux (Weier et coll, 2005 ; Zybina et coll, 2002) (Cf. Figure 10 et 11).

### 4) Les cytotrophoblastes extravilleux endovasculaires

Certains cytotrophoblastes extravilleux migrent dans la décidue et envahissent spécifiquement les artères utérines spiralées. Ils prennent alors le nom de cytotrophoblastes endovasculaires car ils adoptent un phénotype pseudo-endothélial et interagissent avec l'endothélium artériel. En effet, ces cellules expriment un répertoire particulier de molécules d'adhérence comme la VE-cadhérine, les intégrines  $\alpha v\beta 3$  et  $\alpha 4\beta 1$ , PECAM-1 (*Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule-1*), VCAM-1, ICAM-1 (*Intercellular Cell Adhesion Molecule-1*), NCAM (*Neural Cell Adhesion Molecule*) (Burrows et coll, 1994 ; Zhou et coll, 1997) (Cf. Figure 10).

L'acquisition du phénotype invasif par les cytotrophoblastes est associée à une diminution rapide de l'expression du récepteur tyrosine kinase EphB4 et à une augmentation de l'expression de ses ligands éphrine-B1 et éphrine-B2. En effet, précocement dans la grossesse, l'éphrine-B1 est exprimée par les cytotrophoblastes endovasculaires et interstitiels (Chennakesava et coll, 2006). *In vitro*, il a été mis en évidence que la protéine de fusion EphB4-Fc diminue l'adhérence et réduit la migration des cytotrophoblastes. Or l'EphB4 est exprimé par l'endothélium veineux utérin, ce qui pourrait expliquer pourquoi les cytotrophoblastes ne colonisent pas les veines utérines. A l'inverse, la protéine de fusion éphrine-B2-Fc favorise la migration des cytotrophoblastes *in vitro*. Ainsi, l'expression de



**Figure 12 : Trajets possibles des cytotrophoblastes endovasculaires.** D'après Kaufmann et coll, 2003 ; Tsatsaris et coll, 2006.

1 : ancrage villositaire, 2 : colonnes de cytotrophoblastes extravilloux, 3 : cytotrophoblastes interstitiels et invasifs, 4 : artères utéro-placentaires, 5 : cytotrophoblastes endovasculaires, 6 : espace intervilloux

En cas d'intravasation (A), le trophoblaste endovasculaire provient du trophoblaste interstitiel qui a envahi la paroi artérielle. Par contre, en cas d'extravasation (B), le trophoblaste endovasculaire provient du cytotrophoblaste extravilloux qui a colonisé la lumière des artères utérines par voie endoluminale et remonté le long de la paroi vasculaire à contre courant vers le myomètre.

l'éphrine-B2 par l'endothélium des artères spiralées utérines pourrait promouvoir préférentiellement leur remodelage (Red-Horse et coll, 2005). Les cytotrophoblastes endovasculaires expriment aussi les Sialyl Lewis<sup>x</sup> qui lient les E- et P-sélectines exprimées par l'endothélium (Burrows et coll, 1994). Ils expriment Tie-2, un récepteur des cellules endothéliales impliqué dans l'angiogenèse (Goldman-Wohl et coll, 2000), l'angiogénine (Pavlov et coll, 2003), le facteur de croissance placentaire PIGF, les récepteurs VEGFR-2 et VEGFR-3 et leur ligands le VEGF-A et -C (Zhou et coll, 2002) et l'HLA-G et plus faiblement l'HLA-C (Proll et coll, 1999) (Cf. Figure 11).

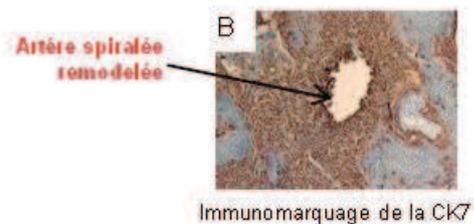
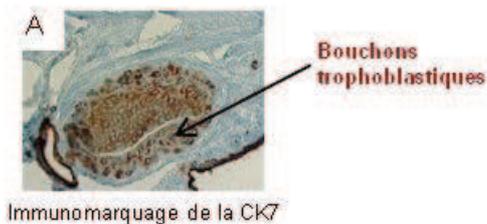
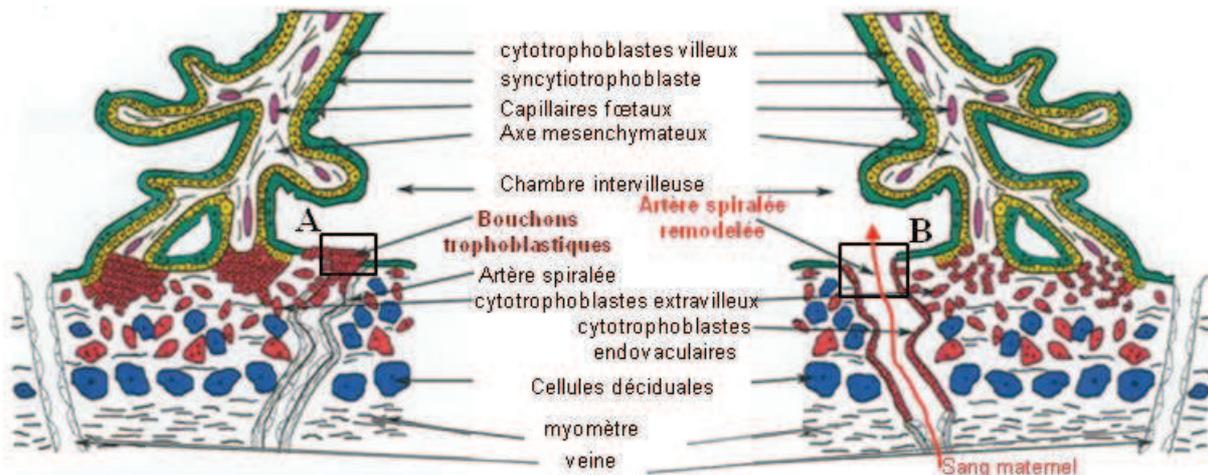
L'origine exacte de ces cytotrophoblastes endovasculaires reste encore indéterminée à ce jour. En effet, ils pourraient provenir des cytotrophoblastes invasifs périvasculaires situés à proximité dans la décidue (Jaffe et coll, 1997), par un phénomène d'intravasation, ou des bouchons de cytotrophoblastes qui obturent la partie terminale des artères en début de grossesse appelés "*plugs*", par un phénomène d'extravasation (Cf. Figure 12). Ces deux mécanismes co-existent probablement. Cette invasion de la paroi artérielle par la cellule trophoblastique extravillieuse conduit à la disparition totale de la tunique musculaire lisse artérielle et des cellules endothéliales maternelles qui sont remplacées par les trophoblastes extravillieux. Les cytotrophoblastes endovasculaires sont donc essentiels pour le remodelage des artères utérines.

## 5) L'invasion trophoblastique

Les cytotrophoblastes extravillieux, situés à l'interface fœto-maternelle à la base de la villosité crampon, se différencient en cellules invasives après avoir quittés le cycle cellulaire. Le caractère invasif de la cellule trophoblastique extravillieuse semble être intrinsèque, comme en témoigne la capacité du trophoblaste humain à s'implanter en dehors de la cavité utérine et à envahir les tissus avoisinants en cas de grossesse extra-utérine. Ces cellules colonisent l'endomètre, le myomètre superficiel et les artères spiralées utérines. Cette invasion trophoblastique est dûment contrôlée par l'environnement utérin et se limite au tiers supérieur du myomètre où les cytotrophoblastes extravillieux adoptent un phénotype particulier de cellules géantes polyploïdes. L'invasion trophoblastique est aussi orientée vers les artères spiralées utérines où vont se former des bouchons de cellules trophoblastiques obstruant leur lumière.

Villosité choriale au site d'implantation **avant 10 SA**

Villosité choriale au site d'implantation **après 12 SA**



PpO<sub>2</sub> dans l'espace intervilloux  
18 mmHg, soit 2.5% d'O<sub>2</sub>

PpO<sub>2</sub> dans l'espace intervilloux  
61 mmHg, soit 8% d'O<sub>2</sub>

### Figure 13 : Oxygénation de la chambre intervillieuse

Les cytotrophoblastes extravilloux sont à l'origine de la formation de bouchons trophoblastiques obstruant les artères spiralées utérines au premier trimestre précoce (avant 10 SA). Aucun élément figuré n'est présent au niveau de la chambre intervillieuse et l'environnement placentaire est pauvre en oxygène (2-3% O<sub>2</sub> à 8 semaines d'aménorrhée). Les bouchons disparaissent progressivement vers 9-10 SA, ce qui permet la perfusion graduelle de la chambre intervillieuse et une augmentation progressive de la pression partielle en oxygène (8% O<sub>2</sub> à 12 SA).

A et B : immunomarquage de la cytokératine 7 (CK7), marqueur spécifique des trophoblastes dans le placenta, sur des coupes placentaires en paraffine. Visualisation d'un bouchon trophoblastique obstruant une artère spiralée utérine (A) et d'une artère spiralée utérine remodelée (B).

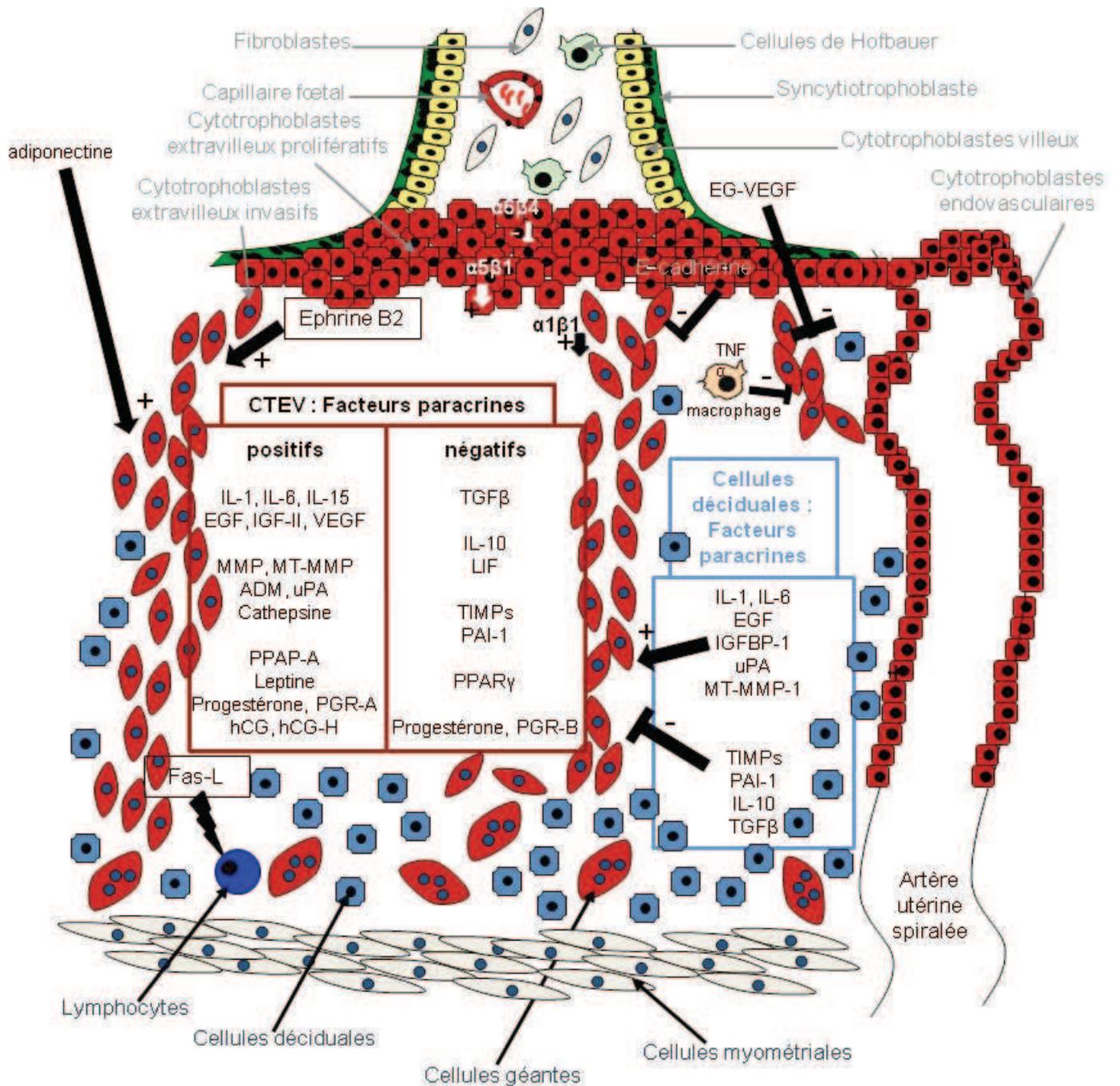
### 5-a) Rôle des bouchons trophoblastiques

L'invasion artérielle trophoblastique et la formation des bouchons trophoblastiques dans les artères spiralées utérines au premier trimestre de grossesse jouent un rôle physiologique fondamental.

Les bouchons trophoblastiques empêchent le sang maternel de se déverser dans la chambre intervillieuse et ne laissent passer qu'un exsudat. En effet, aucun élément figuré maternel, particulièrement des hématies, n'est présent au niveau de la chambre intervillieuse pendant les huit premières semaines de grossesse. Il en résulte un environnement placentaire pauvre en oxygène durant cette période (2-3% O<sub>2</sub> ou 20 mm Hg à 8 SA). Ces bouchons trophoblastiques protègent l'embryon et le placenta de taux trop élevés d'oxygène à ces étapes critiques du développement. En effet, à ce stade précoce, le trophoblaste n'exprime pas les enzymes de défense contre les espèces réactives de l'O<sub>2</sub>. Cette hypoxie relative est essentielle pour le bon développement de la villosité placentaire, dont la prolifération et l'angiogenèse sont dépendantes de la concentration en oxygène. Les bouchons se délitent progressivement vers 10 SA, ce qui permet la perfusion graduelle de la chambre intervillieuse et une augmentation progressive de la pression partielle en oxygène (8% O<sub>2</sub> ou 60 mmHg à 12 SA) (Jauniaux et coll, 2000) (*Cf.* Figure 13).

### 5-b) Régulation de l'invasion trophoblastique

Comme toute cellule invasive, le trophoblaste extravillieux établit au cours de sa différenciation un contact avec la matrice extracellulaire via des récepteurs spécifiques. Elle est aussi capable de digérer cette matrice extracellulaire par la production d'enzymes telles que les métalloprotéases comme cela a été décrit précédemment. Les cytotrophoblastes mais aussi les cellules de la décidue sécrètent un grand nombre de facteurs solubles agissant sur le cytosquelette favorisant la motilité ou l'invasion cellulaire mais restreignant cette invasion. L'invasion trophoblastique est ainsi particulièrement modulée par son environnement à l'interface fœto-maternelle (Bischof et coll, 2000a).



**Figure 14 : Schéma récapitulatif de la balance entre les sécrétions trophoblastiques et l'environnement utérin, régulant l'invasion trophoblastique.**

### 5-b-i) Les molécules d'adhérence

Si l'expression d'intégrines à la surface des cytotrophoblastes extravilloux marque leur état différencié, elle est aussi directement impliquée dans le processus d'invasion. Les cytotrophoblastes extravilloux à la base de la villosité crampon expriment l'intégrine  $\alpha 6\beta 4$ , récepteur prédominant de la laminine-5. Les cytotrophoblastes extravilloux de la colonne distale expriment l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , récepteur de la fibronectine, qui permettrait leur déplacement dans la matrice riche en fibronectine de cette partie de la colonne (Redman, 1997). Enfin les cytotrophoblastes extravilloux invasifs n'expriment plus l'intégrine  $\alpha 6\beta 4$  mais  $\alpha 1\beta 1$  qui promeut leur invasion par son interaction avec le collagène et différentes laminines, comme la laminine-2, abondamment exprimée dans la décidue (Church et coll, 1996).

En parallèle du « *switch* » des intégrines, on observe également un « *switch* » dans l'expression des cadhérines, molécules impliquées dans l'adhérence cellule-cellule. Dans le placenta, l'E-cadhérine permet une forte interaction entre les cytotrophoblastes, comme dans beaucoup d'épithélium (Birchmeier, 1995). Cette expression de la E-cadhérine diminue progressivement avec la différenciation des cytotrophoblastes dans la colonne en cellules invasives. Ainsi, la modulation des cadhérines contribue à l'acquisition du phénotype invasif par les cytotrophoblastes en voie de différenciation (Damsky et coll, 1994).

Les éphrines et leurs récepteurs sont également impliqués dans le processus d'invasion trophoblastique. En effet, les cytotrophoblastes extravilloux prolifératifs situés à la base de l'axe mésenchymateux expriment le récepteur tyrosine kinase EphB4 dont le ligand, l'éphrine B1, est exprimé par les cytotrophoblastes sous-jacents. Il a été suggéré que le changement d'expression de l'éphrine B1 en éphrine B2 entraînerait une répulsion des cellules, ce qui permettrait la migration et donc l'invasion des cytotrophoblastes extravilloux vers la décidue profonde (Red-Horse et coll, 2005) (Cf. Figure 14).

Les composants de la matrice extracellulaire jouent un rôle sur l'invasion en affectant l'expression des MMPs et de leurs inhibiteurs les TIMPs (Xu et coll, 2001). En effet, des cytotrophoblastes cultivés en présence de vitronectine, de laminine ou de fibronectine sécrètent plus de MMP-9 qu'en présence de collagène I ou IV. En revanche, l'expression de TIMP-3 est inhibée en présence de vitronectine. Sachant que les cytotrophoblastes eux-mêmes sécrètent de la laminine, de la fibronectine et de la vitronectine au cours du premier trimestre, il a été suggéré que ces protéines matricielles pourraient avoir un effet paracrine sur l'expression des MMPs et jouer ainsi un rôle dans le contrôle de l'invasion trophoblastique (Xu et coll, 2001) (Cf. Figure 14).



5-b-ii) La balance entre les sécrétions trophoblastiques et déciduales  
(Cf. Figure 14)

L'acquisition du phénotype invasif par les cytotrophoblastes extravilleux est caractérisé non seulement par un changement d'expression des molécules d'adhérence mais aussi par la production de toute une série de protéases : des métalloprotéases ou MMP (Hurskainen et coll, 1998), des sérines protéases (Liu et coll, 2003) et des cathepsines (Varanou et coll, 2006), leur permettant de dégrader et d'envahir profondément la décidue. Parallèlement les cellules déciduales produisent des TIMPs et le PAI-1 (Schalz & Lockwood, 1993 ; Lala & Graham 1990) qui permettraient de restreindre l'invasion trophoblastique. Des expériences réalisées *in vitro* suggèrent en effet que le processus d'invasion trophoblastique résulterait d'une balance entre la sécrétion des MMPs par le cytotrophoblaste et leur inhibition par les TIMPs provenant majoritairement de la décidue (Niu et coll, 2000). Les gélatinases MMP-2 et MMP-9 qui dégradent le collagène IV, constituant majoritaire des membranes basales, sont probablement les enzymes clés qui permettent aux cytotrophoblastes d'envahir la décidue et la paroi vasculaire (Bischof et coll, 2000b ; Staun-Ram et coll, 2004). Les trophoblastes extravilleux augmentent leur production et l'activation de la MMP-9, ce qui contribue à l'acquisition de leur caractère invasif *in vitro* (Librach et coll, 1991 ; Schatz et coll, 1999). Le pic de production de la MMP-9 coïncide d'ailleurs avec la capacité d'invasion maximale des trophoblastes extravilleux *in vivo*. La MMP-2 est aussi exprimée par les cytotrophoblastes extravilleux mais une étude plus récente suggère que la MMP-9 jouerait un rôle plus important que la MMP-2 dans l'invasion trophoblastique au cours de la grossesse et que la MMP-9 serait un pré-requis pour l'invasion trophoblastique (Cohen et coll, 2006).

Outre leur rôle de dégradation de la matrice, les MMPs régulent également l'activité d'un grand nombre de facteurs de croissance et de cytokines. En effet, les MMP-2 et -9 activent directement les trois isoformes du TGF $\beta$  (Yu et Stamenkovic, 2000) et permettent la libération des IGF en dégradant les IGFBPs (*Insulin-like growth factor binding protein*) (Coppock et coll, 2004). L'activité physiologique des MMPs est régulée par les TIMPs, qui sont exprimés dans les cellules déciduales et trophoblastiques (Hurskainen et coll, 1996 ; Ruck et coll, 1996) et capables de lier toutes les formes de MMPs. Cependant, le TIMP-1 inhibe préférentiellement la MMP-9 (Goldberg et coll, 1992) et le TIMP-2, la MMP-2 (Stetler-Stevenson et coll, 1989). De plus, la MMP-14, exprimée à la membrane des cellules déciduales et des cytotrophoblastes extravilleux, participe activement à l'invasion



trophoblastique en activant les MMPs et plus particulièrement la MMP-2 (Bjorn et coll, 2000 ; Hurskainen et coll, 1998). La sécrétion de MMP-9 est également inhibée par le TGF $\beta$  (Meisser et coll, 1999) produit par les cellules déciduales et trophoblastiques (Bischof et Campana, 2000b ; Tarrade et coll, 2001b). Parmi les protéases matricielles qui contrôlent l'invasion trophoblastique, on retrouve les sérine-protéases comme l'uPA, le PAI-1 et l'adrénomédulline (ADM). Le système de l'activateur du plasminogène, outre ses effets directs sur la dégradation de la matrice extracellulaire, a des effets indirects sur l'activation protéolytique des MMPs. Il a été montré, dans le modèle des lignées JAR et HTR-8/SV neo, que l'ADM active l'invasion en diminuant l'expression des transcrits du PAI-1 et en stimulant l'activité gélatinase de la MMP-2 (Zhang et coll, 2005).

#### 5-b-iii) Les facteurs de croissance et cytokines à l'interface fœto-maternelle

(Cf. Figure 14).

Le développement précoce du placenta a lieu sans apport maternel via les artères mais avec les sécrétions des glandes endométriales maternelles. Elles sécrètent en particulier des protéines comme l'EGF, le VEGF ou le LIF (*Leukemia inhibitory factor*) qui sont considérées comme les régulateurs critiques de l'implantation (Burton et coll, 2007). Tout au long de la grossesse, de nombreuses cellules, telles que les trophoblastes, les cellules épithéliales et stromales maternelles, les cellules NK utérines et les macrophages, sécrètent abondamment des facteurs de croissance comme l'EGF, le VEGF, le PDGF (*Platelet derived growth factor*), le PlGF, IGF-I ou IGF-II. Ces facteurs ont été montrés comme particulièrement importants pour la prolifération, l'adhérence et l'invasion des cytotrophoblastes (Bischof et coll, 2000a; Ferretti et coll, 2007).

Par exemple, l'effet de l'EGF, du VEGF, du FGF-4 (*Fibroblast Growth Factor-4*) et du FGF-10 a été testé sur des cultures primaires de cytotrophoblastes du premier trimestre. Il a été montré, dans ce modèle, que ces facteurs augmentent l'activité de l'uPA, du PAI-1 et de la MMP-9, suggérant qu'ils sont impliqués dans le contrôle de l'invasion trophoblastique (Anteby et coll, 2004). De plus, l'EGF augmente la sécrétion des MMP-2 et MMP-9 (Qiu et coll, 2004 ; Staun-Ram et coll, 2004). D'autres expériences réalisées sur des lignées de choriocarcinome suggèrent que l'EGF active la migration en inhibant l'expression de la connexine 40 (Wright et coll, 2006).



Récemment un nouveau facteur de croissance produit spécifiquement par les glandes endocrines a été mis en évidence : l'EG-VEGF (*endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor*). Il a été détecté dans les testicules, les glandes surrénales, l'ovaire et le placenta (Lecouter et coll, 2001). Dans le placenta, son expression est plus importante au premier trimestre et est restreinte à la couche syncytiale, cellules endocrines du placenta, (Hoffmann et coll, 2006). C'est une molécule qui est sécrétée et mesurable dans le sérum des femmes enceintes. D'un point de vue fonctionnel, il a été montré que l'EG-VEGF inhibe l'invasion trophoblastique. En effet, le traitement par l'EG-VEGF de culture d'explants sur Matrigel réduit la migration et l'invasion des cytotrophoblastes extravilloux. De même, le traitement par l'EG-VEGF de la lignée trophoblastique HTR8 inhibe la migration (Hoffmann et coll, 2009). Dans ces deux modèles, les auteurs montrent que le traitement par EG-VEGF s'accompagne d'une forte diminution de la production et de l'activité des MMP-2 et MMP-9.

L'IGFBP-1 est la protéine majoritairement sécrétée par les cellules déciduales. Cette protéine de liaison des IGF-I et IGF-II augmente l'activité gélatinase des cytotrophoblastes du premier trimestre sans affecter les MMP-2 et 9 (Bischof et coll, 1998). La combinaison de l'IGF-II et de l'IGFBP-1 stimule l'invasion des cytotrophoblastes extravilloux isolés d'explants du premier trimestre, l'effet de l'IGF-II passant par le récepteur de type 2 de l'IGF (IGF-2R) exprimé par les cytotrophoblastes et l'effet de l'IGFBP-1 étant dû à sa séquence RGD capable de lier les intégrines  $\alpha 5\beta 1$  (Hamilton et coll, 1998) D'autres études ont confirmé que l'IGF-II stimule l'invasion trophoblastique via l'activation de l'IGF-2R impliquant l'inhibition des protéines G et la phosphorylation des MAP kinases (McKinnon et coll, 2001). La biodisponibilité des IGFs peut être modulée par la PAPP-A (protéine plasmatique associée à la grossesse). En effet, la PAPP-A a été identifiée comme la protéase qui clive les IGFBP-4, protéines de liaison de type 4 de l'IGF-II. Une étude montre que le CTEV invasif exprime et sécrète 10 fois plus de PAPP-A que le CTV *in vitro*. Ces résultats suggèrent que l'expression de la PAPP-A pourrait être reliée au phénotype invasif du cytotrophoblaste. D'autre part, les auteurs mettent en évidence que l'activation du PPAR $\gamma$  inhibe l'expression et la sécrétion de la PAPP-A dans les CTEV, alors qu'elle n'a pas d'effet sur les CTV. Or les agonistes du PPAR $\gamma$  inhibent l'invasion trophoblastique *in vitro* (Tarrade et coll, 2001). L'ensemble de ces résultats suggère que la PAPP-A, en tant que gène cible de PPAR $\gamma$ , pourrait être impliquée dans le contrôle de l'invasion médiée par PPAR $\gamma$  en modulant la biodisponibilité des IGF-II, facteur connu pour stimuler l'invasion trophoblastique (Handschuh et coll, 2006).



Le LIF est un facteur produit par les glandes endométriales qui s'avère essentiel pour l'implantation du blastocyste (Stewart et coll, 1992). Lors de l'implantation sa sécrétion par l'endothélium endométrial est alors maximale (Simon et coll, 2000). Cependant, il est aussi exprimé avec son récepteur par les cytotrophoblastes. Il a été montré qu'il affecte l'invasion trophoblastique en inhibant l'activité gélatinase des cytotrophoblastes (Bischof et coll, 1995).

Certaines interleukines et leurs récepteurs sont présents à l'interface foëto-maternelle. L'IL-1 et son récepteur sont exprimés à la fois par les cellules déciduales et par les cytotrophoblastes et il a été montré que l'IL-1 stimule l'activité de la MMP-9, activant ainsi l'invasion trophoblastique (Meisser et coll, 1999a). De même, l'IL-6 active la MMP-2 et la MMP-9 (Meisser et coll, 1999b). L'IL-15 stimule l'invasion trophoblastique de la lignée JEG3 sans moduler les MMP-2 et 9 mais en augmentant la MMP-1 (Zygmunt et coll, 1998). Cependant, l'IL-10 a un effet inhibiteur sur l'invasion trophoblastique via la diminution de la sécrétion de MMP-9 (Roth et Fisher, 1999).

#### 5-b-iv) Les hormones

La progestérone a été mise en évidence comme modulateur de l'invasion, ayant un effet opposé suivant le terme des cytotrophoblastes observés (Shimonovitz et coll, 1998). En effet, si la progestérone inhibe l'activité gélatinase et donc l'invasion dans des cytotrophoblastes au début du premier trimestre (6 SA), elle active l'expression de la MMP-2 et donc l'invasion dans des cytotrophoblastes plus tardifs (12 SA) (Goldman et Shalev, 2006). Ces effets inverses pourraient être expliqués par le profil d'expression du récepteur de la progestérone qui varie au cours de la grossesse. Dans les trophoblastes précoces c'est l'expression du PGRB (*Progesterone Receptor B*) qui prédomine alors qu'après 9 semaines de gestation c'est le PGRA. La transfection de cellules trophoblastiques précoces par un ADN<sub>c</sub> codant pour le PGRA induit une activité gélatinase semblable à celle des cellules trophoblastiques tardives. La surexpression de PGRB dans des cellules de carcinome endométrial inhibe leur pouvoir invasif et l'expression des MMPs. Ainsi, ces récepteurs induisent des signalisations différentes modulant des gènes cibles différents qui dans un cas (PGRA) favorisent l'expression de gènes impliqués dans l'invasion et dans l'autre cas (PGRB) favorisent l'expression de gènes cibles inhibant l'invasion. Ces résultats supportent l'hypothèse que les effets opposés de la progestérone sur l'invasion trophoblastique en fonction du terme seraient dus à une expression différente des isoformes du PGR au cours du premier trimestre (Goldman et Shalev, 2006).



La leptine stimule l'invasion trophoblastique en augmentant la sécrétion de la MMP-2 et l'activité de la MMP-9 de cytotrophoblastes isolés à partir de placenta du premier trimestre (Castellucci et coll, 2000).

L'adiponectine a également un effet pro-invasif. Elle n'est pas produite pas le cytotrophoblaste extravilleux qui par contre exprime ses récepteurs. Elle a plusieurs origines à l'interface fœto-maternelle. Elle peut provenir de sécrétion de l'endomètre (Takemura et coll, 2006) ou des tissus fœtaux (Corbetta et coll, 2005) mais aussi être apportée par le sang maternel qui se déverse dans la chambre intervillieuse. L'adiponectine stimule l'invasion modifiant la balance MMP/TIMP. En effet, il a été mis en évidence dans la lignée HTR-8/SV-neo, dans des cultures primaires sur matrigel de cytotrophoblastes extravilleux et dans des cultures d'explants sur collagène-I, que l'adiponectine augmente la sécrétion et l'activité des MMP-2 et MMP-9 alors qu'elle diminue l'expression de TIMP2 (Benaitreau et coll, 2010).

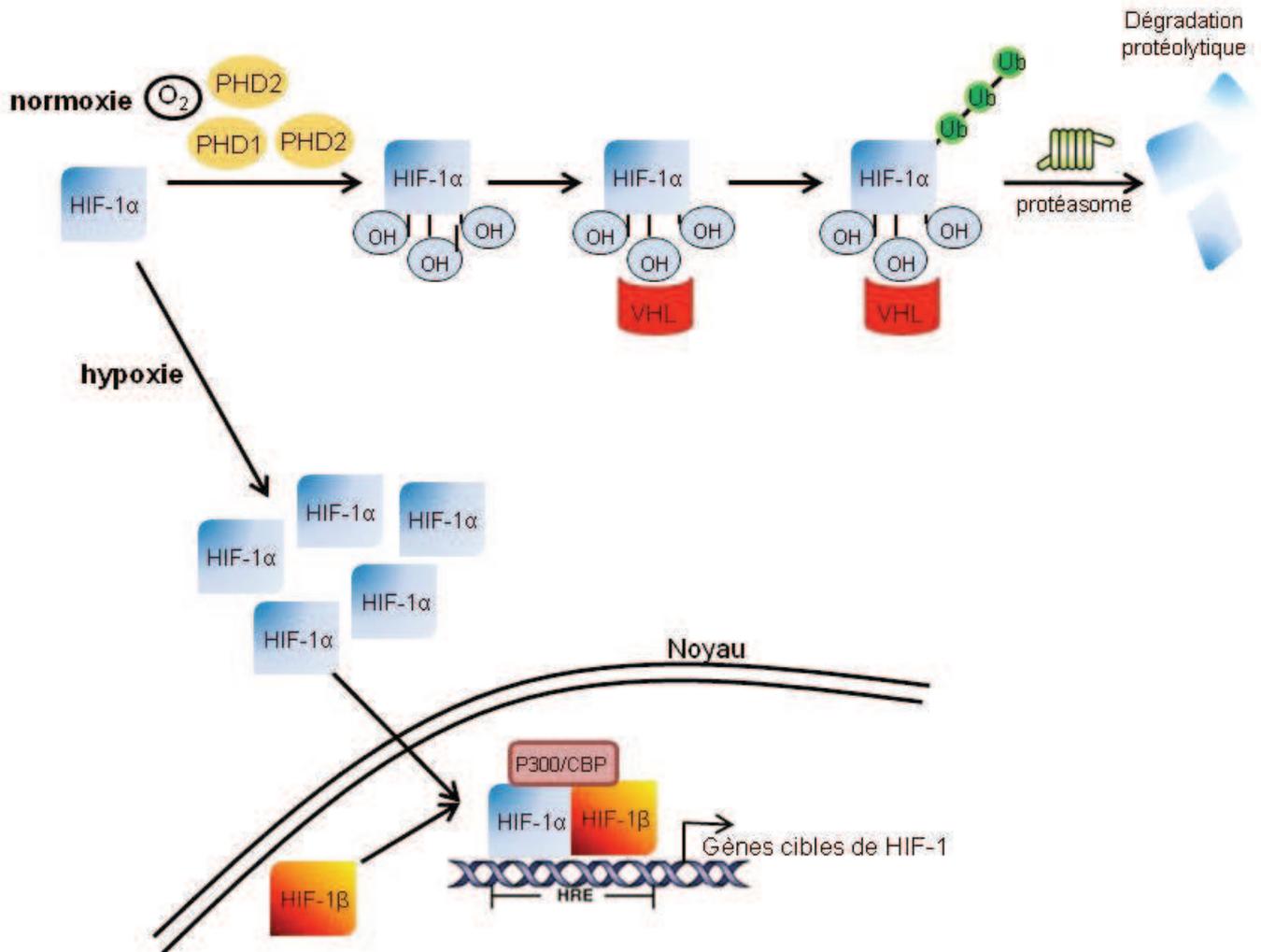
L'hCG joue également un rôle dans la régulation de l'invasion trophoblastique. Des études *in vivo* montrent que l'hCG active la MMP-9 (Licht et coll, 2001). *In vitro*, l'hCG recombinante (Sigma) est capable de stimuler la migration de la lignée de cytotrophoblastes extravilleux HTR8/SV neo probablement en augmentant la liaison de l'IGF-II au récepteur IGF II/mannose-6-phosphate (Zygmunt et coll, 2005). De même, l'hCG d'origine urinaire (Sigma) active l'invasion du choriocarcinome JEG-3 (Zygmunt et coll, 1998). Cependant, ces travaux ont été remis en cause car de l'EGF, un facteur stimulant l'invasion trophoblastique (Burton et coll, 2007), a été mis en évidence dans les préparations commerciales d'hCG d'origine urinaire (Yarram et coll, 2004). Récemment, Handschuh et coll (2007), ont montré que l'hCG sécrété *in vitro* par les cytotrophoblastes extravilleux invasifs stimulait l'invasion trophoblastique contrairement à l'hCG sécrétée par le syncytiotrophoblaste. Pour cela, ils ont testé la capacité des surnageants de CTEV et de ST à stimuler l'invasion trophoblastique en utilisant le modèle de la lignée HIPEC, cytotrophoblastes extravilleux invasifs immortalisés (Pavan et coll, 2003). Les CTEV primaires et les HIPEC expriment le récepteur LH/CG, mais à l'inverse des cellules primaires, les HIPEC ne sécrètent pas d'hCG et constituent ainsi un modèle privilégié pour étudier les effets d'une hCG exogène. Ils montrent dans ce modèle que les surnageants de CTEV, contenant 1 nmole/L d'hCG, sont capables d'induire l'invasion des HIPEC alors que les surnageants de ST, contenant la même quantité d'hCG, n'ont pas d'effet. De plus, l'immunodéplétion de l'hCG dans les surnageants de CTEV abolit presque totalement l'effet stimulant sur l'invasion. Afin d'expliquer cette différence entre les surnageants de CTEV et les surnageants de ST, ils ont recherché dans les milieux de culture une forme particulière



d'hCG hyperglycosylée produite par les choriocarcinomes, l'hCG-H. Ils ont trouvé des taux importants d'hCG-H uniquement dans les surnageants de CTEV, suggérant ainsi qu'elle serait responsable de la stimulation de l'invasion trophoblastique, par des mécanismes indépendants du récepteur LH/CG puisque l'hCG d'origine syncytiale n'a pas d'effet (Handschuh et coll, 2007 ; Guibourdenche et coll, 2010) (Cf. Figure 14).

#### 5-b-v) Rôle de l'oxygène

En raison de la présence de bouchons trophoblastiques dans les artères spiralées utérines, la pression d'oxygène dans l'espace intervilloux au premier trimestre de la grossesse est d'environ 20 mm Hg alors qu'au niveau de la décidue elle avoisine 60 mm Hg. De telles conditions favorisent le développement embryonnaire et minimise la production de radicaux libres dérivés de l'oxygène hautement tératogènes. Cet environnement favorise aussi le développement placentaire par la stimulation de l'angiogenèse et la prolifération des cytotrophoblastes. La disparition progressive des bouchons trophoblastiques augmente significativement les pressions intraplacentaires d'oxygène. Des pressions d'oxygène de 60 mm Hg sont ainsi observées au deuxième trimestre de la grossesse. Elles diminuent ensuite à 40 mm Hg en fin de grossesse en raison de la forte consommation fœto-placentaire (Burton et Jauniaux, 2001). Un défaut d'adaptation du trophoblaste à cette augmentation de la concentration en oxygène est à l'origine d'un stress oxydatif délétère pour le développement fœto-placentaire (Burton, 2009). Expérimentalement il a été montré que si des cytotrophoblastes isolés au premier trimestre de la grossesse sont cultivés en condition d'hypoxie (2% d'oxygène) ils restent prolifératifs, n'expriment pas l'intégrine  $\alpha 1\beta 1$ , marqueur de l'acquisition du phénotype invasif, et ne sont plus capables d'envahir une membrane poreuse dans le modèle de la chambre de Boyden (Genbacev et coll, 1996 ; Genbacev et coll, 1997). Il a été montré que l'hypoxie induit l'expression de l'éphrine B2 dans les cytotrophoblastes invasifs. Cette molécule et son récepteur (EphB4), également présent dans le placenta, sont importants dans l'établissement du réseau vasculaire embryonnaire. Leur distribution dans le placenta indiquerait qu'elles aient également un rôle dans le remodelage vasculaire placentaire et dans l'ancrage des villosités choriales (Chennakesava et coll, 2006).



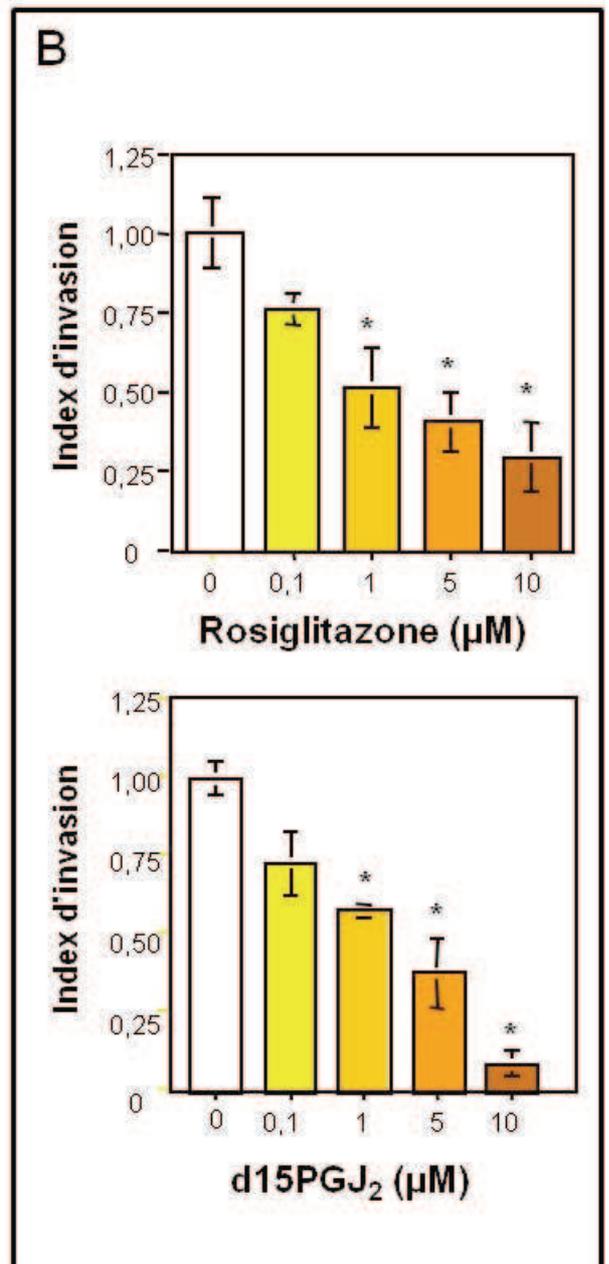
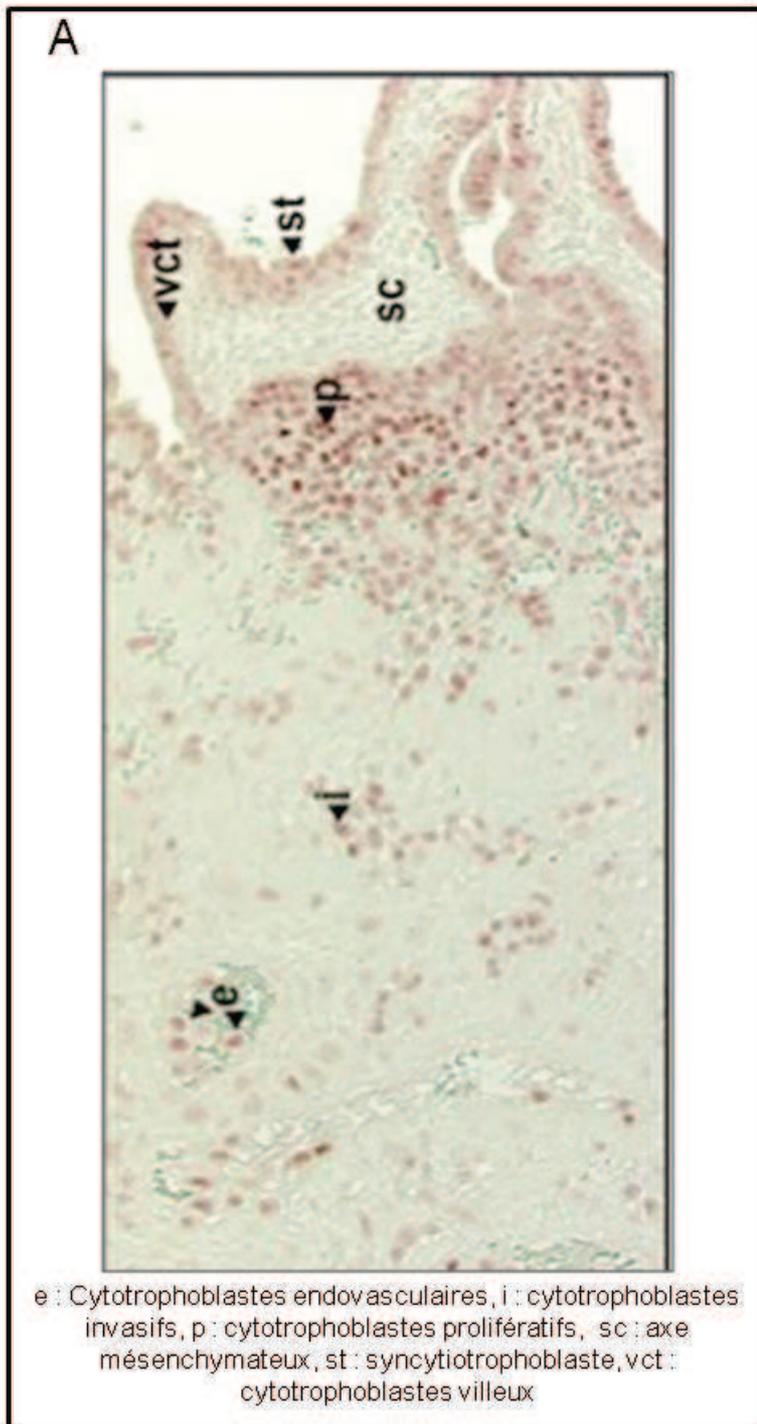
**Figure 15: Régulation du facteur HIF-1.**

*HIF-1* : hypoxia inducible factor 1 ; *PHD* : propyl-hydroxylase ; *VHL* : Vn Hippel Lindau ; *HRE* : Hypoxia Responsive Element ; *ub* : ubiquitine ; *p300/CBP* : co-activateur

L'hypoxie module l'activité du facteur HIF-1 (*Hypoxia inducible factor*). HIF-1 est composé de deux sous-unités :

- HIF-1 $\beta$ , sous-unité nucléaire constitutivement exprimée et ubiquitaire, aussi appelée ANRT (*aryl hydrocarbon nuclear receptor translocator*).
- HIF-1 $\alpha$ , sous-unité inductible.

HIF-1 $\alpha$  est régulé par la tension en oxygène. Il possède un domaine de dégradation dépendant de l'oxygène permettant sa protéolyse en normoxie. HIF-1 $\alpha$  est hydroxylé par 3 propyl hydroxylases dont l'activité est dépendante de l'oxygène (PHD1 à 3). Il est alors reconnu par la protéine suppresseur de tumeur VHL (*Von Hippel Lindau*) qui est un composant du complexe ubiquitine ligase E3. Cette reconnaissance va entraîner l'ubiquitination de HIF-1 $\alpha$  et son adressage au protéasome (Ivan et coll, 2001). En hypoxie, les hydroxylases ne sont pas actives, HIF-1 $\alpha$  n'est donc pas dégradé et s'accumule. Il peut alors être transloqué dans le noyau où il dimérise avec HIF-1 $\beta$  pour former le facteur HIF-1 actif. Le dimère ainsi formé peut se lier à des séquences régulatrices (*Hypoxia Responsive Element, HRE*) dans les promoteurs de gènes cibles (Cf. Figure 15). Par exemple, HIF-1 diminue l'expression membranaire de l'intégrine  $\alpha\beta3$  (Cowden Dahl et coll, 2005). L'hypoxie entraîne donc une cascade de régulations géniques qui a pour effet l'inhibition de l'invasion trophoblastique. Ainsi, très probablement, l'oxygénation de l'espace intervilleux favorise la différenciation du trophoblaste vers la voie invasive.



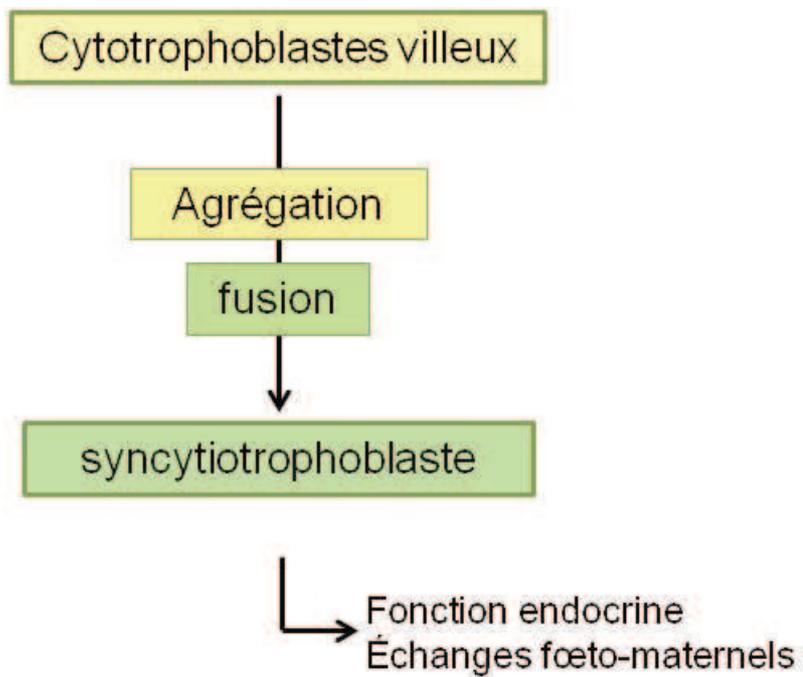
**Figure 16 : PPAR<sub>γ</sub> et l'invasion trophoblastique.** D'après Fournier et coll, 2006

A. PPAR<sub>γ</sub> est exprimé exclusivement dans les cytotrophoblastes.

B. L'activation de PPAR<sub>γ</sub> par son agoniste naturel (d15PGJ<sub>2</sub>) ou un agoniste synthétique (rosiglitazone) inhibe l'invasion trophoblastique de manière dose dépendante.

#### 5-b-vi) Le rôle de PPAR $\gamma$ dans l'invasion trophoblastique

Le rôle de PPAR $\gamma$  dans le placenta humain sera plus amplement détaillé dans le chapitre traitant des facteurs impliqués dans la différenciation des cytotrophoblastes. Cependant, on peut déjà retenir que PPAR $\gamma$  est exprimé dans les cytotrophoblastes extravilleux à tous les stades de différenciation : prolifératifs, invasifs, endovasculaires et dans les cellules géantes (Fournier et coll, 2007 ; Tarrade et coll, 2001c). Ses agonistes synthétiques (rosiglitazone) et naturels (15-Deoxy-Delta-12,14-prostaglandine J<sub>2</sub> ou 15-dPGJ<sub>2</sub>) inhibent l'invasion des cytotrophoblastes extravilleux primaires comme immortalisés (HIPEC) dans le modèle de la chambre de Boyden (Pavan et coll, 2003 ; Tarrade et coll, 2001c) (Cf. Figure 16). Ces résultats ont été confirmés lors de l'utilisation de dérivés lipidiques oxydés (LDL (*Low density lipoprotein*) oxydées, HETE (*8(S) hydroxy eicosa tetraenoic acid*), HODE (*Hydroxy octa decadienoic acid*)) en tant qu'agonistes du PPAR $\gamma$  (Pavan et coll, 2004 ; Fournier et coll, 2008). Il est important de noter que ces différents agonistes n'ont pas d'effet sur la prolifération cellulaire.



**Figure 17 : La voie de différenciation du cytotrophoblaste villosus.**

## D. Les cytotrophoblastes vilieux

(Cf. Figure 17)

Dans sa structure définitive, la villosité chorale est constituée d'un axe mésenchymateux, contenant les vaisseaux fœtaux, recouvert d'une couche interne de cellules épithéliales mononucléées, les cytotrophoblastes vilieux, reposant sur une lame basale. Ces cytotrophoblastes fusionnent et génèrent le syncytiotrophoblaste qui constitue la couche cellulaire externe de la villosité (Cf. Figure 17). Ce syncytiotrophoblaste se caractérise à sa surface apicale par une membrane microvillositaire qui favorise sa fonction d'échange. En effet, le syncytiotrophoblaste est en contact direct avec le sang maternel dès la fin du premier trimestre de grossesse et constitue la première couche placentaire séparant la circulation maternelle de la circulation fœtale. Il remplit des fonctions métaboliques, sécrétrices, endocrines, d'échange et d'hémostase. Le fonctionnement optimal du trophoblaste à tous les stades de la gestation est tout à fait vital pour une grossesse menée à terme.

### 1) Différenciation morphologique

Le cytotrophoblaste vilieux est organisé en monocouche de cellules épithéliales prolifératives recouvrant la villosité chorale. Les cellules filles quittent le cycle cellulaire et se différencient. Ces cellules différenciées accumulent de grandes quantités d'ARN messagers (ARN<sub>m</sub>), de protéines et d'organelles cellulaires et s'agrègent les unes aux autres. Enfin elles fusionnent pour donner naissance au syncytiotrophoblaste. Le syncytiotrophoblaste se forme et se régénère donc tout au long de la grossesse par fusion des cellules cytotrophoblastiques sous-jacentes. Il se définit comme une large masse cytoplasmique au centre de laquelle sont regroupés tous les noyaux. Il représente le stade de différenciation terminal du cytotrophoblaste vilieux. Il a été montré de nombreuses fois que les noyaux contenus dans le syncytiotrophoblaste ne se répliquent pas (Toki et coll, 1999, Kar et coll, 2007). La fusion des cytotrophoblastes vilieux différenciés permet l'apport de nouveaux noyaux, organelles, cytoplasme et ARN<sub>m</sub> au syncytiotrophoblaste. Les noyaux des cytotrophoblastes vilieux et du syncytiotrophoblaste présentent des morphologies très différentes. Les cytotrophoblastes



villeux ont généralement des noyaux ronds avec une structure chromatinienne diffuse et un nucléole distinct. Dans le syncytiotrophoblaste, on observe par contre toute une gamme de morphologie nucléaire. La plupart présente un plus petit volume, une enveloppe nucléaire plus irrégulière et contiennent un plus fort taux de chromatine condensée que les noyaux des cytotrophoblastes. Au début de la grossesse environ 50% des noyaux du syncytiotrophoblaste présentent un nucléole, mais plus la gestation avance plus cette proportion diminue (Martin et Spicer, 1973). De même, plus tard dans la grossesse, les noyaux des syncytiotrophoblastes s'aggrègent. C'est anormal si cela a lieu avant 20 SA dans une grossesse saine et leur incidence augmente avec le terme. Ces agrégats présentent une collection de noyaux avec une chromatine très condensée. Ces derniers vont former des « *knots* » qui seront éliminés loin des zones d'échanges. Les noyaux des cytotrophoblastes villeux subissent aussi un processus de différenciation avant leur fusion en syncytiotrophoblaste. Les noyaux présentent une forme de plus en plus irrégulière avec progressivement plus de zone de chromatine condensée par rapport aux cytotrophoblastes indifférenciés (Mayhew et coll, 1999). Les noyaux des cytotrophoblastes villeux qui vont fusionner sont hétérochromatiques et présentent toujours un nucléole. Ces apparences suggèrent qu'ils sont toujours transcriptionnellement actifs au moment de leur incorporation au syncytiotrophoblaste.

L'état transcriptionnel du syncytiotrophoblaste est toujours sujet à controverse à ce jour. Certains auteurs ont montré *in vitro* sur des cultures d'explants que l'incorporation d'uridine tritiée était fortement diminuée dans les noyaux des syncytiotrophoblastes contrairement aux noyaux des cytotrophoblastes villeux correspondants (Huppertz et coll, 1999). Plus récemment, ces auteurs ont montré que la différenciation des cytotrophoblastes villeux et leur fusion déclenche l'activation de la cascade apoptotique, ce qui amène également à la conclusion que le syncytiotrophoblaste est transcriptionnellement inactif (Gauster et coll, 2010 ; Huppertz et coll, 2006). L'équipe de Burton met en cause ces résultats car ils ont été obtenus sur des cultures d'explants réalisées sous 95% d'air, dont 20% d'O<sub>2</sub>, et 5% de dioxyde de carbone. Ces conditions sont hyperoxiques comparées aux conditions *in vivo* et pourraient causer la mort des syncytiotrophoblastes (Jauniaux et coll, 2000). L'équipe de Burton a donc mené de nouvelles investigations et mis en évidence par immunohistochimie et immunofluorescence qu'une partie des noyaux des syncytiotrophoblastes étaient positifs pour la forme active de la polymérase RNAPol II (Ellery et coll, 2009). Son activité a été confirmée par l'incorporation de fluoro-uracil *in vitro* sur des cultures d'explants de courte durée à 2,5% O<sub>2</sub> / 92,5% N<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>. Il a été observé la



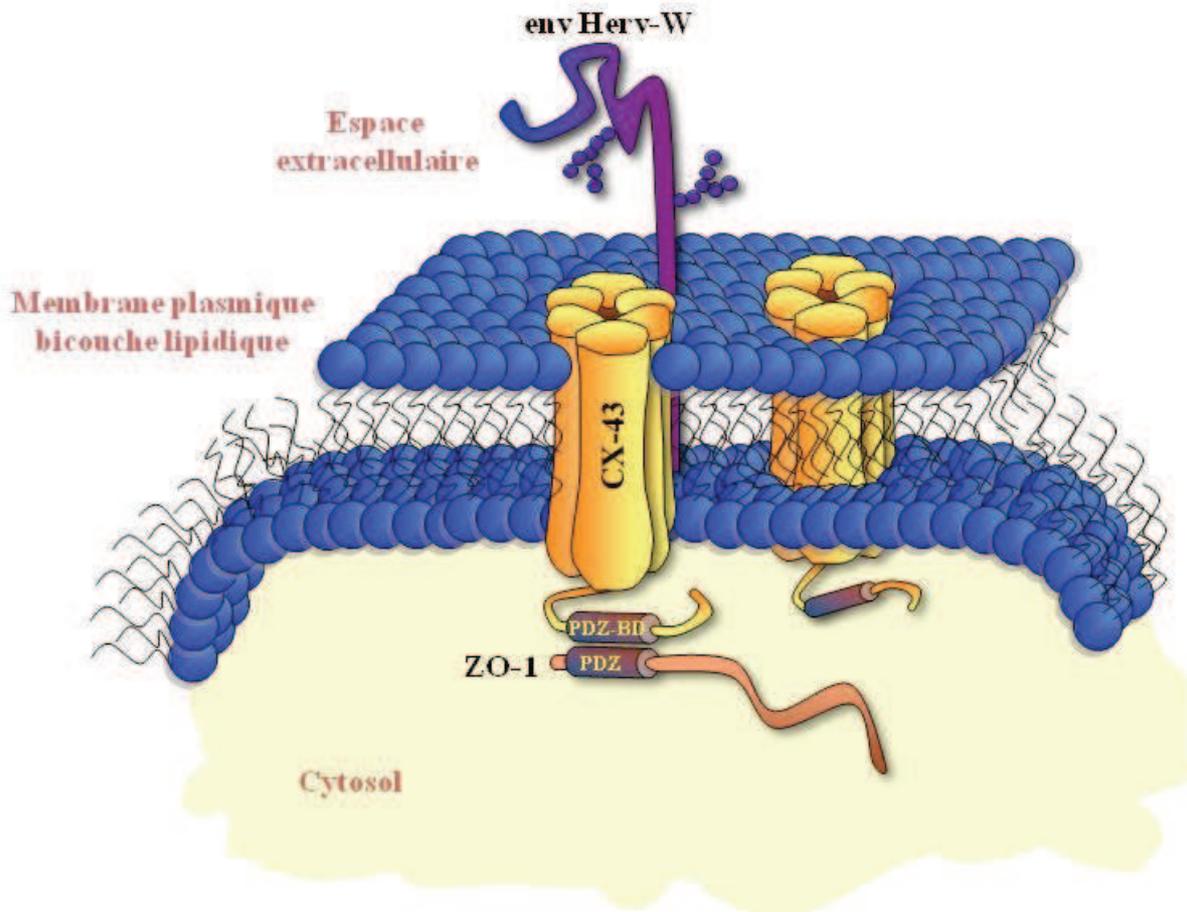
présence de modifications d'histones associée à l'expression active de gène. Très récemment cette équipe a également mis en évidence *in situ* la présence de CREB (*cAMP Response Element-Binding*) phosphorylé (Ser-133 pCREB), protéine stimulant l'activité de la RNAPol II via un domaine constitutivement actif quand elle est non phosphorylée et via un domaine inductible lorsqu'elle est phosphorylée augmentant d'autant plus l'activité de cette enzyme. Les auteurs ont aussi montré qu'un facteur nucléolaire nécessaire à l'activité de la RNAPol I, UBF (*Upstream Binding Factor*), était présent *in situ* sous sa forme phosphorylée. Or c'est sous cette forme qu'il se lie avec la RNAPol I et permet la transcription des ARN<sub>m</sub> ribosomiques et donc l'obtention de ribosomes fonctionnels (Fogarty et coll, 2011). Les auteurs montrent donc que les noyaux des syncytiotrophoblastes seraient transcriptionnellement actifs avec cependant 20 à 40% de noyaux inactifs.

Les produits syncytiaux sont majoritairement sécrétés dans la chambre intervillieuse donc dans la circulation maternelle. Après une activité sécrétoire intense, le syncytiotrophoblaste entre en apoptose. Les noyaux se regroupent et migrent vers la membrane apicale où ils se détachent sous la forme de corps apoptotiques qui se retrouvent libérés dans la chambre intervillieuse. Ces débris syncytiaux sont captés par le premier système capillaire situé derrière l'utérus, les capillaires pulmonaires (Ikle, 1964).

Le processus de fusion entraîne un profond remaniement du cytosquelette et de la membrane cytoplasmique, ainsi que des protéines d'adhérence et de communication cellulaire. La membrane apicale du syncytiotrophoblaste comporte de nombreuses microvillosités dirigées vers la chambre intervillieuse contenant le sang maternel. Le syncytiotrophoblaste constitue alors une zone privilégiée d'échanges entre le sang maternel et le sang fœtal qui ne se mélangent jamais car ils sont séparés par l'endothélium des capillaires fœtaux, par le mésenchyme embryonnaire et par la couche trophoblastique.

## 2) Le processus de fusion

Le syncytiotrophoblaste a besoin d'être maintenu tout au long de la grossesse par une incorporation continue des cytotrophoblastes villosités sous jacents dans la couche syncytiale. Avant que deux cellules puissent fusionner, plusieurs étapes sont nécessaires. Premièrement les cellules doivent quitter le cycle cellulaire et exprimer les gènes et les protéines impliqués dans le processus de fusion. Deuxièmement, elles doivent reconnaître et interagir avec leur



**Figure 18 : Schéma représentant un agencement possible des différentes protéines impliquées dans la fusion cellulaire des cytotrophoblastes villosus humains. D'après le Master 2 de M. Grinberg, dirigé par J.L. Frenco**

Connexine 43, env Herv-W = syncytine 1, ZO-1 : Zona occludens-1 protein, PDZ : Post synaptic density protein – Drosophila disc large tumor suppressor – Zona occludens-1 protein ; PDZ-BD : domaine de liaison à PDZ.

partenaire de fusion. Troisièmement, les cellules doivent communiquer entre elles et permettre les échanges de signaux, alors seulement elles pourront fusionner.

Plusieurs protéines ont été directement impliquées dans le mécanisme de fusion des cytotrophoblastes villosités en syncytiotrophoblaste. De plus, il est devenu clair que la coordination et le bon contrôle de la fusion trophoblastique étaient cruciaux pour préserver une grossesse saine.

#### 2-a) les protéines de la fusion trophoblastique.

La fusion nécessite la présence de jonctions communicantes comme la connexine 43 (Cx43). En effet, il a été montré en utilisant la méthode du gap-FRAP (*Fluorescence recovery after photobleaching*, technique pour étudier la fonctionnalité des jonctions communicantes ou « *gap-junctions* ») que la présence et la fonctionnalité des jonctions communicantes étaient requises pour la communication inter-trophoblastique. Il a été mis en évidence que la Cx43 était exprimée dans le cytotrophoblaste et le syncytiotrophoblaste alors que les Cx26, Cx32, Cx33 et Cx40 ne sont pas détectées (Cronier et coll, 1994 ; Malassine et Cronier, 2005). De plus, le traitement de cytotrophoblastes en culture *in vitro* avec un antisens de la Cx43 entraîne une faible fusion (Frendo et coll, 2003a). D'autres protéines interagissant avec les connexines ont été identifiées : protéines chaperonnes, kinases, phosphatases et des protéines de la signalisation cellulaire. Parmi elles, la Zona occludens-1 (ZO-1) a été montrée comme interagissant avec de multiples connexines. Son rôle dans la fusion trophoblastique a été étudié et il a été mis en évidence *in situ* qu'elle était localisée entre les cytotrophoblastes et entre les cytotrophoblastes et le syncytiotrophoblaste. *In vitro* elle est retrouvée uniquement sur les cytotrophoblastes agrégés où elle colocalise avec la Cx43. Des expériences de coimmunoprécipitation ont confirmé une interaction physique entre les deux protéines. Le traitement des cytotrophoblastes villosités en culture par un siRNA dirigé contre ZO-1, induit une diminution de la fusion mais pas de l'agrégation, démontrant son importance pour la fusion trophoblastique (Pidoux et coll, 2010) (*Cf.* Figure 18).

La fusion s'accompagne d'une diminution de l'expression de protéines membranaires comme la E-cadhérine (Coutifaris et coll, 1991) et la desmoplakine (Douglas et coll, 1990). L'antigène de surface CD98, chaîne lourde de l'hétérodimère du transporteur d'acide aminé, semble nécessaire à la syncytialisation, puisque des expériences d'interférence à l'ARN visant



à éteindre l'expression de cette molécule dans le modèle des cellules BeWo ont montré que la fusion était inhibée ainsi que la sécrétion de l'hCG (Kudo et Boyd, 2004). La stratégie des anticorps neutralisants a permis dans une autre étude de montrer que la phosphatidyl-sérine était indispensable à la fusion cellulaire dans le modèle de la lignée Jar (Adler et coll, 1995). Enfin, deux enzymes ont été impliquées dans le processus de syncytialisation. Une inhibition de la caspase 8 par des antisens mène à une abolition de la fusion, dans un modèle de culture d'explants (Black et coll, 2004) et l'ADAM12 (*A Disintegrin And Metalloproteinase domain 12*), exprimée dans le cytotrophoblaste villos, jouerait un rôle sur la fusion via son activité protéolytique (Huppertz et coll, 2006).

Environ 8% du génome humain est d'origine rétroviral mais la plupart de ces régions ne sont pas traduites. Cependant, on peut retrouver certains de ses éléments traduits dans le placenta humain, en particulier les gènes codant pour l'enveloppe ERV-3, HERV-W et HERV-FRD (Rote et coll, 2004). Ces protéines ont été impliquées dans le processus de fusion, en particulier HERV-W, renommée syncytine-1 (Mi et coll, 2000) et HERV-FRD, renommée syncytine-2 (Blaise et coll, 2003). En effet, l'utilisation d'un oligonucléotide antisens dirigé contre la syncytine-1 dans des cultures primaires de cytotrophoblastes villos, entraîne une diminution de la fusion de ces cellules (Frendo et coll, 2003b). Le rôle de la syncytine-2 dans les trophoblastes villos n'est pas encore clairement établi. Cependant, il a été montré que sa surexpression dans différentes lignées cellulaires entraînait une forte augmentation de leur fusion (Blaise et coll, 2003). De même, assez peu de choses sont connues sur les récepteurs des syncytines et leur localisation. Le récepteur de la syncytine-1 est le RDR (*D mammalian retrovirus receptor*) et il est décrit comme un transporteur d'acides aminés neutres. Le récepteur de la syncytine-2 a été mis en évidence comme étant MFSD2A (*Major facilitator superfamily domain containing 2A*) (Esnault et coll, 2008). Il est intéressant de noter que le récepteur de la syncytine-1 semble être exprimé ubiquitairement dans les tissus différenciés (Cariappa et coll, 2003) alors que celui de la syncytine-2 est très fortement exprimé dans le placenta, et plus particulièrement dans la couche syncytiale (Esnault et coll, 2008).



## 2-b) La régulation de la fusion trophoblastique.

La régulation de la fusion des cytotrophoblastes vilieux a majoritairement été étudiée *in vitro* sur des cytotrophoblastes vilieux issus de placenta à terme ou dans la lignée cellulaire dérivée d'un choriocarcinome, les cellules BeWo. Elle serait modulée par les cytokines, les facteurs de croissances, les hormones et les protéines kinases dérivant aussi bien de l'environnement maternel que fœtal.

L'EGF induit la syncytialisation des cytotrophoblastes vilieux isolés en culture primaire, entraînant une augmentation de la sécrétion d'hCG et d'hPL (Morrish et coll, 1987). Des résultats similaires ont été décrits après le traitement de cytotrophoblastes vilieux en culture par le CSF (*colony stimulating factor*), le GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*) (Garcia-Lloret et coll, 1994), ainsi que par le LIF et le TGF $\alpha$  (Yang et coll, 2003). De ces expériences il est également apparu que l'hCG produite par le syncytiotrophoblaste pouvait agir de manière autocrine et stimuler la formation du syncytiotrophoblaste (Yang et coll, 2003). Il avait été montré précédemment que l'hCG était impliquée dans la fusion en augmentant la communication jonctionnelle et l'expression de la connexine 43 (Cronier et coll, 2001). De même, les stéroïdes tels que l'œstradiol favorisent la fusion (Cronier et coll, 1999a). Par rapport aux cellules témoins, le traitement par le VEGF *in vitro* augmente le nombre et la taille des syncytia formés (Crocker et coll, 2001).

Peu de facteurs inhibiteurs sont à ce jour décrits. Le TNF $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor*) réprime la sécrétion d'hCG *in vitro* et ainsi altère la formation de syncytia (Leisser et coll, 2006). Le TGF $\beta$  a également été mis en évidence comme inhibiteur de la formation de syncytium et de la sécrétion d'hCG et d'hPL (Morrish et coll, 1991). La fusion peut aussi être retardée par l'endothéline (neuropeptide sécrété par l'endothélium connu pour ses effets vasoconstricteurs, mitogènes et pro-angiogéniques) (Cronier et coll, 1999b) et l'hypoxie (Alsat et coll, 1996).

Des protéines kinases ont aussi été mises en évidence dans la régulation de la fusion des cytotrophoblastes. En effet, l'inhibition de l'activité d'ERK 1/2 (*Extracellular signal-regulated kinase 1/2*) et/ou de p38 diminue la différenciation des cytotrophoblastes vilieux et la formation de syncytiotrophoblastes *in vitro* (Daoud et coll, 2005). La PKA semble aussi impliquée dans la régulation du processus de fusion puisque la fusion des trophoblastes vilieux est diminuée *in vitro* par l'ajout d'inhibiteurs de la protéine kinase A (PKA) (Cronier et



coll, 1997 ; Keryer et coll 1998) et que la surexpression de sa sous-unité catalytique dans le modèle des BeWo, augmente la fusion (Knerr et coll, 2005). L'inhibition de la protéine kinase C (PKC) entraîne également une baisse de la fusion des trophoblastes villosités *in vitro* (Cronier et coll, 1997). Enfin, la fusion est modulée par l'adénosine mono-phosphate cyclique (AMP<sub>c</sub>). L'ajout d'un analogue de l'AMP<sub>c</sub>, *in vitro*, stimule la formation de syncytium alors que l'ajout d'un antagoniste de l'AMP<sub>c</sub> stoppe la fusion (Cronier et coll, 1997 ; Keryer et coll, 1998).

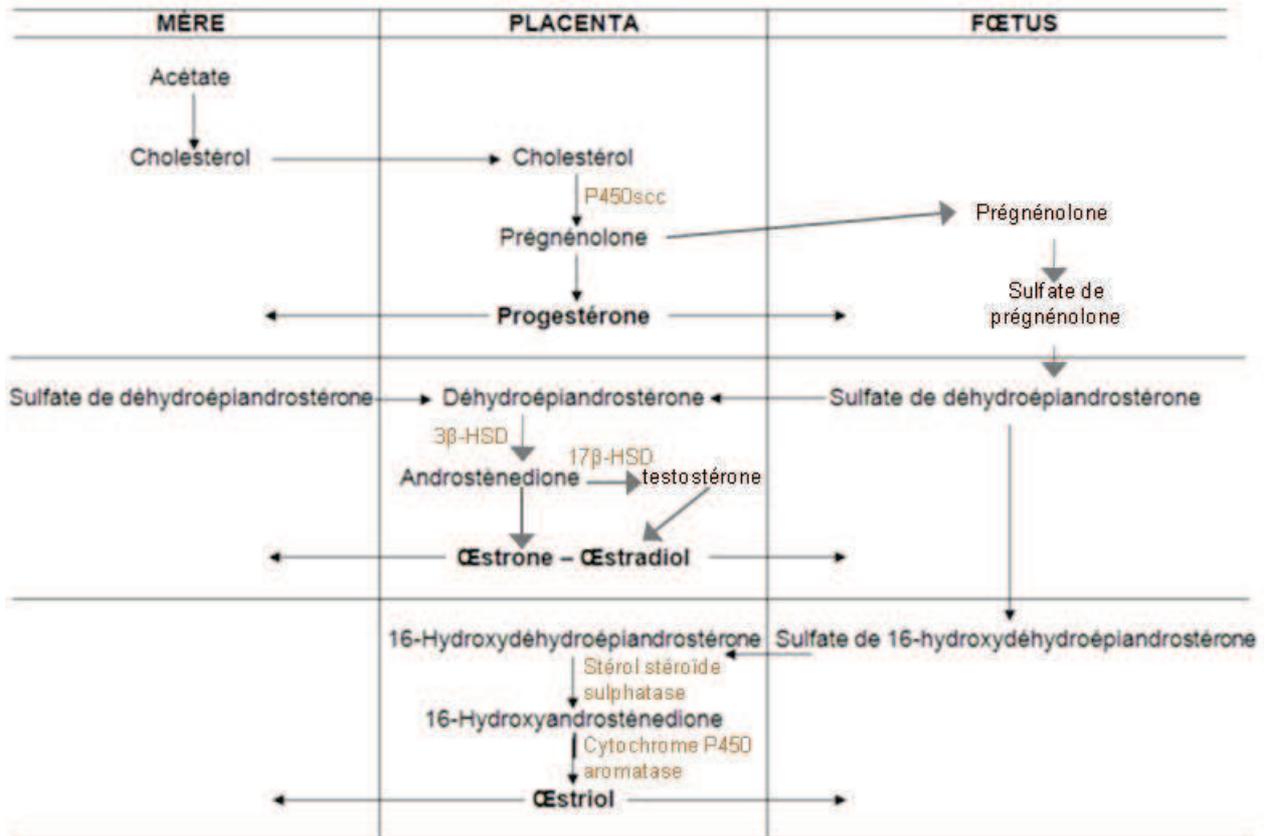
### 3) Fonction endocrine

Le syncytiotrophoblaste remplit de multiples fonctions dont les plus capitales sont la fonction d'échange et la fonction endocrine. En effet, le syncytiotrophoblaste est responsable d'une production intense et variée d'hormones stéroïdes et polypeptidiques, qu'il sécrète à 99 % dans la circulation maternelle du fait de sa polarisation (Linnemann et coll, 2000).

#### 3-a) Les hormones stéroïdes

Dès la 8<sup>ème</sup> semaine de grossesse, le placenta produit de la progestérone et des œstrogènes tels que l'œstriol, l'œstradiol et l'œstrone. Ces hormones sont synthétisées à partir du cholestérol véhiculé par les lipoprotéines du plasma maternel. Le placenta produit entre 250 et 600 mg de progestérone par jour. Ces stéroïdes agissent essentiellement au niveau du muscle utérin où la progestérone possède une action myorelaxante indispensable au bon déroulement de la grossesse (Lye et Porter, 1978).

Contrairement aux autres organes stéroïdogènes, le placenta humain n'exprime pas l'enzyme 17 $\beta$ -hydroxylase-17:20 lyase qui convertit la progestérone et la prégnénolone en androgènes, eux-mêmes substrats pour la synthèse des œstrogènes. Le placenta agit donc en complète coopération avec le fœtus pour cette synthèse. La prégnénolone part du côté fœtal où elle sera transformée en sulfate de prégnénolone. Les surrénales fœtales utiliseront ce sulfate de prégnénolone pour produire le sulfate de déhydroépiandrostérone ou S-DHEA, précurseur des androgènes.



**Figure 19 : Schéma de la synthèse des hormones stéroïdes par le placenta.**

P450<sub>scc</sub> : cytochrome P450 side chain cleavage, 3β-HSD: 3β-Hydroxystéroïde déshydrogénase, 17β-HSD: 17β-Hydroxystéroïde déshydrogénase

Le S-DHEA sera métabolisé par le foie fœtal en sulfate de 16 $\alpha$ -hydroxydéhydroépiandrostérone (16 $\alpha$  OH DHEAS). Cette molécule pénètre alors dans le syncytiotrophoblaste par diffusion où elle sera hydrolysée par une stérol stéroïde sulfatase placentaire puis aromatisée en œstrogènes par le cytochrome P450 aromatasé du syncytiotrophoblaste (Cf. Figure 19). Le S-DHEA peut également diffuser dans le syncytiotrophoblaste pour être transformé en androsténone par l'enzyme 3 $\beta$ -hydroxystéroïde-déshydrogénase (3 $\beta$ -HSD), puis en testostérone par la 17 $\beta$ -HSD. Les androgènes obtenus peuvent aussi être aromatisés en œstrogènes. Les œstrogènes régulent la voie de synthèse de la progestérone en contrôlant le taux d'ARN<sub>m</sub> des récepteurs des LDL, de la P450<sub>scc</sub> (*cytochrome P450 side chain cleavage*) et de la 3 $\beta$ -HSD via leurs récepteurs nucléaires présents dans le syncytiotrophoblaste. Ce dernier est aussi impliqué dans le métabolisme et le transport des glucocorticoïdes. La cortisone est métabolisée en cortisol au début de la gestation, tandis qu'à terme, le cortisol est oxydé en cortisone. L'enzyme syncytiale qui catalyse cette réaction, la 11 $\beta$ -HSD, est sous le contrôle des œstrogènes.

### 3-b) Les hormones polypeptidiques

Le syncytiotrophoblaste sécrète de nombreuses hormones polypeptidiques. Ce sont essentiellement l'hCG, l'hPL et en quantité moindre la pGH et la leptine.

#### 3-b-i) l'hormone chorionique gonadotrope humaine ou hCG

L'hCG est le premier message trophoblastique émis dans le sang pour prévenir l'organisme maternel de la grossesse. Elle est détectable dès le deuxième jour qui suit l'implantation. Elle a un rôle capital pour la grossesse en permettant le maintien du corps jaune et pour le développement précoce du placenta. Toute altération de sa production aura des conséquences sur le déroulement de la grossesse. Elle est sécrétée dans le sang maternel tout le long de la grossesse et atteint un pic de sécrétion à 10-12 semaines d'aménorrhée. C'est une hormone complexe, hautement glycosylée, formée de deux sous-unités : la sous-unité alpha commune avec la LH (*Luteinizing hormone*), FSH (*Follicle-stimulating hormone*) et la TSH (*Tyroid-stimulating hormone*) et la sous-unité beta, spécifique à chaque hormone, codée par un « cluster » de gènes regroupé en type I (gène  $\beta 7$ ) et type II (gènes  $\beta 3$ , 5 et 8). Le second chapitre de ce manuscrit lui est consacré.



### 3-b-ii) Hormone lactogène placentaire ou hPL

Le gène de l'hPL fait partie d'un "*cluster*" de gène qui comprend également celui de l'hormone de croissance (GH). L'hPL est une protéine non glycosylée qui présente 98% d'homologie de séquence avec la GH hypophysaire et 67% avec la prolactine. Elle est fortement exprimée par le syncytiotrophoblaste et constitue un bon marqueur de différenciation fonctionnelle de celui-ci (Sakbun et coll, 1990). L'hPL est sécrétée tout au long de la grossesse dans le sang maternel où elle ne cesse d'augmenter. Elle est donc le reflet de la masse syncytiale. Son rôle physiologique reste mal élucidé. Elle participerait principalement à la différenciation de la glande mammaire en induisant la prolifération et la différenciation de ses cellules (Walker et coll, 1991). Elle pourrait également avoir un rôle chez le fœtus comme le suggère la présence de ses récepteurs au niveau du foie fœtal. Cependant, elle n'est pas indispensable à la grossesse humaine comme en témoigne l'évolution normale de la grossesse en cas de délétion génétique (Handwerger et Freemak, 2000).

### 3-b-iii) La GH placentaire (hormone de croissance placentaire)

La pGH est codée par un gène situé dans le même "*cluster*" que celui de l'hPL. La pGH, exprimée spécifiquement dans le trophoblaste, diffère de la protéine hypophysaire par 13 acides aminés (Frankenne et coll, 1990) et est sécrétée par le syncytiotrophoblaste de façon non pulsatile (Frankenne et coll, 1988). Elle vient remplacer progressivement l'hormone de croissance hypophysaire maternelle qui devient indétectable dans la circulation maternelle au cours du deuxième trimestre de grossesse. La pGH, comme l'hPL, a une forte activité somatogénique, par contre son activité lactogénique est faible. La pGH est un régulateur important du métabolisme maternel. La pGH est considérée comme le médiateur majeur de l'insulino-résistance observée pendant la grossesse, via la modulation de l'expression de l'IGF-1 (Alsat et coll, 1998). Il a été montré qu'elle augmente directement l'insulino-résistance chez des souris transgéniques (Barbour et coll, 2004). Ceci suggère donc un rôle métabolique de l'hormone, sécrétée spécifiquement dans la circulation maternelle et non détectée dans la circulation fœtale. En cas de chute de la glycémie maternelle, la GH placentaire sécrétée alors abondamment par le placenta maintiendra un apport énergétique au fœtus. Elle semble aussi avoir un rôle sur la différenciation du cytotrophoblaste puisque Lacroix et coll ont montré qu'elle stimule l'invasion des cytotrophoblastes extravilleux *in vitro* (Lacroix et coll, 2005).



### 3-b-vi) La leptine

La synthèse d'adipokines, produites habituellement par le tissu adipeux, a également été localisée dans le syncytiotrophoblaste. Les taux d'adipokines sont élevés dans la circulation maternelle et chutent post-partum soulignant leur origine placentaire. L'adipokine la plus étudiée dans le placenta est la leptine. Elle est codée par le gène *ob* identifié chez la souris en 1994 (Zhang et coll, 1994). C'est une hormone de 16 kDa, sécrétée de façon pulsatile et selon le rythme circadien. La leptine joue un rôle majeur sur le statut des réserves énergétiques au niveau du système central, via ses récepteurs situés dans l'hypothalamus (Auwerx et Staels, 1998). Chez la femme enceinte, le taux circulant de leptine est augmenté d'un facteur deux à quatre (Masuzaki et coll, 1997), ce taux reste élevé jusqu'à l'accouchement mais il est tout de même 50 fois plus élevé dans les villosités du premier trimestre que dans des villosités à terme (Chardonens et coll, 1999 ; Senaris et coll, 1997). La leptine induit la prolifération des cellules trophoblastiques, stimule la synthèse protéique dont la production d'hormones et de cytokines par les cytotrophoblastes (Perez-Perez et coll, 2010 ; Cameo et coll, 2003 ; Chardonens et coll, 1999) et favorise la survie des cytotrophoblastes (Magarinos et coll, 2007).

#### 4) Adaptation à la pression partielle en oxygène

Vers 11 SA, le délitement des bouchons trophoblastiques permet au sang maternel d'entrer dans l'espace intervillieux ce qui entraîne, comme cela a été décrit précédemment, une forte augmentation de la  $PpO_2$  (20 mmHg à 8 SA puis 60 mmHg à 12 SA). Cette augmentation d' $O_2$  s'accompagne d'une élévation proportionnelle des ROS (*Reactive oxygen species*) au niveau intracellulaire. Or ces molécules, nécessaires car ce sont des seconds messagers dans de nombreuses voies de signalisation, peuvent dégrader les lipides, les protéines ou les acides nucléiques. Le placenta doit donc s'adapter pour se protéger du stress oxydatif créé par les ROS. Ainsi, cette mise en place du flux sanguin maternel dans la chambre intervillieuse est accompagnée par une augmentation de l'expression de la forme inductible d'HSP70 (*heat shock protein 70*), l'apparition de résidus nitrotyrosine sur les protéines et une modification des crêtes mitochondriales dans le syncytiotrophoblaste (Jauniaux et coll, 2003) témoignant d'un stress oxydatif. Il a été observé en parallèle une augmentation marquée des ARN<sub>m</sub> codant pour des enzymes antioxydantes et de leur activité enzymatique, telle que les catalases, les peroxidases à glutathion, les superoxydes dismutases



(SOD) à cuivre et zinc ou à manganèse (Burton, 2009). Le syncytiotrophoblaste est le premier tissu placentaire en contact avec le sang maternel et donc susceptible d'être endommagé par cette arrivée soudaine d'oxygène. Pour la catalase, il a été observé, en plus de l'augmentation de l'expression de son ARN, que l'activité de l'enzyme augmentait de trois fois entre 8 et 19 SA, avec une augmentation particulièrement forte après 12 SA. *In situ* on observe un marquage dans le syncytiotrophoblaste à partir de 13 SA, c'est-à-dire après la réoxygénation de l'espace intervilloux (Watson et coll, 1998), confirmant les résultats obtenus *in vitro*. Pour la SOD Cu/Zn les résultats ont été plus troublants. Malgré l'augmentation du taux d'ARN de la SOD Cu/Zn, la protéine est à peine détectable *in situ* (Watson et coll, 1997). De même, *in vitro*, la formation des syncytia est associée à une chute de l'expression de la protéine SOD Cu/Zn que les cellules proviennent de placentas du premier trimestre ou de placentas à terme.

Cependant, il a été mis en évidence que l'activité de la protéine est identique entre le cytotrophoblaste villositaire et le syncytiotrophoblaste. Ces résultats suggèrent que le cytotrophoblaste exprime majoritairement l'apoenzyme, activable par l'ajout de cuivre *in vitro*, alors que le syncytiotrophoblaste exprime majoritairement la forme active de la SOD Cu/Zn, déjà saturée en cuivre, participant à sa protection contre le stress oxydatif (Frendo et coll, 2000). Il a été observé que les cytotrophoblastes provenant de placenta de trisomie 21 fusionnaient difficilement. Or le gène de la SOD Cu/Zn est situé sur le chromosome 21 et cette protéine est surexprimée dans plusieurs types cellulaires dont les trophoblastes dans le cas de trisomie 21, suggérant un rôle de cette protéine dans la fusion. Cela a été confirmé *in vitro* par la surexpression de la SOD CU/Zn dans des cultures de cytotrophoblastes villositaires à terme. Elle s'est révélée délétère pour la formation du syncytiotrophoblaste. En effet, il a été observé une diminution de la fusion et de la sécrétion d'hCG confirmant le rôle important des signaux médiés par les ROS et donc des ROS eux-même dans le développement placentaire (Frendo et coll, 2001). Ainsi, pour que les trophoblastes et donc le placenta soient fonctionnels, il est nécessaire que l'équilibre entre les facteurs pro et anti-oxydants soit obtenu au moment du délitement des bouchons trophoblastiques puis maintenu pour le reste de la grossesse. Un déséquilibre de cette balance pourra aboutir à différentes pathologies comme la fausse-couche spontanée, la prééclampsie ou le retard de croissance intra-utérin.



## E. Les facteurs qui contrôlent la différenciation trophoblastique

### 1) Les facteurs de transcription

Les facteurs de croissance et les molécules de signalisation représentent le signal auquel répondent les cellules en maintenant ou en modifiant leur état de différenciation. Cependant, ce sont les facteurs de transcription, localisés dans le noyau des cellules, qui déterminent comment ce signal sera interprété et quelle sera la réponse cellulaire en régulant leurs gènes cibles. Les facteurs de transcription sont catégorisés en quelques larges familles comme les facteurs à doigt de zinc, facteurs à motif « *leucine zipper* », « hélice-boucle-hélice », ou « hélice-tour-hélice » et les facteurs de transcription à homeodomaine. Au niveau du placenta, plusieurs facteurs de transcription ont été mis en évidence pour être impliqués dans trois processus importants : maintenance de la prolifération des cytotrophoblastes, différenciation vers un phénotype invasif et vers la syncytialisation (pour revue voir Loregger et coll, 2003).

#### 1-a) Maintien de la prolifération des cytotrophoblastes.

Le facteur basic hélice-boucle-hélice (bHLH) Hash2 est exprimé *in vitro* et *in vivo* dans les cytotrophoblastes de la colonne et est inhibé quand les cellules sont cultivées sur Matrigel (Alders et coll, 1997 ; Janatpour et coll, 1999). De même, Id2 (*Inhibitor of DNA binding 2*) semble être un marqueur de prolifération puisqu'il est diminué lorsque les cytotrophoblastes adoptent un phénotype invasif (Janatpour et coll, 2000). HIF-1 $\alpha$  est potentiellement impliqué dans le maintien du caractère prolifératif des cellules puisque lorsqu'il est inhibé, les cytotrophoblastes deviennent invasifs (Caniggia et coll, 2000).



### 1-b) Différenciation vers le phénotype invasif.

La transition vers un phénotype invasif s'accompagne de l'expression des facteurs Alf1 (*Alpha-tubulin folding protein 1*) / HEB (*E protein with a bhlh domain*) et Stra13 (*stimulated by retinoic acid 13 homolog*). Les facteurs bHLH Alf1/HEB et Stra13 sont exprimés dans les cytotrophoblastes invasifs *in vitro* (Janatpour et coll, 1999). Stra13, qui induit par ailleurs la différenciation neuronale, est exprimé dans les cellules géantes murines qui correspondent aux cytotrophoblastes extravilleux humains (Boudjelal et coll, 1997). Deux autres facteurs bHLH ont été impliqués dans la différenciation vers le phénotype invasif/endovasculaire : NeuroD1 (*Neurogenic differentiation factor 1*) est localisé dans les cytotrophoblastes invasifs de la décidue et les cytotrophoblastes endovasculaires, et NeuroD2 est spécifiquement exprimé dans les cytotrophoblastes endovasculaires (Westerman et coll, 2002). Le facteur GCM1 (*Glial cell missing gene1*) a été détecté dans certains des cytotrophoblastes extravilleux de la colonne distale et aucun marquage n'est visible dans les cellules de la colonne proximale suggérant un rôle de GCM1 dans l'acquisition du phénotype invasif (Baczyk et coll, 2004). En effet, plus récemment il a été mis en évidence que les cytotrophoblastes extravilleux cultivés sur du matrigel en présence d'un oligonucléotide antisens contre GCM1 présentaient une réduction de leur invasion. De plus, les cytotrophoblastes extravilleux présents au niveau des points de contact de l'explant avec le matrigel n'expriment pas l'intégrine  $\alpha 1$  (marqueur du phénotype invasif) uniquement si l'explant est cultivé en présence de l'oligonucléotide antisens contre GCM1. Ces résultats suggèrent donc que GCM1 favorise la différenciation des cytotrophoblastes extravilleux en cellules invasives (Baczyk et coll, 2009).

### 1-c) Différenciation vers la syncytialisation.

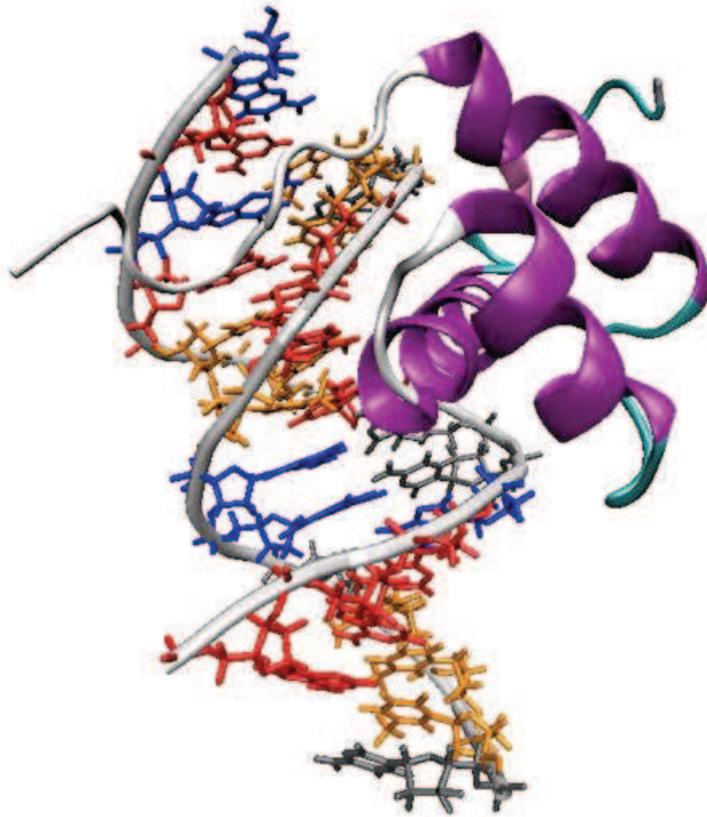
Il semble que le facteur GCM1 soit capable d'induire la syncytialisation. En effet, il a été observé dans les cytotrophoblastes villeux et les syncytiotrophoblastes (Nait-Oumesmar et coll, 2000). Par hybridation *in situ* d'autres auteurs ont pu décrire plus spécifiquement la localisation de GCM1 dans le placenta : l'ARN<sub>m</sub> de GCM1 est présent dans le noyau de certains cytotrophoblastes villeux, dans le cytoplasme et dans le noyau de certains syncytia mais pas dans les agrégats de noyaux syncytiaux (Baczyk et coll, 2004). L'étude fonctionnelle



de GCM1 dans des cultures d'explants et dans la lignée BeWo met en évidence un rôle central de ce facteur dans la régulation de la balance entre prolifération et différenciation. De plus, il semble capital à l'initialisation et à la complétion de la syncytialisation (Baczyk et coll, 2009).

Tous les facteurs de transcription qui activent les gènes codant pour les hormones spécifiques de la différenciation morphologique du syncytiotrophoblaste sont cruciaux. Ainsi, AP-2 (*Activating Protein*), CREB et Sp1 qui régulent l'expression des gènes des sous-unités de l'hCG sont considérés comme participant au contrôle de la syncytialisation. De plus, TEF5 (*Transcription enhancer factor 5*), facteur de transcription augmentant lors de la formation du syncytiotrophoblaste, interagit avec les séquences activatrice du gène codant pour l'hPL (Jacquemin et coll, 1997).

Récemment, une étude du programme génétique dirigeant la différenciation du placenta humain a été réalisée en utilisant des *microarrays* à ADN : *Incyte Human GEM V microarray* et *affymetrix UI33 chip*. Les résultats obtenus sont très concordants et pointent le rôle fondamental de l'induction ou la répression simultanée des ARN<sub>m</sub> codant pour des protéines fonctionnellement reliées au cours du processus de différenciation. De plus, les auteurs montrent que dans les 102 gènes les plus induits 92 ont un ou plusieurs sites pour AP-2 $\alpha$ , 75 ont un site pour NRF2 (*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) et 82 ont un site pour FOXF1 (*Forkhead box F1*) dans leur région promotrice. De manière intéressante, aucun des 100 gènes les plus réprimés n'ont un site pour AP-2 $\alpha$ . L'expression des ARN<sub>m</sub> d'AP-2 $\alpha$ , NRF2 et FOXF1 augmente au cours de la différenciation des trophoblastes villosités *in vitro*. Pris ensemble ces résultats suggèrent un rôle de ces facteurs de transcription dans la régulation de la différenciation trophoblastique, le rôle important d'AP-2 $\alpha$  dans la différenciation des trophoblastes a d'ailleurs été détaillée (Handwerger, 2010). Les auteurs ont utilisé un dominant négatif d'AP-2 dans des cultures de cytotrophoblastes villosités (Cheng et coll, 2004). Les cellules traitées ne présentent pas de différence morphologique au cours de la différenciation, elles fusionnent normalement. Cependant, la régulation de nombreux gènes est altérée par la transfection du dominant négatif d'AP-2. Dix-huit des 25 gènes les plus induits et dix-sept des 20 gènes les plus réprimés sont AP-2 dépendants, avec une majorité de gènes impliqués dans l'organisation extracellulaire, la communication cellulaire et la transduction des signaux. Ces résultats suggèrent fortement que le facteur de transcription AP-2 jouerait un rôle critique dans la différenciation terminale du syncytiotrophoblaste (Handwerger, 2010).



**Figure 20: Visualisation de la liaison d'une protéine à homéodomaine à l'ADN.**

*Opabinia regalis* [GFDL ([www.gnu.org/copyleft/fdl.html](http://www.gnu.org/copyleft/fdl.html)) ou CC-BY-SA-3.0 ([www.creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/](http://www.creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/))], via Wikimedia Commons, 2006.

URL du fichier : <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/cb/Homeodomain-dna-1ahd.png>

Liaison de la protéine à homéodomaine *Antennapedia* (*Drosophila melanogaster*) à un fragment d'ADN, illustrant les interactions de reconnaissance de l'homéodomaine, constitué d'hélices  $\alpha$  et de l'extrémité N-terminale non structurée, avec le grand et le petit sillon de l'ADN.

Une autre famille de facteur de transcription a été plus récemment impliquée dans les trois processus importants du développement placentaire décrits ci-dessus, ce sont les facteurs de transcription à homéodomaine.

#### 1-d) Rôle des facteurs de transcription à homéodomaine dans la régulation du développement placentaire.

Ces protéines sont codées par des gènes qui contiennent une séquence de 180 pb très conservée dans l'évolution appelée *homeobox*. Elle correspond à un homéodomaine de 60 acides aminés ayant une structure « hélice-tour-hélice ». C'est cet homéodomaine qui permet la liaison très spécifique de la protéine à l'ADN et entraîne une activation ou une inhibition de l'expression des gènes cibles (Cf. Figure 20). Ces homéogènes sont classés en deux groupes : les gènes *homeobox* appartenant à un « *cluster* », les gènes HOX, ou ceux n'appartenant pas à un « *cluster* », les *HOX-like-gene* ou Hlx. Les études menées dans le placenta humain ont permis d'identifier un certain nombre de gènes *homeobox* exprimés dans le placenta sain ou pathologique. Certains ont été mis en évidence comme potentiellement importants : DLX3, DLX4, MSX2, GAX, ESX1L et HLX (Quinn et coll, 1997 ; Rajaraman et coll, 2008).

##### 1-d-i) DLX4

Dans les lignées de choriocarcinome, l'inactivation de DLX4 induit un taux anormal d'apoptose (Sun et coll, 2006). *In situ*, l'expression de DLX4 est augmentée dans le placenta en cas de retard de croissance intra utérin (RCIU) autant au niveau de l'ARN que de la protéine. La protéine est détectée par immunohistochimie dans le syncytiotrophoblaste, dans le cytotrophoblaste mais aussi dans les cellules endothéliales. Les auteurs de cette étude, en fonction de leurs résultats et des données de la littérature, proposent que l'augmentation de DLX4 dans les cas de RCIU pourrait être le reflet d'une différenciation et d'une mort cellulaire aberrante et donc impliquerait l'homéogène DLX4 dans le contrôle de la différenciation des cytotrophoblastes (Murthi et coll, 2006).



### 1-d-ii) HLX

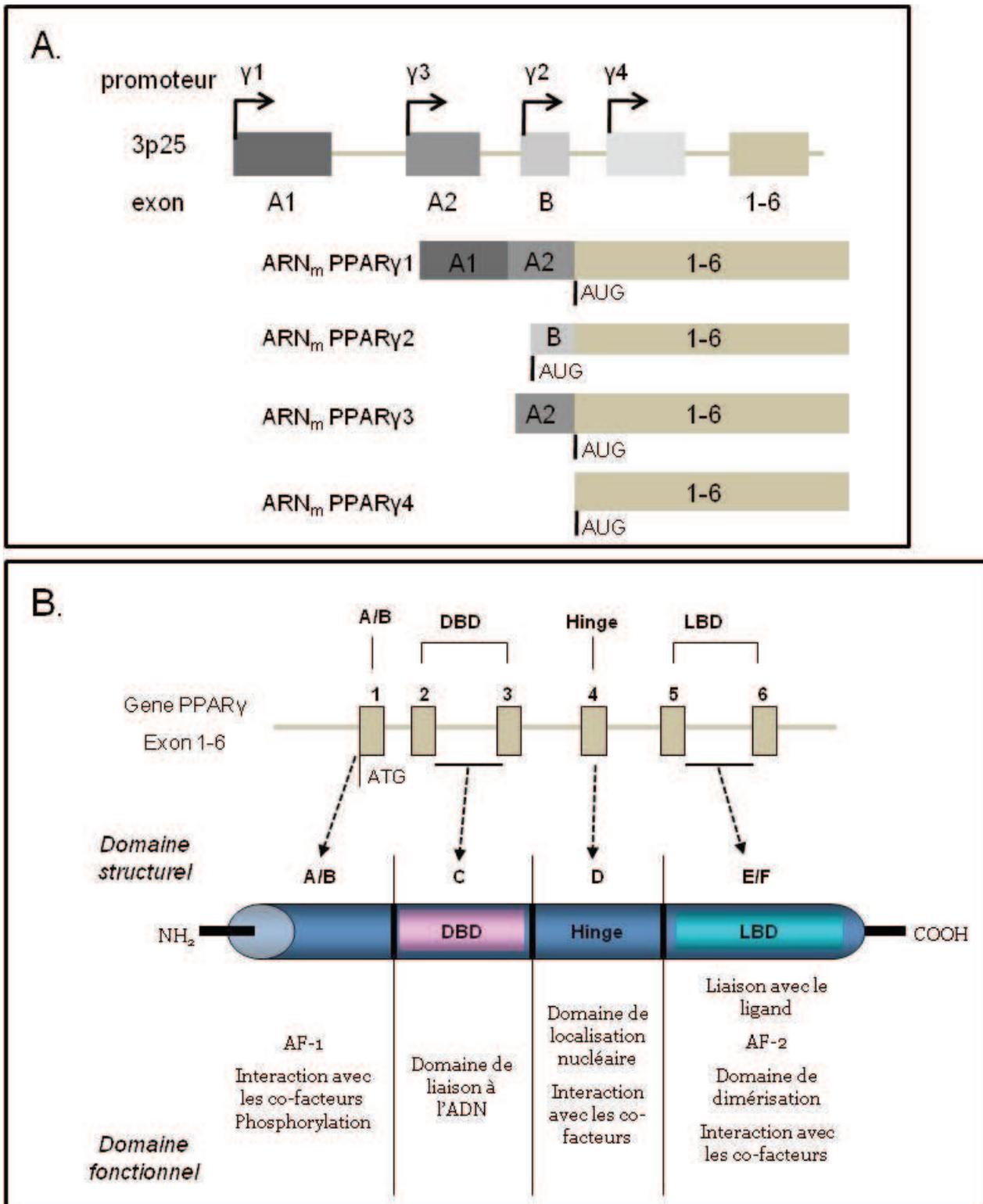
HLX est exprimé dans les noyaux des cytotrophoblastes villeux et extravilleux prolifératifs au début du développement placentaire mais il n'est pas détecté dans le syncytiotrophoblaste. Dans des lignées de cellules trophoblastiques immortalisées, l'utilisation d'un anti-sens contre HLX1 inhibe significativement la prolifération cellulaire (Rajaraman et coll, 2007) et entraîne des modifications de l'expression de gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire comme RB1 (*Retinoblastoma protein-1*), MYC, cycline B1 (CCNB1). Ces résultats suggèrent que HLX serait un élément régulateur important de l'état prolifératif des cytotrophoblastes et qu'une dérégulation de HLX pourrait aboutir à une prolifération aberrante des cytotrophoblastes et à une mauvaise différenciation cellulaire (Rajaraman et coll, 2008 et 2010).

### 1-d-iii) DLX3

DLX3 est exprimé au premier trimestre de grossesse humaine par les cytotrophoblastes villeux et extravilleux à la fois lorsqu'ils sont prolifératifs et différenciés (Chui et coll, 2010). Dans des cultures de trophoblastes villeux issus de placenta à terme, il est observé une augmentation de l'expression des transcrits et des protéines DLX3 et 3 $\beta$ -HSD au cours de la différenciation *in vitro* des cellules. Sa fonction a été étudiée dans la lignée BeWo où sa surexpression entraîne une augmentation de l'expression de la 3 $\beta$ -HSD, de la syncytine et de la sécrétion de l'hCG  $\beta$ . DLX3 serait donc en amont de ces trois gènes, marqueurs connus de l'état de différenciation des cytotrophoblastes villeux. Il aurait un rôle régulateur dans la différenciation de ces cellules (Chui et coll, 2011).

## 2) Le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$

Les PPARs sont des facteurs de la famille des récepteurs nucléaires aux hormones qui inclue les récepteurs de l'acide rétinoïque (RAR) et de l'acide 9-cis-rétinoïque (RXR), des hormones stéroïdiennes (progestérone PGR, androgènes AR, œstrogènes ER, glucocorticoïdes GR, minérallo-corticoïdes MR), des hormones thyroïdiennes (THR), de la vitamine D3 (VDR), des acides biliaires (FXR), de l'ecdysone (EcR), des oxystérols (LXR) et des récepteurs orphelins dont les ligands ne sont pas encore connus comme COUP-TF, HNF-4



**Figure 21 : Le PPAR<sub>γ</sub>.** D'après Fournier et coll. 2006.

Structure du gène (A) et de la protéine (B).  
 DBD : DNA binding domain; LBD : ligand binding domain.

Le gène du PPAR<sub>γ</sub> génère quatre transcrits contenant chacun 6 exons. L'exon 1 code le domaine A/B, les exons 2 et 3 codent le domaine C de liaison à l'ADN, l'exon 4 code le domaine D de liaison entre les domaines C et E/F, les exons 5 et 6 codent le domaine E/F de liaison au ligand.

(*Hepatocyte Nuclear Factor 4*) et ERR (*Estrogen Related receptor*) (Laudet et coll, 1992). Le PPAR alpha a été identifié dans les années 1990 comme le récepteur des fibrates, une classe de médicaments hypolipémiants utilisés chez l'Homme depuis les années 60 (Chinetti-Gbaguidi et coll, 2005). Les PPARs tirent leur nom de leur habilité à induire la prolifération des péroxysomes chez les rongeurs (Issemann et Green, 1990), mais depuis, plusieurs études ont montré qu'ils contrôlent l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique et dans de nombreux processus cellulaires tels que la prolifération, l'inflammation ou encore l'apoptose.

## 2-a) Structures des PPARs

Il existe trois types de récepteurs nucléaires PPAR codés par des gènes distincts : PPAR $\alpha$  (NR1C1), PPAR $\beta$  ou  $\delta$  (NR1C2) et PPAR $\gamma$  (NR1C3) localisés sur les chromosomes humains 22, 6 et 3 respectivement (Greene et coll, 1995; Sher et coll, 1993 ; Yoshikawa et coll, 1996). Il existe une isoforme  $\alpha$ ,  $\delta$  et quatre isoformes  $\gamma$ . PPAR $\gamma$ 1,  $\gamma$ 2,  $\gamma$ 3 et  $\gamma$ 4 dérivent du même gène suite à l'utilisation de promoteurs distincts et à l'épissage alternatif. Le gène PPAR $\gamma$  contient six exons et les protéines PPAR $\gamma$ 1, PPAR $\gamma$ 2, PPAR $\gamma$ 3 et PPAR $\gamma$ 4 font entre 49 et 56 kDa (Evans, 1988 ; Green et Chambon, 1988). PPAR $\gamma$ 1, PPAR $\gamma$ 3 et PPAR $\gamma$ 4 produisent la même protéine (Fajas et coll, 1997 ; Al-Shali et coll, 2004) de 49 kDa et PPAR $\gamma$ 2 est traduit en une protéine de 56 kDa contenant 30 acides aminés supplémentaires en N-terminal codés par l'exon B (*Cf.* Figure 21A) (Zhu et coll, 1995). La structure du gène PPAR $\gamma$  et donc de la protéine qui en dérive est commune avec celle des récepteurs nucléaires. Ils sont composés de plusieurs domaines fonctionnels (*Cf.* Figure 21B) :

- L'exon 1 correspond au domaine N-terminal de la protéine appelé A/B ou encore AF-1, fonction activatrice indépendante du ligand, qui permet l'interaction avec des cofacteurs et est le site de phosphorylation qui régule l'activité du récepteur nucléaire.
- Les exons 2 et 3 correspondent au domaine C de la protéine, encore appelé DBD (*DNA Binding Domain*) car il est responsable de la reconnaissance avec la séquence nucléotidique cible située dans les promoteurs de gènes cibles : le PPRE (*PPAR response element*). Le domaine DBD est aussi impliqué dans la dimérisation du récepteur, où le PPAR est toujours situé en 5' par rapport au RXR.

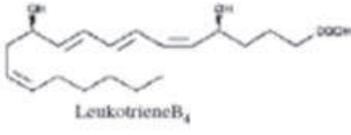
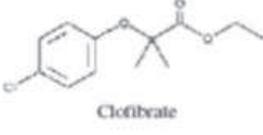
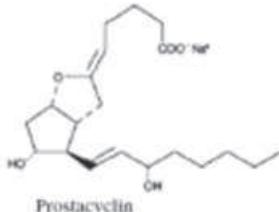
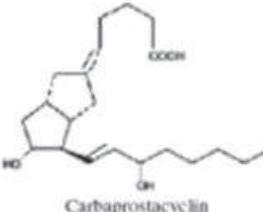
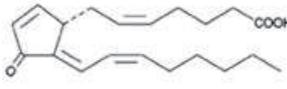
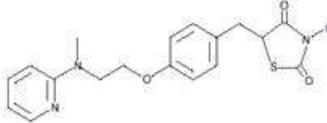
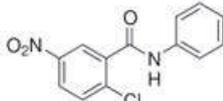
Récepteur	Ligand naturel	Ligand synthétique	
PPAR $\alpha$	Arachidonic acid Eicosapentaenoic Linoleic acid Linolenic acid Palmitic acid Stearic acid 8(S)-HETE eukotriene B <sub>4</sub>	 LeukotrieneB <sub>4</sub>	 Clofibrate
	Arachidonic acid Eicosapentaenoic Linoleic acid Linolenic acid Palmitic acid Stearic acid Prostacyclin	 Prostacyclin	 Carbaprostacyclin

Figure 22 : Les ligands de PPAR $\alpha$  et  $\beta/\delta$ . D'après Fournier et coll, 2006

Ligands naturels	Agonistes synthétiques	Antagonistes
Acide Arachidonique Acide Eicosapentaenoïque Acide Linoléique Acide Linoléique	<u>Thiazolidinediones</u> Rosiglitazone Ciglitazone Pioglitazone Troglitazone	GW9662 T0070907 BADGE G3335 Fmoc-Leu
15-HETE 9-HODE, 13-HODE 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ <sub>2</sub> azPC	GW1929	
 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ <sub>2</sub>	 Rosiglitazone	 GW9662

HETE : hydroxyeicosatetraenoic acid; HODE : hydroxyoctadecadienoic acid

15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ<sub>2</sub> : 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J<sub>2</sub>

azPC : hexadecyl azelaoyl phosphatidylcholine

GW1929 : (N-(2-Benzoylphenyl)-O-[2-(methyl-2-pyridinylamino)ethyl]-L-tyrosine hydrate)

GW9662 : 2-Chloro-5-nitro-N-phenylbenzamide

T0070907 : 2-Chloro-5-nitro-N-4-pyridinyl-benzamide

BADGE : Bisphenol A diglycidyl ether

G3335 : dipeptide (H-Trp-Glu-OH)

Fmoc-Leu : N-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)-L-leucine

Figure 23 : Les ligands naturels, agonistes synthétiques et les antagonistes de PPAR $\gamma$ . D'après Fournier et coll, 2011

- L'exon 4 permet d'obtenir le domaine D qui est très conservé parmi les récepteurs nucléaires et qui permet la liaison entre le DBD et le domaine de liaison au ligand (LBD).
- Les exons 5 et 6 correspondent au domaine E/F c'est à dire au LBD. C'est la partie C-terminale de la protéine et elle contient une large poche hydrophobe qui permet d'accueillir de nombreux types de ligands lipophiles. Le LBD constitue le domaine de transactivation ligand-dépendant appelé AF-2.

## 2-b) les ligands des PPARs

*(Cf. Figure 22 et 23)*

Les récepteurs PPARs ont pour ligands de petites molécules lipophiles comme les acides gras à chaîne moyenne et longue et les éicosanoïdes (*Cf. Figure 23*). Des éicosanoïdes tels que l'HETE et le leukotriène B4 ont été identifiés comme des ligands de PPAR $\alpha$  (Devchand et coll, 1996 ; Kliewer et coll, 1997). La prostacycline est le ligand du PPAR $\beta/\delta$  (Gupta et coll, 2000) et la 15-dPGJ<sub>2</sub> celui du PPAR $\gamma$  (Forman et coll, 1995 ; Kliewer et coll, 1997). Les métabolites oxydés de l'acide linoléique tels que l'HODE sont retrouvés dans les LDL oxydées et ont été identifiés comme des ligands spécifiques de PPAR $\gamma$  (Nagy et coll, 1998).

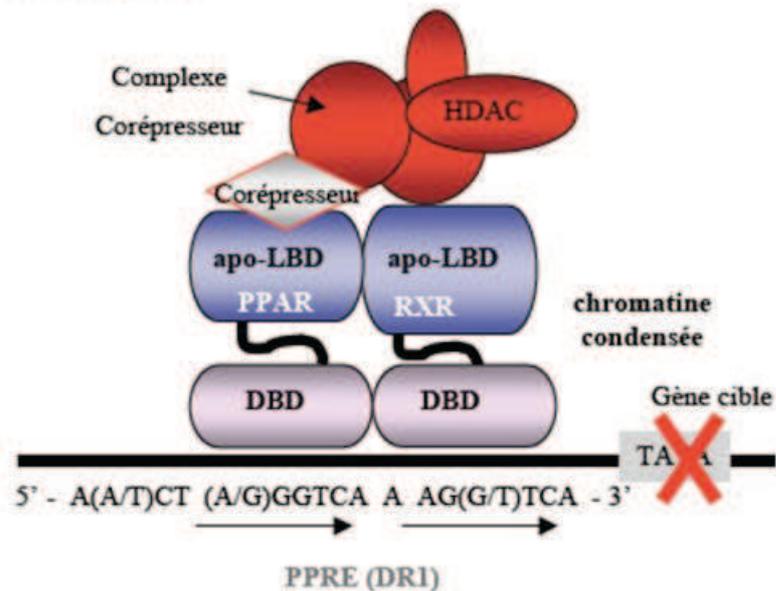
Parmi les molécules synthétiques, les clofibrates sont les premiers composés hypolipémiants rapportés comme activateurs des PPARs avec une plus forte affinité pour PPAR $\alpha$ . La rosiglitazone ou BRL49653, médicament synthétique de la famille des thiazolidinediones utilisé dans le traitement du diabète non-insulino-dépendant, est un agoniste puissant et spécifique du PPAR $\gamma$  (Lehmann et coll, 1995).

## 2-c) le mécanisme d'action des PPARs

*(Cf. Figure 24)*

La liaison de PPAR $\gamma$  à l'ADN sur ses éléments de réponse requiert obligatoirement l'hétérodimérisation avec le récepteur de l'acide rétinoïque 9-cis, RXR, son partenaire exclusif. L'hétérodimère PPAR/RXR se lie au PPRE, séquence constituée de la répétition de

En absence de ligand



En présence de ligand

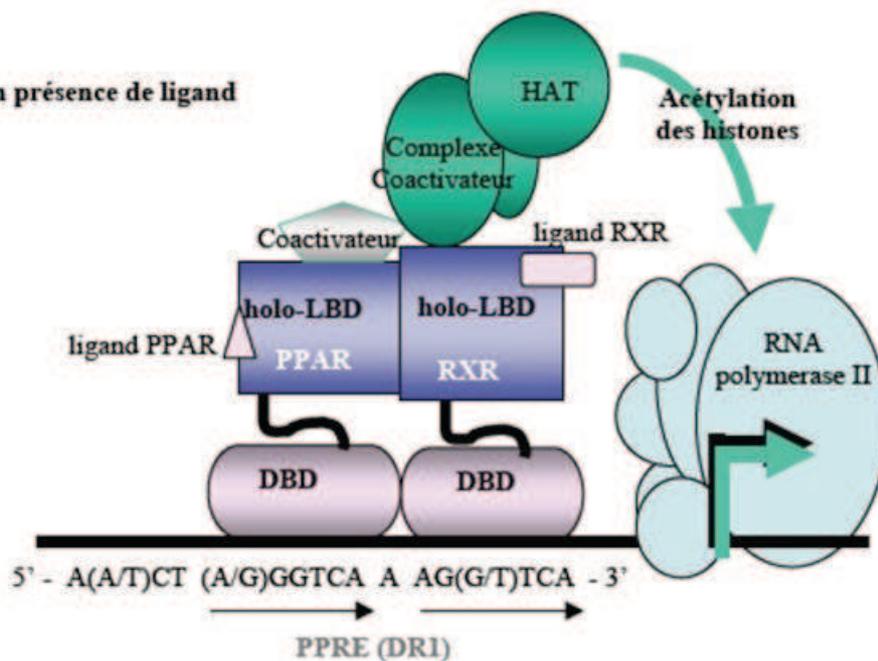


Figure 24 : Mécanisme d'action des PPARs. D'après Fournier et coll, 2006

En absence de ligand, l'hétérodimère PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$  est lié à l'ADN et à un complexe de co-répresseur. Il a alors un effet inhibiteur constitutif. La liaison des ligands permet un changement de conformation des récepteurs qui recrutent un complexe de co-activateurs et entraînent la transcription du gène cible.

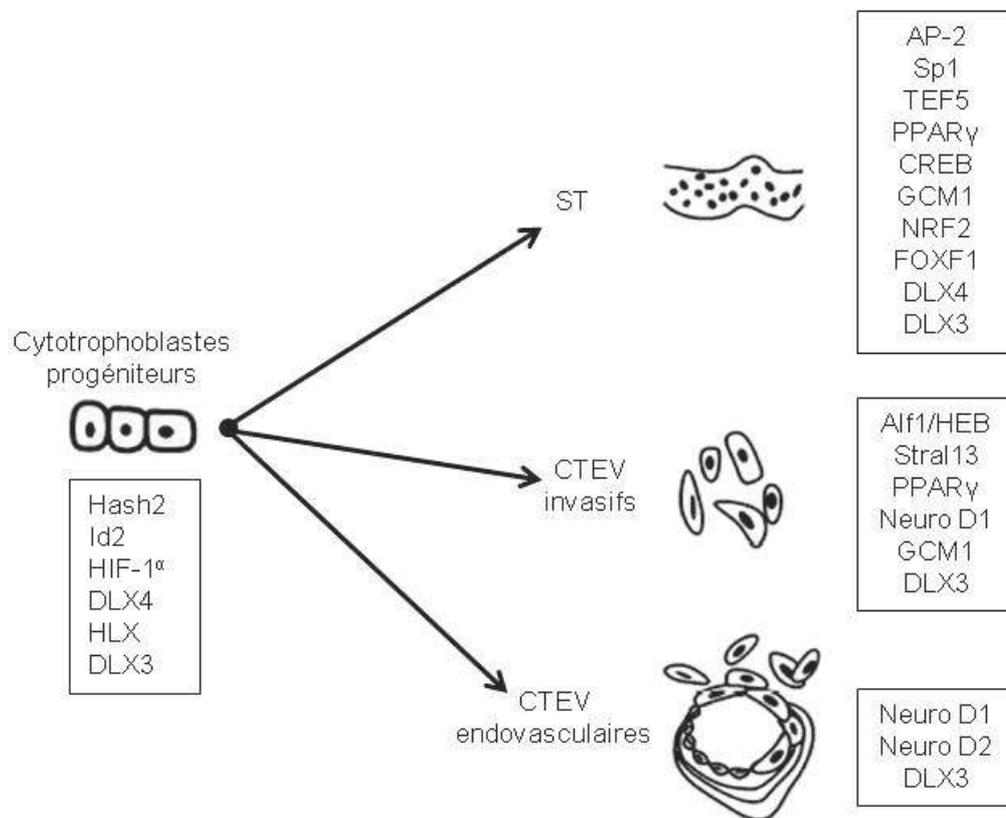
deux motifs hexanucléotidiques (AGGTCA) séparés par une base, appelée DR1, et précédés d'une extension en 5' : 5'-A(A/T)CT (A/G)GGNCA A AG(G/T)TCA-3' (Kliwer et coll, 1992). Le PPRE est situé dans le promoteur de gènes cibles dont la transcription sera modulée en fonction de l'activation ou de l'inhibition de l'hétérodimère PPAR/RXR. Cet hétérodimère peut être activé par la liaison des ligands de PPAR ou de RXR (acide rétinoïque-9-cis), leurs différentes combinaisons aboutissant à un effet additif ou synergique (Mukherjee et coll, 1997 ; Tontonoz et coll, 1997). Le changement de conformation du LBD après fixation du ligand induit le recrutement des co-régulateurs. En l'absence de ligand ou en présence d'un antagoniste le récepteur nucléaire interagit avec des corépresseurs transcriptionnels dont NCoR ou le SMRT (*silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptor*). Ces corépresseurs recrutent des histone-désacétylases (HDAC) qui entraînent une compaction de la chromatine qui n'est plus alors accessible à la machinerie transcriptionnelle. Lorsque les ligands se fixent sur le LBD, le domaine AF-2 change de conformation ce qui aboutit au recrutement de co-activateurs tels que PBP (*PPAR binding protein*) (Yuan et coll, 1998), PRIP/RAP250 (*PPAR interacting protein/receptor activating protein*) (Zhu et coll, 2000), PGC-1 (*PPAR gamma coactivator-1*) (Puigserver et coll, 1999) et SRC-1 (*Steroid receptor coactivator-1*) (Xu et coll, 1998). D'autres facteurs comme CBP/p300 (*CREB Binding Protein/protein 300*), ayant une activité d'histone acétyl-transférase (HAT), sont recrutés ce qui permet de relâcher localement la structure de la chromatine. La machinerie transcriptionnelle contenant la RNA polymérase II et des facteurs initiant la transcription, peut alors se fixer à l'ADN et amorcer la transcription du gène ciblé par l'hétérodimère PPAR $\gamma$ /RXR. Par ailleurs, il a été montré que PPAR seul et activé par son ligand, est capable d'interagir avec d'autres facteurs de transcription. En effet, PPAR $\gamma$  est capable de se lier à NF- $\kappa$ B (p65), à CBP et à c-Jun et ainsi d'inhiber la transcription de gènes qui ne contiennent pas de séquences PPRE (Delerive et coll, 1999). Il a également été montré que PPAR $\gamma$  une fois activé par son ligand peut être sumoylé ce qui entraîne sa fixation au co-répresseur NCoR qui est lié de façon constitutive sur le promoteur des gènes impliqués dans l'inflammation dont il inhibe la transcription. La fixation du PPAR $\gamma$  empêche l'ubiquitinylation du complexe répresseur et donc maintient l'état réprimé du gène (Pascual et coll, 2005). Ces mécanismes correspondent au rôle anti-inflammatoire qui a été attribué aux PPARs dont les effets seraient médiés par une interférence négative avec les voies de NF- $\kappa$ B, AP-1 ou C/EBP (*CCAAT/Enhancer-Binding Proteins*) (Genolet et coll, 2004).



## 2-d) PPAR $\gamma$ et le développement placentaire

(Cf. Fournier et coll, *placenta* 2007 et *Journal of reproductive immunology* 2011)

Les PPARs modulent la transcription de nombreux gènes impliqués dans la différenciation, la prolifération et la mort cellulaire. Ils présentent différents profils d'expression dans les tissus. Ainsi, PPAR $\gamma$  s'avère hautement exprimé dans le tissu adipeux blanc et brun, c'est un important déterminant de la différenciation des adipocytes, du stockage des lipides, du métabolisme des lipides (Tontonoz et coll, 1994) et de l'homéostasie du glucose. Des travaux de transgénèse chez la souris ont montré que la délétion de PPAR $\gamma$  ou de RXR $\alpha/\beta$  avait d'importantes conséquences sur le développement précoce du placenta murin. On a observé une désorganisation de la zone labyrinthique chez les souris RXR $\alpha/\beta$ <sup>-/-</sup>. Les souris PPAR $\gamma$ <sup>-/-</sup> présentent, elles, un défaut de différenciation trophoblastique et de vascularisation du placenta (Barak et coll, 1999 ; Kubota et coll, 1999). Des études réalisées *in vitro* et *in situ* chez l'homme ont révélé l'existence d'une très forte expression du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  spécifiquement dans les noyaux des CTV et des CTEV du premier trimestre de grossesse à tous les stades de différenciation. En revanche, son partenaire d'hétérodimérisation RXR $\alpha$  est présent dans le placenta de manière ubiquitaire, autant dans le noyau des trophoblastes que dans celui des cellules mésenchymateuses ou déciduales (Fournier et coll, 2007). Peu d'études ont décrit l'effet de l'activation de PPAR $\gamma$  sur la différenciation et l'invasion des trophoblastes humains. L'activation de PPAR $\gamma$  *in vitro* dans des cytotrophoblastes vilieux à terme induit la formation du syncytiotrophoblaste (Schaiff et coll, 2000). La différenciation des cytotrophoblastes vilieux mononucléés *in vitro* en syncytiotrophoblaste s'accompagne de l'activation de PPAR $\gamma$  comme le montre l'accumulation de lipides neutres par la coloration Oil Red O (Tarrade et coll, 2001c). Il a été montré que l'hétérodimère PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$  régule l'incorporation d'acides gras dans les trophoblastes humains, comme dans ses autres cellules cibles (Schaiff et coll, 2005). Enfin la stimulation *in vitro* de PPAR $\gamma$  par un agoniste synthétique dans des trophoblastes vilieux est associée à une augmentation de l'expression et de la sécrétion d'hCG (Tarrade et coll, 2001c) confirmant son effet positif sur la différenciation du cytotrophoblaste vilieux à terme. Dans les cytotrophoblastes extravilleux et dans la lignée immortalisée HIPEC, l'activation de PPAR $\gamma$  par ses ligands synthétiques ou naturels entraîne une diminution de l'invasion et de la migration cellulaire de manière dose dépendante (Tarrade et coll, 2001b ; Pavan et coll, 2003).



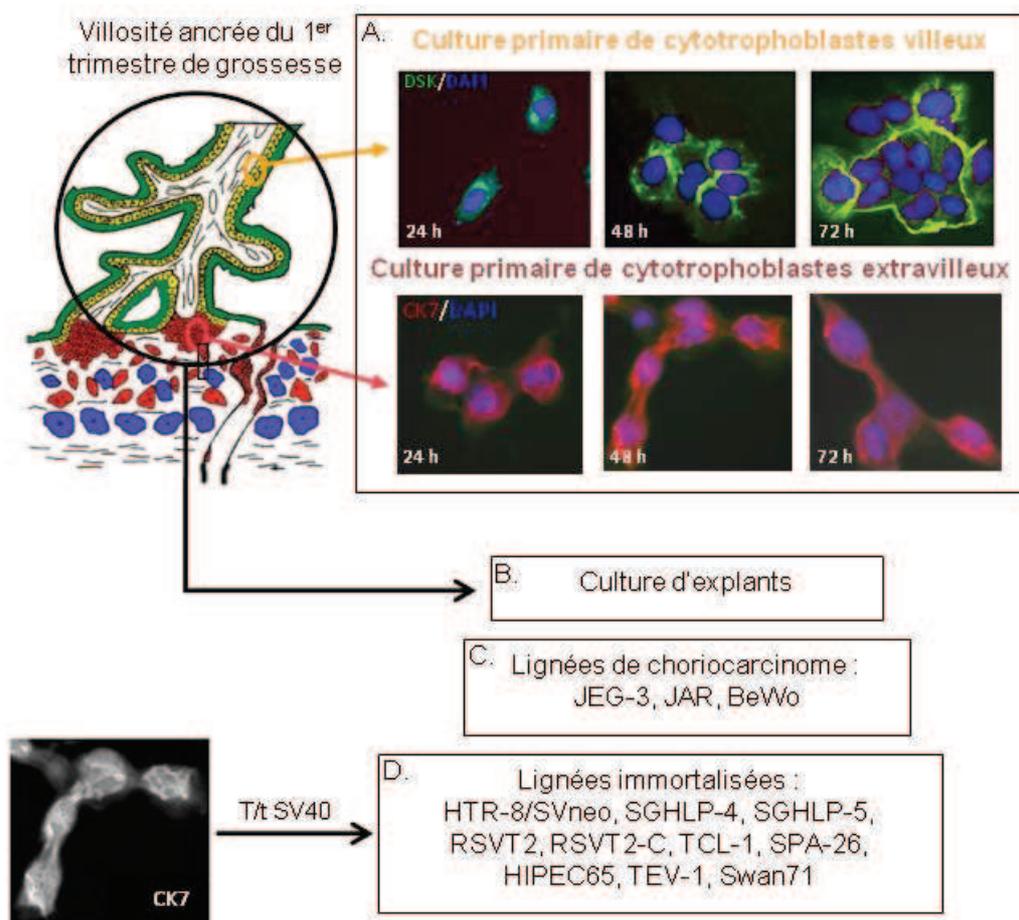
**Figure 25 : Les facteurs de transcription décrits comme impliqués dans la différenciation trophoblastique. D'après Loregger et coll, 2003, actualisé**

CTEV : cytotrophoblaste extravilleux, ST : syncytiotrophoblaste

### 3) Résumé des facteurs de transcription impliqués dans la régulation de la différenciation trophoblastique

De la description précédente des facteurs de transcription importants dans le contrôle de la différenciation trophoblastique, nous pouvons retenir que les trois processus importants sont régulés par des facteurs spécifiques mais qu'il existe également des facteurs que l'on retrouve dans plusieurs processus voire dans tous.

Par exemple les facteurs Hash 2, Id2, HIF-1 $\alpha$  et HLX sont spécifiques de la régulation de la prolifération, CREB, TEF5, NRF2, FOXF1 sont spécifiques du processus de fusion, Alfl/HEB et Stra13 sont spécifiques de l'acquisition du phénotype invasif par les CTEV alors que NeuroD2 est spécifiques des la différenciation des CTEV endovasculaires (*Cf.* Figure 25). Les facteurs PPAR $\gamma$ , GCM1 sont mis en évidence comme essentiels dans les deux voies de différenciation trophoblastiques alors que DLX4 et NeuroD1 sont spécifiques d'une seule des deux voies, respectivement villeuse et extravilleuse. Enfin, le facteur DLX3 est retrouvé à toutes les étapes de la différenciation trophoblastique, que se soit dans le maintien du statut prolifératif que dans la différenciation trophoblastique selon les deux voies, et semble donc être un facteur majeur du développement placentaire (*Cf.*Figure 25).



**Figure 26 : Les modèles d'études du placenta humain.**

DSK : desmoplakine, CK7 : cytokératine 7, DAPI : marqueur nucléaire, T/t SV40 : antigène grand T et petit t du polymavirus SV40

A. Visualisation par immunofluorescence de la cinétique des cultures primaires *in vitro* de cytotrophoblastes villos (cultivés sur plastique, marqués par un anticorps anti-desmoplakine, protéine membranaire (en vert)) ou de cytotrophoblastes extravilloux (cultivés sur Matrigel®, marqué par un anticorps anti-cytokératine 7 (en rouge)).

B. Culture d'explants : modèle placentaire *ex vivo*.

C. Lignées de choriocarcinomes : La lignée JEG-3 ne fusionne pas mais les cellules présentent un phénotype invasif sur une matrice extracellulaire. Elle est utilisée comme modèle de culture de trophoblastes et de trophoblastes extravilloux. Les lignées JAR et BeWo peuvent fusionner sous inductions ( $AMP_c$ , Forskoline) et sont utilisées comme modèle de culture de trophoblastes et de trophoblastes villos.

D. Lignées immortalisées : noms des différentes lignées obtenues après immortalisation de cultures primaires de cytotrophoblastes extravilloux par transfection de l'antigène grand T et/ou petit t du polymavirus SV40.

## F. Les modèles d'études du placenta humain

Le placenta humain est un organe d'investigation difficile et délicate pour des raisons éthiques évidentes. L'étude des trophoblastes est longtemps restée uniquement descriptive par l'analyse de sections placentaires à terme à l'aide de techniques d'hybridation *in situ* ou d'immunohistochimie. Aujourd'hui, de nombreux modèles ont été développés pour étudier les cytotrophoblastes villosités et extravillosités ainsi que les mécanismes impliqués dans leur différenciation : cultures d'explants, lignées cellulaires d'origine tumorale, cellules primaires ou lignées cellulaires immortalisées (Figure 26). Enfin, la possibilité d'avoir accès à des tissus placentaires précoces, alliée au progrès des techniques de culture cellulaire *in vitro*, a permis des approches de biologie cellulaire innovantes.

### 1) Les explants de villosités

La culture d'explants consiste à obtenir à partir d'une villosité chorionale un fragment d'une taille de 1 à 2 mm<sup>3</sup>. Ce fragment est soit incubé quelques heures dans des milieux physiologiques ou dans des milieux de culture, soit mis en culture sur une matrice de Matrigel (matrice extracellulaire isolée à partir de la tumeur murine Engelbreth, Holm, Swarm), de collagène de type I ou au contact d'un fragment de décidue, uniquement s'il est obtenu à partir d'une villosité du premier trimestre de grossesse. Dans le premier cas cette technique permet d'analyser les fonctions de fragments de villosités chorionales mais à partir de villosités à terme on observe que l'intégrité de la villosité est vite altérée. Elle est donc principalement utilisée sur des explants de villosité du premier trimestre de grossesse. Cependant, la dégénérescence du syncytiotrophoblaste s'observe après 24 heures de culture, suivi en quelques heures de la formation d'un nouveau syncytiotrophoblaste (Palmer et coll, 1997). Il est alors possible d'étudier l'implication de certains facteurs, tels les facteurs de transcription, dans la différenciation trophoblastique (Baczyk et coll, 2009). Dans le deuxième cas, la culture d'explants sur une matrice extracellulaire, les cultures sont viables pendant une dizaine de jours et peuvent reproduire le phénotype des villosités ancrées. En effet, des cellules de type épithélial apparaissent à l'extrémité de la villosité et expriment les marqueurs des



cytotrophoblastes extravilleux décrits *in situ* (Aplin et coll, 1999). Ce modèle apporte l'avantage de pouvoir étudier le comportement des cytotrophoblastes extravilleux dans un environnement proche de celui existant *in vivo*. Il maintient les interactions et les régulations paracrines entre le syncytiotrophoblaste, les cytotrophoblastes et le stroma villeux.

## 2) Cultures primaires

### 2-a) Cytotrophoblastes extravilleux

L'utilisation de digestions enzymatiques douces (Trypsine et DNase) et séquentielles de villosités du premier trimestre de grossesse permet de détacher graduellement les cytotrophoblastes des colonnes des villosités ancrées. Ces cellules sont purifiées sur un gradient de percoll puis cultivées sur une matrice de laminine, de fibronectine ou de Matrigel car elles sont incapables d'adhérer au plastique (Burrows et coll, 1993 ; Handschuh et coll, 2006 ; Tarrade et coll, 2001b). La pureté de la population trophoblastique dépend de l'origine, de la qualité et du temps d'action des enzymes utilisées, par conséquent une estimation de la contamination par des cellules mésenchymateuses est préconisée pour chaque préparation (Frank et coll, 2000). De même, il est indispensable de tester les différents marqueurs du cytotrophoblaste extravilleux par des techniques de RT-PCR (*Reverse transcription-polymerase chain reaction*) quantitatives et d'immunocytochimie. Les cytotrophoblastes ainsi isolés à l'unité Inserm U767 expriment entre autres, la cytokératine 7 (CK7), le CD9 et l'HLA-G, les trois marqueurs dont la co-expression est déterminante dans la définition du cytotrophoblaste extravilleux (Workshop, European Placental Group; Shiverick et coll, 2001). Le changement de mode de production de la trypsine nous a amenés à modifier le protocole initial (Tarrade et coll, 2001b ; Handschuh et coll, 2006).



## 2-b) Cytotrophoblastes vilieux

Diverses techniques de dissociation de villosités placentaires par des digestions enzymatiques séquentielles (Trypsine et DNase) ont permis d'isoler des cytotrophoblastes vilieux mononucléés. L'utilisation d'un gradient de percoll (Kliman et coll, 1986) puis d'une sélection négative par un anticorps monoclonal dirigé contre les HLA-A, -B et -C ont permis l'obtention de hauts rendements avec 95% de cytotrophoblastes vilieux. Cultivés sur boîtes plastiques traitées pour la culture, en présence de milieu pourvu de sérum de veau fœtal et en condition normale d'oxygénation, les cytotrophoblastes s'agrègent puis fusionnent pour former des syncytiotrophoblastes. Ces syncytiotrophoblastes évolueront vers l'apoptose après 72 heures de culture. Cette différenciation *in vitro* des cytotrophoblastes vilieux est associée à une augmentation de l'expression d'hormones spécifiques du syncytiotrophoblaste : hCG, hPL, progestérone et œstradiol.

## 3) Les lignées cellulaires trophoblastiques

De nombreux auteurs ont utilisé des lignées cellulaires trophoblastiques pour mener des études de biologie cellulaire, d'endocrinologie et de toxicologie. Leur accès et leur utilisation pour des études fonctionnelles sont en effet plus aisés mais ces cellules ne présentent que certaines propriétés des cellules trophoblastiques originales et ne reflètent pas nécessairement la complexité des phénotypes vilieux ou extravilleux.

### 3-a) Les lignées cellulaires tumorales.

Il existe trois lignées tumorales couramment utilisées établies à partir de choriocarcinomes : JEG-3, JAR et BeWo. Ces cellules aneuploïdes ont gardé certaines des propriétés de la cellule trophoblastique, telles que la sécrétion d'hCG, d'hPL ou de progestérone. La lignée BeWo a particulièrement été utilisée comme un modèle d'étude de la fusion cellulaire puisque celle-ci est induite en présence d'AMP<sub>c</sub>. Mais ces trois lignées, dont les BeWo, ont également été largement utilisées pour étudier les phénomènes d'invasion

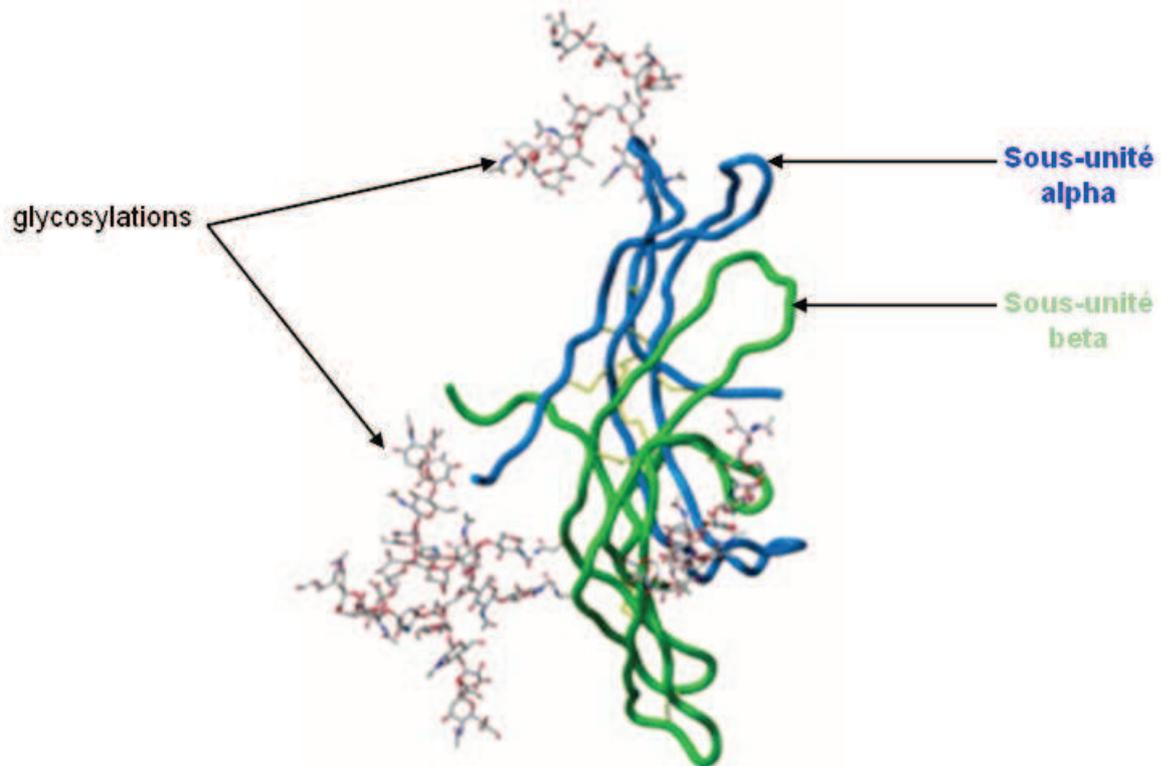


cellulaire. Les choriocarcinomes sont donc composés des populations hétérogènes qui partagent les caractéristiques des cytotrophoblastes villeux et extravilleux. C'est pourquoi, malgré leur facilité d'accès, ces lignées ne constituent pas une approche satisfaisante pour l'étude des fonctions spécifiques à chaque type de cytotrophoblastes.

### 3-b) Les lignées cellulaires immortalisées

Certaines lignées trophoblastiques extravilleuses proviennent de la transformation spontanée des cellules au cours de la culture telles que la lignée HTR-8 (Irving et Lala, 1995). Cependant, elles résultent le plus souvent de la transfection des gènes immortalisant grand T et petit t du virus Simien 40. C'est le cas des lignées SGHPL-4, SGHPL-5 (Choy et coll, 1998), HTR-8/SVneo, RSVT2, RSVT2-C (Graham et coll, 1993 ; Khoo et coll, 1998), TCL-1 (Lewis et coll, 1996), SPA-26 (Logan et coll, 1992), HIPEC65 (Pavan et coll, 2003), TEV-1 (Feng et coll, 2005) et Swan71 (Aplin et coll, 2006).

Cependant, l'immortalisation des cellules conduit souvent à la perte de certaines caractéristiques phénotypiques, c'est pourquoi il est indispensable de définir les marqueurs des cytotrophoblastes extravilleux afin de légitimer l'utilisation de ces lignées. Ainsi, d'après les membres de Groupe Européen sur le Placenta (EPG), ces marqueurs sont la CK7, HLA-G et CD9. En effet, la CK7 est le marqueur des cytotrophoblastes dans le placenta humain et CD9 et HLA-G sont spécifiques des cytotrophoblastes extravilleux (King et coll, 2000). Toutefois, ces lignées n'expriment pas toujours l'ensemble de ces marqueurs et l'utilisation d'autres marqueurs tels que les intégrines ou hormones placentaires semble indispensable à la caractérisation de ces lignées trophoblastiques (Manyonda et coll, 2001). Un nouveau marqueur du cytotrophoblaste extravilleux a récemment été utilisé pour caractériser les lignées cellulaires, le marqueur HLA de classe I. Il a permis de montrer qu'aucune des lignées cellulaires trophoblastiques extravilleuses immortalisées testées (HTR8/SVneo, Swan71, TEV-1) n'exprimait ce marqueur, remettant en cause l'utilisation de ces lignées comme modèle de l'invasion trophoblastique (Apps et coll, 2009).



**Figure 27 : Structure tridimensionnelle de l'hormone chorionique gonadotrope humaine.** D'après Neil Isaacs, Adrian Laphorn et Debbie Harris, 1999, Université de Glasgow, brevet n°5864488.

Représentation de la structure tridimensionnelle de l'hCG permettant de voir l'association des sous-unités alpha (bleu) et beta (vert) et les chaînes glycaniques.

## II - L'hormone chorionique gonadotrope humaine ou hCG

L'hCG est une hormone peptidique. Elle appartient à la famille des gonadotrophines qui comprend les gonadotrophines hypophysaires (LH, FSH et la TSH) et les gonadotrophines placentaires (hCG et *equine CG*). C'est une glycoprotéine composée de deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  liées de façon non covalente (Figure 27). La sous-unité  $\alpha$  est commune aux autres hormones polypeptidiques (LH, FSH et TSH) et la sous-unité  $\beta$  confère sa spécificité à l'hormone (Pierce et Parsons, 1981).

L'hCG est une hormone spécifiquement humaine majoritairement produite par le trophoblaste mais également en faible quantité par différents épithélia de tissus sains, particulièrement au niveau intestinal, urinaire, respiratoire, hypophysaire et testiculaire. (Bellet et coll, 1997 ; Rull et coll, 2008). En effet, on a pu mesurer dans le sang d'hommes et de femmes non enceintes une très faible concentration d'hCG et de sa sous-unité béta libre. (Alfthan et coll, 1992). On retrouve également une sécrétion anormale d'hCG beta libre dans différents cancers (urothélial, de la vessie, du pancréas...) (Marcillac et coll, 1993 ; Lazar et coll, 1995 ; Bidart et coll, 1997).

### A. Les gènes de l'hCG

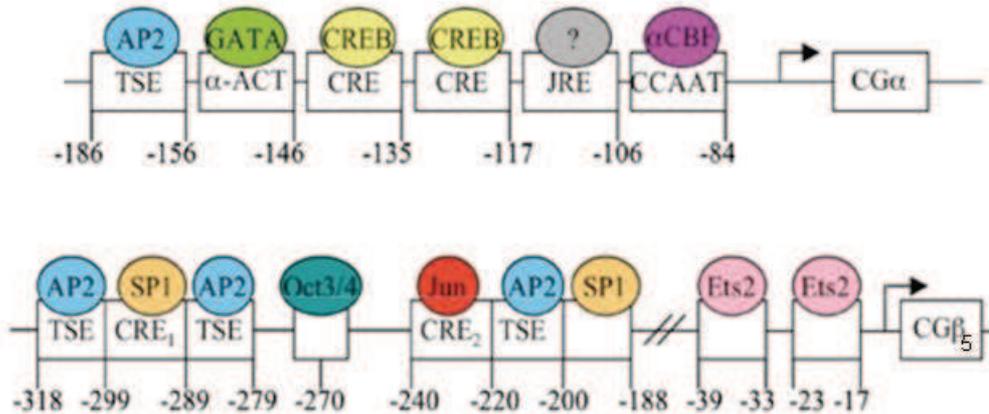
#### 1) La sous-unité alpha

La sous-unité alpha est codée par un seul gène situé sur le chromosome 6q21.1-23 et contenant 4 exons (Fiddes et Goodman, 1981). Le promoteur contient de nombreux éléments de réponse spécifique du placenta (Figure 28) :

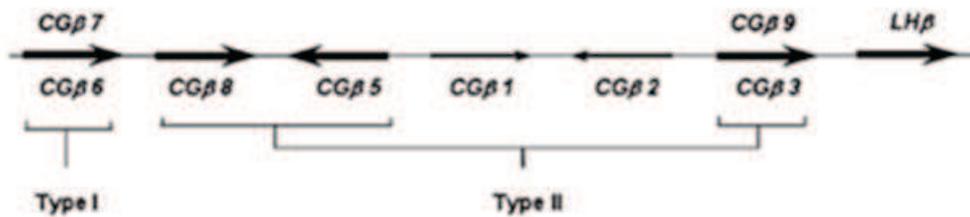
- un site TSE (*Trophoblast specific element*) (Steger et coll, 1993) qui lie la protéine activatrice AP-2 dont la séquence consensus est :

5'-GGCTTGAGGG-3' (Johnson et Jameson, 1999)

**A.**



**B.** Cluster des gènes codant pour la sous-unité beta de l'hCG sur le chromosome 19q13.32



**Figure 28 : Les gènes des sous-unités de l'hCG.**

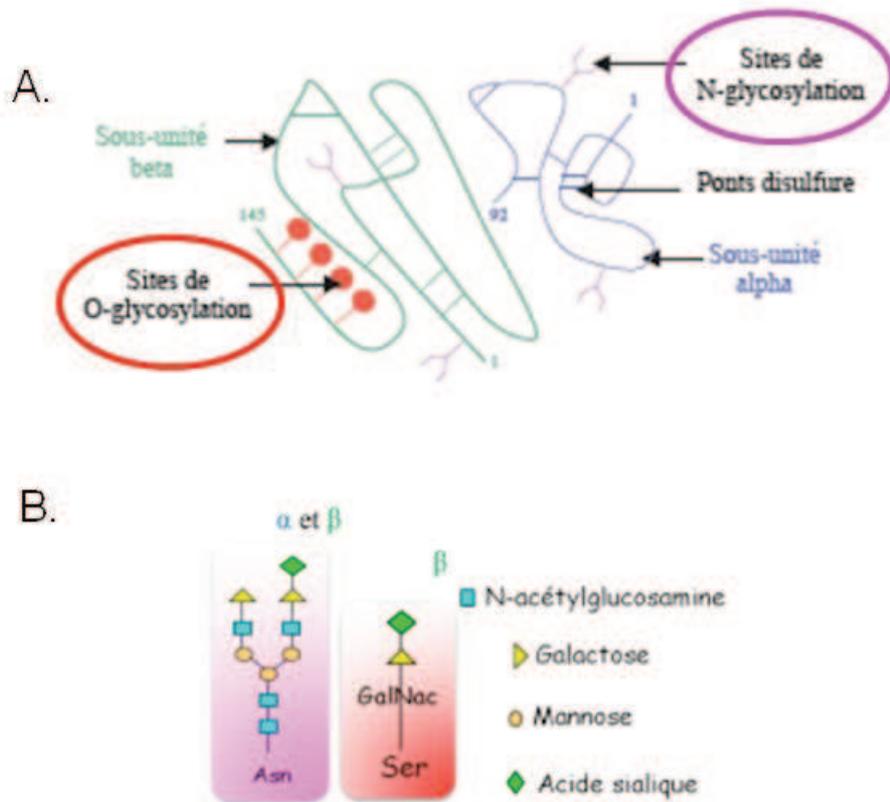
A. Schéma présentant les différentes protéines régulatrices se fixant sur les séquences promotrices des gènes de la sous-unité alpha et beta 5 de l'hormone chorionique gonadotrope humaine.

B. Représentation du cluster des différents gènes CGβ et leur regroupement en fonction de leur type.

- un site  $\alpha$ -ACT (Alpha-1-antichymotrypsin) capable de lier les protéines GATA-2 (Globin transcription factor-2) et GATA-3 dont la séquence consensus est 5'-AGATAG-3' (Steger et coll, 1994)
- deux sites CRE (*cAMP Responsive Element*) qui fixent les protéines ATF/CREB (*Activating Transcription Factor/ cAMP Response Element-Binding protein*) dont la séquence consensus est :  
5'-AAATTGACGTCATGGTAA-3' (Heckert et coll, 1996)
- un site JRE (*Junctional Regulatory Element*) qui fixe une protéine inconnue de 50 kDa (Andersen et coll, 1990)
- une boîte CCAAT qui lie une protéine  $\alpha$ CBF ( *$\alpha$ -CCAAT Binding Factor*) (Kennedy et coll, 1990).

## 2) La sous-unité bêta

Elle est codée par un « *cluster* » de sept gènes localisé sur le chromosome 19q13.32, chacun étant composé de 3 exons et de 2 introns. Ce « *cluster* » dérive d'un gène ancestral unique *LHB* qui a été dupliqué plusieurs fois durant l'évolution des primates, aboutissant à l'apparition d'un nouveau gène *CGB*, présent en plusieurs exemplaires fortement homologues (Policastro et coll, 1986, Li et Ford, 1998, Hallast, 2005). Leur expression est différente de celle de *LHB* à la fois dans le temps (fœtus vs. vie adulte) et au niveau tissulaire (placenta vs. hypophyse). Les gènes *CGB* sont organisés de la façon suivante :  $CG\beta 7$ ,  $CG\beta 8$ ,  $CG\beta 5$ ,  $CG\beta 1$ ,  $CG\beta 2$ ,  $CG\beta 3$  et  $LH\beta$  ou  $CG\beta 4$  où l'orientation des gènes  $CG\beta 2$  et  $CG\beta 5$  est 3'-5' (Figure 28). Le gène  $CG\beta 6$  est décrit comme un allèle du gène  $CG\beta 7$  avec une différence au niveau de l'exon1 dans la région en 5' non traduite (Policastro et coll, 1986). Cependant, récemment, une équipe a mis en évidence au niveau endometrial, qu'il y avait une différence entre les ARN<sub>m</sub> de  $CG\beta 7$  et  $CG\beta 6$  dans la région promotrice non traduite et dans l'exon 2 traduit aboutissant donc à deux protéines différentes. Elle aurait aussi réussi à développer des anticorps spécifiques de ces deux protéines (Zimmermann, 2011). Les gènes *CGB* ont été regroupés en deux sous groupes en fonction de la protéine traduite : les gènes de type I ( $CG\beta 7$ ) et les gènes de type II ( $CG\beta 5$ ,  $CG\beta 3$  et  $CG\beta 8$ ). Tous les gènes de la sous-unité  $\beta$  de l'hCG sont exprimés dans le placenta du premier trimestre (Bo et Boime, 1992). Toutefois leur niveau d'expression n'est pas égal. En effet, il a été publié que les gènes  $CG\beta 5$ ,  $CG\beta 3$  et



**Figure 29 : Structure des sous-unités de l'hormone chorionique gonadotrope humaine et de ses glycosylations.**

Asn : asparagine ; Ser : Sérine ; GalNAc : N-acétylgalactosamine

A.Schéma représentant la structure des deux sous-unités de l'hCG. La sous-unité  $\alpha$  contient 5 ponts disulfures et 2 sites de N-glycosylation. La sous-unité  $\beta$  contient 6 ponts disulfures, 2 sites de N-glycosylation et 4 sites de O-glycosylation.

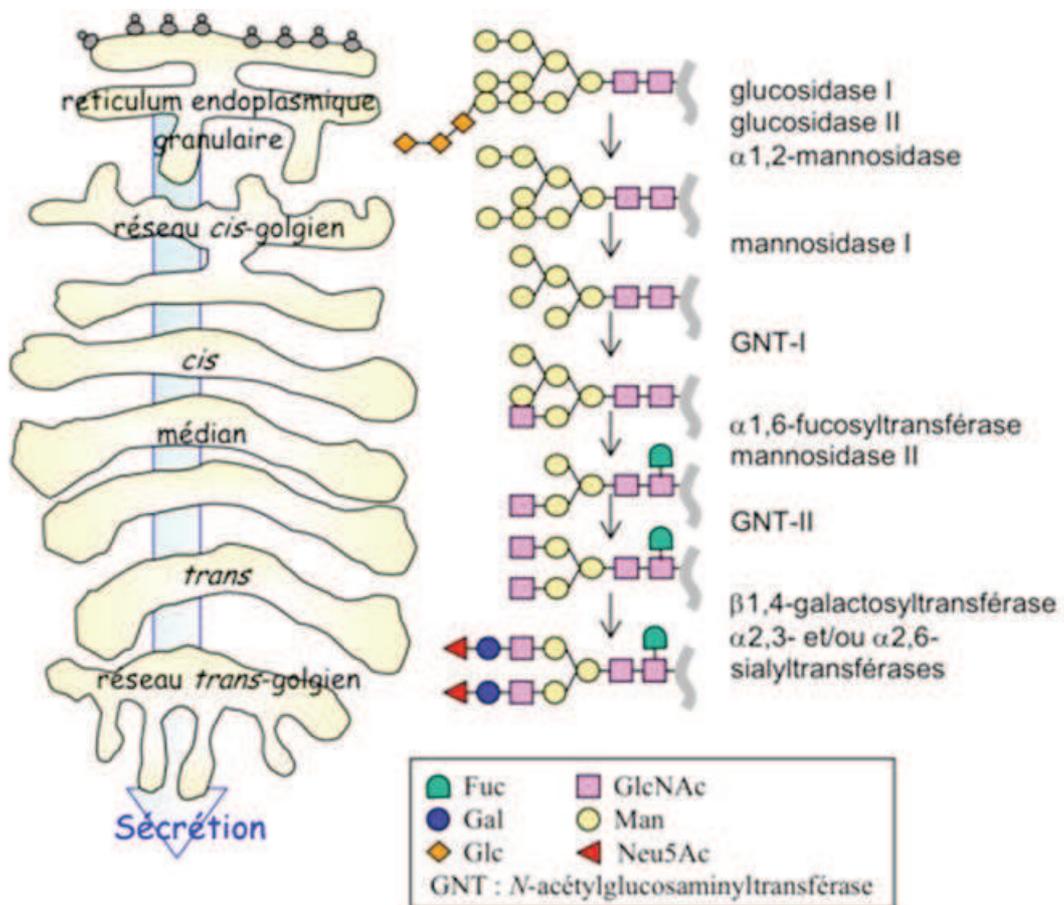
B.Schéma représentant les antennes glycaniques des N-glycosylations ou des O-glycosylations

CG $\beta$ 8 sont les plus exprimés dans le placenta, avec les ARN<sub>m</sub> de CG $\beta$ 5 qui représentent 65% des ARN<sub>m</sub> totaux CG $\beta$ . Le promoteur le mieux étudié à l'heure actuelle est celui du gène CG $\beta$ 5. Selon les différentes études basées sur la méthode de transfection de séquences promotrices mutées et d'expériences de « retard sur gel », les séquences suivantes ont été mises en évidence (Figure 28) :

- deux sites CRE (Steger et coll, 1993) en -299/-289 et -240/-219. Le premier fixe très probablement le "*selective promotor factor*" Sp1 dont la séquence consensus est 5'-GGGCGAGG-3' (Johnson et Jameson, 1999; Pestell et coll, 1994) et l'autre lie le facteur de transcription c-Jun (Pestell et coll, 1994)
- plusieurs sites TSE de fixation du facteur AP-2 entre -318 et -279 et entre -220 et 200 (Johnson et Jameson, 1999; Steger et coll, 1993)
- un site de fixation au facteur de transcription Oct3/4 aux alentours de -270 (Liu et Roberts, 1996)
- un site de fixation à Sp1 entre -200 et -188 (Johnson et Jameson, 1999)
- deux sites de fixation au facteur Ets-2 en -39/-33 et -23/-17 (Ghosh et coll, 2003).

## B. La protéine

La sous-unité  $\alpha$  contient 92 acides aminés et 5 ponts disulfures (Bahl et coll, 1972; Morgan et coll, 1975). Sa masse moléculaire est de l'ordre de 14 500 Da, elle contient deux chaînes N-glycaniques sur des résidus Asparagine. La sous-unité  $\beta$  contient 145 acides aminés et 6 ponts disulfures, sa masse moléculaire est de l'ordre de 23 200 Da, elle présente 2 chaînes N-glycaniques en N-terminal, sur des asparagines, et 4 chaînes de O-glycosylation, sur des sérines, du côté C-terminal (Kessler et coll, 1979a; Kessler et coll, 1979b) (Figure 29). La traduction des gènes *CGB* en fonction du type auquel ils appartiennent donne lieu à deux protéines différentes pour trois acides aminés en position 2, 4 et 117 (Cf. tableau n°1). Les sous-unités s'associent de façon non covalente.



**Figure 30 : Schéma de la synthèse et de la maturation des N-Glycane de l'hCG.**

Fuc : fucose ; Gal : galactose ; Glc : Glucose ; GlcNAc : Nacétyl-glucosamine ; Man : Manose ; NeuNAc : acide N-acétyl-neuraminique .

Tableau n°1 : Séquences différentes entre l'hCG beta de type I et de type II

<b>Type de gène CGB</b>	<b>PEPTIDE</b>	<b>Exon</b>	<b>Acide aminé</b>
Type I	Ser- <b>Arg</b> -Glu- <b>Met</b> -Leu-Arg-Pro-Arg-Cys-Arg-Pro-Ile-Asn-Ala-Thr	2	1-15
Type II	Ser- <b>Lys</b> -Glu- <b>Pro</b> -Leu-Arg-Pro-Arg-Cys-Arg-Pro-Ile-Asn-Ala-Thr	2	1-15
Type I	Cys-Asp-Asp-Pro-Arg-Phe-Gln- <b>Ala</b> -Ser-Ser	3	110-119
Type II	Cys-Asp-Asp-Pro-Arg-Phe-Gln- <b>Asp</b> -Ser-Ser	3	110-119

1) La glycosylation des deux sous-unités de l'hCG

Les N-glycanes se fixent pendant ou après la traduction des sous-unités de l'hCG dans le reticulum endoplasmique (RE) puis les chaînes glycaniques sont complétées dans l'appareil de Golgi. La N-glycosylation consiste en un transfert d'un oligosaccharide pré-assemblé sur un résidu asparagine au sein d'une séquence particulière de formule Asn-X-Thr/Ser, X désignant tout acide aminé autre que la proline. Cet événement a lieu sur un polypeptide en voie d'élongation (Figure 30). Avant de quitter le RE pour être transportées dans le Golgi, les protéines glycosylées subissent une excision de trois résidus glucose et d'un résidu mannose (Man). Dans le Golgi, les autres modifications enzymatiques des protéines glycosylées se font dans un ordre précis. La mannosidase I élimine 3 résidus Man et la N-acétylglucosamine-transférase (GlcNac-tranférase) ajoute 1 résidu GlcNac à un résidu Man. La mannosidase II élimine 2 résidus Man et la GlcNac-tranférase ajoute 1 autre résidu GlcNac à un résidu Man. Les galactosyl-transférases ajoutent 2 résidus galactose (Gal) à des résidus GlcNac. Les sialyltransférases ajoutent 2 résidus acide sialique à des

### Sous-unité alpha de l'hCG

ala-pro-asp-val-gln-asp-cys-pro-glu-cys-thr-leu-gln-glu-asp-pro-phe-phe-ser-gln-pro-gly-ala-pro-ile-leu-gln-cys-met-gly-  
 1 N  
 cys-cys-phe-ser-arg-ala-tyr-pro-thr-pro-leu-arg-ser-lys-lys-thr-met-leu-val-gln-lys-asn-val-thr-ser-glu-ser-thr-cys-cys-  
 31 N 52  
 val-ala-lys-ser-tyr-asn-arg-val-thr-val-met-gly-gly-phe-lys-val-glu-asn-his-thr-ala-cys-his-cys-ser-thr-cys-tyr-tyr-his-lys-ser  
 61 78 92

### Sous-unité beta de type II de l'hCG

ser-lys-glu-pro leu-arg-pro-arg-cys-arg-pro-ile-asn-ala-thr-leu-ala-val-glu-lys-glu-gly-cys-pro-val-cys-ile-thr-val-asn-  
 1 13 N 30  
 thr-thr-ile-cys-ala-gly-tyr-cys-pro-thr-met-thr-arg-val-leu-gln-gly-val-leu-pro-ala-leu-pro-gln-val-val-cys-asn-tyr-arg-  
 31  
 asp-val-arg-phe-glu-ser-ile-arg-leu-pro-gly-cys-pro-arg-gly-val-asn-pro-val-val-ser-tyr-ala-val-ala-leu-ser-cys-gln-cys-  
 61  
 ala-leu-cys-arg-arg-ser-thr-thr-asp-cys-gly-gly-pro-lys-asp-his-pro-leu-thr-cys-asp-asp-pro-arg-phe-gln-asp ser-ser-ser-  
 O O O O  
 ser-lys-ala-pro-pro-pro-ser-leu-pro-ser-pro-ser-arg-leu-pro-gly-pro-ser-asp-thr-pro-ile-leu-pro-gln  
 121 127 132 138 145

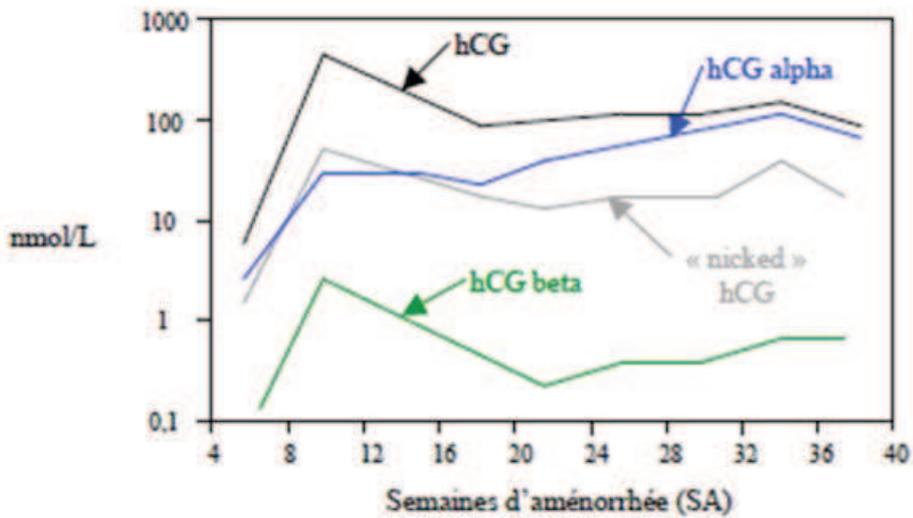
**Figure 31 : Localisation des sites de glycosylation sur les séquences protéiques des sous-unités alpha et beta de type II de l'hCG.**

 acides aminés qui diffèrent entre la sous unité beta de type I et II de l'hCG

résidus Gal. Le même mécanisme permet d'ajouter d'autres antennes à des résidus Man grâce à différentes GlcNac transférases. Ainsi, il existe une très grande hétérogénéité structurale de ces chaînes saccharidiques du fait de la variabilité du nombre et de longueur des antennes saccharidiques. Ceci se traduit par un polymorphisme de charges, l'acide sialique terminal étant électronégatif. Cette hétérogénéité structurale est majorée par le catabolisme hépatique et rénal subi par les glycoformes d'hCG. La O-glycosylation a lieu uniquement dans l'appareil de Golgi et consiste en un ajout d'une chaîne glycosylée entre l'hydroxyle anomérique d'un résidu  $\alpha$ -N-acétylgalactosamine et l'hydroxyle d'une sérine des extensions des sous-unités  $\beta$  de l'hCG. Ces glycanes sont plus courts et contiennent principalement des galactoses et des acides sialiques. Par ailleurs la composition de la chaîne glycosylée est très variable. L'étude de la glycosylation de la sous-unité beta de l'hCG en fonction de son type n'a pas été réalisée. On sait que les N-glycosylation ont lieu sur les asparagines en position 13 et 30 de la sous-unité  $\beta$  et que les O-glycosylation ont lieu sur les sérines en position 121, 127, 132 et 138. En revanche, on ignore si les changements d'acides aminés entre le type I et le type II amènent une variation au niveau des glycosylations, particulièrement pour les O-glycosylations qui ont lieu près du changement d'acide aminé en position 117 (Figure 31).

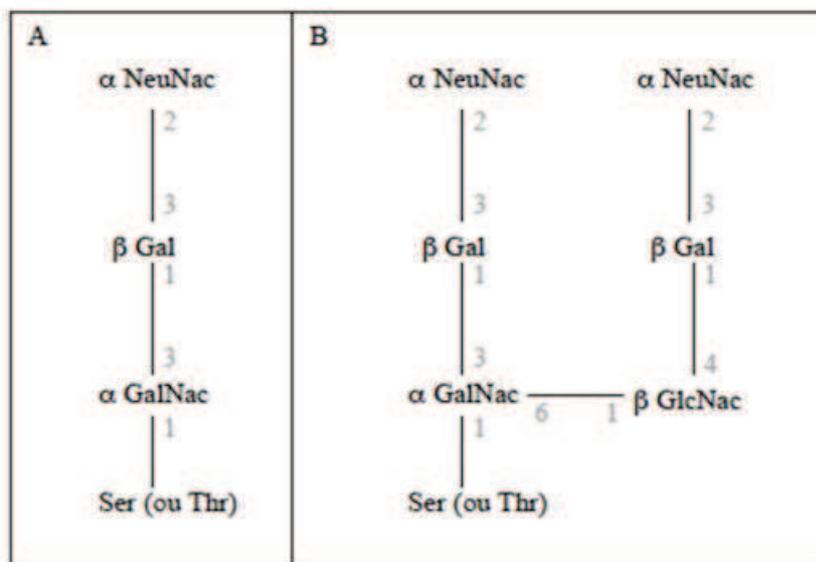
## 2) Rôle des glycosylations de l'hCG dans son activité biologique

Il a été montré que le profil glycanique de l'hCG varie au cours de la grossesse. Des formes très acides, donc riches en acides sialiques, ont été détectées avant 10 semaines d'aménorrhée (pI < 3,7), puis des formes à pH neutre au deuxième et troisième trimestre de la grossesse (Diaz-Cueto et coll, 1996). Le rôle des chaînes glycaniques sur l'activité biologique de l'hCG a été étudié par Moyle et coll., l'activité stéroïdogène et l'activation de l'AMP<sub>c</sub> ont été analysées individuellement comme réponses à une stimulation d'hCG (Moyle et coll, 1975). Le but de cette étude étant d'évaluer l'impact de la glycosylation sur l'action de l'hormone, l'hCG a été incubée avec diverses glycosidases puis les hCG « native » et « déglycosylée » ont été utilisées pour stimuler *in vitro* des cellules de Leydig. Les auteurs ont montré que l'hCG non glycosylée est capable de se fixer sur son récepteur et même d'être un inhibiteur compétitif de l'hCG native, suggérant que les chaînes glycaniques ne modifient pas l'affinité de l'hCG pour son récepteur. L'hCG « déglycosylée » active la sécrétion de testostérone avec la même efficacité qu'une hCG native. En revanche, aucune variation



**Figure 32 : Cinétique de la sécrétion de l'hCG et de ses sous-unités pendant la grossesse. D'après Cole, 1997.**

Concentration de l'hCG et de ses différents métabolites dans 300 échantillons de sérum depuis la 4<sup>ème</sup> jusqu'à la 40<sup>ème</sup> SA.



**Figure 33 : Hétérogénéité des O-glycosylation de l'hCG.**

A.O-glycanes présents dans les urines de femmes enceintes.

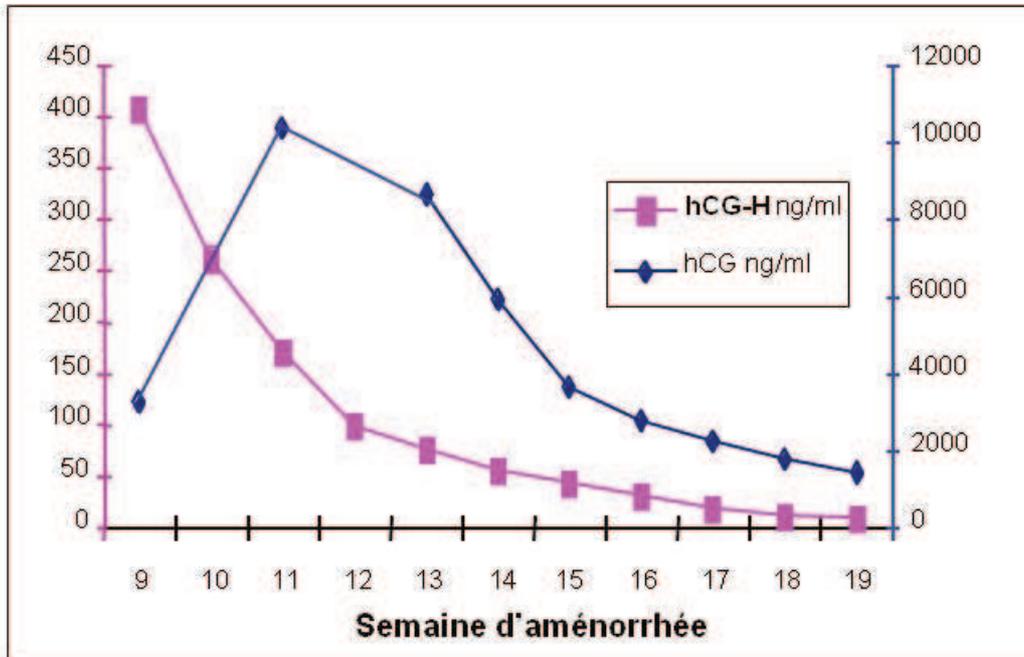
B.O-glycanes présents dans les urines de femmes portant un choriocarcinome.

d'AMP<sub>c</sub> n'a été observée (Moyle et coll, 1975). Ces dernières observations surprenantes ont été expliquées par les auteurs de la façon suivante : la quantité d'AMP<sub>c</sub> nécessaire et suffisante à la sécrétion de testostérone est trop faible pour qu'elle influe de façon détectable sur le pool d'AMP<sub>c</sub> total. L'hCG deglycosylée garderait une activité biologique qui semble indépendante de l'AMP<sub>c</sub>. En effet, il est envisageable que la transmission du signal soit médiée par la phospholipase C, qui est une voie alternative à celle de l'AMP<sub>c</sub> (détaillé ci-après). Sairam a montré que lorsque la sous-unité alpha est déglycosylée, le dimère alpha-beta se fixe sur le récepteur de l'hCG mais n'est plus capable de transmettre le signal (Sairam et Bhargavi, 1985). De même, lorsque l'hCG est désialylée par action d'une neuraminidase elle perd son activité biologique sans que sa liaison au récepteur ne soit affectée (Apparailly et Combarous, 1994). Ces études suggèrent que la présence des chaînes glycaniques n'est pas nécessaire à la liaison au récepteur mais est indispensable à la transmission du signal. Cependant, dans une autre étude, les auteurs ont montré que la capacité de l'hCG à stimuler la stéroïdogénèse dans un modèle de cellules de Leydig est beaucoup plus forte lorsque l'hCG est faiblement sialylée (Diaz-Cueto et coll, 1996).

### 3) Sécrétion de l'hCG

#### 3-a) Sécrétion de l'hCG totale, de la sous-unité alpha et de la sous-unité beta libre

La sécrétion d'hCG et de sa sous-unité beta libre dans le sérum maternel est très précoce. Elle débute dès la 2<sup>ème</sup> SA, elle augmente de façon exponentielle jusqu'à atteindre un pic à 10 SA : elle est maximale entre la 8<sup>ème</sup> et la 10<sup>ème</sup> SA. Puis elle diminue et atteint un plateau jusqu'à l'accouchement (Cf. Figure 32) alors que le taux d'hCG $\alpha$  augmente progressivement jusqu'au terme. Il faut noter qu'il existe une grande variabilité individuelle des taux circulants d'hCG. Les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  sont sécrétées sous forme libre par le placenta et sont dosables dans les urines et le sang maternels : la concentration sérique d'hCG $\alpha$  augmente tout au long de la grossesse et reflète vraisemblablement la masse placentaire (Cf. Figure 32). La cinétique de sécrétion de la sous-unité  $\beta$  suit celle de l'hCG totale avec un pic vers la 10<sup>ème</sup> SA, mais sa concentration sérique représente moins de 1% de l'hCG totale (Cole, 1997) (Figure 32). L'hCG $\alpha$  étant en excès par



**Figure 34 : Cinétique de la sécrétion de l'hCG et de l'hCG-H au premier et deuxième trimestre de la grossesse. D'après Guibourdenche et coll, 2010.**

Concentration de l'hCG et de l'hCG-H dans 147 échantillons de sérum maternel du premier trimestre et dans 392 échantillons de sérum maternel du second trimestre de grossesse.

rapport à l'hCG $\beta$ , la synthèse de la sous-unité  $\beta$  constitue donc l'étape limitante de la synthèse de l'hCG. Par ailleurs, il a été retrouvé dans des urines de femmes enceintes une sous-unité alpha libre hyperglycosylée appelée "*large free alpha*" (Blithe et Nisula, 1985). La différence de glycosylation provient d'une plus haute complexité des oligosaccharides constituant les N-glycanes, ce qui empêche la liaison entre la sous-unité beta et cette sous-unité alpha hyperglycosylée (Blithe, 1990). La majorité de la sous-unité alpha détectée dans les urines maternelles est de la "*large free alpha*" (Blithe et Nisula, 1985).

### 3-b) L'hCG-H

Des concentrations circulantes en hCG anormalement élevées, pendant la grossesse, peuvent être le signe de tumeurs trophoblastiques (môle hydatiforme ou choriocarcinome). Des études ont montré que l'hCG produite par un choriocarcinome est une forme hyperglycosylée, ce qui a mené à une nouvelle nomenclature, puisque cette hCG hyperglycosylée d'origine tumorale a été nommée hCG-H et l'antigène la différenciant spécifiquement de l'hCG « classique » est connu sous le nom d'ITA pour « *Invasive Trophoblast Antigen* ». En 1987, Cole détermine que la structure O-glycannique majoritairement retrouvée dans l'hCG urinaire de femmes enceintes est de type tri-saccharide NeuAc alpha 2-3Gal beta 1-3GalNAc (Cf. Figure 33) (Cole, 1987). En comparaison, il trouve une structure différente dans les urines de femmes portant un choriocarcinome avec une organisation hexa-saccharidique NeuAc alpha 2-3Gal beta 1-3(NeuAc alpha 2-3Gal beta 1-4 GlcNAc beta 1-6)GalNAc (Cf. Figure 33). Il génère alors, en collaboration avec Birken et collaborateurs, un anticorps, B152, capable de reconnaître spécifiquement la forme d'hCG sécrétée par les choriocarcinomes (Birken et coll, 1999). Cette forme d'hCG a également été retrouvée dans le sérum de femmes ayant une grossesse normale (Birken, 2005 ; Guibourdenche et coll, 2010). La sécrétion d'hCG-H est beaucoup plus faible que celle de l'hCG totale (1-12%) et sa cinétique est également différente : très forte en début de grossesse puis en diminution constante à partir de 9 SA jusqu'à 19 SA, où elle représentera moins de 1% de l'hCG totale (Figure 34). La sécrétion d'hCG-H par les trophoblastes a aussi été mise en évidence *in vitro* (Guibourdenche, et coll 2010). Plus précisément cette étude montre une différence significative de glycoformes d'hCG entre les trophoblastes villeux et extravilleux isolés à partir des mêmes placentas du premier trimestre et mis en cultures primaires. En effet, les trophoblastes extravilleux invasifs sécrètent 4 à 6 fois plus d'hCG-H que le syncytiotrophoblaste. Ces résultats

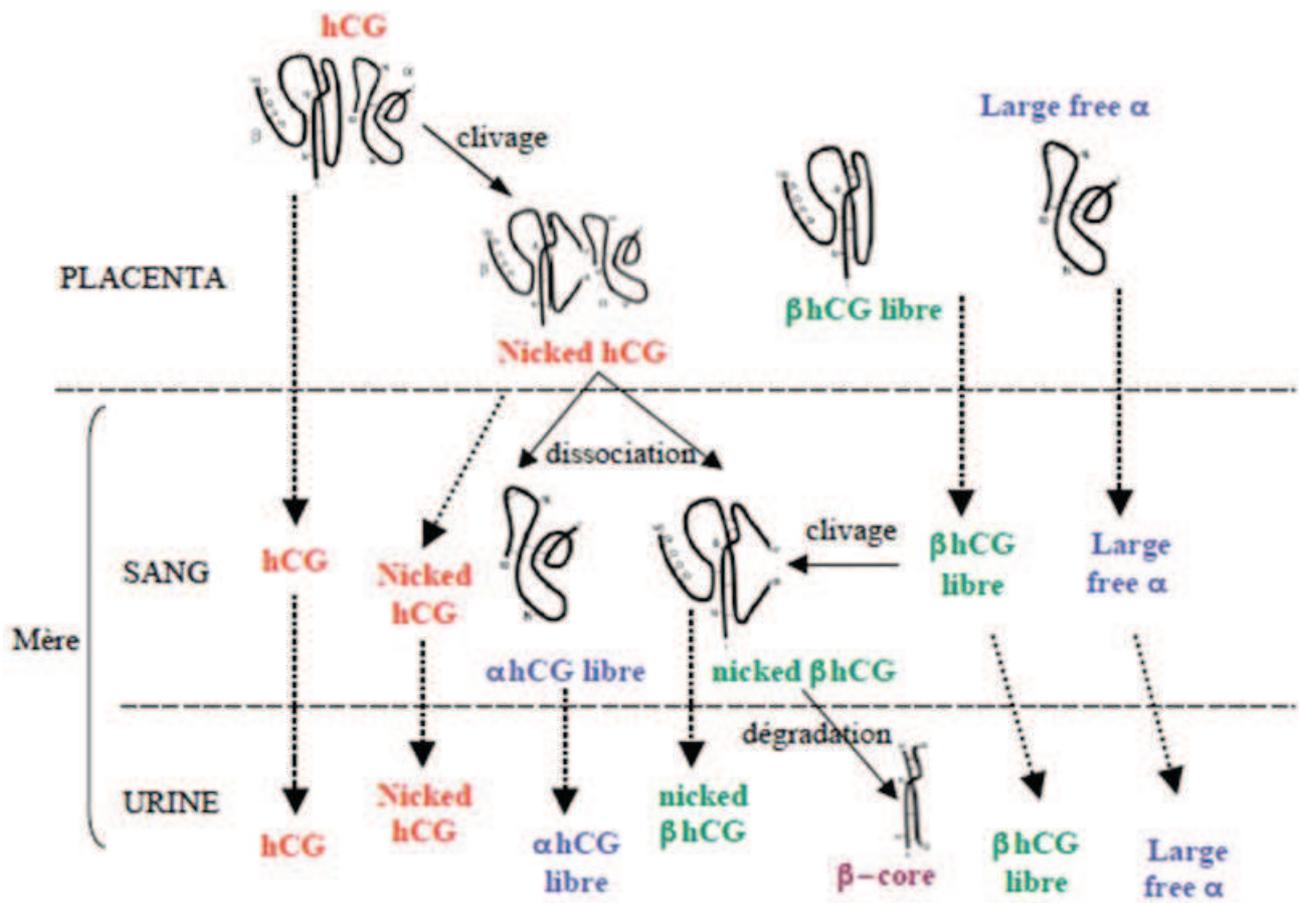


Figure 35 : Représentation des différentes formes d'hCG et de ses métabolites dans le placenta, le sang et les urines. D'après Cole, 1997.

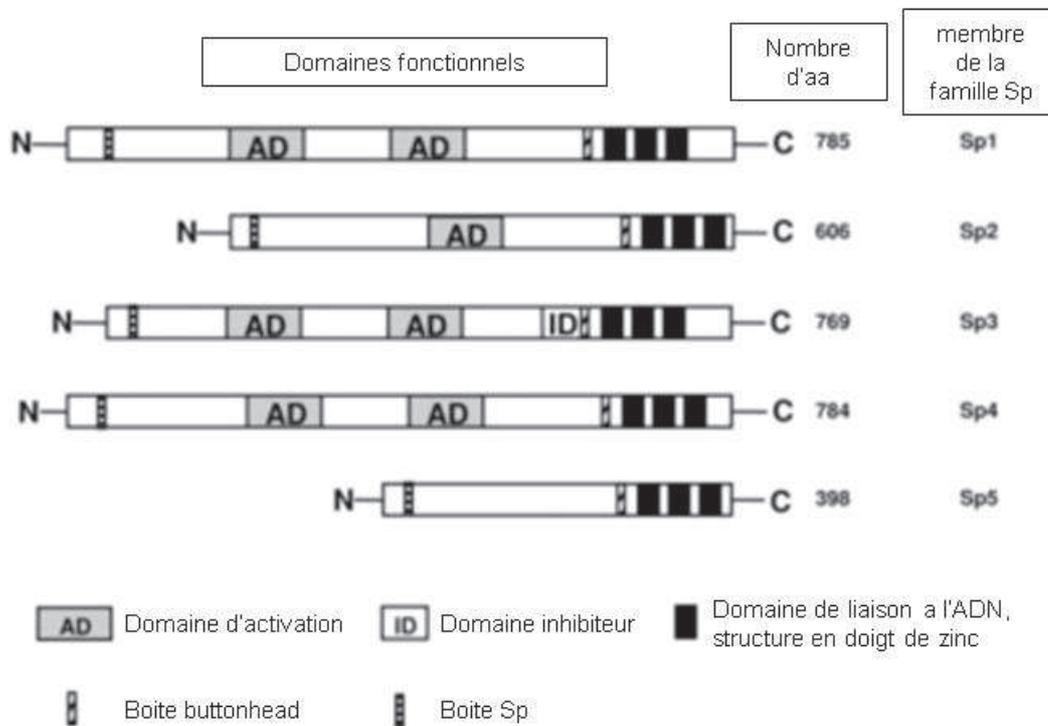
ont été confirmés *in situ* par immunohistologie placentaire où l'on n'observe aucun marquage de l'hCG-H dans le syncytiotrophoblaste mais les cytotrophoblastes sont marqués ainsi que les trophoblastes extravilleux invasifs. L'hCG-H mesurée dans le sérum des femmes enceintes a donc très probablement pour origine les cytotrophoblastes extravilleux endovasculaires (Guibourdenche, et coll 2010).

#### 4) Métabolisme de l'hCG

Le placenta sécrète donc quatre formes d'hCG : l'hCG totale, l'hCG-H, la sous-unité beta libre et la sous-unité alpha libre plus ou moins hyperglycosylée. Ces molécules se retrouvent dans le sang puis dans les urines de la mère où elles sont métabolisées (Cf. Figure 35) :

- la "*nicked hCG*" ou hCG tronquée résulte du clivage de la sous-unité beta entre les résidus 47 et 48 (Cole, 1997). Elle est détectable dans le sérum et dans les urines maternelles (Cole et coll, 1993). Le même pic de sécrétion dans le sérum maternel est retrouvé vers la 10<sup>ème</sup> SA (Cole, 1997). La "*nicked hCG*" est relativement instable et elle se dissocie rapidement dans le sérum pour donner de la sous-unité alpha libre et de la sous-unité beta tronquée, ou "*nicked free beta*" (Cole et coll, 1993).
- la sous-unité beta tronquée (*nicked  $\beta$  hCG*), résultant d'un clivage de la sous-unité beta (Bidart et coll, 1988; Cole et coll, 1991), est retrouvée dans le sérum et les urines de la mère. Ce métabolite serait le substrat qui permettrait la fabrication du  $\beta$ -core au niveau du rein (Cole et coll, 1993; Kardana et Cole, 1994).
- le  $\beta$ -core est le produit terminal de dégradation de l'hCG. Il est constitué des résidus 6 à 40 et 55 à 92 de la sous-unité beta liés entre eux par 5 ponts disulfure (Birken et coll, 1991), et correspond à 1/5 de la masse moléculaire de l'hCG. Le  $\beta$ -core est quasi indétectable dans le serum (Alfthan et Stenman, 1990 ; Birken et coll, 1991). En revanche, il est majoritaire dans les urines (Cole et coll, 1993 ; McChesney et coll, 2005). C'est pourquoi certains auteurs ont suggéré que le  $\beta$ -core serait produit au niveau du rein (Alfthan et Stenman, 1990 ; Birken et coll, 1988 ; Lefort et coll, 1986). La cinétique de sécrétion du  $\beta$ -core urinaire suit celle de l'hCG sérique avec un pic vers la 10<sup>ème</sup> SA (Cole, 1997).

Enfin, il a été proposé le schéma de métabolisme suivant (Cole et coll, 1993 ; Kardana et Cole, 1997) : hCG  $\rightarrow$  *nicked hCG*  $\rightarrow$  *nicked free  $\beta$*   $\rightarrow$   $\beta$ -core.



**Figure 36 : Caractéristiques des membres de la famille Sp.** D'après Safe et coll, 2005.

Les domaines dans la région C-terminale sont présents et conservés chez tous les membres de la famille Sp (Sp1-Sp5) alors que la région N-terminale est moins conservée en particulier chez Sp5, chez qui elle est tronquée.

## C. La régulation de l'expression de l'hCG

L'hCG est régulée par le taux intracellulaire d'AMP<sub>c</sub> des cellules trophoblastiques (Feinman et coll, 1986 ; Husa et coll, 1978). En effet, l'AMP<sub>c</sub> induit une augmentation des ARN<sub>m</sub> de la sous-unité  $\alpha$  et une augmentation plus tardive des ARN<sub>m</sub> de la sous-unité  $\beta$  et joue également un rôle sur la stabilité de ces ARN<sub>m</sub> (Fuh et coll, 1989). L'AMP<sub>c</sub> semble donc réguler la transcription des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  par des mécanismes différents (Albanese et coll, 1991) impliquant comme facteurs de transcription AP-2, c-Jun et SP-1. AP-2 et SP-1 activent la transcription des gènes alpha et beta (Johnson et coll, 1997 ; Knöfler et coll, 2004 ; Knöfler et coll, 2000 ; LiCalsi et coll, 2000).

### 1) Les facteurs de transcription Sp

La famille des facteurs de transcription Sp comprend cinq membres : Sp1, Sp2, Sp3, Sp4 et Sp5. Les facteurs Sp1, Sp2, Sp3 et Sp4 ont des structures très similaires et ils se lient sur l'ADN au niveau de boîtes GC (GGGGCGGGC) et GT (GGGTGTGGC) hautement conservées (Hagen et coll, 1992). Sp5, lui, présente une plus faible identité avec les autres membres de la famille Sp même s'il se lie également à des éléments de réponse riches en GC (Figure 36). Sp1 et Sp3 sont des facteurs de transcription ubiquitaires et sont abondants dans de nombreuses lignées cellulaires (Ishikawa, CV-1, HeLa) alors que Sp4 est principalement exprimé dans le cerveau (Hagen et coll, 1994).

Il a été décrit que Sp1, Sp2 et Sp4 sont de puissants transactivateurs dans les lignées de cellules de mammifères tandis que Sp3 ne semble avoir aucun effet positif sur l'activité de promoteurs Sp dépendants. En revanche, Sp3 inhibe fortement l'activation transcriptionnelle médiée par Sp1. Cet effet inhibiteur de Sp3 est dû à la compétition avec Sp1 au niveau de leur site de liaison commun sur l'ADN (Hagen et coll, 1994). Il semblerait donc que le *ratio* des molécules Sp1 et Sp3 dans une cellule contribue à la régulation transcriptionnelle des gènes ayant des sites de liaison Sp en modulant leur degré d'activation. Sp3 semble être le membre répresseur de la famille Sp.



## 2) Les facteurs de transcription AP-2

La famille des facteurs de transcription AP-2 comprend trois isoformes : AP-2  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . Ces trois isoformes ont une masse moléculaire comprise entre 48 et 52 kDa (Figure 37) et elles reconnaissent la séquence consensus suivante : 5'-GCCCCAGGC-3', séquence très similaire à la séquence du site TSE (Williams et Tjian, 1991). Chez la souris les trois membres de la famille AP-2 sont exprimés dans les tissus trophoblastique et embryonnaire. Cette expression persiste dans les cellules trophoblastiques comme dans les cellules embryonnaires où le profil d'expression des membres de la famille AP-2 est mieux connu. Il a également été montré que le taux d'AP-2 $\beta$  était très faible à la fois dans le placenta et chez l'embryon alors qu'AP-2 $\gamma$  est très abondamment exprimé dans le placenta ce qui suggère un rôle clé de ce facteur de transcription dans la régulation des gènes placentaires (LiCalsi et coll, 2000). Chez la femme, il a été montré qu'AP-2 $\alpha$  et AP-2 $\gamma$  étaient présents au troisième trimestre dans le placenta et qu'ils jouaient un rôle important dans la différenciation trophoblastique (Cheng et coll, 2004,). Ils ont en particulier été identifiés dans le complexe protéique liant les sites TSE sur les promoteurs des gènes des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  de l'hCG (Johnson et coll, 1997 ; LiCalsi et coll, 1999).

## 3) Rôle des facteurs de transcription Sp et AP-2 dans la régulation de l'expression de l'hCG dans les trophoblastes villosités

Comme il a été décrit dans le chapitre concernant les gènes de l'hCG, le promoteur de la sous-unité  $\alpha$  contient de nombreux éléments de réponses spécifiques du placenta pouvant fixer ces facteurs de transcription. Par exemple le site TSE qui lie les protéines AP-2 (Johnson et Jameson, 1999) et les deux sites CRE qui lient les protéines ATF/CREB. Il a été montré que seules les séquences CRE et TSE étaient nécessaires à l'induction de la transcription du gène de la sous-unité alpha dans les cytotrophoblastes villosités (Knöfler et coll, 2000). Actuellement, le promoteur le mieux connu de la sous-unité beta de l'hCG est celui du gène CG $\beta$ 5. De nouveau, plusieurs séquences ont été mises en évidence comme deux sites CRE, le premier fixant probablement Sp1, plusieurs sites TSE fixant le facteur AP-2, ou

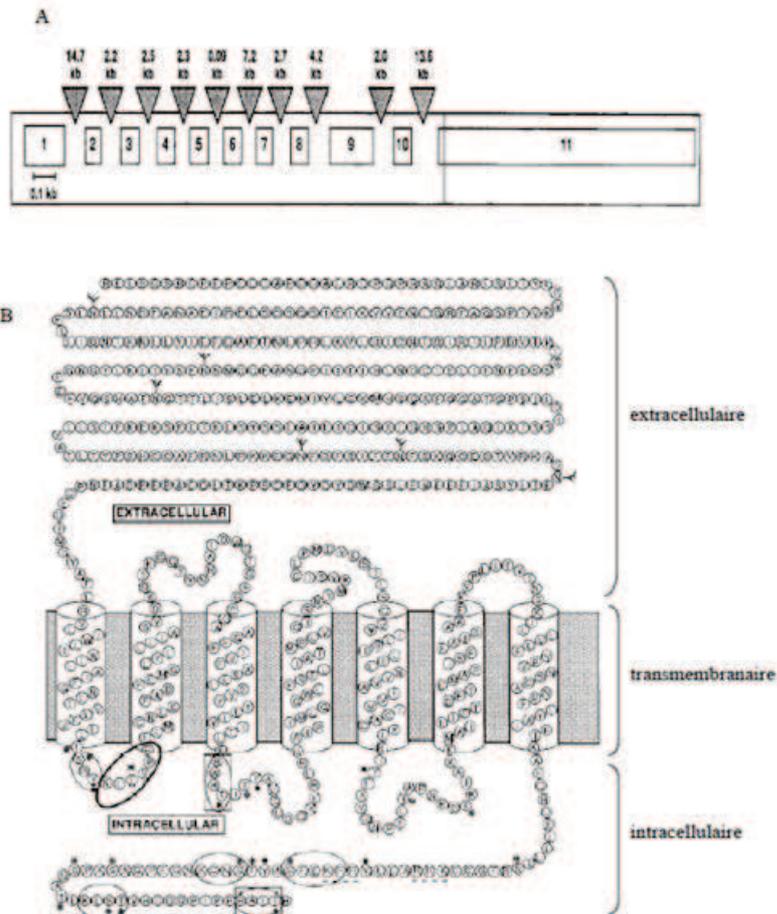


un site de fixation spécifique des protéines Sp (Johnson et Jameson 1999). Des expériences utilisant plusieurs constructions du promoteur CG $\beta$ 5 transfectées dans des cytotrophoblastes vilieux à terme ont montré que la fixation de trois AP-2 et de deux Sp étaient nécessaires à l'induction de la transcription de CG $\beta$  (Johnson et Jameson, 1999 ; Knöfler et coll, 2004 ; LiCalsi et coll, 2000).

#### 4) Autres facteurs régulant l'expression de l'hCG dans les trophoblastes vilieux

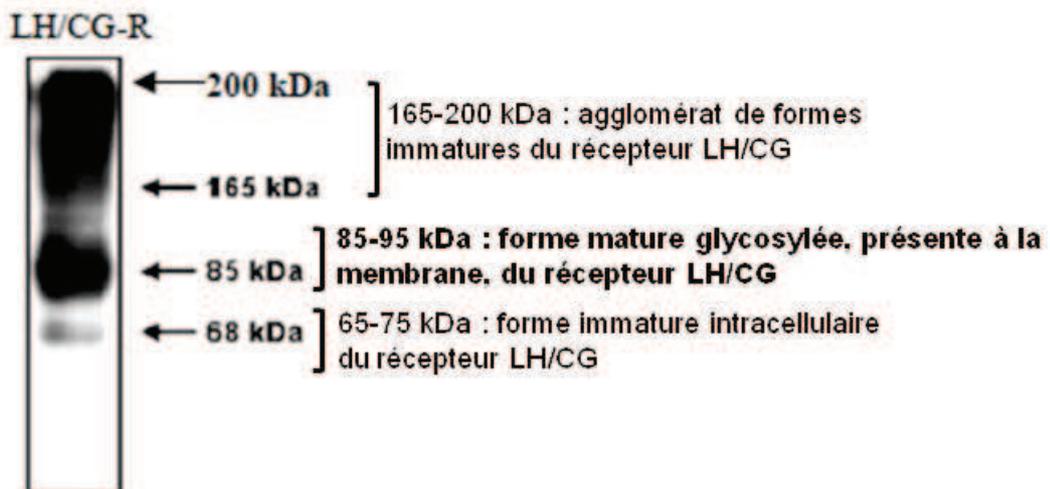
L'hCG est également régulée par des facteurs qui stimulent ou inhibent la différenciation des cytotrophoblastes vilieux en syncytiotrophoblaste et qui induisent donc de façon indirecte l'augmentation ou non de la synthèse et de la sécrétion d'hCG :

- Les glucocorticoïdes (Wilson et Jawad, 1982), le 17 $\beta$ -oestradiol (Cronier et coll, 1999a) et la progestérone (Cronier et coll, 1999a) favorisent la production d'hCG. La production d'hCG est capable aussi de s'autoréguler par l'intermédiaire de ses récepteurs exprimés par le syncytiotrophoblaste (Cronier et coll, 1994 ; Shi et coll, 1993).
- Les facteurs de croissance et les cytokines régulent l'hCG. L'EGF exerce un effet concentration dépendante sur la sécrétion d'hCG, dont le nombre de récepteurs augmente au cours de la différenciation (Alsat et coll, 1993 ; Morrish et coll, 1987). L'IL-1 et le TNF- $\alpha$  stimulent l'IL-6 qui active également la libération de l'hCG tandis que le TGF $\beta$ 1 inhibe l'action de ces cytokines et la production d'hCG (Matsuzaki, 1992 ; Morrish et coll, 1991).
- Le GnRH (*Gonadotropin releasing hormone*), exprimé par les trophoblastes (Currie et coll, 1981), stimule la sécrétion d'hCG par des explants issus de placentas à terme (Siler-Khodr et Khodr, 1981) ainsi que l'expression de la  $\beta$ hCG dans la lignée de choriocarcinome NUCC-3 (Shi et coll, 1994).
- Les esters de phorbols et les acylglycérols stimulent la PKC et augmentent également l'accumulation des ARN<sub>m</sub> des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  de l'hCG dans les cytotrophoblastes (Andersen et coll, 1988).



**Figure 38 : Le récepteur de l'hCG (LH/CG).** D'après Segaloff et Ascoli, 1993

Schéma représentant la structure du gène (A) et de la protéine (B) du LH/CG-R. Le gène contient 11 exons (carrés) et 10 introns (triangles). La protéine est composée de trois domaines : une partie extracellulaire codée par les exons 1 à 10 et une partie transmembranaire et intracellulaire codées par l'exon 11.



**Figure 39 : Western Blot du récepteur de l'hCG (LH/CG).** D'après Ascoli, 2002

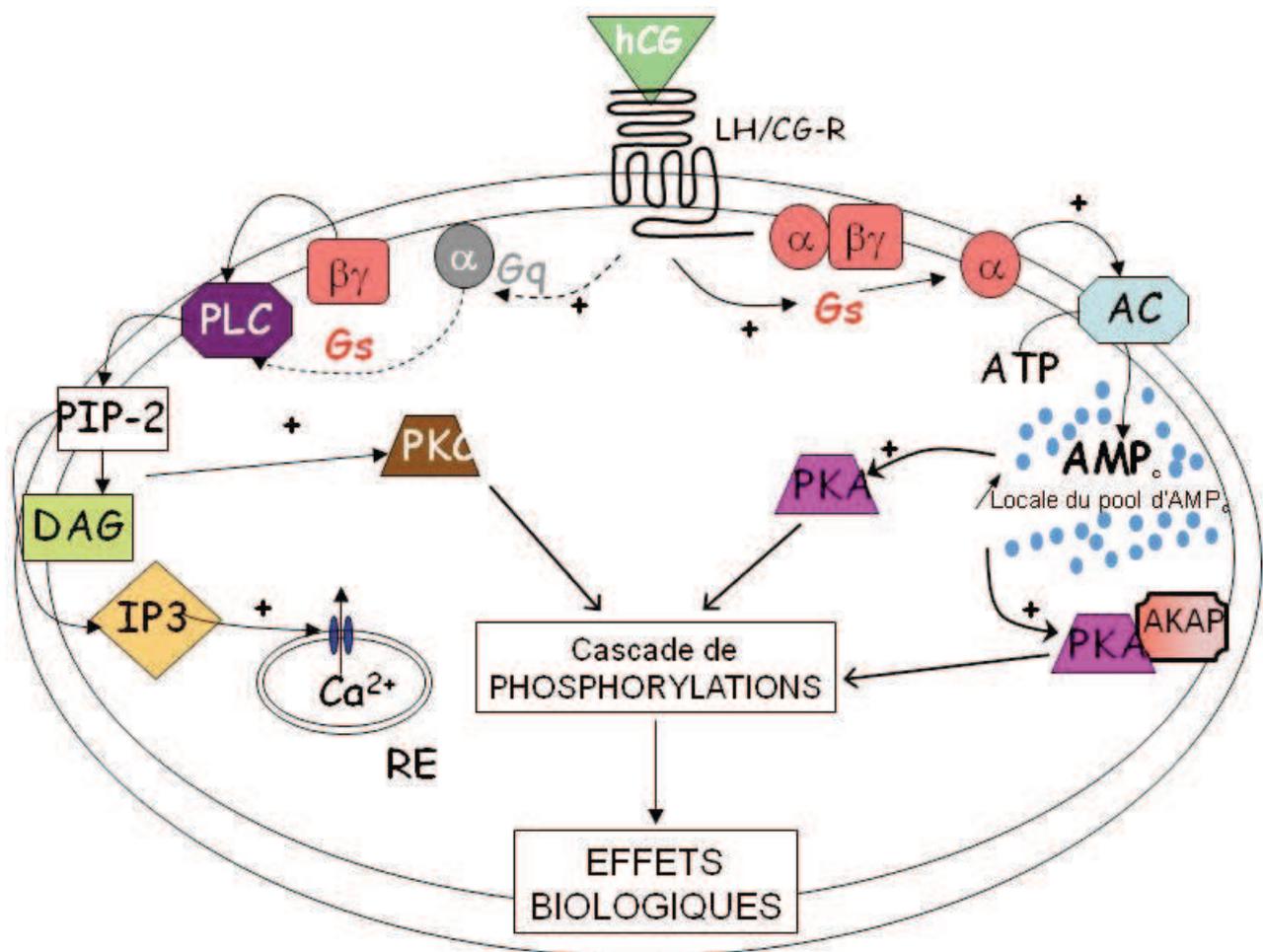
Western Blot réalisé sur un extrait protéique totale de cellules 293 transfectées temporairement avec des ADN<sub>c</sub> du récepteur LH/CG.

- La pression partielle en oxygène module la production d'hCG. En effet, une hypoxie modérée (8 % d'oxygène) imposée à des cytotrophoblastes vilieux en culture primaire issus d'un placenta à terme entraîne une diminution de la fusion et parallèlement de la sécrétion d'hCG et d'hPL (Alsats et coll, 1996).
- La leptine stimule la sécrétion d'hCG par des cytotrophoblastes vilieux du premier et du troisième trimestre de la grossesse maintenus en culture primaire (Cameo et coll, 2003 ; Chardonnens et coll, 1999).
- Les agonistes pharmacologiques du récepteur nucléaire RXR $\alpha$  entraînent une augmentation de la sécrétion d'hCG par des cytotrophoblastes vilieux en culture alors que ceux du récepteur RAR $\alpha$  inhibent cette sécrétion (Guibourdenche et coll, 1998). De plus, l'hétérodimère PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$  est également impliqué dans le contrôle de la sécrétion de l'hCG puisque lorsqu'il est activé par ses ligands naturels ou synthétiques il augmente le taux de transcrits de la sous-unité  $\beta$  et la sécrétion d'hCG totale à terme (Tarrade et coll, 2001a).

#### D. Le récepteur de l'hCG

Il existe un récepteur unique capable de lier à la fois la LH et l'hCG, mais ce récepteur a plus d'affinité pour l'hCG que pour la LH (Rao, 1979). Il peut aussi lier l'hCG-H mais pas les sous-unités libres de l'hCG ou l'hCG tronquée (*nicked hCG*) (Cole, 2009). Les récepteurs LH/CG sont localisés sur les cellules lutéales ovariennes, les cellules déciduales, les cellules musculaires lisses utérines, les cellules endothéliales, sur les cytotrophoblastes vilieux (Shi et coll, 1993) ou extravilleux (Tao et coll, 1995 ; Handschuh et coll, 2007) mais aussi dans des sites extraplacentaires (Rodway et Rao, 1995).

C'est une glycoprotéine de 675 acides aminés dont le gène est localisé sur le chromosome 2p21 et comprend 11 exons et 10 introns. Les exons 1 à 10 codent la partie extracellulaire du récepteur et l'exon 11 code les parties transmembranaire et intracellulaire (Figure 38). L'étude de la séquence de ce gène et des expériences de clonage ont permis de mettre en évidence que le récepteur LH/CG appartenait à la large famille des récepteurs transmembranaires couplés aux protéines G (McFarland et coll, 1989). La protéine mature présente à la membrane



**Figure 40 : Représentation schématique des voies de signalisation activées par le récepteur LH/CG après fixation de son ligand (ici hCG).**

Gs : petite protéine G de type s, Gq : petite protéine G de type q, ATP : adénosine tri-phosphate, AMPc : adénosine mono-phosphate cyclique, PKA : protéine kinase A, AKAP : *A-kinase ankorng protein*, DAG : di-acyl glycérol, IP3 : inositol-triphosphate, Ca<sup>2+</sup> : ion calcium, PKC : protéine kinase C, RE : réticulum endoplasmique.

Le LH/CG-R active la voie de l'adénylate cyclase (AC) et celle de la phospholipase C (PLC) en activant la protéine Gs. La protéine Gq est potentiellement activée par le récepteur de l'hCG.

contient 6 sites de N-glycosylation sur sa partie extracellulaire et a une masse moléculaire apparente de 85 à 95 kDa. La migration électrophorétique du récepteur à l'hCG donne lieu à trois bandes majoritaires qui ont été définies comme suit (Cf. Figure 39) : une bande à 65-75 kDa qui correspondrait à la forme immature du récepteur encore intracellulaire; une bande à 85-95 kDa qui serait la forme mature glycosylée et membranaire du récepteur car elle est sensible à des glycosidases comme la neuraminidase ou la peptide-N-glycosidase-F qui agissent sur des sucres matures et une bande à 165-200 kDa qui représenterait un agglomérat de formes immatures du récepteur (Ascoli et coll, 2002).

La liaison d'un de ses ligands sur le récepteur LH/CG active la petite protéine G de type Gs et aboutit à la stimulation d'une adénylate cyclase (AC), qui catalyse la conversion de l'adénosine triphosphate (ATP) en AMP<sub>c</sub> en élevant ainsi localement son niveau intracellulaire. Il s'en suit une activation de la PKA qui peut être soit libre soit liée à un complexe multiprotéique organisé par une AKAP (*A-kinase-anchoring protein*), aboutissant à une cascade de phosphorylation et d'activation des éléments de réponse à l'AMP<sub>c</sub>. Le récepteur LH/CG a été identifié parmi les premiers récepteurs couplés aux protéines G capable d'activer à la fois l'adénylate cyclase et la phospholipase C (PLC) (Hirsch et coll, 1996 ; Liu et coll, 2003). En effet le récepteur LH/CG active principalement la voie de l'AMP<sub>c</sub>/PKA après la liaison de son ligand mais il a été mis en évidence qu'il pouvait aussi activer le système du second messager inositol triphosphate (IP3) via la PLC et ainsi augmenter le taux intracellulaire de calcium (Figure 40). Alors qu'il est bien établi que le récepteur LH-CG active directement la protéine Gs, l'identité des autres protéines G activées par le récepteur LH/CG reste discutée. Des études de transfection du récepteur murin suggèrent que l'activation de la PLC serait médiée par les sous-unités Gβ/γ libérées lors de l'activation de la protéine Gs par le LH-R (Herrlich et coll, 1996). Cependant, même si ce fait reste à démontrer, il semble possible que le LH/CG-R active aussi la protéine Gq, qui est l'activateur classique de la PLC (Ascoli et coll, 2002).

Le récepteur LH/CG possède des caractéristiques spécifiques par rapport aux autres récepteurs aux protéines G (GPCR), en particulier en ce qui concerne sa régulation post-traductionnelle. Alors que la dissociation de l'agoniste des autres GPCR fait partie intégrante du processus de désensibilisation, la haute affinité de la liaison de la LH ou de l'hCG au récepteur LH/CG aboutit à ce que l'on peut considérer comme une activation irréversible du récepteur jusqu'à son internalisation. Les récepteurs internalisés par endocytose peuvent alors soit être recyclés à la membrane plasmique (voix préférentielle chez l'homme) soit être dégradé dans les lysosomes (Ascoli et coll, 2002).



## E. Le rôle physiologique de l'hCG

L'hCG est le premier message soluble d'origine trophoblastique vers l'organisme maternel. Elle permet la transformation du corps jaune ovarien cyclique en corps jaune gravidique, assurant le maintien de la sécrétion de progestérone par l'ovaire pendant les six premières semaines de la grossesse, jusqu'à ce que le placenta prenne le relais. La progestérone a un rôle myorelaxant sur le myomètre, ce qui contribue au maintien de la grossesse (Ambrus et Rao, 1994). Outre cette action endocrine bien connue, l'hCG est impliquée dans d'autres processus favorisant la grossesse :

- Elle favorise l'implantation de l'embryon.
- Elle participe à la régulation immunitaire permettant l'« allogreffe » du fœtus
- Elle participe au contrôle de la différenciation trophoblastique.
- Elle stimule l'angiogenèse.

### 1) Rôle de l'hCG dans l'implantation embryonnaire

Dès le stade 2 cellules, le blastocyste exprime l'ARN<sub>m</sub> de l'hCG beta (Juriscova et coll, 1999) et cette hCG est sécrétée 7 jours après la fécondation (Lopata et Hay, 1989). Cette hCG module l'activité des cellules endométriales avant l'implantation, stimule l'angiogenèse endométriale maternelle et ainsi jouerait un rôle critique dans l'établissement d'un environnement favorable à l'implantation (Berndt et coll, 2006 ; Cameo et coll, 2004). Dans les cellules myométriales, l'hCG induit non seulement la prolifération cellulaire mais aussi réduit leur contractibilité via la régulation des jonctions communicantes entre les cellules musculaires lisses et du calcium intracellulaire, favorisant ainsi l'implantation (Kornyei et coll, 1993).



## 2) Les effets de l'hCG sur l'immunité

Une étude récente de protéomique a démontré l'influence de plusieurs molécules produites par les trophoblastes régulant la tolérance immunitaire de la mère. Parmi ces molécules, l'hCG est impliquée dans l'inhibition des lymphocytes T (Dong et coll, 2008). La tolérance immunitaire transitoire pendant la gestation est en partie due à la présence de cellules T régulatrices dont le nombre serait augmenté par l'hCG (Zenclussen et coll, 2006). Une autre étude a montré que l'hCG serait un régulateur de la prolifération cellulaire des cellules NK utérines, via une voie de signalisation impliquant un récepteur au mannose (CD206), récepteur appartenant à la famille des récepteurs lectine de type-c, et non le récepteur classique de l'hCG, le récepteur LH/CG (Kane et coll, 2009). Enfin, une étude suggère que l'hCG jouerait un rôle clé dans le développement d'une tolérance immunitaire locale par l'intermédiaire de la mort cellulaire programmée médiée par le système FAS/FAS-L (Kayisli et coll, 2003). L'hCG régule positivement FAS-L dans l'endomètre, permettant l'invasion trophoblastique mais aussi induisant l'apoptose des lymphocytes T et des cellules endométriales.

## 3) hCG et angiogenèse

En 2002, l'hCG recombinante est décrite comme un nouveau facteur angiogénique dans un modèle de cellules microvasculaires utérines (Zygmunt et coll, 2002 ; Islami et coll, 2003). Plus récemment, il a été confirmé l'effet angiogénique de l'hCG recombinante et d'origine urinaire sur les cellules endothéliales et dans des modèles 3D d'angiogenèse, phénomène médié par le récepteur LH/CG (Berndt et coll, 2006 et 2009). Herr et coll, ont aussi montré que l'hCG stimulait la prolifération des cellules endothéliales microvasculaires placentaires humaines (HPMVEC) de manière dose dépendante (Herr et coll, 2007). Des travaux récents ont montré que l'hCG stimulait l'expression et la sécrétion du facteur angiogénique EG-VEGF dans des cultures d'explants placentaires et des cultures primaires de cytotrophoblastes villosités (Brouillet et coll, 2011). Ce facteur ayant lui même été récemment mis en évidence comme un nouveau facteur angiogène du placenta, agissant spécifiquement sur les HPEC, cellules endothéliales des capillaires fœtaux de la villosité chorale (Brouillet et coll, 2010).



#### 4) hCG et différenciation trophoblastique

L'hCG exerce des effets autocrines et paracrines sur la différenciation du cytotrophoblaste villositaire en syncytiotrophoblaste, comme démontré *in vitro* par plusieurs équipes (Cronier et coll, 2001 ; Shi et coll, 1993). L'hCG a aussi été impliquée dans la différenciation du trophoblaste extravillous prolifératif en cellule invasive. Tout d'abord en 1998, Zygmunt et coll. utilisent la lignée JEG-3 et montrent que de l'hCG d'origine urinaire active l'invasion de cellules de choriocarcinome (Zygmunt et coll, 1998a) mais ces résultats ont été controversés, comme on l'a vu précédemment, car il a été mis en évidence une contamination de l'hCG d'origine urinaire par de l'EGF (Yarram et coll, 2004). Puis en 2005, ils montrent que l'hCG recombinante (Sigma) est capable de stimuler la migration des lignées de cytotrophoblastes extravillous HTR8/SV neo par la voie de l'IGF-II (Zygmunt et coll, 2005). *In vivo*, des études rapportent que l'hCG active la MMP-9 (Litch et coll, 2001). Enfin, *in vitro* il a été mis en évidence que l'hCG sécrétée dans les surnageants de cultures primaires de cytotrophoblastes extravillous, qui contiennent une proportion d'hCG-H, stimule l'invasion alors que celle sécrétée par des cytotrophoblastes villositaires n'avait aucun effet, suggérant ainsi que cet effet est indépendant de la voie impliquant le récepteur LH/CG (Handschuh et coll, 2007).



### III - Les pathologies de la grossesse

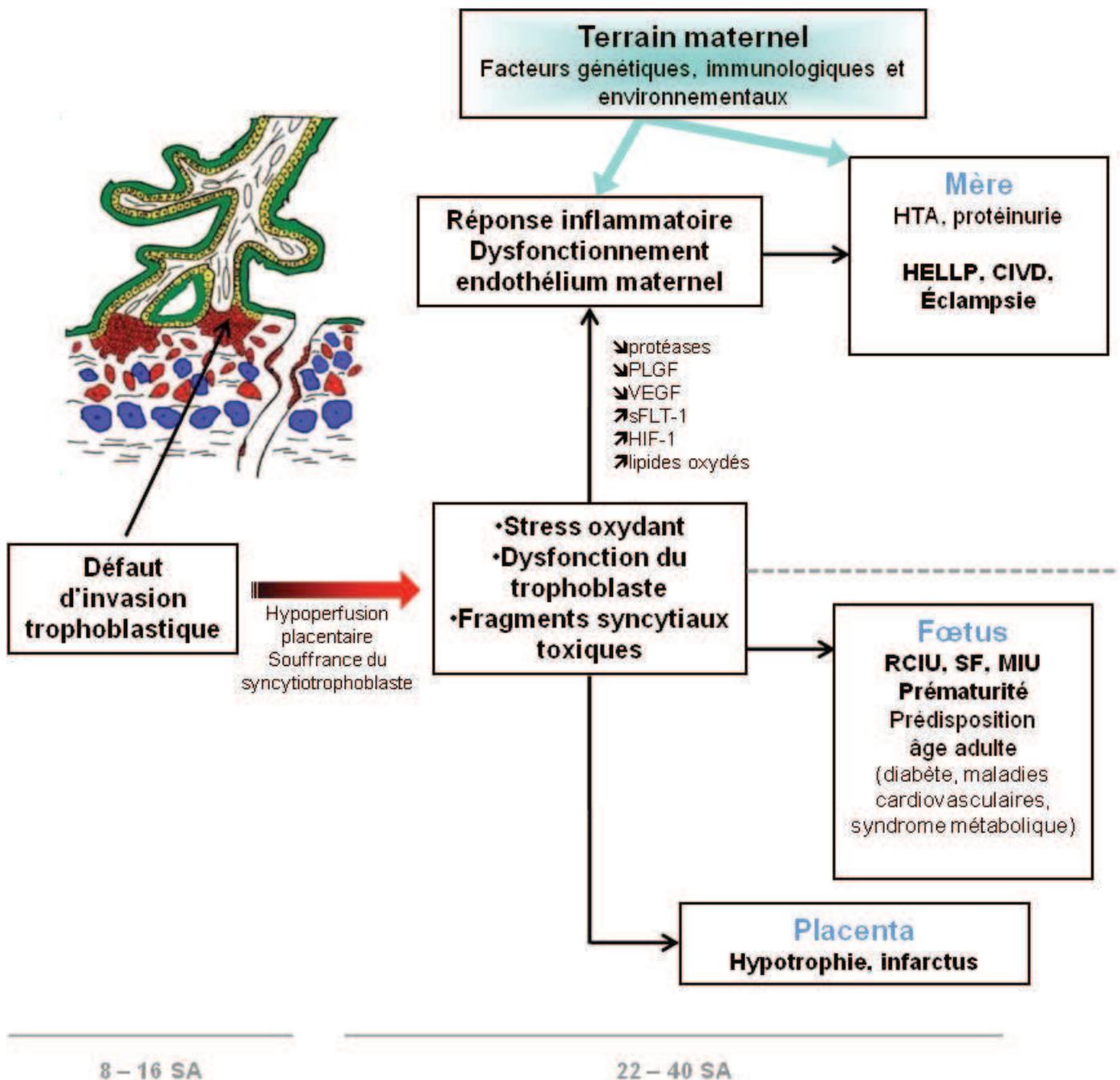
#### A. La pré-éclampsie

La pré-éclampsie, également appelée toxémie gravidique ou syndrome toxémique, est une pathologie obstétricale spécifique à l'espèce humaine. Elle est liée à un dysfonctionnement placentaire car elle ne survient qu'au cours de la grossesse et disparaît après l'ablation du placenta. De plus, elle peut avoir lieu en absence de fœtus (en cas de complications de grossesse molaire) et elle est indépendante de l'environnement utérin (elle peut survenir en cas de grossesse abdominale). La pré-éclampsie complique, suivant les pays, 0,5 à 7 % des grossesses. En France, elle survient dans 3 à 7% des grossesses chez les femmes primipares et dans 1 à 3% des cas chez les patientes multipares. C'est une pathologie gravidique sévère entraînant une mortalité et morbidité fœtale persistante et également des accidents maternels de type hématome rétroplacentaire, HELLP syndrome (*Hemolysis, elevated liver enzymes, low platelets count*) et éclampsie. Le pronostic vital est engagé en l'absence de traitement, lequel est fondé sur l'arrêt de la grossesse et la délivrance du placenta.

Ainsi, du fait de ses conséquences périnatales, la pré-éclampsie représente une cause majeure de prématurité sévère et est un important problème de santé publique.

##### 1) Définition clinique

La pré-éclampsie est définie comme l'association de deux symptômes maternels : une hypertension, une protéinurie et qui peut être accompagnés d'œdèmes. Il s'agit d'une hypertension *de novo* survenant après 20 semaines d'aménorrhée et se normalisant dans les trois mois après l'accouchement. L'hypertension artérielle est définie par une tension artérielle (TA) systolique supérieure à 140 mm Hg et/ou par une TA diastolique supérieure à 90 mm Hg. La protéinurie est considérée comme significative au-delà de 0,3 g dans des urines de 24 heures.



**Figure 41 : Schéma simplifié de la physiopathologie de la prééclampsie.**

RCIU : retard de croissance intra-utérin, SF : souffrance foetale, MIU : mort *in utero*, HELLP : *Hemolysis Elevated Liver Low Platelet*, CIVD : Coagulation intravasculaire disséminée, HTA : hypertension artérielle, PLGF : *placental growth factor*, VEGF : *vascular endothelial factor*, sFLT-1 : récepteur soluble du VEG, HIF-1 : *Hypoxia Inducible Factor*

## 2) Physiopathologie

La physiopathologie de la pré-éclampsie reste encore mal connue. Cependant, les données moléculaires récentes associées aux données anatomopathologiques plus anciennes permettent de construire un schéma physiopathologique incluant plusieurs étapes successives (Cf. figure 41). Le schéma physiopathologique classique comporte :

- un défaut d'invasion trophoblastique et de remodelage des artères spirallées utérines, aboutissant à une diminution de l'afflux sanguin maternel vers le placenta,
- une hypoxie placentaire et un stress oxydant induisant un dysfonctionnement généralisé du syncytiotrophoblaste et la libération de fragments syncytiaux toxiques dans la circulation maternelle,
- un dysfonctionnement de l'endothélium maternel lié aux diverses substances libérées par le placenta dans la circulation maternelle (protéases, cytokines, sFlt1 (*Soluble fms-like tyrosine kinase-1* / Récepteur soluble au VEGF), lipides oxydés) conduisant aux signes cliniques de la maladie.

### 2-a) Le défaut d'invasion trophoblastique

Une particularité de la placentation humaine est son haut degré d'invasion trophoblastique, jusqu'au tiers supérieur du myomètre et le remodelage de ses artères utérines pendant le premier trimestre. En cas de pré-éclampsie on observe une altération de l'invasion trophoblastique. L'invasion trophoblastique orientée vers la décidue est préservée, par contre l'invasion des artères spirallées utérines est peu ou pas observée. Meekins et coll montrent qu'en cas de pré-éclampsie l'invasion des artères déciduales par les cytotrophoblastes extravilleux diminue de 56% et l'invasion des artères endométriales passe de 78% à 18% (Meekins et coll, 1994). L'absence d'invasion de ces artères par les trophoblastes extravilleux entraîne l'absence de remodelage des artères et une persistance des cellules endothéliales et musculaires lisses. Ainsi, les artères utérines, lors d'une pré-éclampsie, ont un diamètre plus petit et conservent leur potentiel vasoconstricteur (Redman, 1991) à l'origine de l'hypoxie placentaire. Le diagnostic de la pré-éclampsie étant posé postérieurement au phénomène d'invasion, l'identification des facteurs responsables de ce défaut d'invasion se révèle difficile.



Ainsi, les anomalies observées en cas de pré-éclampsie ne permettent pas d'établir si elles sont la cause ou la conséquence de ce syndrome. La plupart des facteurs impliqués dans le contrôle de l'invasion trophoblastique cités ci-dessus (Cf. Chapitre I-C-5-b) sont affectés. Par exemple il a été mis en évidence que la concentration plasmatique d'uPA diminue et que l'expression placentaire du PAI-1 augmente en cas de pré-éclampsie. De plus, l'expression de la forme activée de la MMP-9 est diminuée (Graham et McCrae, 1996) et la production des MMP-10, MMP-13 et MMP-15 ainsi que de TIMP-2 et -3 est augmentée (Pang et coll, 2003). Ces résultats suggèrent qu'un défaut d'expression et/ou d'activité des protéases par les cellules trophoblastiques extravilleuses serait impliqué dans la pré-éclampsie.

Dans les conditions physiologiques du développement placentaire, la différenciation des trophoblastes extravilleux en cellules invasives est régulée par la tension en oxygène. En effet, il a été montré que l'augmentation de la pression en oxygène favorise l'acquisition du phénotype invasif par les trophoblastes extravilleux alors qu'en cas de condition hypoxique ils continuent de proliférer et se différencient peu (Genbacev et coll, 1997). Une des hypothèses serait que l'hypoxie placentaire préexiste longtemps avant les signes cliniques de pré-éclampsie et pourrait même être responsable du défaut d'invasion trophoblastique. HIF-1 $\alpha$ , le médiateur le plus décrit de l'hypoxie, est hyper-exprimé dans le placenta en cas de pré-éclampsie (Rajakumar et coll, 2001). De plus, il induit la transcription de TGF $\beta$ 3 qui inhibe l'invasion trophoblastique (Caniggia et coll, 1999 et 2000). Cependant, on ne sait pas aujourd'hui avec certitude si l'hypoxie est la cause ou la conséquence de la pré-éclampsie.

Les placentas pré-éclamptiques présentent également un profil de molécules d'adhérence modifié. En effet, l'expression des intégrines  $\alpha$ 6 $\beta$ 4,  $\alpha$ v $\beta$ 6 et l'E-cadhérine persistent alors que l' $\alpha$ 1 $\beta$ 1 n'apparaît pas à la surface des trophoblastes extravilleux (Zhou et coll, 1993 et 1997). De même, l'apparition de molécules spécifiques des cellules endothéliales telles que l' $\alpha$ v $\beta$ 3, la VE-cadhérine, VCAM, PECAM, normalement exprimées par les trophoblastes extravilleux les plus différenciés et invasifs (Kaufmann et coll, 2003), n'a pas lieu. Ainsi, il semblerait que les trophoblastes extravilleux perdent leur capacité à passer d'un phénotype prolifératif à invasif.

Enfin, il semble que la défense immunitaire du placenta soit aussi dérégulée en cas de pré-éclampsie. En effet, l'expression de FAS-L et d'HLA-G diminue drastiquement dans les cytotrophoblastes extravilleux (Hsu et coll, 1999 ; Colbern et coll, 1994 ; Goldman-Wohl et coll, 2000). Or l'expression de HLA-G et HLA-E protège les trophoblastes extravilleux de l'effet cytotoxique des cellules NK.



## 2-b) Dysfonction placentaire

La diminution de la perfusion placentaire due au mauvais remodelage vasculaire utérin engendre progressivement une dysfonction placentaire. Il est globalement admis que sa cause est l'hypoxie placentaire, cependant seuls des éléments indirects la mettent en évidence tels que l'augmentation du marqueur HIF-1 $\alpha$ , l'augmentation de l'index mitotique ou l'épaisseur du syncytium (Benirschke et Kaufmann, 2000 ; Rajakumar et coll, 2001). Par ailleurs les placentas de grossesses pré-éclampsiques présentent des marqueurs du stress oxydatif (Hubel, 1999). Le stress oxydatif est en partie responsable des changements physiopathologiques liés à la pré-éclampsie. En effet, il stimule l'apoptose et la nécrose du syncytium ce qui augmente la quantité de débris syncytiaux libérés dans le sang maternel (Huppertz et coll, 2006 ; Knight et coll, 1998). Ces débris sont susceptibles d'activer la réponse inflammatoire et seraient impliqués dans l'activation endothéliale caractéristique de la pré-éclampsie (Redman et Sargent, 2001). La dysfonction placentaire engendre également la libération dans la circulation maternelle de plusieurs autres facteurs comme des facteurs de croissance (EGF, TGF $\alpha/\beta$ , VEGF et son récepteur soluble sFlt1), des cytokines (IL-1, IL-6, IL-10, TNF $\alpha$ , LIF), des protéases (MMPs, uPA) et des lipides oxydés (Kharfi et coll, 2003). Tous ces facteurs contribuent au développement de la maladie endothéliale maternelle.

## 2-c) La maladie endothéliale maternelle

Au cours de la pré-éclampsie, l'endothélium maternel subit des modifications structurales et fonctionnelles aboutissant à une altération de la réactivité vasculaire aux substances vasomodulatrices et à une activation de la cascade de coagulation. En cas de dysfonctionnement endothélial, on observe une forte concentration de marqueurs de l'activation endothéliale dans le sang et les urines de la mère (Roberts, 1998), en particulier le facteur von Willebrand, la fibronectine, la thrombomoduline, l'endothéline, VCAM et l'augmentation de l'activité des facteurs de croissance. De plus, les cytokines sécrétées par le placenta dans le sang maternel inhibent les facteurs myorelaxants tels que le NO et la prostacycline et augmentent la production des facteurs vasoconstricteurs comme les endothélines et le tromboxane. Il en résulte une augmentation des résistances vasculaires



périphériques et une hypertension artérielle (Khalil et Granger, 2002). Il a également été mis en évidence que les cellules endothéliales des capillaires rénaux présentaient des lésions et que des dépôts fibrinoïdes subendothéliales étaient présents. En effet, elles accumulent des lipides qui bouchent la lumière des capillaires ce qui a pour conséquence un dysfonctionnement rénal en partie à l'origine de la protéinurie associée à la pré-éclampsie (Gaber et coll, 1994). Plus récemment, deux protéines endogènes antiangiogéniques d'origine placentaire, sFlt1 et l'endogline soluble, ont été montrées comme probablement importantes dans le développement de la pré-éclampsie et plus particulièrement dans le développement des lésions glomérulaires. En effet, ces deux protéines sont augmentées dans la pré-éclampsie. De plus, l'administration de sFlt1 à des rongeurs gestantes ou non-gestantes induit un syndrome d'hypertension, de protéinurie et d'enthoteliose glomérulaire ressemblant à la pré-éclampsie humaine. L'administration d'endogline soluble aggrave les effets induits pas le sFlt1 (pour revue : Hladunewich et coll, 2007).

## 5) Génétique

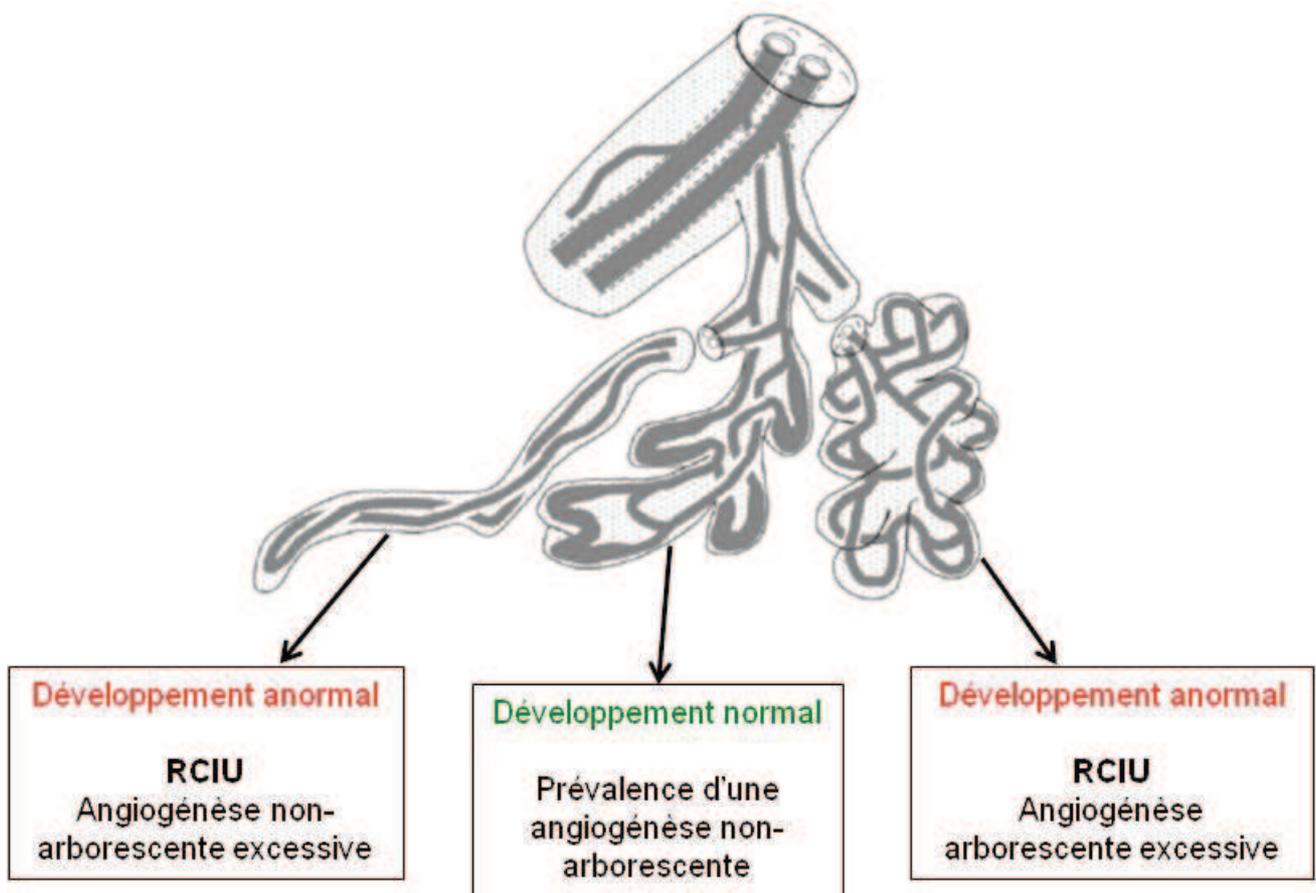
Le caractère familial de la maladie est bien établi, avec une participation maternelle mais aussi paternelle. En effet, une femme naissant d'une mère pré-éclamptique a deux fois plus de risques de développer une pré-éclampsie. Un homme naissant d'une grossesse pré-éclamptique a un risque augmenté de 50% d'induire une pré-éclampsie chez sa partenaire. L'étude des polymorphismes et mutations génétiques a permis de déterminer plusieurs gènes candidats. La majorité de ces gènes participent aux changements hémodynamiques de la grossesse, aux processus thrombophiliques, au stress oxydatif et à l'immunologie placentaire (Lachmeijer et coll, 2002). Il a été montré que l'association de l'allèle AA du récepteur KIR (*Killer immunoglobulin-like receptor*), exprimé par les cellules uNK, avec l'allèle HLA-C2, exprimé par les trophoblastes, est liée à une augmentation du risque de pré-éclampsie (Hiby et coll, 2004). Une autre étude a mis en évidence un nouveau locus de susceptibilité à la pré-éclampsie en 10q22.1 (Van Dijk et coll, 2005). La perte de fonction du gène STOX1 situé dans ce locus code pour une protéine capable de se lier à l'ADN et dont la perte de fonction pourrait entraîner un défaut de polyploïdie. Or l'apparition de l'endoréplication est parallèle à l'acquisition du phénotype invasif des cytotrophoblastes extravilleux. La mutation de STOX1 dans ces cellules, causant une anomalie de polyploïdie, pourrait être responsable du défaut d'invasion observé



dans la pré-éclampsie (Oudejans et coll, 2007). Enfin, plusieurs arguments épidémiologiques suggèrent que le degré d'exposition aux antigènes du père et notamment à son sperme jouerait un rôle important dans les phénomènes de tolérance immunitaire de la grossesse. Le risque de pré-éclampsie est augmenté chez les femmes ayant leur première grossesse ou ayant une grossesse avec un nouveau procréateur. Au contraire une pré-éclampsie est rare chez les femmes avec une déficience immunitaire ou lors d'une exposition prolongée au sperme (Robillard et coll, 2002). De toute évidence, il semble qu'il y ait plusieurs gènes responsables de la pré-éclampsie, cette pathologie associe un déterminisme multigénique à un contexte environnemental particulier.

## 6) Traitement

Actuellement, il n'existe pas de traitement curatif de la pré-éclampsie. Tout repose sur un diagnostic précoce de cette pathologie, un suivi prénatal rigoureux avec le traitement des pathologies maternelles et la décision d'interrompre la grossesse en ayant pour objectif de préserver la santé de la mère et d'éviter une trop grande prématurité de l'enfant.



**Figure 42 : Schéma simplifié des anomalies vasculaires de l'arbre villositaire initiales à un RCIU d'origine utéroplacentaire. D'après Kaufmann, 2004.**

## B. Le retard de croissance intra-utérin (RCIU)

Le RCIU ou l'hypotrophie fœtale est la 3<sup>ème</sup> cause de mortalité périnatale après la prématurité et les malformations. Elle est définie par un retard de croissance du poids, de la taille et périmètre crânien, dont la valeur est située en dessous du 10<sup>ème</sup> percentile voire du 3<sup>ème</sup> percentile (RCIU sévère) pour l'âge gestationnel. Le RCIU sévère est une cause importante d'accouchement prématuré, de mortalité périnatale et de séquelles neurologiques. La notion de retard de croissance intra-utérin est réservée aux enfants dont on connaît réellement la vitesse de croissance intra-utérine par le suivi échographique des mensurations fœtales et/ou d'une étiologie bien spécifique connue (infection fœtale, exposition intra-utérine à des toxiques, défaut de développement placentaire...).

La croissance fœtale étant majoritairement régulée par l'apport nutritionnel au fœtus, elle est tributaire du développement du placenta qui assure les échanges entre la mère et le fœtus. En effet, la fonction d'échange est la fonction primordiale du placenta. Son bon fonctionnement dépend principalement de la circulation du sang maternel dans la chambre intervillieuse et de l'intégrité de la surface du syncytiotrophoblaste. Ce tissu est en contact direct avec le sang maternel et donc avec les toxiques qu'il peut potentiellement contenir, d'origine infectieuse ou environnementale. Son développement et/ou ses fonctions peuvent donc être altérées et ne plus assurer une croissance fœtale normale.

L'examen histopathologique du placenta est anormal dans 85% des RCIU. Il présente principalement une hypotrophie et des lésions vasculaires.

L'étiologie du RCIU peut être résumée ainsi :

- Le RCIU est dû dans 10% des cas à une pathologie fœtale : anomalie chromosomique, malformations, infection au cytomegalovirus, paludisme. Ces situations font habituellement proposer une interruption médicale de grossesse.
- Le RCIU est dû dans 40% des cas à une insuffisance placentaire évoquée en cas de pré-éclampsie, d'altération des Dopplers utérins, ou, rétrospectivement, de lésions ischémiques à l'examen du placenta.
- Dans 50% des cas, le RCIU reste mal expliqué.
- Le tabac diminue le poids de naissance d'environ 200 g, mais représente plus un facteur aggravant qu'une étiologie pleine et entière.



Les RCIU d'origine utéro placentaire peuvent être dus à deux types d'anomalies : anomalie du développement villositaire ou anomalie du développement de la vascularisation utéro-placentaire (Figure 42). Dans le premier cas on observe une diminution des échanges entre le sang maternel et le sang fœtal, dans le second cas il y a modifications des flux circulants dans la chambre intervillieuse. Il existe deux types de RCIU. Les RCIU harmonieux qui sont précoces pendant la vie intra-utérine, rapidement sévères et qui touchent tous les paramètres biométriques (taille, poids, périmètre crânien). Ils font craindre une anomalie génétique. Les RCIU dysharmonieux ou asymétriques, qui surviennent plus tardivement, touchent au début les paramètres abdominaux et sont la conséquence d'une pathologie vasculaire maternelle. Les RCIU tardifs ont un meilleur pronostic avec notamment un rattrapage staturo-pondérale spontané dans les deux premières années de vie.



## IV - Les objectifs de travail

Comme il a été décrit dans les chapitres précédents, le développement précoce du placenta est capital pour le bon déroulement de la grossesse. La perturbation de phénomènes physiologiques indispensables, tels que l'invasion trophoblastique, l'environnement en oxygène ou le remodelage utérin, peuvent entraîner des pathologies graves pour la mère et/ou le fœtus (pré-éclampsie, RCIU). Il est particulièrement important que l'environnement en oxygène au cours du premier trimestre soit respecté : une phase précoce avant 10 SA présentant une concentration en oxygène d'environ 2%, et une phase tardive après 12 SA présentant une concentration en oxygène d'environ 8%. Entre les deux on observe la délitescence progressive des bouchons trophoblastiques obstruant la lumière des artères spiralées utérines permettant une oxygénation graduelle de la chambre intervillieuse.

L'étude des cytotrophoblastes, de leur différenciation et de leur fonctionnalité, a été réalisée au premier trimestre mais toujours de manière globale, sans tenir compte de ces deux phases présentant pourtant des différences majeures. Afin d'obtenir une meilleure compréhension de la régulation de l'expression des gènes trophoblastiques au cours du premier trimestre de la grossesse, nous nous sommes intéressés à l'exemple des gènes codant pour l'hCG et plus particulièrement aux gènes de type I et de type II de la sous-unité beta de l'hCG. En effet, l'hCG est une hormone capitale pour le développement du placenta (différenciation trophoblastique et angiogenèse) mais plus généralement pour le bon déroulement de la grossesse. C'est le premier message trophoblastique vers l'organisme maternel. Elle est produite tout au long de la grossesse et présente un pic de sécrétion au premier trimestre vers 10 SA. Elle est produite à la fois par le syncytiotrophoblaste et le cytotrophoblaste extravillieux invasif. Ils produisent des formes différentes d'hCG mais dans les deux cas elle régule leur différenciation. Grâce aux modèles de cultures primaires trophoblastiques disponibles au laboratoire, nous avons pu étudier l'expression et la régulation de l'hCG au cours de la différenciation du trophoblaste villositaire provenant soit de placenta du premier trimestre précoce soit de placenta du premier trimestre tardif et comparer



ces résultats avec ceux obtenus dans les cytotrophoblastes extravilloux provenant de placenta du premier trimestre précoce. Plus précisément nos objectifs ont été les suivants :

1. Etudier l'expression des sous-unités beta de type I et II de l'hCG au cours de la différenciation du trophoblaste villex avant (placenta de 8-9 SA) ou après (placenta de 12-14 SA) l'oxygénation de la chambre intervillouse.
2. A l'aide d'une approche ciblée, étudier l'expression des principaux facteurs de transcription décrits pour réguler l'hCG, au cours de la différenciation du trophoblaste villex avant (placenta de 8-9 SA) ou après (placenta de 12-14 SA) l'oxygénation de la chambre intervillouse.
3. Analyser, au premier trimestre, la régulation de l'hCG par le PPAR $\gamma$  dans les cytotrophoblastes villex et extravilloux de manière globale puis en distinguant les différents types de gènes de la sous-unité beta de l'hCG.
4. Par une approche globale, analyser le profil d'expression des facteurs de transcription au cours de la différenciation des cytotrophoblastes villex et extravilloux mais aussi entre ces deux sous-populations trophoblastiques.



*Résultats 1<sup>ère</sup> partie*



Résultats I : Expression et régulation des gènes de type I ou de type II de la sous-unité beta de l'hCG au cours de la différenciation du trophoblaste villositaire avant et après oxygénation de la chambre intervillieuse.

## I - Contexte et présentation de la publication

L'hCG est le premier message trophoblastique vers l'organisme maternel. Elle joue un rôle capital pour la grossesse en permettant le maintien du corps jaune et pour le développement précoce du placenta. C'est une hormone complexe, hautement glycosylée, formée de deux sous-unités : la sous-unité alpha commune avec la LH, FSH et la TSH et la sous-unité beta, spécifique à chaque hormone, codée par un « *cluster* » de gènes regroupé en type I (gène  $\beta 7$ ) et type II (gènes  $\beta 3$ , 5 et 8). Elle est sécrétée dans le sang maternel tout le long de la grossesse et atteint un pic de sécrétion à 10-12 semaines d'aménorrhée. A peu près au même moment, les bouchons trophoblastiques obstruant la lumière de ces artères spirales utérines se délitent progressivement permettant ainsi l'entrée graduelle du sang maternel artériel dans la chambre intervillieuse. La pression partielle en dioxygène ( $PpO_2$ ) augmente de 18 mm Hg (8-9 SA) à 60 mm Hg (12-14 SA).

L'impact de ce changement d'environnement, particulièrement en oxygène, sur l'expression, la synthèse et la sécrétion de l'hCG par les trophoblastes n'a encore jamais été étudiées. Il en va de même pour l'effet de ce changement d'environnement sur le type de sous-unité beta de l'hCG exprimée et sécrétée par les trophoblastes villositaires. C'est pourquoi nous avons comparé l'expression et la sécrétion de l'hCG beta de type I et de type II *in vitro* au cours de la différenciation de trophoblastes villositaires issus de placentas du 1<sup>er</sup> trimestre précoce (8-9 SA, avant l'oxygénation de la chambre intervillieuse) ou du 1<sup>er</sup> trimestre tardif (12-14 SA, après l'oxygénation de la chambre intervillieuse). Pour vérifier l'oxygénation des tissus placentaires de 12-14 SA par rapport à ceux de 8-9 SA nous avons étudié la protéine SOD1, inductible par l'oxygène. Nous montrons par Western Blot que son expression est augmentée dans les placentas de 12-14 SA par rapport à ceux de 8-9 SA, confirmant une



augmentation de la  $PO_2$  dans l'espace intervilloux. En parallèle nous avons comparé la localisation, *in situ* sur des coupes de villosités placentaires, et l'expression *ex vivo*, dans des extraits de villosités placentaires totaux, de l'hCG beta de type I et de type II avant et après l'oxygénation de la chambre intervillouse. *In vitro* nous mettons en évidence que l'expression (Q-PCR), la synthèse (Western Blot) et la sécrétion (dosage de l'hCG dans les surnageants de culture) de l'hCG beta de type I et II augmentent avec la différenciation des trophoblastes villeux en syncytia quelque soit le terme étudié. Nous montrons aussi que l'hCG beta de type II est plus exprimée que l'hCG beta de type I également quelque soit le terme. En revanche, les résultats que nous avons obtenus *in vitro* et *ex vivo* montrent une différence de production d'hCG entre le 1<sup>er</sup> trimestre précoce et le 1<sup>er</sup> trimestre tardif. Avant l'oxygénation de la chambre intervillouse, le trophoblaste villeux mononucléé exprime et secrète plus d'hCG beta que ce soit de type I ou de type II. De plus, nous avons mesuré l'index de fusion des trophoblastes villeux en culture primaire et nous mettons en évidence que les trophoblastes villeux du 1<sup>er</sup> trimestre précoce fusionnent plus rapidement que les trophoblastes villeux du 1<sup>er</sup> trimestre tardif. Sachant que l'hCG stimule de manière autocrine la fusion en syncytiotrophoblaste des trophoblastes villeux, nous suggérons que la sécrétion d'hCG plus importante des CTV mononuclées du 1<sup>er</sup> trimestre précoce pourrait expliquer leur fusion plus rapide.



COMPARATIVE EXPRESSION OF HCG BETA GENES IN  
VILLOUS TROPHOBLAST FROM EARLY AND LATE FIRST-  
TRIMESTER HUMAN PLACENTAS

M Cocquebert, N Segond, J Guibourdenche, P Murthi, S Berndt, L Aldaz-  
Carroll, D Evain Brion, T Fournier

Soumis à : *American Journal of Physiology –Endocrinology and Metabolism*

## **II - Localisation et expression des facteurs de transcription régulant l'hCG au cours du premier trimestre de la grossesse.**

Les différences d'expression et de sécrétion d'hCG beta de type I et de type II au cours du 1<sup>er</sup> trimestre de la grossesse mises en évidence dans l'article précédent, nous ont interrogés sur la régulation de l'hCG au cours de cette même période. A ce jour, la régulation de l'hCG a été étudiée majoritairement sur des trophoblastes villosités issus de placentas à terme. De plus, pour la régulation de la sous-unité beta de l'hCG les auteurs se sont concentrés sur l'étude d'un seul promoteur, celui du gène CGB5, sur les quatre possibles, ceux des gènes CGB3, CGB5, CGB7 et CGB8. Ces études mettent en évidence plusieurs séquences régulatrices sur le promoteur comme deux sites CRE, le premier fixant probablement Sp1, plusieurs sites TSE fixant le facteur AP-2, ou un site de fixation spécifique des protéines Sp (Johnson et Jameson 1999). Des expériences de retard sur gel et de transfection dans des cytotrophoblastes villosités à terme ont montré que la fixation de trois AP-2 et de deux Sp étaient nécessaires à l'induction de la transcription de CGB5 (Johnson et Jameson, 1999 ; Knöfler et coll, 2004 ; LiCalsi et coll, 2000). Nous nous sommes appuyés sur cette base pour débiter notre étude de la régulation de l'hCG au cours du 1<sup>er</sup> trimestre de grossesse. Dans un premier temps, nous avons choisi d'étudier la localisation *in situ* et l'expression *ex vivo* des 5 facteurs de transcription suivants : AP-2 $\alpha$ , AP-2 $\beta$ , AP-2 $\gamma$ , Sp1 et Sp3, avant et après l'oxygénation de la chambre intervilluse. Dans un second temps, nous avons voulu vérifier ces résultats *in vitro* dans des cultures primaires de trophoblastes villosités, toujours en considérant le statut oxydatif des placentas dont ils étaient issus.

Tableau n° 2 : Anticorps primaires

<b>Protéine humaine contre laquelle est dirigé l'anticorps</b>	<b>AP2<math>\alpha</math></b> 3B5	<b>AP2<math>\beta</math></b> H-87	<b>AP2<math>\gamma</math></b> 6E4/4	<b>Sp1</b> H-225	<b>Sp3</b> F7 ou D-20	<b>Lamine A/C</b> H-110
<b>Espèce d'origine</b>	souris	lapin	souris	lapin	souris/lapin	lapin
<b>Type d'immunoglobuline</b>	IgG2b	IgG	IgG1	IgG	IgG1/IgG	IgG
<b>Concentration initiale</b>	200 $\mu$ g/mL	200 $\mu$ g/mL	200 $\mu$ g/mL	200 $\mu$ g/mL	200 $\mu$ g/mL	200 $\mu$ g/mL
<b>Dilution utilisée ICC et /ou WB</b>	1/50 <sup>ème</sup>	1/50 <sup>ème</sup>	1/50 <sup>ème</sup>	1/100 <sup>ème</sup>	1/50 <sup>ème</sup>	1/5000 <sup>ème</sup>

<b>Protéine humaine contre laquelle est dirigé l'anticorps</b>	<b>PPAR<math>\gamma</math></b> H100	<b>PPAR<math>\gamma</math></b> E8	<b>RXR<math>\alpha</math></b> D20	<b>HNF4<math>\alpha</math></b>	<b>actine</b>
<b>Espèce d'origine</b>	lapin	souris	lapin	lapin	lapin
<b>Isotype</b>	IgG	IgG1	IgG	IgG	IgG
<b>Valence</b>	polyclonal	monoclonal	polyclonal	monoclonal	polyclonal
<b>Epitope</b>	N-terminal	C-terminal	N-terminal	Non renseigné	C-terminal
<b>Concentration initiale</b>	200 $\mu$ g/mL	200 $\mu$ g/mL	200 $\mu$ g/mL		0,6mg/mL
<b>Dilution WB</b>	1/1000 <sup>e</sup>	1/500 <sup>e</sup>	1/1000 <sup>e</sup>	1/1000 <sup>e</sup>	1/5000 <sup>e</sup>
<b>Dilution IHC</b>	1/100 <sup>e</sup>	1/100 <sup>e</sup>	1/500 <sup>e</sup>	1/100 <sup>e</sup>	
<b>Fournisseur</b>	Santa Cruz	Santa Cruz	Santa Cruz	Epitomics	Sigma

## A. Matériels et méthodes

L'obtention des tissus placentaires, la culture primaire des cytotrophoblastes villos, les extractions d'ARNs totaux, la Q-PCR, l'extraction nucléaire et cytoplasmique et les Western Blots ont été réalisés dans les mêmes conditions que celles présentées dans l'article précédent.

Les couples d'amorces suivant ont été utilisés pour mener cette étude :

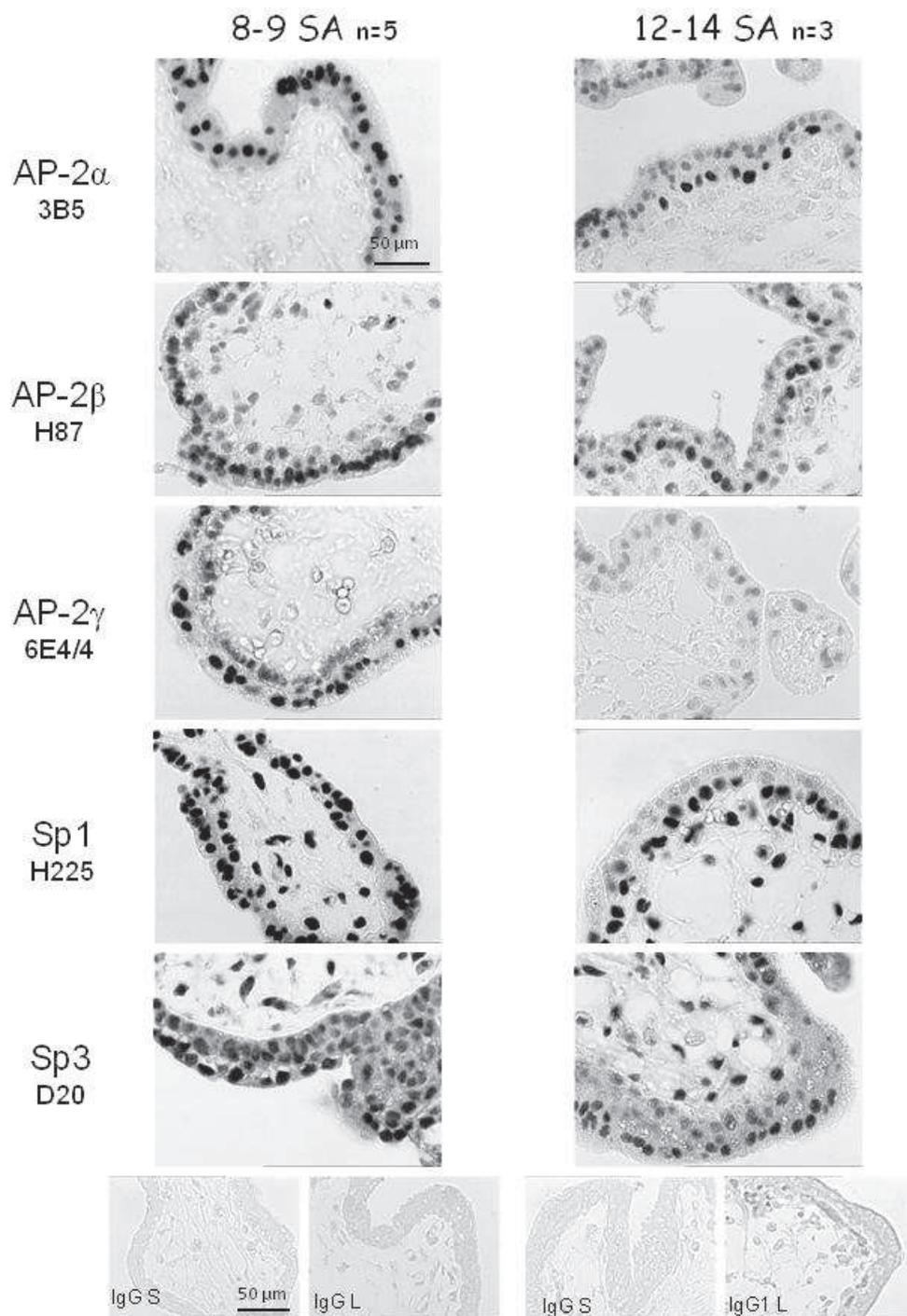
gene	Amorce sens	Amorce anti-sens
AP-2 $\alpha$	5'-TGG ATC CTC GCA GGG ACT ACA G-3'	5'-GTT GGA CTT GGA CAG GGA CAC G-3'
AP-2 $\beta$	5'-AACACAGGAGCTAGTCCAGCAG 3'	5'-CAT GCC GCT GTT ATT GGC ATC T-3
AP-2 $\gamma$	5'-CACCTGTTGCTGCACGATCAGA 3'	5' AGGAGCGACAATCTTCCAGGGA 3'
Sp1	5'-ACGCTTCACACGTTCCGGATGAG-3'	5'-TGACAGGTGGTCACTCCTCATG-3'
Sp3	5'-TGTCCCAACTGTAAAGAAGGTGG-3'	5'-CTCCAGAATGCCAACGCAGATG-3'

L'immunocytochimie a été réalisée de la façon suivante : les cellules sont fixées pendant 20 minutes avec une solution de PBS-PFA 4% (*Phosphate buffer saline-Paraformaldehyde*) puis les fonctions aldéhydes libres ont été bloquées par un traitement au NH<sub>4</sub>Cl (50 mM) pendant 10 minutes. Les cellules ont été perméabilisées avec une solution de Triton à 0,3% pendant 10 minutes. Les sites non spécifiques sont saturés pendant 30 minutes à température ambiante avec une solution de sérum d'âne et/ou de chèvre à 7% et d'IgG humaines à 20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Les cellules sont ensuite incubées avec la solution d'anticorps primaires (Santa Cruz) pendant la nuit à 4°C (*Cf.* tableau n°2), puis avec l'anticorps secondaire correspondant (*Cf.* tableau n°3). Pour une observation en microscopie confocale, une contre coloration avec du TOPRO3 au 1/500<sup>ème</sup> est effectuée pour marquer les noyaux. Le montage s'effectue avec une lamelle de 0,17  $\mu\text{m}$  d'épaisseur, qualité optique confocale, et du liquide de montage « Vectashield ». Les lames seront ensuite observées à l'aide du microscope confocal Leica TCS SP2 avec l'objectif 63 (plateforme d'imagerie, IMTCE).



Tableau n° 3 : Anticorps secondaires

<b>Espèce contre laquelle est dirigé l'anticorps</b>	<b>Souris</b>		<b>Lapin</b>	
<b>Espèce d'origine</b>	âne		Chèvre	âne
<b>Fluorochrome couplé à l'anticorps</b>	Cy3	Alexa Fluor 488	Cy3	Alexa Fluor 488
<b>Dilution d'utilisation</b>	1/300 <sup>e</sup>	1/500 <sup>e</sup>	1/300 <sup>e</sup>	1/500 <sup>e</sup>
<b>Longueur d'onde d'excitation</b>	543 nm	488 nm	543 nm	488 nm
<b>Longueur d'onde d'émission</b>	568 nm	520 nm	568 nm	520



**Figure 43 : Localisation des facteurs de transcription AP-2 $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , Sp1 et Sp3 sur des coupes en paraffine de placenta humain du premier trimestre précoce (8-9 SA) ou tardif (12-14 SA).**

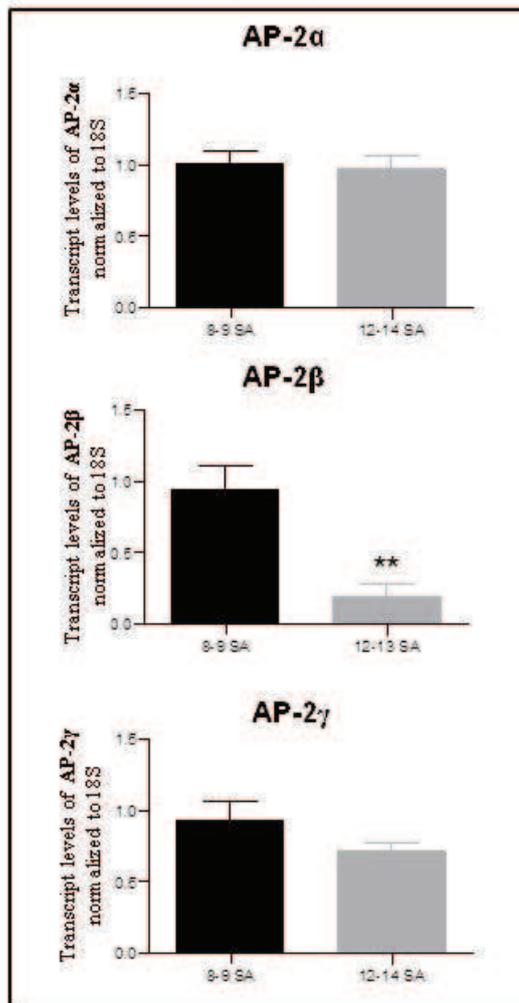
B. Expression des facteurs de transcription de la famille AP-2 et Sp *in situ* avant et après réoxygénation de la chambre intervillieuse.

1) Localisation des facteurs de transcription de la famille AP-2 et Sp *in situ*

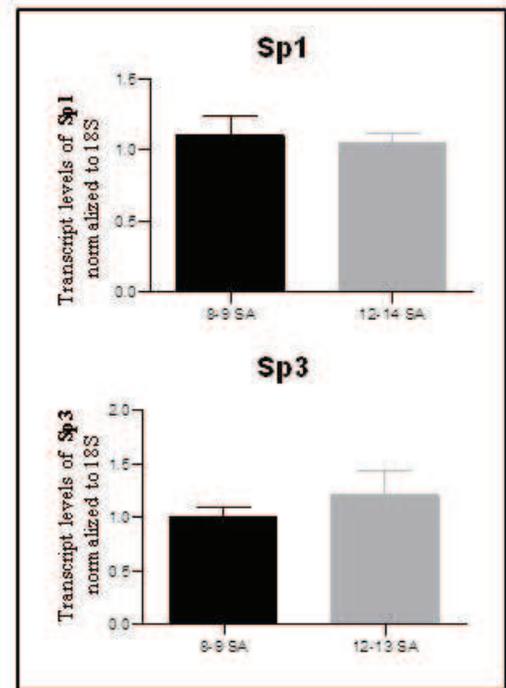
Le marquage par immunohistochimie des facteurs de transcription AP-2 $\alpha$ , AP-2 $\beta$ , AP-2 $\gamma$ , Sp1 et Sp3 permet d'observer qu'ils sont majoritairement trophoblastiques et localisés dans le noyau au sein des villosités placentaires. Si l'on compare la localisation précise de ces facteurs de transcription en fonction du terme des villosités placentaires on observe des différences pour chacun. A 8-9 SA AP-2 $\alpha$  et AP-2 $\beta$  sont principalement détectés dans les noyaux du ST alors qu'à 12-14 SA ils sont détectés majoritairement dans le noyau des CTV (Cf. Figure 43). AP-2 $\gamma$  est également plutôt détecté dans les noyaux du ST au premier trimestre précoce alors qu'au premier trimestre tardif sa localisation est plus diffuse et semble moins importante. L'immunomarquage du facteur Sp1 est intense dans les noyaux du ST, des CTV et des cellules de l'axe mésenchymateux, à 8-9 SA et le marquage apparaît principalement cytotrophoblastique après 12 SA. Enfin le facteur Sp3 est aussi immunolocalisé dans le noyau de toutes les cellules trophoblastiques à 8-9 SA alors qu'il est plutôt présent dans les noyaux du ST après 12 SA.

Ainsi, cette étude *in situ* des facteurs de transcription de la famille AP-2 et Sp met en évidence une différence nette de leur immunolocalisation en fonction du terme des placentas étudiés. Avant l'oxygénation de la chambre intervillieuse, le marquage des trois facteurs AP-2 étudiés est majoritairement syncytiaux et les deux facteurs Sp étudiés semblent ubiquitaires. Après l'oxygénation de la chambre intervillieuse, AP-2 $\alpha$ , AP-2 $\beta$  et Sp1 sont principalement localisés dans le noyau des cytotrophoblastes, AP-2 $\gamma$  est plus diffus et Sp3 est majoritairement détecté dans le syncytiotrophoblaste.

A. Les facteurs de transcription de la famille AP-2



B. Les facteurs de transcription de la famille Sp



**Figure 44 : Comparaison de l'expression des gènes des facteurs de transcription de la famille AP-2 ou Sp entre des tissus placentaires du premier trimestre précoce (8-9 SA) ou tardif (12-14 SA).**

Les transcrits codant pour les facteurs de transcription AP-2α, β et γ (A.), Sp1 et Sp3 (B.) ont été quantifiés par Q-PCR relative (n=8 pour chaque groupe). Les valeurs des taux de transcrits ont été normalisées par rapport au 18S. Le test statistique "Mann and Whitney" a été utilisé pour comparer les taux de transcrits dans les villosités de 12-14 SA par rapport aux villosités de 8-9 SA: \*\* p < 0,01

2) Expression des facteurs de transcription de la famille AP-2 et Sp dans les villosités placentaires totales du premier trimestre précoce ou tardif.

Pour comparer l'expression des gènes des facteurs de transcription AP-2 $\alpha$ , AP-2 $\beta$ , AP-2 $\gamma$ , Sp1 et Sp3 dans les villosités placentaires entre le premier trimestre précoce et le premier trimestre tardif, les transcrits de ces gènes ont été quantifiés par Q-PCR relative. Sur les 5 facteurs de transcription étudiés seule l'expression du facteur de transcription AP-2 $\beta$  est significativement différente entre les deux groupes de terme. En effet, AP-2 $\beta$  est 5 fois moins exprimé dans les villosités du 1<sup>er</sup> trimestre tardif par rapport au 1<sup>er</sup> trimestre précoce (Cf. Figure 44).

C. Expression des facteurs de transcription de la famille AP-2 et Sp *in vitro* au cours de la différenciation du trophoblaste villex avant et après oxygénation de la chambre intervillieuse.

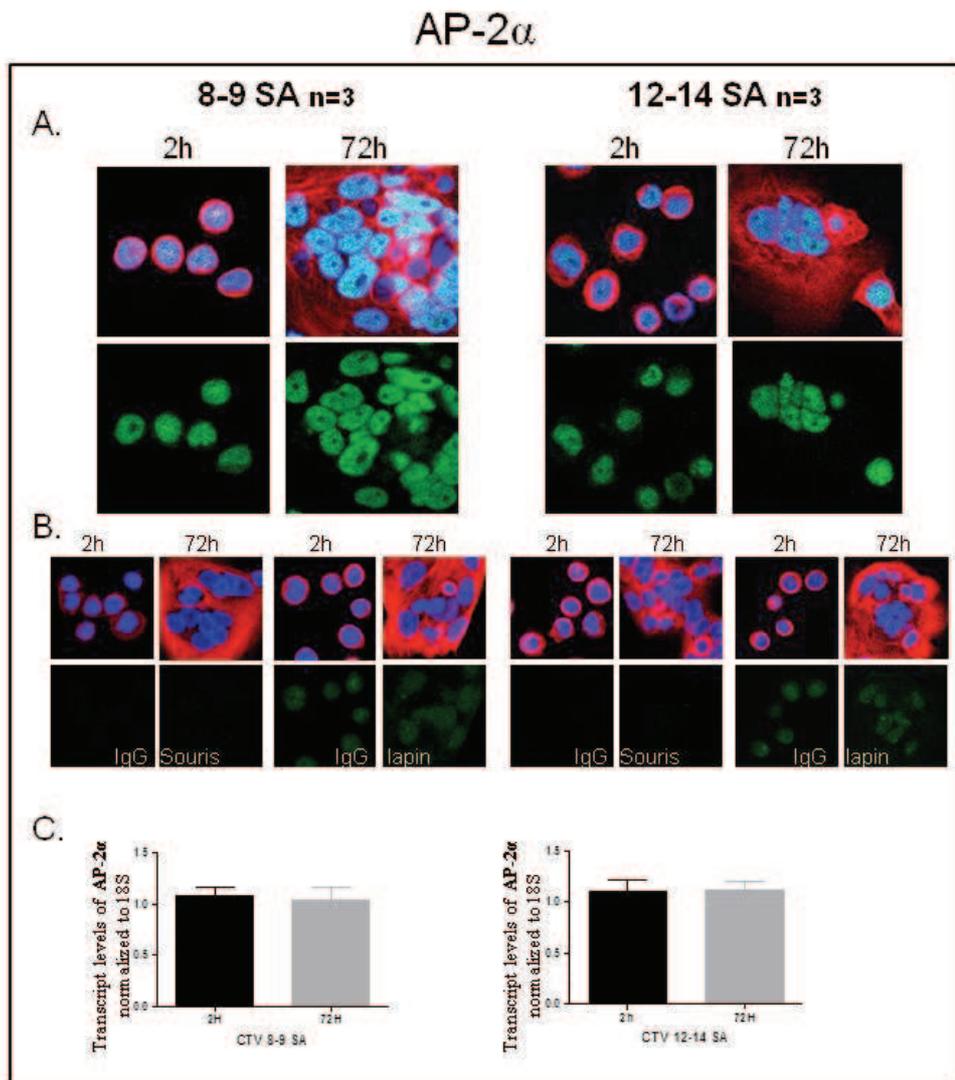
1) Expression d'AP-2 $\alpha$ , AP-2 $\beta$ , AP-2 $\gamma$ , Sp1 et Sp3 au cours de la différenciation du cytotrophoblaste villex *in vitro*

Par immunocytochimie nous avons pu mettre en évidence les facteurs de transcription AP-2 $\alpha$ , AP-2 $\gamma$  et Sp1 dans les trophoblastes villex mononucléés ou fusionnés en syncytium qu'ils proviennent de placentas du premier trimestre précoce ou tardif (Cf. Figures 45, 46 et 47). Sp3 par contre n'est pas détecté quelque soit le stade de différenciation des trophoblastes villex étudiés et quelque soit le terme des placentas dont ils sont issus. L'utilisation de cet anticorps dans d'autres techniques s'est révélée tout aussi inefficaces. Nos collaborateurs en Australie ayant fait la même observation et un autre anticorps a été choisi. Cependant, trop tardivement pour compléter cette étude. Pour AP-2 $\beta$ , nous avons également rencontré des difficultés à valider un anticorps et l'étude n'a pas pu être menée sur cette protéine.

Nous avons ensuite quantifié par Q-PCR l'expression des ces 5 facteurs de transcription au cours de la différenciation du trophoblaste villex. Pour les facteurs de transcription AP-2 $\alpha$  et



AP-2 $\gamma$  on ne met pas en évidence de modification de leur expression avec la syncytialisation quelque soit le terme étudié. L'expression du facteur AP-2 $\beta$  augmente avec la syncytialisation que les CTV proviennent de placentas du premier trimestre précoce ou tardif. Les facteurs de la famille Sp présentent un profil d'expression un peu différent. L'expression de Sp1 diminue avec la syncytialisation des CTV issus de placentas du 1<sup>er</sup> trimestre précoce alors qu'elle augmente lorsqu'ils proviennent de placentas du 1<sup>er</sup> trimestre tardif. L'expression de Sp3 diminue aussi avec la syncytialisation des CTV issus de placentas du 1<sup>er</sup> trimestre précoce mais reste stable lorsqu'ils sont issus du 1<sup>er</sup> trimestre tardif (Cf. Figures 45, 46 et 47).

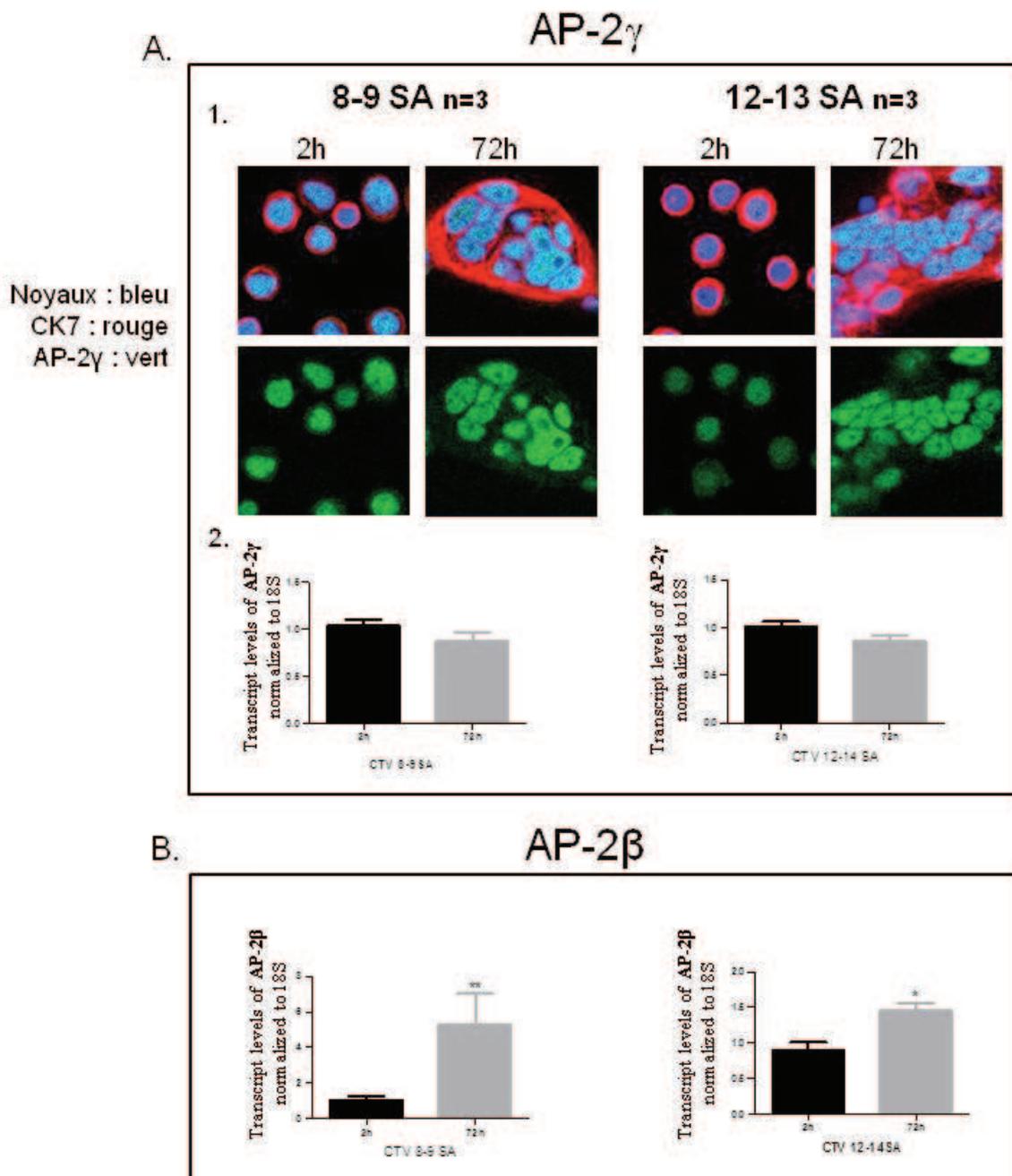


**Figure 45 : Localisation et expression d'AP-2 $\alpha$  au cours de la différenciation du trophoblaste villositaire issus de placentas du premier trimestre précoce (8-9 SA) ou tardif (12-14 SA).**

A. Localisation par immunocytochimie d'AP-2 $\alpha$  (en vert) dans les CTV à 2h ou 72h de culture. Visualisation de la Cytokératine 7 (en rouge) et des noyaux (en bleu).

B. Marquage isotypique contrôlé : IgG de souris ou de lapin (en vert)

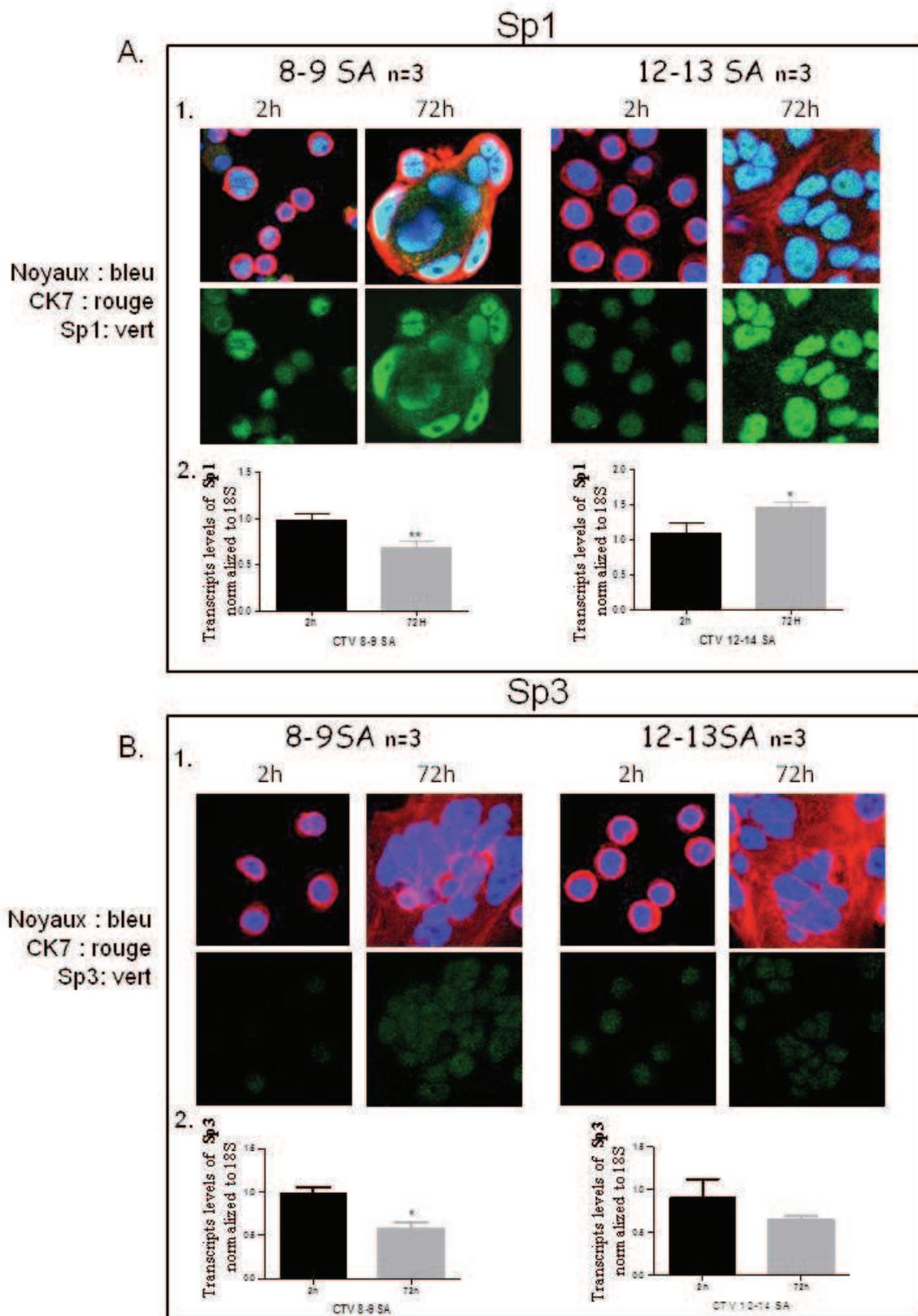
C. Les transcrits codant pour le facteur de transcription AP-2 $\alpha$  ont été quantifiés par Q-PCR relative (CTV 8-9 SA : n= 7 ; CTV 12-14 SA : n=5). Les valeurs des taux de transcrits ont été normalisées par rapport au 18S.



**Figure 46 : Localisation et/ou expression d'AP-2 $\gamma$  et d'AP-2 $\beta$  au cours de la différenciation du trophoblaste villositaire issus de placentas du premier trimestre précoce (8-9 SA) ou tardif (12-14 SA).**

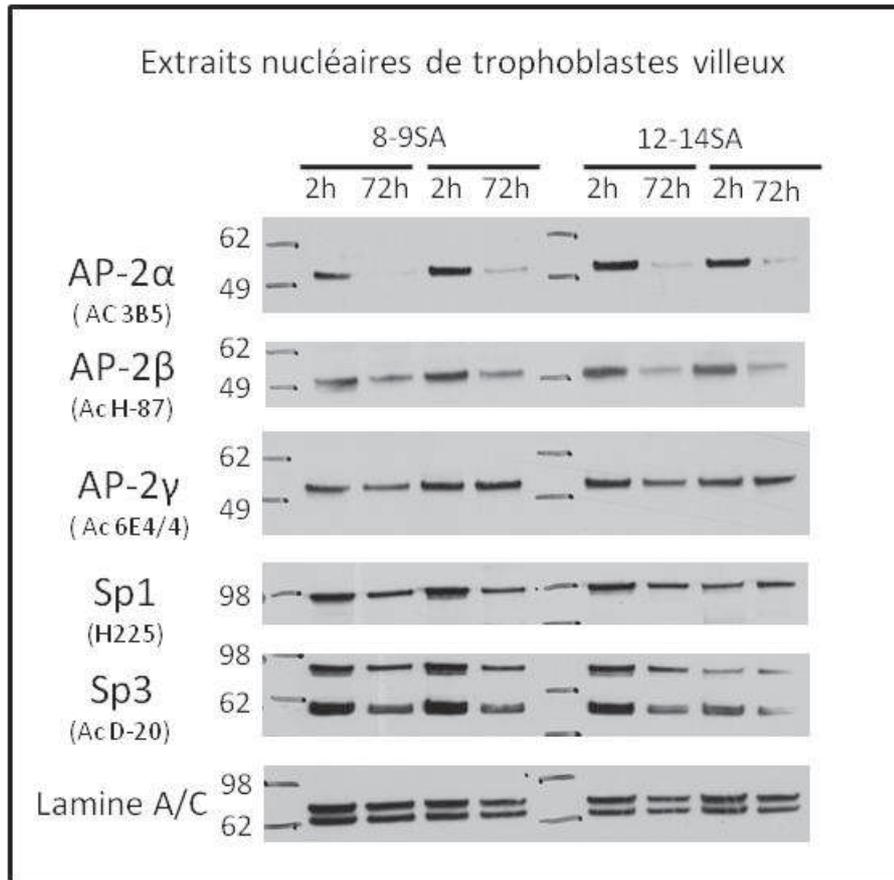
A.1. immunocytochimie d'AP-2 $\gamma$  ; contrôles isotypiques *cf. figure n°44*

B.2 et B. QPCR (*cf. figure 44*) . Le test statistique "Mann and Whitney" a été utilisé pour comparer les taux de transcrits dans les CTV à 72h par rapport au CTV à 2h : \*  $p < 0.05$  ; \*\*  $p < 0.01$



**Figure 47 : Localisation et expression de Sp1 et de Sp3 au cours de la différenciation du trophoblaste villositaire issus de placentas du premier trimestre précoce (8-9 SA) ou tardif (12-14 SA).**

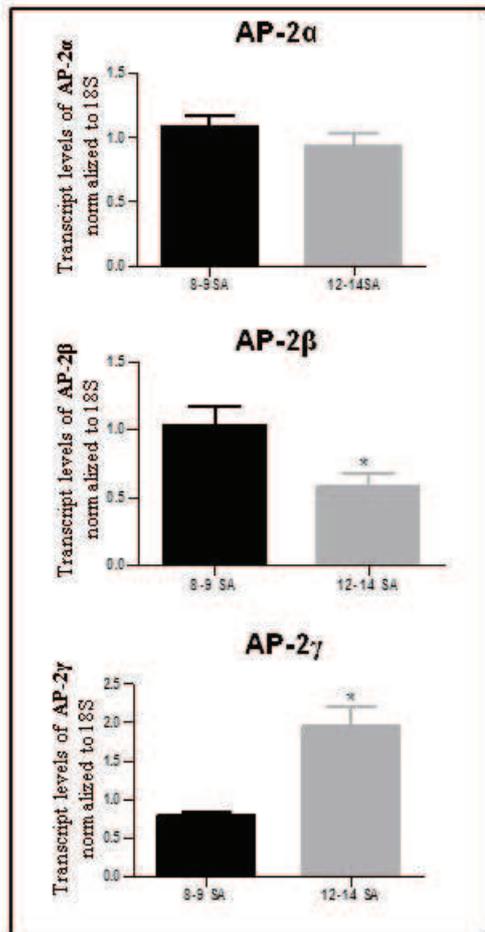
A.1. et B.1. Immunocytochimie de Sp1 et Sp3 (Ac F7) ; contrôles isotypiques cf. *Figure n°44*  
A.2 et B.2. Q-PCR – statistique cf. *Figure n°45*



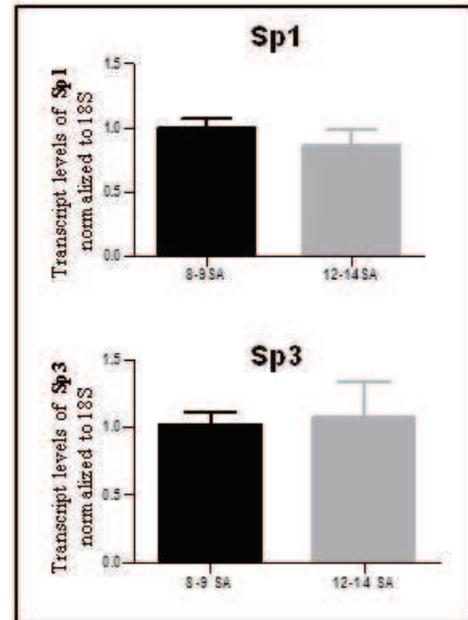
**Figure 48 : Détection par Western Blot des facteurs de transcription AP-2 $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , Sp1 et Sp3 dans des extraits nucléaires de trophoblastes villosus monoclésés (2h) ou fusionnés (72h) issus de placentas du premier trimestre précoce (8-9 SA) ou tardif (12-14 SA).**

*Les extraits nucléaires sont normalisés par rapport à la lamine A/C, protéine de l'enveloppe nucléaire interne.*

A. Les facteurs de transcription de la famille AP-2



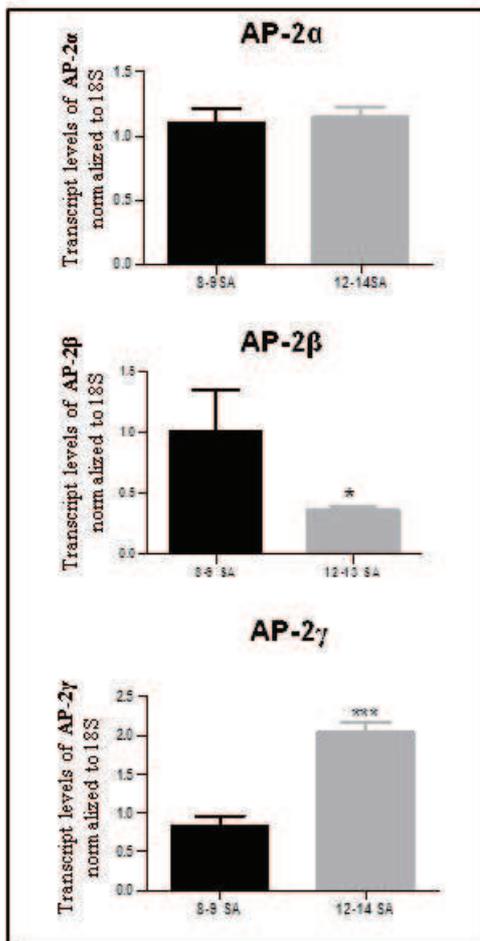
B. Les facteurs de transcription de la famille Sp



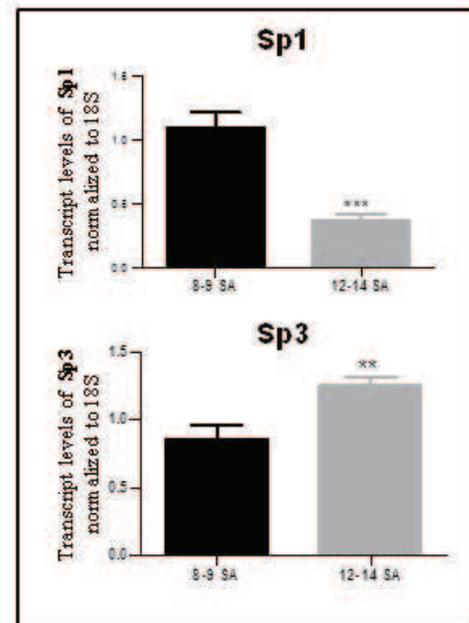
**Figure 49 : Comparaison de l'expression des gènes des facteurs de transcription de la famille AP-2 ou Sp entre les **cytotrophoblastes villeux mononucléés** issus de placentas du premier trimestre précoce (8-9 SA) ou tardif (12-14 SA).**

Les transcrits codant pour les facteurs de transcription AP-2α, β et γ (A.), Sp1 et Sp3 (B.) ont été quantifiés par Q-PCR relative. Les valeurs des taux de transcrits ont été normalisées par rapport au 18S. Le test statistique "Mann and Whitney" a été utilisé pour comparer les taux de transcrits dans les CTV mononucléés de 12-14 SA par rapport aux CTV mononucléés de 8-9 SA: \* p < 0,05

A. Les facteurs de transcription de la famille AP-2



B. Les facteurs de transcription de la famille Sp



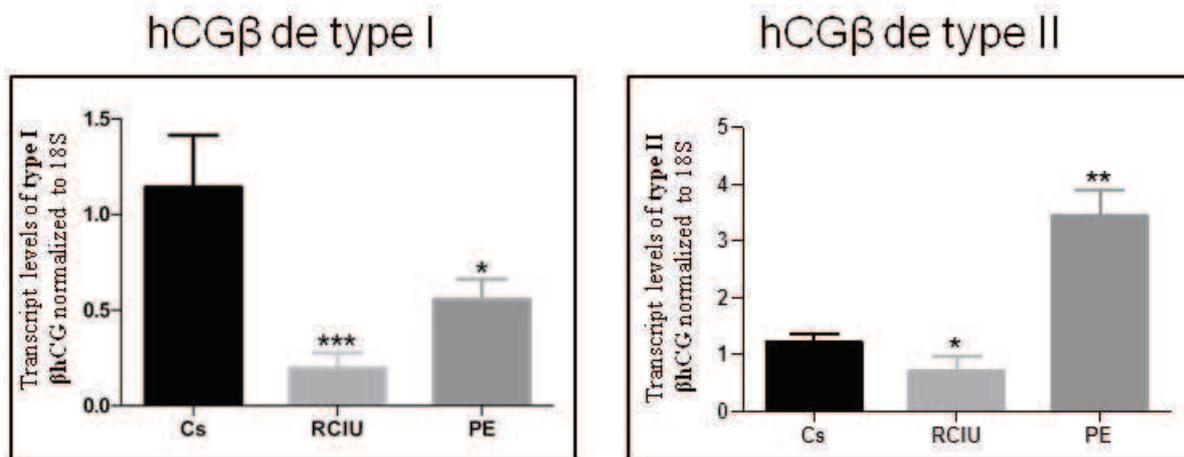
**Figure 50 : Comparaison de l'expression des gènes des facteurs de transcription de la famille AP-2 ou Sp entre les syncytiotrophoblastes issus de placentas du premier trimestre précoce (8-9 SA) ou tardif (12-14 SA).**

Les transcrits codant pour les facteurs de transcription AP-2α, β et γ (A.), Sp1 et Sp3 (B.) ont été quantifiés par Q-PCR relative. Les valeurs des taux de transcrits ont été normalisées par rapport au 18S. Le test statistique "Mann and Whitney" a été utilisé pour comparer les taux de transcrits dans les CTV fusionnés (syncytiotrophoblaste) de 12-14 SA par rapport aux CTV fusionnés de 8-9 SA: \* p < 0.05 ; \*\* p < 0.01 ; \*\*\* p < 0.001

Dans l'étude de l'expression protéique des facteurs de transcription, les résultats obtenus par la technique du Western Blot, utilisant les mêmes anticorps que pour la technique de l'immunocytochimie, nous ont déconcertés. Nous avons obtenus les mêmes résultats que ce soit sur des extraits protéiques nucléaires (résultats présentés) ou sur des extraits protéiques totaux. Comme on peut le voir sur la figure 48, l'expression des cinq facteurs de transcription diminue avec la syncytialisation quel que soit le terme des placentas dont les CTV sont issus. La diminution peut être drastique comme pour AP-2 $\alpha$  et AP-2 $\beta$ , ou moindre comme pour AP-2 $\gamma$ , Sp1 et Sp3. La régularité des dépôts est contrôlée par la révélation de la lamine, protéine de l'enveloppe nucléaire interne, qui reste constante au cours de la différenciation en syncytiotrophoblaste.

## 2) Expression d'AP-2 $\alpha$ , AP-2 $\beta$ , AP-2 $\gamma$ , Sp1 et Sp3 dans le cytotrophoblaste villositaire *in vitro* avant et après oxygénation de la chambre intervillieuse.

Nous avons ensuite analysé ces résultats en fonction du terme des placentas dont les cytotrophoblastes villositaires étaient issus. Les résultats obtenus par immunocytochimie ou par Western blot, ne mettent pas en évidence de différence d'expression protéique de ces facteurs de transcription en fonction du terme. En revanche, au niveau des taux de transcrits on peut noter certaines différences (Cf. Figures 49 et 50). Au niveau initial, dans les cytotrophoblastes villositaires mononucléés fraîchement isolés, l'expression d'AP-2 $\beta$  est deux fois plus faible dans les trophoblastes villositaires du 1<sup>er</sup> trimestre tardif que dans ceux du 1<sup>er</sup> trimestre précoce. Pour AP-2 $\gamma$  on observe l'inverse, son expression double dans les trophoblastes villositaires du 1<sup>er</sup> trimestre tardif par rapport à ceux du 1<sup>er</sup> trimestre précoce. En revanche, l'expression d'AP-2 $\alpha$ , Sp1 et Sp3 ne semble pas varier au cours du 1<sup>er</sup> trimestre. Au niveau de l'expression de ces facteurs dans le syncytiotrophoblaste d'autres différences apparaissent. L'expression des facteurs de transcription de la famille AP-2 est comparable à celle observée dans les CTV mononucléés, c'est à dire que l'expression d'AP-2 $\alpha$  est inchangée, celle d'AP-2 $\beta$  diminue de deux fois et celle d'AP-2 $\gamma$  double au 1<sup>er</sup> trimestre tardif par rapport au 1<sup>er</sup> trimestre précoce. En revanche, on observe une diminution de 50% de l'expression de Sp1 dans le syncytiotrophoblaste du 1<sup>er</sup> trimestre tardif par rapport au 1<sup>er</sup> trimestre précoce et l'expression de Sp3 est plus forte entre le 1<sup>er</sup> trimestre précoce par et le 1<sup>er</sup> trimestre tardif.



**Figure 51 : Expression des gènes de la sous-unité  $\beta$  de l'hCG dans des villosités choriales de placentas à terme (Cs), de RCIU ou de pré-éclampsie (PE).**

Les transcrits codant pour la sous-unité  $\beta$  de type I ou de type II de l'hCG ont été quantifiés par QPCR relative (Cs : n=11 ; RCIU : n=10 ; PE: n=10). Les valeurs des taux de transcrits ont été normalisées par rapport au 18S. Le test statistique "Mann and Whitney" a été utilisé pour comparer les taux de transcrits dans les villosités choriales de RCIU ou PE par rapport villosités choriales de placentas à terme (Cs): \* p < 0.05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0.001

### **III - Dérégulation de l'expression de l'hCG beta de type I et de type II dans la pré-éclampsie et le RCIU**

Grâce à nos collaborateurs australiens, nous avons pu quantifier l'expression des hCG beta de type I et de type II dans des extraits totaux de villosités placentaires provenant de placentas pré-éclamptiques, de RCIU et de grossesses normales. Nous mettons ainsi en évidence que l'hCG beta de type I est diminuée dans les placentas provenant des deux pathologies mais cette diminution est plus forte dans les placentas de RCIU (6 fois) que dans les placentas de PE (2 fois). La quantification des transcrits de l'hCG beta de type II a permis de mettre en évidence des résultats surprenants. Son expression est augmentée de 4 fois dans les placentas de PE par rapport aux placentas sains alors qu'elle est diminuée de deux fois dans les placentas de RCIU (Cf. figure 51). Ces résultats montrent que pour ces échantillons (Cf. tableau clinique page suivante) l'hCG beta, quelque soit son type, est diminuée dans le RCIU. Dans la pré-éclampsie on observe une régulation opposée des deux types de l'hCG, le type I diminue alors que le type II augmente.

### **IV - Discussion**

La régulation de l'hCG a été précédemment étudiée, essentiellement dans des modèles de cultures primaires de trophoblastes villex issus de placentas à terme et dans la lignée trophoblastique JEG-3. Ces études ont permis de mettre en évidence sur le promoteur du gène CGB5 la présence de séquences consensus de différents facteurs de transcription (Sp, AP-2, oct, JUN...) et elles ont montré que les facteurs Sp seraient plutôt impliqués dans la régulation de l'expression basale de l'hCG alors que les facteurs AP-2 seraient impliqués à la fois dans sa régulation basale et dans celle induite par une augmentation de l'AMP<sub>c</sub> (Jonhson et Jameson, 1999 ; LiCalsi et coll, 2000 ; Knöfler et coll, 2004). Cependant, ces études ne peuvent pas refléter le panel d'expression des facteurs de transcription par les cytotrophoblastes villex du 1<sup>er</sup> trimestre. Les trophoblastes villex à terme sont différents de ceux obtenus au 1<sup>er</sup> trimestre, qui par exemple fusionnent plus vite et produisent plus d'hCG

Tableau n°4 : Caractéristiques cliniques des échantillons

<b>Caractéristique (moyenne ± SD)</b>	<b>RCIU</b>	<b>Contrôle (césarienne)</b>	<b>significativité</b>
<b>Age gestationnel</b>	36,42 ± 3,4	36,23 ± 364	p = 0,8465
<b>Age maternel</b>	29 ± 5,4	32,69 ± 5,6	p = 0,1641
<b>Poids du placenta</b>	429 ± 125,6	526 ± 157,6	p = 0,1826
<b>Parité</b>			
<i>Primipare</i>	7	5	
<i>Multipare</i>	5	8	
<b>Mode de délivrance</b>			
<i>Voies vaginales</i>	6	4	
<i>Césarienne avec travail</i>	2	3	
<i>Césarienne sans travail</i>	2	6	
<b>Sexe du nouveau né</b>			
<i>Male</i>	4	6	
<i>femelle</i>	8	7	
<b>Poids de naissance</b>	2164 ± 663,5	2856 ± 799,6	p < 0,01

<b>Caractéristique (moyenne ± SD)</b>	<b>PE</b>	<b>Contrôle (césarienne)</b>	<b>significativité</b>
<b>Age gestationnel</b>	36,42 ± 3,4	36,23 ± 364	p = 0,5929
<b>Age maternel</b>	29,81 ± 3,4	32,69 ± 5,6	p = 0,164
<b>Poids du placenta</b>	337 ± 152,2	526 ± 157,6	P < 0,05
<b>Sexe du nouveau né</b>			
<i>Male</i>	6	6	
<i>femelle</i>	4	7	
<b>Poids de naissance</b>	1752 ± 801,5	2856 ± 799,6	p < 0,05

(données du laboratoire). Le modèle JEG-3 est une lignée trophoblastique issue d'un choriocarcinome et cultivé depuis de nombreuses années à 20% d'oxygène, ce qui ne correspond pas au contexte physiologique d'expression de l'hCG. De plus, nous montrons que les JEG-3 ne produisent que de l'hCG beta de type II (résultat non présenté) ce qui ne permet donc pas d'étudier la régulation des deux types d'hCG. Une seule étude (Knöfler et coll, 2004) a abordé la régulation de l'hCG au 1<sup>er</sup> trimestre mais sans prendre en compte l'impact du changement de l'environnement en oxygène lorsque les bouchons trophoblastiques se délitent. Nous montrons donc pour la première fois, la localisation et l'expression des facteurs de transcription, connus pour réguler l'hCG, au cours du premier trimestre, avant et après oxygénation de la chambre intervillieuse.

Nous avons débuté l'étude des facteurs de transcription par leur détection *in situ* et *in vitro* par immunohistochimie et immunocytochimie. Les résultats que nous avons obtenus *in situ* montrent une différence de localisation nette des 5 facteurs de transcription que nous avons ciblés (d'AP-2 $\alpha$ , AP-2 $\beta$ , AP-2 $\gamma$ , Sp1 et Sp3) entre le 1<sup>er</sup> trimestre précoce et le 1<sup>er</sup> trimestre tardif. Nos résultats ne correspondent que partiellement aux résultats obtenus par Knöfler au 1<sup>er</sup> trimestre. Ces auteurs ne précisent pas le terme exact des placentas utilisés. Pour Sp1 nous obtenons le même type de marquage (CTV et ST) uniquement au 1<sup>er</sup> trimestre précoce. Pour Sp3, nous montrons que les CT et le ST sont marqués au 1<sup>er</sup> trimestre précoce puis majoritairement le ST au 1<sup>er</sup> trimestre tardif. Knöfler et coll, mettent en évidence un marquage uniquement dans le CT mais avec un anticorps que nous avons remis en question avec nos collaborateurs australiens.

Les variations d'expression protéiques observées *in situ* par immunohistochimie ne reflètent pas l'expression transcriptionnelle, hormis pour AP-2 $\beta$ . La quantification des transcrits étant faite sur des extraits de villosités totales, une différence d'expression entre les trophoblastes villex et le syncytiotrophoblaste peut être masquée au niveau global. Nous n'avons pas obtenu par immunocytochimie, les résultats escomptés dans les cultures primaires de trophoblastes villex. La localisation des facteurs de transcription étudiés au cours de la différenciation des CTV en ST ne semble pas changer quelque soit le terme étudié, par contre les niveaux d'expression des ARN varient avec la syncytialisation. L'expression d'AP-2 $\beta$  augmente avec la syncytialisation alors que celle de Sp1 et Sp3 diminue et que celle d'AP-2 $\alpha$  et d'AP-2 $\gamma$  ne varie pas dans les cultures de CTV de 8-9 SA. L'expression d'AP-2 $\beta$  et de Sp1 augmente avec la syncytialisation des CTV de 12-14 SA contrairement à celles des 3 autres facteurs de transcription qui ne sont pas modifiées. Ces variations de transcrits ne sont pas



reflétées au niveau protéique, peut être dû au fait de régulations traductionnelles et/ou de la demi-vie des ARNs. La comparaison des niveaux d'expression des facteurs de transcription dans les CTV mononucléés entre les deux groupes de termes permet d'obtenir des résultats beaucoup plus proches de ceux obtenus *ex vivo*. En effet, l'expression d'AP-2 $\alpha$ , Sp1 et Sp3 ne varie pas et celle d'AP-2 $\beta$  augmente entre les CTV de 8-9 SA et ceux de 12-14 SA. Seule différence, l'expression d'AP-2 $\gamma$  qui augmente avec le terme alors qu'*ex vivo* elle n'était pas modifiée. Après 72h de culture, lorsque les syncytia sont formés, les différences observées *ex vivo* ne sont plus autant conservées. L'expression d'AP-2 $\alpha$ , d'AP-2 $\beta$  et Sp3 reste inchangée, par contre l'expression d'AP-2 $\gamma$  augmente et celle de Sp1 diminue dans les ST de 12-14 SA par rapport à ceux de 8-9 SA, ce qui ne correspond pas aux résultats obtenus *ex vivo*. La compréhension de ces résultats se complique avec ceux obtenus par Western blot. En effet, cette technique, tout en utilisant les mêmes anticorps, donne des résultats différents. La présence des 5 facteurs de transcription diminue avec la syncytialisation *in vitro*, parfois jusqu'à disparaître complètement comme AP-2 $\alpha$ , quelque soit le terme des placentas dont sont issus les CTV. Nous avons obtenu les mêmes résultats sur des extraits protéiques de cellules totales, les masses moléculaires apparentes sont justes, les Western blot sont propres, nous retrouvons pour Sp3 deux bandes correspondant à la forme courte, tronquée, de Sp3 et à sa forme longue et la quantité de protéines totales déposée dans chaque puits est identique (contrôlé par la lamine A/C). Nous n'avons pas encore trouvé d'explication valide aux résultats obtenus par cette technique. Nous savons uniquement, après leur présentation sous forme de poster à un congrès, que l'équipe de Knöfler obtient les mêmes résultats et ne parvient pas non plus à trouver d'explication à ce phénomène. On peut seulement considérer que l'immunocytochimie est une technique non quantitative qui ne permet pas de voir les variations d'expression des protéines mais également une technique plus sensible que le Western Blot. Il est également possible que les anticorps utilisés aient une affinité plus importante pour leur antigène ayant une structure 3D (Immunocytochimie) et non pas linéarisé (Western blot), et qu'ainsi leur seuil de détection soit différent suivant la technique utilisée. Ces deux hypothèses tendent à valider les résultats obtenus en Western Blot, c'est à dire que l'expression protéique des facteurs de transcription diminue avec la syncytialisation. La réalisation d'une cinétique (2h, 24h, 48h, et 72h) en immunocytochimie et en Western blot de l'expression protéique de ces facteurs de transcription permettrait de connaître avec plus de précision leur évolution au cours de la différenciation des trophoblastes villosités *in vitro*.



Globalement la différence de résultats obtenus *in situ* et *in vitro* au niveau de l'expression de ces facteurs de transcription peut s'expliquer par le changement d'environnement que subissent les CTV. Ils ne sont plus dans leur environnement physiologique (absence de structure 3D, d'axe mésenchymateux, de syncytiotrophoblaste, de sang maternel) et la concentration en oxygène est très supérieure à celle présente dans la chambre intervillieuse (20% d'O<sub>2</sub> au lieu de 2 ou 8%). Cependant, il est intéressant de noter que la différence est principalement marquée après 72h de culture, les résultats obtenus après 2h de culture sont identiques à ceux obtenus *ex vivo*, hormis pour le facteur AP-2 $\gamma$ . Nous allons donc considérer que les résultats obtenus *in situ* ou en début de culture sont plus proches de la réalité. Au niveau protéique il est difficile de tirer des conclusions au vu des résultats obtenus.

Dans l'article présenté précédemment nous avons mis en évidence que l'environnement pauvre en oxygène du premier trimestre précoce était associé à une production supérieure d'hCG par les trophoblastes. Pour cela nous avons quantifié les taux de transcrits des gènes de l'hCG beta de type I, de type II, ou les deux sans distinction et nous montrons qu'ils sont 5 à 10 fois plus élevés dans les villosités de 8-9 SA comparées à celles de 12-14 SA. Etonnamment nous retrouvons les mêmes résultats *in vitro* avec des cultures primaires de cytotrophoblastes villex issus de placentas de 8-9 SA ou de 12-14 SA, que ce soit au niveau de l'expression de l'hCG beta qu'au niveau de sa sécrétion. De même, nous avons mis en évidence *in situ* sur des villosités placentaires de 8-9 SA que les cytotrophoblastes villex non encore fusionnés avec le syncytiotrophoblaste, présentaient un marquage pour l'hCG beta alors que ceux des villosités placentaires de 12-14 SA étaient non marqués. *In vitro*, ce résultat est confirmé, les CTV mononucléés de 8-9 SA expriment et secrètent plus d'hCG beta de type I et de type II que ceux de 12-14 SA. Cette différence n'est pas retrouvée au niveau des ST. Ainsi, *ex vivo* nous mettons en évidence une importante différence d'expression des transcrits et des protéines d'hCG entre le 1<sup>er</sup> trimestre précoce et le 1<sup>er</sup> trimestre tardif, différence que l'on peut corrélérer au pic d'hCG sérique. *In vitro* nous observons une différence d'expression d'hCG entre les deux termes uniquement dans les trophoblastes villex mononucléés. Il semble peu probable que cette différence de production d'hCG par les CTV mononucléés du 1<sup>er</sup> trimestre précoce par rapport à ceux du 1<sup>er</sup> trimestre tardif puisse être à elle seule responsable de la différence de production d'hCG observée *in situ* entre ces deux périodes du 1<sup>er</sup> trimestre. Notre hypothèse serait que les syncytia du 1<sup>er</sup> trimestre précoce



sécrètent également plus d'hCG que ceux du 1<sup>er</sup> trimestre tardif mais elle n'est pas confirmée *in vitro*, probablement car les cultures ont lieu à 20% d'oxygène pendant 72 heures.

Nous avons également observé que les CTV du 1<sup>er</sup> trimestre précoce fusionnaient plus vite que les CTV du 1<sup>er</sup> trimestre tardif. Sachant que l'hCG stimule de façon autocrine la fusion trophoblastique, nous suggérons que la plus grande production d'hCG des cytotrophoblastes villosités du 1<sup>er</sup> trimestre précoce pourrait expliquer leur vitesse de fusion augmentée par rapport au CTV du 1<sup>er</sup> trimestre tardif.

Les caractéristiques des tissus placentaires du 1<sup>er</sup> trimestre précoce ou tardif semblent être conservées en partie au cours des cultures primaires de trophoblastes à 20% d'O<sub>2</sub>. Nous avons pu mettre en évidence ce phénomène étonnant pour l'expression de la SOD1, de l'hCG, du maintien d'un index de fusion différent entre les périodes du 1<sup>er</sup> trimestre. De la même façon, il a été montré au laboratoire *in situ* et *in vitro* que les trophoblastes villosités du 1<sup>er</sup> trimestre précoce n'exprimaient pas les mêmes isoformes de la lysyl oxydase que ceux du 1<sup>er</sup> trimestre tardif (résultats non publiés). Nous montrons cependant que l'expression et la localisation des facteurs de transcription des familles AP-2 et Sp observées *in situ*, ne sont pas fidèlement retrouvés *in vitro*. En début de culture la différence d'expression de ces facteurs est conservée entre les deux groupes de termes mais l'évolution au cours de la syncytialisation est différente et aboutit au niveau des syncytia à des différences d'expression en fonction des groupes de termes par rapport aux résultats obtenus *in situ*. Il semble donc exister des systèmes plus sensibles aux variations d'environnement, particulièrement en oxygène. Cette non conservation du profil d'expression des facteurs de transcriptions *in vitro* pourrait expliquer, dans notre étude, pourquoi nous n'observons pas de différence d'expression des deux types d'hCG beta dans les syncytia (au bout de 72h de culture à 20% d'O<sub>2</sub>) entre les deux groupes de termes considérés.

Connaissant le rôle important de l'hCG dans le développement précoce du placenta et dans l'angiogénèse nous nous sommes intéressés à l'expression de l'hCG beta de type I et de type II dans deux pathologies de la grossesse : la pré-éclampsie et le RCIU. Étonnamment les données de la littérature sur l'hCG et la pré-éclampsie sont contradictoires, il n'est pas clairement établi si l'hCG est augmentée, non modifiée ou diminuée (pour revue : ROMOSCANU, Ilinca. Thèse de doctorat de Médecine, 2007). Au niveau des grossesses présentant un RCIU, beaucoup moins d'études ont été réalisées mais les résultats sont également contradictoires (Odibo et coll, 2011 ; Newhouse et coll, 2007). L'étude de l'hCG dans ces pathologies au niveau sérique mais aussi au niveau placentaire nécessite donc d'être



plus approfondie. Nous mettons en évidence que l'expression de l'hCG de type I et de type II est diminuée dans les placentas de RCIU. Dans les placentas de pré-éclampsie seule l'expression de l'hCG beta de type I est diminuée. En effet, l'expression de l'hCG beta de type II est augmentée de quatre fois dans ces placentas. Ce résultat reflète probablement l'augmentation de l'hCG totale observée dans certaines études car l'hCG de type II est la forme la plus abondante. La cohorte d'échantillons que nous avons utilisée ne comportait pas un grand nombre d'échantillons (RCIU n = 10, PE n = 10, Césarienne n = 11). Il sera donc nécessaire de confirmer ces résultats sur une plus grande cohorte. Il serait également intéressant d'étudier l'expression des facteurs de transcription régulant l'hCG dans ces pathologies.



*Résultats 2<sup>ème</sup> partie*



## Résultats II: régulation de l'hCG par le Récepteur nucléaire PPAR gamma dans les cytotrophoblastes vilieux et extravilleux.

### **I - Contexte et présentation de la publication :**

Lorsque j'ai débuté mon travail de thèse, l'équipe de Thierry Fournier venait de mettre en évidence la production et la sécrétion de l'hormone chorionique gonadotrope humaine (hCG) par les cytotrophoblastes extravilleux au même titre que le syncytiotrophoblaste. En effet, il était bien établi que l'hCG est produite et sécrétée par le syncytiotrophoblaste dans le compartiment maternel où elle exerce des fonctions endocrines mais aussi localement où elle stimule de façon autocrine la syncytialisation. Les données de la littérature concernant l'expression de l'hCG par le cytotrophoblaste extravilleux étaient contradictoires, l'équipe a donc voulu préciser ces données. *In situ*, ils ont détecté l'hCG dans les CTEV à tous leurs stades de différenciation (invasifs, endovacuaires ou cellules géantes) à l'exception du stade prolifératif. Ces résultats ont été confirmés *in vitro* par des techniques d'immunocytochimie, de dosage immunologique dans les surnageants de culture et de Western blot. Dans un deuxième temps, l'équipe a montré que l'hCG produite par les cytotrophoblastes extravilleux invasifs stimulait l'invasion trophoblastique *in vitro* contrairement à celle produite par le syncytiotrophoblaste, et que cette hCG était régulée négativement par le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$ . Ainsi, l'hCG produite par le CTEV invasif représente un candidat pour expliquer la régulation de l'invasion trophoblastique par le PPAR $\gamma$ .

A mon arrivée au laboratoire, la doctorante de l'équipe de Thierry Fournier, Karen Handschuch, cherchait à comparer la régulation des gènes des deux sous-unités de l'hCG par le récepteur nucléaire PPAR gamma dans les deux types de trophoblastes, vilieux « endocrines » et extravilleux invasifs. Pour cela nous avons comparé les taux respectifs de transcrits et de protéines des sous-unités alpha et beta de l'hCG, ainsi que ceux de l'hCG



totale, entre les cytotrophoblastes vilieux « endocrines » et les cytotrophoblastes extravilleux invasifs, traités ou non avec un agoniste de PPAR gamma, obtenus à partir des mêmes villosités placentaires du premier trimestre de la grossesse. Cette étude a permis de mettre en évidence que :

- la sous-unité alpha libre et la sous-unité beta libre étaient différemment exprimées et secrétées par les deux types de trophoblastes avec un ratio  $\alpha/\beta$  cent fois plus faible dans les CTEV.
- L'activation de PPAR $\gamma$  par l'agoniste synthétique la rosiglitazone dans les cytotrophoblastes vilieux et extravilleux aboutit à des résultats opposés: les taux de transcrits des sous-unités alpha et beta de l'hCG ainsi que leur sécrétion protéique sont augmentés dans les trophoblastes vilieux alors qu'ils sont diminués dans les cytotrophoblastes extravilleux.

Ainsi, PPAR $\gamma$  contrôle la différenciation des deux types de trophoblastes humains : il promeut la différenciation des trophoblastes vilieux en syncytiotrophoblaste alors qu'il inhibe l'acquisition du phénotype invasif par les cytotrophoblastes extravilleux. De plus, il régule de façon opposée l'expression des gènes de l'hCG selon qu'il s'agit des cytotrophoblastes vilieux endocrines ou des cytotrophoblastes extravilleux invasifs. L'ensemble de nos résultats, associés à ceux obtenus précédemment par l'équipe, montre que l'hCG produite par le cytotrophoblaste extravilleux est différente d'un point de vue **qualitatif et quantitatif** de celle produite par le trophoblaste vilieux. L'hCG est un gène cible de PPAR $\gamma$  dans les deux types de trophoblastes mais sa régulation est opposée.



**EXPRESSION AND REGULATION BY PPAR $\gamma$  OF HCG  $\alpha$ -  
AND  $\beta$ -SUBUNITS: COMPARISON BETWEEN VILLOUS  
AND INVASIVE EXTRAVILLOUS TROPHOBLASTIC  
CELLS**

K. Handschuh, J. Guibourdenche, M. Cocquebert, V. Tsatsaris, M. Vidaud,  
D. Evain-Brion, T. Fournier

Placenta, 30 (2009) 1016–1022





## Expression and Regulation by PPAR $\gamma$ of hCG $\alpha$ - and $\beta$ -subunits: Comparison between Villous and Invasive Extravillous Trophoblastic Cells<sup>☆</sup>

K. Handschuh<sup>a,b</sup>, J. Guibourdenche<sup>a,b,c,f</sup>, M. Cocquebert<sup>a,b,f</sup>, V. Tsatsaris<sup>a,b,d,f</sup>, M. Vidaud<sup>b,e</sup>,  
D. Evain-Brion<sup>a,b,f</sup>, T. Fournier<sup>a,b,d,f,\*</sup>

<sup>a</sup>INSERM, UMR767, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Paris F 75006, France

<sup>b</sup>Université Paris Descartes, Paris F 75006, France

<sup>c</sup>Biologie Hormonale, CHU Cochin, Paris F 75014, France

<sup>d</sup>AP-HP, Maternité Port-Royal, groupe hospitalier Cochin, Paris F 75014, France

<sup>e</sup>INSERM, UMR745, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Paris F 75006, France

<sup>f</sup>PremUP, Foundation, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Paris F 75006, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Accepted 18 September 2009

#### Keywords:

Human placenta  
Trophoblast differentiation  
Trophoblast invasion  
Syncytiotrophoblast  
Rosiglitazone  
hCG gene expression

### ABSTRACT

During human placental development trophoblast follows two differentiation pathways: the extravillous (EVCT) and the villous cytotrophoblasts (VCT) that display different phenotypes and functions. It is well established that human chorionic gonadotropin hormone (hCG) is mainly secreted by the endocrine VCT (syncytiotrophoblast) into the maternal compartment and stimulates the formation of the syncytiotrophoblast (ST) in an autocrine manner. We recently reported that the invasive EVCT also produces hCG that promotes trophoblast invasion in vitro. Herein, we compared hCG gene expression in primary culture of villous and extravillous trophoblasts obtained from the same first trimester human chorionic villi and differentiated in vitro into ST and invasive EVCT, respectively. Total hCG, free  $\alpha$  and free  $\beta$  subunits were quantified in cell supernatants by immunometric assays and normalized to DNA content.  $\alpha$  and  $\beta$  transcript levels were quantified by Q-PCR and normalized to cytokeratin 7. We show that free  $\alpha$ -, free  $\beta$ -subunits and total hCG are differently expressed and secreted by the two trophoblast subtypes during their differentiation in vitro. We found an  $\alpha/\beta$  ratio 100 times lower in invasive EVCT in comparison to the ST suggesting that  $\beta$  subunit may not be step limiting for hCG production in EVCT. Finally we investigated the regulation of hCG gene expression by PPAR $\gamma$ , a nuclear receptor that controls trophoblast differentiation and invasion. Interestingly, activation of PPAR $\gamma$  by the agonist rosiglitazone gave opposite results in the endocrine VCT and invasive EVCT:  $\alpha$  and  $\beta$  subunit transcript levels and protein secretions were up regulated in VCT, whereas they were down regulated in EVCT. Our results demonstrated that hCG gene expression is differentially regulated in the two trophoblast lineages during their in vitro differentiation and modulated in an opposite way by PPAR $\gamma$ .

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Human chorionic gonadotropin hormone (hCG), specific to humans and great apes, is a glycoprotein composed of an  $\alpha$  subunit (hCG $\alpha$ ), which is common to other peptide hormones such as LH (luteinizing hormone), FSH (follicle stimulating hormone) and TSH (thyroid stimulating hormone), and a  $\beta$  subunit (hCG $\beta$ ), which

<sup>☆</sup> This work was supported by "la Caisse d'Assurance Maladie des Professions Libérales-Provence", CAMPLP, Paris la Défense, 92042, France.

\* Corresponding author. INSERM, UMR767, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Paris F 75006, France. Tel.: +33 (1) 53 73 96 03; fax: +33 (1) 44 07 39 92.

E-mail address: [thierry.fournier@parisdescartes.fr](mailto:thierry.fournier@parisdescartes.fr) (T. Fournier).

confers the biological specificity of the hormone [1,2]. hCG $\alpha$  is encoded by a single gene on chromosome 6 and hCG $\beta$  by a cluster of six genes on chromosome 19, the CG $\beta$ 5 and CG $\beta$ 8 genes being the most actively transcribed contributing about 60–80% to the total pool of  $\beta$ -subunit mRNA transcripts in the placenta [3–5].

After implantation, hCG is the first trophoblast signal detected in the maternal blood and is used as a diagnostic of pregnancy. hCG and its free  $\beta$  subunit are detected in the maternal blood from the second week of pregnancy and their levels increase until reaching a peak at ten to twelve weeks and then decrease gradually, whereas hCG $\alpha$  levels increase progressively up to term [6]. Maintenance of pregnancy during early gestation depends on the synthesis of hCG, which prevents regression of the corpus luteum [7] allowing the maintenance of ovarian progesterone secretion [8]. In addition to

its well-established endocrine role, hCG plays a role in human trophoblast differentiation [9].

After implantation, human trophoblasts follow two paths of differentiation leading to villous and extravillous cytotrophoblasts that display different phenotypes and functions (Fig. 1). The mononucleated villous cytotrophoblasts (VCT) that cover the floating chorionic villi aggregate and fuse to form a multinucleated syncytiotrophoblast (ST), which is involved in the exchange of gases and nutrients between the mother and the fetus. Moreover, the ST represents the endocrine tissue of the placenta, secreting large amounts, unparalleled in other mammals, of protein hormones including hCG [10]. Importantly, hCG increases its own synthesis in an autocrine fashion by inducing the formation of the ST through the hCG/LH receptor present in VCT and cAMP/protein kinase A-dependent pathway [9,11,12].

The trophoblasts located at the tip of the anchoring villi contacting the uterine wall follow a different differentiation pathway. These trophoblasts, named extravillous cytotrophoblasts (EVCT), proliferate to form multilayered columns of cells and then invade the decidua up to the upper third of the myometrium. At the deciduomuscular junction, EVCT undergo a final differentiation into multinucleated giant cells. EVCT also specifically invade the uterine arterioles through endovascular or perivascular routes, and replace the endothelial lining and most of the musculoelastic tissue of the vessel wall leading to low resistance vessels. Hence, EVCT are directly involved in the anchoring of chorionic villi in the uterus, and in the essential remodelling of the uterine arterioles to provide a supply of maternal blood to the intervillous space adequate to support fetal growth [13,14].

We have recently reported in placental sections from 8 to 16 weeks of gestation that hCG is also expressed *in situ* by invasive EVCT along their differentiation pathway from the distal column to the myometrium and the uterine arteries including interstitial, endovascular EVCT and giant cells [15]. We also demonstrated that only hCG glycoforms from EVCT origin promoted trophoblast invasion *in vitro* [16].

Interestingly, among the factors controlling human trophoblast differentiation, activation of the nuclear receptor PPAR $\gamma$  by synthetic or natural ligands was shown to stimulate ST formation and hCG secretion in villous trophoblast from term placenta [18,19] and to inhibit trophoblast invasion using primary EVCT isolated from first trimester placenta and cultured on Matrigel [20].

hCG and PPAR $\gamma$  play a key role in human trophoblast differentiation and invasion; we have in the present study (i) compared transcript levels and protein secretions of the  $\alpha$ -,  $\beta$ -subunits and total hCG in villous and extravillous trophoblast primary cells obtained from the same first trimester human placentas and (ii) investigated the role of PPAR $\gamma$  in the regulation of hCG gene expression in each trophoblast subtype.

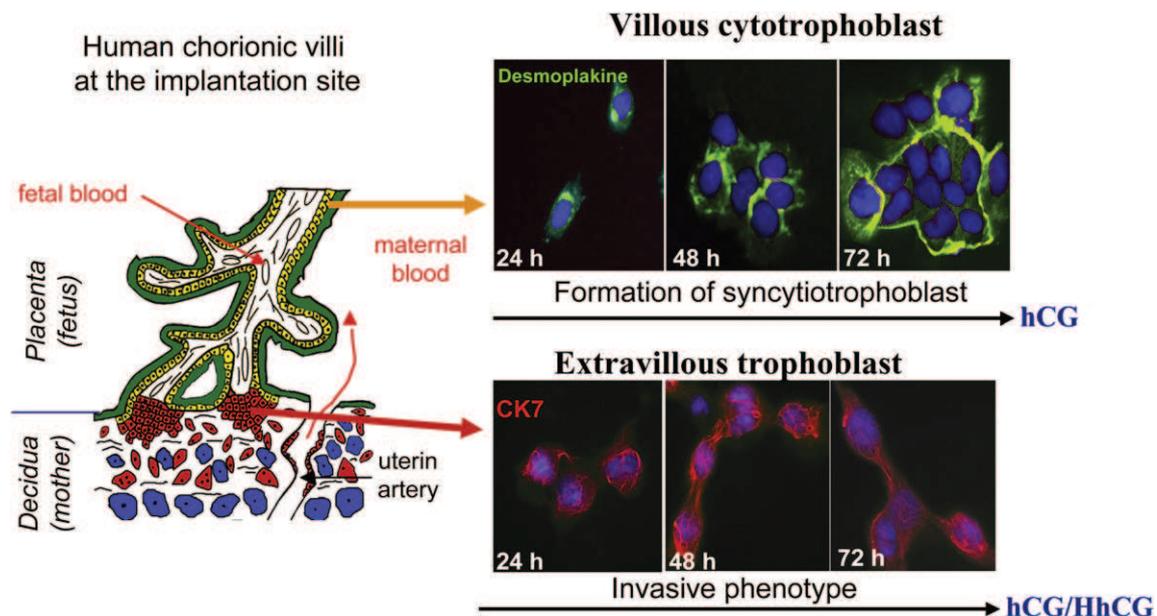
## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Placental tissues from patients who voluntarily and legally chose to terminate pregnancy during the first trimester (8–12 week of gestation) were obtained from Broussais Hospital (Paris, France). All patients gave informed consent.

### 2.2. Isolation and purification of villous (vct) and extravillous (evct) cytotrophoblasts

EVCT and VCT were isolated from the same first trimester chorionic villi by differential trypsin digestion according to the methods of Tarrade et al. [20], with slight modifications [21]. Cells were diluted to a concentration of  $2.5 \times 10^5$  cells/mL in DMEM supplemented with 10% FCS, 2 mM glutamine, 100 IU/mL penicillin and 100  $\mu$ g/mL streptomycin and plated on Matrigel-coated (5 mg/mL; Collaborative Biomedical Products, Le Pont de Claix, France) 35-mm Falcon culture dishes. After 2 h of culture in 5% CO $_2$  at 37 °C, cells were carefully washed three times to eliminate non-adherent cells. Each preparation of purified EVCT was characterized using immunocytochemistry and



**Fig. 1.** *In vitro* models of villous and extravillous cytotrophoblasts. Extravillous (EVCT) and mononucleated villous (VCT) cytotrophoblasts were isolated from the same first trimester placenta and cultured up to 72 h. VCT aggregate (48 h) and fuse to form a syncytiotrophoblast (ST) at 72 h as shown by desmoplakine immunolabelling. EVCT acquire an invasive phenotype (cytokeratin 7 immunolabelling). The ST expresses and secretes hCG that plays a well-established endocrine and autocrine role. More recently, we showed that EVCT secretes hCG and hyperglycosylated hCG that promotes trophoblast invasion *in vitro*.

real-time PCR and cells were shown to express *in vitro* the specific markers of human invasive EVCT *in situ* as described previously, i.e., cytokeratin 7, human leukocyte antigen G (HLA-G), CD9, human placental lactogen, *c-erbB2* and  $\alpha 5\beta 1$  and were negative to vimentin [19,20]. These purified EVCT were non-proliferative and highly invasive on Matrigel-coated transwells or dishes [19].

After EVCT isolation, the same chorionic villi were used to obtain VCT. VCT isolation is based on the protocol of Kliman et al. [22] and is a modified version [21] of the Tarrade et al. protocol [20]. After Percoll gradient fractionation, cells were diluted to a concentration of  $1.25 \times 10^6$  cells/mL in DMEM supplemented with 10% FCS, 2 mM glutamine, 100 IU/mL penicillin and 100  $\mu$ g/mL streptomycin and plated on 35-mm or 60-mm TPP (Techno Plastic Products, Switzerland) tissue culture dishes. VCT were incubated overnight in 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C and washed three times to eliminate non-adherent cells. Purified VCT cultures were characterized by positive staining for CK7 (95% positive cells) and by the observation of cell aggregates and syncytiotrophoblasts at 48 h and 72 h, respectively. After overnight incubation and washes, purified EVCT and VCT primary cultures were treated for 48 h with 1  $\mu$ M of the PPAR $\gamma$  agonist rosiglitazone (BRL49653, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). Culture media were collected every 24 h after 24 h, 48 h and 72 h of primary cultures, centrifuged and cell supernatants stored at –20 °C until use. Corresponding cells were harvested for DNA quantification.

### 2.3. Hormone assays

Samples were tested for free hCG $\alpha$  using an immunoradiometric assay (IRMA  $\alpha$  subunit, Immunotech Beckman Coulter Company, Marseille, France). Samples were diluted (1/10) in the zero standard and then incubated in tubes coated with the first monoclonal antibody, raised against the  $\alpha$ -subunit of hCG. Performance characteristics were as follows: range 0.25–10 IU/L; within-run precision 6.8% and between-run precision 19%; functional detection limit 0.2 IU/L. Free hCG $\beta$  was determined on the Kryptor automated immunofluorescent analyzer (Brahms, Berlin Germany). The assay combined two monoclonal antibodies against two different epitopes of hCG $\beta$ . Performance characteristics were as follows: range 0.2–150 IU/L; within-run precision 3.4% and between-run precision 5.9%; functional detection limit 0.1 IU/L. Total hCG (hCG) was determined using the chemiluminescent immunoassay analyzer ACS-180SE system (Bayer Diagnostics, Westwood CA, USA). The assay used for total hCG quantification was a sandwich immunoassay that recognized free  $\beta$ -subunit, nicked and intact hCG. Two antibodies were used: a polyclonal goat anti-hCG antibody and a mouse monoclonal anti-hCG antibody, which were raised against two different epitopes of the  $\beta$ -subunit of hCG. Performance characteristics were as follows: range 2–1000 IU/L; within-run precision 2.8% and between-run precision 5.6%; functional detection limit 1 IU/L. Samples were diluted (1/100) in the reaction buffer when necessary. In order to compare the secretion of hCG in VCT and EVCT supernatants, results were converted in ng/mL (9.3 mIU/mL hCG correspond to 1 ng/mL; WHO) and normalized to one  $\mu$ g of DNA.  $\alpha$ - $\beta$ -subunit ratios for VCT and EVCT were determined after conversion of the results in ng/L according to the international standards: 1 IU/L of hCG $\alpha$  corresponds to 10<sup>3</sup> ng/L (WHO 75/569), whereas 1 IU/L of hCG $\beta$  corresponds to 1 ng/L (OMS 75/551).

### 2.4. DNA quantification

Cell pellets were solubilized in 5 M GuSCN, 0.1 M EDTA, pH 7 and stored at –80 °C until use. DNA was quantified by fluorometry using the fluorochrome Hoechst 33258 [15].

### 2.5. Quantification of specific transcripts by real-time RT-PCR

Total RNA was extracted from primary-cultured trophoblastic cells using the acid-phenol guanidium method (TRIzol reagent). The quality of the RNA samples was determined by electrophoresis through agarose gels and staining with ethidium bromide, and the 18S and 28S RNA bands were visualized under UV light. cDNA synthesis and PCR amplification were performed as described by Bieche et al. [23]. RNA was reverse transcribed in a final volume of 20  $\mu$ l containing 1 $\times$  RT buffer [500 mM each dNTP, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 75 mM KCl, and 50 mM Tris–HCl (pH 8.3)], 10 units of RNasin<sup>TM</sup> RNase inhibitor (Promega, Madison, WI), 10 mM DTT, 50 units of Superscript II RNase H-reverse transcriptase (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD), 1.5 mM random hexamers (Pharmacia, Uppsala, Sweden), and 1  $\mu$ g of total RNA. The samples were incubated at 20 °C for 10 min and 42 °C for 30 min, and reverse transcriptase was inactivated by heating at 99 °C for 5 min and cooling at 5 °C for 5 min. All of the PCR reactions were performed using an ABI Prism 7700 Sequence Detection system (Perkin-Elmer Applied Biosystems). PCR was performed using the SYBR Green PCR Core Reagents kit (Perkin-Elmer Applied Biosystems). The thermal cycling conditions comprised an initial denaturation step at 95 °C for 10 min and 50 cycles at 95 °C for 15 s and 65 °C for 1 min. Experiments were performed with duplicates for each data point. The primers used for this study (CGA, CGB, CK7, PPIA) have already been published [24]. The relative target gene expression level was normalized to a calibrator, or 1 $\times$  sample, consisting of the trophoblast sample that contained the smallest amount of target gene mRNA. The CK7 gene coding for cytokeratin 7, whose expression is specific to cytotrophoblasts, and the gene peptidylprolyl isomerase A (PPIA) coding for human peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A) was used as the endogenous RNA control and each sample was normalized on the basis of either its PPIA or CK7 content. Normalization of each sample on the basis of either its CK7 or PPIA contents gave similar results.

### 2.6. Statistical analysis

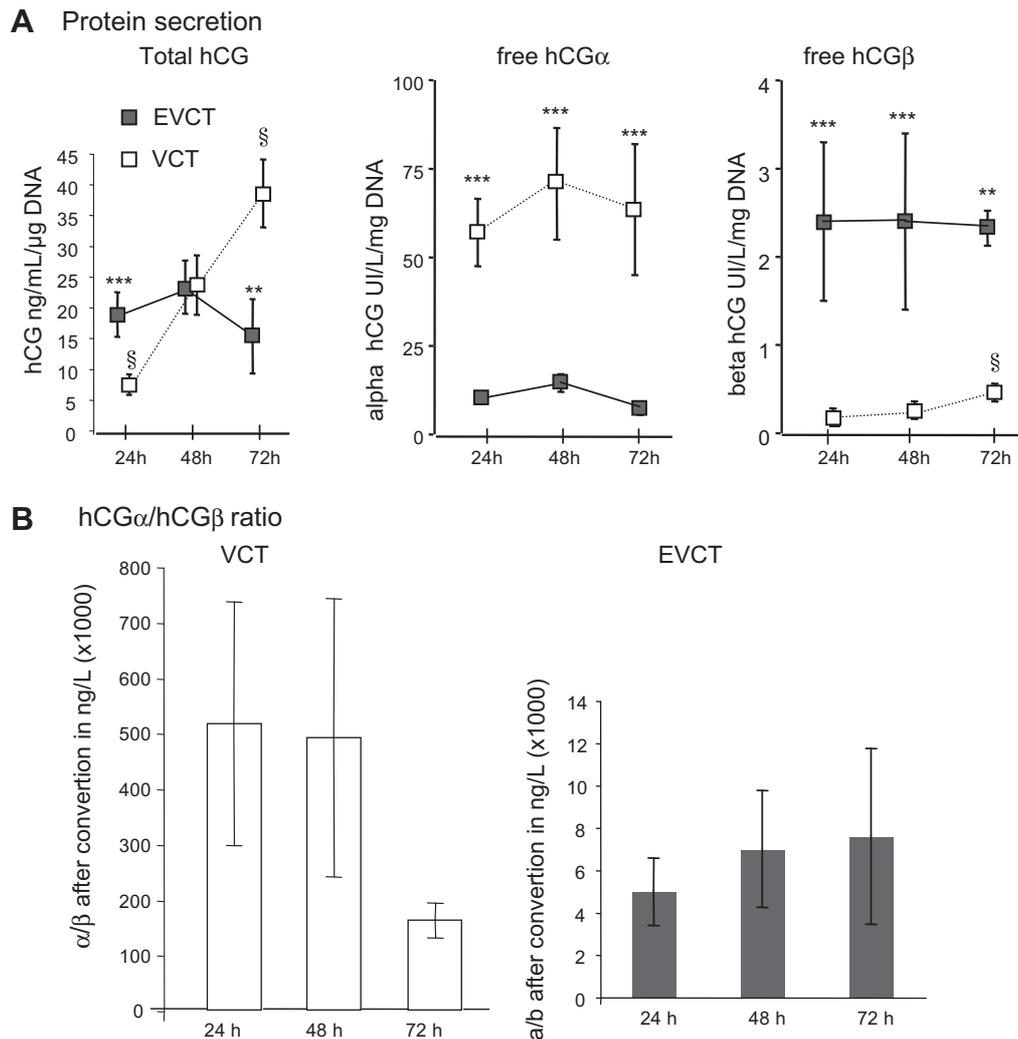
Values represent the mean  $\pm$  SEM of 3–6 separate primary cultures obtained from different placentas. The Mann and Whitney test was used to compare VCT vs EVCT for protein secretion and mRNA levels (\* in Fig. 2 and Fig. 3). The Kruskal and Wallis test (\$) in Fig. 2) was used to compare protein secretion from 24-, 48- and 72 h VCT cultures. In Fig. 4 values were expressed relative to control, but raw values were used for comparison between groups (treated vs controls) using the Wilcoxon test. Results were considered significant when  $P < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Comparative expression of hCG in human VCT and EVCT primary cultures

#### 3.1.1. Protein secretion

Mononucleated villous and extravillous cytotrophoblasts were isolated from the same human chorionic villi and differentiated *in vitro* over a 72 h-culture period into multinucleated ST and invasive EVCT, respectively. As shown in Figure 1, mononucleated VCT aggregated as soon as 48 h and fused to form a multinucleated syncytiotrophoblast at 72 h as demonstrated after desmoplakine immunolabelling. EVCT required extracellular matrix-coated dishes for adhesion and culture and displayed on Matrigel an invasive phenotype but never fused. Cell supernatants were collected at 24, 48 and 72 h and free hCG $\alpha$  and hCG $\beta$ , and total hCG were quantified and normalized to DNA content. As shown in Figure 2A and now well



**Fig. 2.** Comparative secretion of hCG in human VCT and EVCT primary cultures. A, Supernatants from 24, 48, and 72 h cultured VCT (white) and EVCT (dark) were collected and total hCG and its free  $\alpha$  and  $\beta$  subunits quantified as described under Materials and methods. Protein secretion was expressed as ng/mL and normalized to DNA content for comparison between VCT and EVCT. Values represent the mean  $\pm$  SEM of three independent primary VCT and EVCT cultures obtained from three different placentas and run in triplicate. Mann and Whitney test was used to compare EVCT vs VCT: \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  and to compare 72 h vs 24 h hCG $\beta$  secretion in VCT: §§ $p < 0.05$ . B, using previous values, the hCG $\alpha$ /hCG $\beta$  ratios were calculated for VCT and EVCT for each culture time point and represent the mean  $\pm$  SEM. Note that the scales are different between VCT and EVCT.

established, VCT secreted increasing amounts of total hCG and free hCG $\beta$  along their differentiation into ST. By contrast, EVCT showed a stable production of total hCG and its free subunits during the 72-h-culture period. At 24 h, EVCT secreted two times more total hCG than mononucleated VCT. At 48 h, total hCG secretion was identical in EVCT and aggregated VCT. As expected, the multinucleated ST at 72 h was the most potent hCG producer of total hCG.

When comparing the secretion of free hCG subunits expressed ng/L, we found that in each trophoblast subtype, hCG $\alpha$  was secreted in large excess compared to hCG $\beta$ : about 500 000 and 5000 times more  $\alpha$  subunit in VCT and EVCT, respectively. However, EVCT secreted approximately five times less hCG $\alpha$  and about ten times more hCG $\beta$  during the first 48 h of culture compared to VCT. Thus, the hCG $\alpha$ /hCG $\beta$  ratio was about 100 times weaker in EVCT than in VCT and remained constant through the 72 h-culture period as shown in Fig. 2B. In VCT the  $\alpha$ -/ $\beta$ -subunit ratio decreased five times from 24 h to 72 h due to the increase in secretion of  $\beta$  subunit.

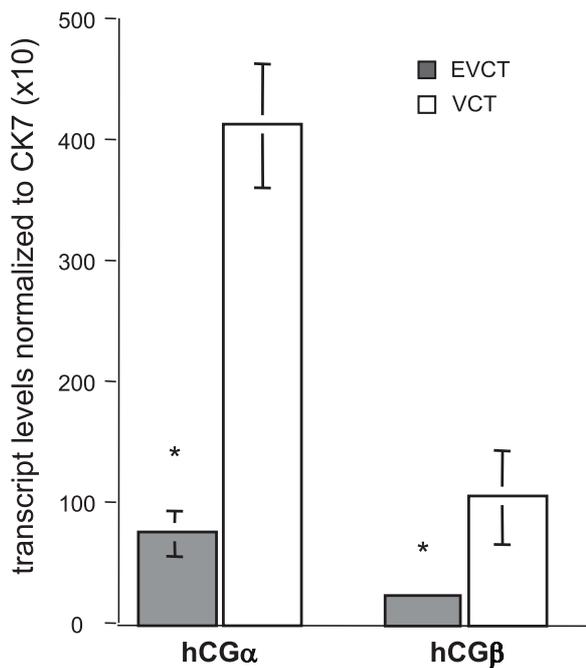
### 3.1.2. Transcript levels

Analyses of hCG $\alpha$  and hCG $\beta$  transcript levels in VCT and EVCT were performed by real-time quantitative RT-PCR and normalized

to CK7 gene coding for the trophoblast specific marker cytokeratin 7 (Fig. 3). Normalization to the house keeping gene PPIA coding for cyclophilin A and used as endogenous RNA control gave similar results. As found for hCG subunit secretion, hCG $\alpha$  transcript levels were more elevated than hCG $\beta$  ones in both VCT and EVCT. hCG $\alpha$  transcript levels were 4 times and 2.8 times more elevated than hCG $\beta$  transcript levels in VCT and EVCT, respectively. The levels of hCG $\alpha$  and hCG $\beta$  transcripts in EVCT at 48 h were about five times less than in VCT.

### 3.1.3. PPAR $\gamma$ agonist differentially regulates hCG gene expression in VCT and EVCT

Because PPAR $\gamma$  agonist was shown to control human cytotrophoblast functions, we incubated VCT and EVCT primary cells for 48 h with 1  $\mu$ M of the specific PPAR $\gamma$  agonist rosiglitazone and analyzed hCG transcript levels and protein secretions (Fig. 4). Results were expressed as percentage of increase or inhibition relative to controls (0 value). In VCT, rosiglitazone increased both hCG $\alpha$  and hCG $\beta$  transcript levels by 70 and 180%, respectively (Fig. 4A, left panel). In contrast, hCG $\alpha$  and hCG $\beta$  transcript levels were down regulated by about 60% in EVCT incubated with 1  $\mu$ M



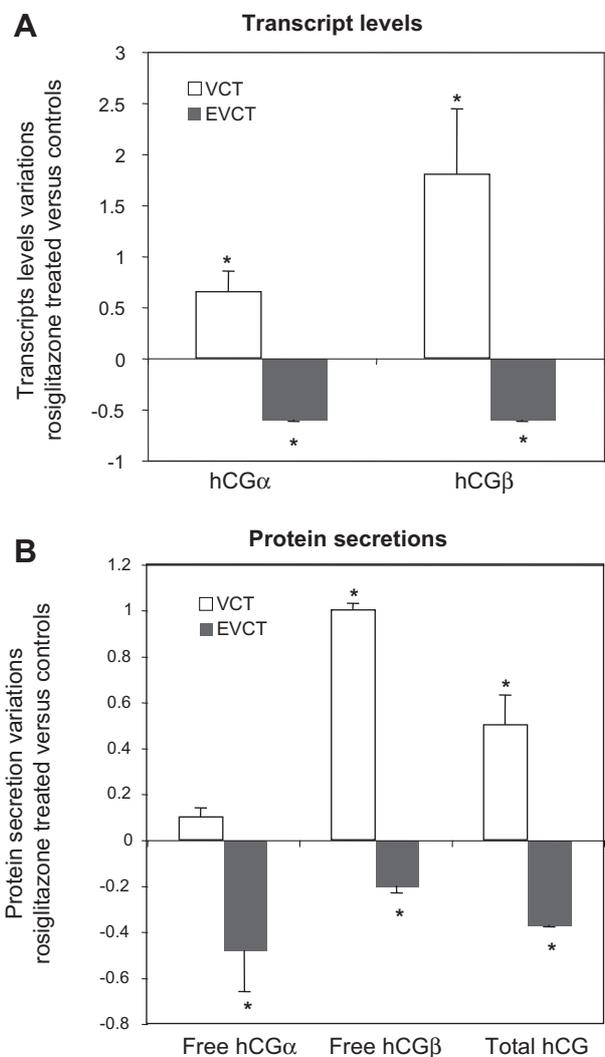
**Fig. 3.** Transcripts coding for  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of hCG were quantified by quantitative RT-PCR. Values were normalized to CK7 transcript levels and represent the mean  $\pm$  SEM of three independent primary cultures isolated from three different placentas. Mann and Whitney test was used to compare hCG $\alpha$  or hCG $\beta$  transcript levels between EVCT and VCT: \* $p < 0.05$ .

rosiglitazone (Fig. 4A, right panel). These data are consistent with levels of secreted hCG. Indeed, in 48 h-cultured EVCT, rosiglitazone significantly inhibited secretion of the  $\alpha$ -subunit, the  $\beta$ -subunit and total hCG by about 45, 20 and 35%, respectively (Fig. 4B, right panel). In VCT secretion of the  $\alpha$ -subunit of hCG was not affected, whereas secretion of the  $\beta$ -subunit and of total hCG were increased by 100 and 50%, respectively (Fig. 4B, left panel).

#### 4. Discussion

Human chorionic gonadotropin hormone has a major role in human pregnancy and placental development. Although the endocrine and autocrine role of hCG from villous origin is well documented, little is known about expression and regulation of hCG from extravillous origin. We recently reported that cytotrophoblasts from extravillous origin expressed hCG *in situ* all along their invasive pathway from the distal column to endovascular and giant multinucleated EVCT [16]. To compare the expression and the regulation of hCG gene expression in the two trophoblast populations, we used in the present work the sequential enzymatic method permitting isolation from the same first trimester chorionic villi of EVCT that differentiate *in vitro* into invasive cytotrophoblasts and VCT that fuse to form the syncytiotrophoblast [21]. After normalization to DNA content, EVCT were found to secrete intermediate amounts of total hCG between first trimester mononucleated VCT and *in vitro* differentiated ST. Secretion of hCG by EVCT remained relatively constant along the three-day culture period, whereas the secretory capacity of villous trophoblast increased during their differentiation into a ST as previously reported in primary cultures from first and third trimester placentas [25,26]. This observation is probably due to the fact that EVCT displayed the same invasive phenotype from 24 to 72 h of culture in contrast to VCT, which differentiate into ST during the same culture period. Indeed, we previously showed that primary EVCT acquire and conserve an invasive phenotype *in vitro* as soon as

few hours of culture on Matrigel, as described by expression of specific markers and the ability to invade extracellular matrix in transwells [20]. Furthermore, as recently reported hCG expression in EVCT is associated to acquisition of invasive phenotype *in situ* and *in vitro* [15]. Levels of expression of both  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of hCG vary during villous cytotrophoblast differentiation, and the ST secretes higher amounts of hCG than VCT at each stage of gestation [26]. In addition, VCT isolated from first trimester placenta and cultured *in vitro* to form ST secrete more hCG than cells isolated from term placenta [25,26]. Little is known about the capacity of EVCT to produce hCG in comparison with VCT. The present study, using purified populations of cells isolated from the same first trimester placentas, compared for the first time the expression and the secretion of both free  $\alpha$  and free  $\beta$  subunits of hCG. We showed that hCG $\alpha$  and hCG $\beta$  were differently produced by cytotrophoblasts from villous and extravillous origin. Thus, EVCT secreted higher amounts of free hCG $\beta$  than VCT, whereas free hCG $\alpha$  was more elevated in VCT compared to EVCT. In EVCT, secretion of free hCG subunits remained stable during the 72 h-culture period, reflecting



**Fig. 4.** Effect of PPAR $\gamma$  agonist on hCG expression in VCT and EVCT. hCG transcripts (A) and secreted proteins (B) were measured in 48 h-cultured human VCT and EVCT treated or not with 1  $\mu$ M of the PPAR $\gamma$  agonist rosiglitazone. Values were expressed relative to untreated cells and represent the mean  $\pm$  SEM of six (protein) or five (transcript) independent cultures isolated from different placentas and run in duplicate. \* $p < 0.05$ , treated vs untreated.

total hCG secretion. In VCT, the increase in total hCG secretion during the formation of the ST is parallel to the increase in free  $\beta$  subunit, the secretion of  $\alpha$  subunit remaining stable and in large excess. Interestingly, despite this discrepancy between the two trophoblast subpopulations, VCT and EVCT secreted identical amounts of total hCG at 48 h. Another striking point was raised when transcript levels coding for each subunit of hCG were analysed. We found higher levels of both  $\alpha$  and  $\beta$  subunits in VCT compared to EVCT, although EVCT secreted more free hCG $\beta$  than VCT and ST. In villous trophoblast the expression of the  $\beta$  chain of hCG seems to be the limiting step for hCG synthesis and secretion [27]; accordingly, we found that in the villous trophoblast the hCG $\alpha$ /hCG $\beta$  transcript ratio was around four and the secretion of free hCG $\alpha$  in large excess over hCG $\beta$ . In EVCT, the hCG $\alpha$ /hCG $\beta$  transcript ratio was weaker, and the excess of secreted hCG $\alpha$  over hCG $\beta$  was 100 times lower than in VCT (about 5000 more  $\alpha$  than  $\beta$ ). Together, these observations suggest a possible autocrine/paracrine role at the maternal-fetal interface for the free hCG subunits of EVCT origin as already described in Ref. [28]. Our results also suggest a different regulation of hCG gene expression in the two trophoblast subtypes and that in contrast to VCT, levels of expression of both  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits might control hCG production in EVCT. This different regulation of hCG gene expression might occur at the transcriptional level, a predominant regulation in VCT and ST [29], but also at a post-transcriptional level such as a modification of transcript stability.

The regulation of hCG has been primarily studied in term VCT. hCG is directly regulated by intracellular levels of cAMP [30–32] in trophoblasts and by a number of factors that regulate villous differentiation into ST recently summarized [33]. These factors include glucocorticoids [34], growth factors such as EGF [35] and TGF $\beta$ 1 [36], PKC activators [37], oxygen concentrations [38], retinoids [39] and PPAR $\gamma$  [17]. Some of these factors, such as TNF $\alpha$  [40,41], leukemia inhibitory factor or EGF, exert their effect through regulation of hCG, suggesting a central role of hCG in villous trophoblast differentiation [9]. In addition many transcriptional factors have been shown to regulate hCG. Differentiation-dependent transcription of the CG $\alpha$  gene in villous trophoblast is mainly governed by increasing expression of AP-2 and PKA-dependent phosphorylation of CREB-1 and ATF-1 [42]. Increasing concentrations of Sp1, Sp3 and AP-2 $\alpha$  enhance transcription of CG $\beta$ 5 in differentiating term villous trophoblasts [43]. In addition, we showed that PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$  heterodimers are functional units during VCT differentiation and elements located in the regulatory regions of the CG $\beta$  gene bind RXR $\alpha$  and PPAR $\gamma$  [17]. To our knowledge, there is no report of hCG regulation in a purified population of EVCT and VCT from early placenta. Therefore, we investigated the role of PPAR $\gamma$  in the regulation of hCG gene expression in trophoblasts of villous and extravillous origin isolated from first trimester chorionic villi. In the present work, PPAR $\gamma$  agonist significantly increased levels of free hCG $\beta$  subunit and total hCG secretion by first trimester VCT. The same results were previously observed with VCT primary cultures obtained from term placentas [18]. Despite the up-regulation of both hCG $\alpha$  and hCG $\beta$  transcripts by PPAR $\gamma$  agonist, we observed no change in secretion of the  $\alpha$ -subunit of hCG in first trimester VCT cultures. As we demonstrated that hCG $\alpha$  was secreted in large excess by VCT, we postulate that PPAR $\gamma$ -induced up-regulation of the hCG $\beta$  gene expression is responsible for the observed increase in total hCG secretion. Unexpectedly, analysis of the regulation of hCG gene expression by PPAR $\gamma$  in EVCT led to opposite results in terms of transcripts and protein secretion. Indeed, PPAR $\gamma$  agonist down regulated  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunit gene expression and total hCG production. To our knowledge, it is the first report of opposite regulation of the same gene by PPAR $\gamma$  in two cellular subtypes. PPAR $\gamma$  was shown to control both villous and

extravillous cytotrophoblast function: its activation by specific ligands induces VCT differentiation into ST [17,18] and inhibits EVCT invasiveness [19]. Because hCG was shown to stimulate ST formation [9] and to promote trophoblast invasion *in vitro* [16] it might be a key regulator in mediating PPAR $\gamma$ -induced effects.

These results open a new field of investigation on the transcriptional regulation of hCG subunits and its modulation by PPAR $\gamma$  depending upon the trophoblast lineage. As suggested by immunohistochemistry studies, a different combination of factors may control hCG expression during VCT differentiation in early placenta [43]. Accordingly, a combination of different cofactors involved in the regulation of hCG $\alpha$  and hCG $\beta$  gene expression in EVCT might explain the discrepancy observed in both basal hCG subunit gene expressions and regulation between EVCT and VCT.

In conclusion, our results showed that basal expression of hCG $\alpha$  and hCG $\beta$  subunits differed between trophoblast of villous and extravillous origin and that hCG is oppositely modulated by PPAR $\gamma$ . Since PPAR $\gamma$  has a major role in human cytotrophoblast differentiation and invasion, we speculate that hCG as a PPAR $\gamma$ -target gene may be involved in mediating the effect of the nuclear receptor.

### Acknowledgments

We thank the Department of Obstetrics and Gynecology at the Broussais Hospitals, Paris, France for providing placental tissues. J.M. Bidart, B. Genevois (Immunotech) and I Bazot (Bayer).

### References

- [1] Pierce JG, Parsons TF. Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu Rev Biochem* 1981;50:465–95.
- [2] Hartree AS, Renwick AGC. Molecular structures of glycoprotein hormones and functions of their carbohydrate components. *Biochem J* 1992;287:665–79.
- [3] Bo M, Boime I. Identification of the transcriptionally active genes of the chorionic gonadotropin  $\beta$  gene cluster in vivo. *J Biol Chem* 1992;267:3179–84.
- [4] Miller-Lindholm AK, LaBenz CJ, Ramey J, Bedows E, Ruddon RW. Human chorionic gonadotropin-gene expression in first trimester placenta. *Endocrinology* 1997;138:5459–65.
- [5] Rull K, Laan M. Expression of  $\beta$ -subunit of human chorionic gonadotropin genes during the normal and failed pregnancy. *Hum Reprod* 2005;20:3360–8.
- [6] Jaffe RB, Lee PA, Midgley Jr AR. Serum gonadotropins before, at the inception of, and following human pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1969;29:1281–3.
- [7] Hay DL, Lopata A. Chorionic gonadotropin secretion by human embryos *in vitro*. *J Clin Endocrinol Metab* 1988;67:1322–4.
- [8] Jameson JL, Hollenberg AN. Regulation of chorionic gonadotropin gene expression. *Endocr Rev* 1993;14:203–21.
- [9] Yang M, Lei ZM, Rao ChV. The central role of human chorionic gonadotropin in the formation of human placental syncytium. *Endocrinology* 2003;144:1108–20.
- [10] Malassine A, Frendo JL, Evain-Brion D. A comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model. *Hum Reprod Update* 2003;9:531–9.
- [11] Cronier L, Bastide B, Herve JC, Deleze J, Malassine A. Gap junctional communication during human trophoblast differentiation: influence of human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 1994;135:402–8.
- [12] Keryer G, Alsat E, Tasken K, Evain-Brion D. Cyclic AMP-dependent protein kinases and human trophoblast cell differentiation *in vitro*. *J Cell Sci* 1998;111:995–1004.
- [13] Loke YW, King A. Human implantation. Cell biology and immunology. Cambridge University Press; 1995.
- [14] Red-Horse K, Zhou Y, Genbacev O, Prakobphol A, Foulk R, McMaster M, et al. Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. *J Clin Invest* 2004;114:744–54.
- [15] Handschuh K, Guibourdenche J, Tsatsaris V, Guesnon M, Laurendeau I, Evain-Brion D, et al. Human chorionic gonadotropin expression in human trophoblasts from early placenta: comparative study between villous and extravillous trophoblastic cells. *Placenta* 2007;28:175–84.
- [16] Handschuh K, Guibourdenche J, Tsatsaris V, Guesnon M, Laurendeau I, Evain-Brion D, et al. Human chorionic gonadotropin produced by the invasive trophoblast but not the villous trophoblast promotes cell invasion and is down-regulated by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Endocrinology* 2007;148:5011–9.
- [17] Tarrade A, Schoonjans K, Guibourdenche J, Bidart JM, Vidaud M, Auwerx J, et al. PPAR gamma/RXR  $\alpha$  heterodimers are involved in human CG  $\beta$  synthesis and human trophoblast differentiation. *Endocrinology* 2001;142:4504–14.
- [18] Schaff WT, Carlson MG, Smith SD, Levy R, Nelson DM, Sadovsky Y. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma modulates differentiation of human

- trophoblast in a ligand-specific manner. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:3874–81.
- [19] Tarrade A, Schoonjans K, Pavan L, Auwerx J, Rochette-Egly C, Evain-Brion D, et al. PPARgamma/RXR $\alpha$  heterodimers control human trophoblast invasion. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:5017–24.
- [20] Tarrade A, Lai Kuen R, Malassine A, Tricottet V, Blain P, Vidaud M, et al. Characterization of human villous and extravillous trophoblasts isolated from first trimester placenta. *Lab Invest* 2001;81:1199–211.
- [21] Handschuh K, Guibourdenche J, Guesnon M, Laurendeau I, Evain-Brion D, Fournier T. Modulation of PAPP-A expression by PPARgamma in human first trimester trophoblast. *Placenta* 2006;27(Suppl. A):S127–34.
- [22] Kliman HJ, Nestler JE, Sermasi E, Sanger JM, Strauss JF. Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placenta. *Endocrinology* 1986;118:1567–82.
- [23] Bieche I, Parfait B, Le Doussal V, Olivi M, Rio MC, Lidereau R, et al. Identification of CGA as a novel estrogen receptor-responsive gene in breast cancer: an outstanding candidate marker to predict the response to endocrine therapy. *Cancer Res* 2001;61:1652–8.
- [24] Frenzo JL, Vidaud M, Guibourdenche J, Luton D, Muller F, Bellet D, et al. Defect of villous cytotrophoblast differentiation into syncytiotrophoblast in Down's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:3700–7.
- [25] Frenzo JL, Therond P, Guibourdenche J, Bidart JM, Vidaud M, Evain-Brion D. Modulation of copper/zinc superoxide dismutase expression and activity with in vitro differentiation of human villous cytotrophoblasts. *Placenta* 2000;21:773–81.
- [26] Massin N, Frenzo JL, Guibourdenche J, Luton D, Giovannardi Y, Muller F, et al. Defect of syncytiotrophoblast formation and human chorionic gonadotropin expression in Down's syndrome. *Placenta* 2001;22(Suppl. A):S93–7.
- [27] Braunstein GD, Rasor JL, Engvall E, Wade ME. Interrelationships of human chorionic gonadotropin, human placental lactogen, and pregnancy-specific  $\beta$  1-glycoprotein throughout normal human gestation. *Am J Obstet Gynecol* 1980;138:1205–13.
- [28] Moy E, Kimzey LM, Nelson LM, Bliethe DL. Glycoprotein hormone  $\alpha$ -subunit functions synergistically with progesterone to stimulate differentiation of cultured human endometrial stromal cells to decidualized cells: a novel role for free  $\alpha$ -subunit in reproduction. *Endocrinology* 1996;137:1332–9.
- [29] Knöfler M, Saleh L, Bauer S, Vasicek R, Griesinger G, Strohmer H, et al. Promoter elements and transcription factors involved in differentiation-dependent human chorionic gonadotrophin- $\alpha$  messenger ribonucleic acid expression of term villous trophoblasts. *Endocrinology* 2000;141:3737–48.
- [30] Feinman MA, Kliman HJ, Caltabiano S, Strauss 3rd JF. 8-Bromo-3',5'-adenosine monophosphate stimulates the endocrine activity of human cytotrophoblasts in culture. *J Clin Endocrinol Metab* 1986;63:1211–7.
- [31] Husa RO, Pattillo RA, Ruckert AC, Scheuermann KW. Effects of butyrate and dibutylryl cyclic AMP on hCG-secreting trophoblastic and non-trophoblastic cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1978;46:69–76.
- [32] Knöfler M, Saleh L, Strohmer H, Husslein P, Wolschek MF. Cyclic AMP- and differentiation-dependent regulation of the proximal  $\alpha$  HCG gene promoter in term villous trophoblasts. *Mol Hum Reprod* 1999;5:573–80.
- [33] Malassiné A, Frenzo JL, Evain-Brion D. Trisomy 21- affected placentas highlight prerequisite factors for human trophoblast fusion and differentiation. *Int J Dev Biol*, in press.
- [34] Ringler GE, Kallen CB, Strauss 3rd JF. Regulation of human trophoblast function by glucocorticoids: dexamethasone promotes increased secretion of chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 1989;124:1625–31.
- [35] Morrish DW, Bhardwaj D, Dabbagh LK, Marusyk H, Siy O. Epidermal growth factor induces differentiation and secretion of human chorionic gonadotropin and placental lactogen in normal human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 1987;65:1282–90.
- [36] Matsuzaki N, Li Y, Masuhiro K, Jo T, Shimoya K, Taniguchi T, et al. Trophoblast-derived transforming growth factor- $\beta$  1 suppresses cytokine-induced, but not gonadotropin-releasing hormone-induced, release of human chorionic gonadotropin by normal human trophoblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;74:211–6.
- [37] Andersen B, Milsted A, Kennedy G, Nilson JH. Cyclic AMP and phorbol esters interact synergistically to regulate expression of the chorionic gonadotropin genes. *J Biol Chem* 1988;263:15578–83.
- [38] Alsat E, Wyplosz P, Malassine A, Guibourdenche J, Porquet D, Nessmann C, et al. Hypoxia impairs cell fusion and differentiation process in human cytotrophoblast, in vitro. *J Cell Physiol* 1996;168:346–53.
- [39] Guibourdenche J, Alsat E, Soncin F, Rochette-Egly C, Evain-Brion D. Retinoid receptors expression in human term placenta: involvement of RXR  $\alpha$  in retinoid induced-hCG secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:1384–7.
- [40] Leisser C, Saleh L, Haider S, Husslein H, Sonderegger S, Knöfler M. Tumour necrosis factor- $\alpha$  impairs chorionic gonadotrophin  $\beta$ -subunit expression and cell fusion of human villous cytotrophoblast. *Mol Hum Reprod* 2006;12:601–9.
- [41] Haider S, Knöfler M. Human tumour necrosis factor: physiological and pathological roles in placenta and endometrium. *Placenta* 2009;30:111–23.
- [42] Heckert LL, Schultz K, Nilson JH. The cAMP response elements of the  $\alpha$  subunit gene bind similar proteins in trophoblasts and gonadotropes but have distinct functional sequence requirements. *J Biol Chem* 1996;271:31650–6.
- [43] Knöfler M, Saleh L, Bauer S, Galos B, Rotheneder H, Husslein P, et al. Transcriptional regulation of the human chorionic gonadotropin  $\beta$  gene during villous trophoblast differentiation. *Endocrinology* 2004;145:1685–94.



## **II – Comparaison de l'expression et de la régulation de l'hCG beta de type I et de type II entre les cytotrophoblastes villeux et extravilleux.**

Comme nous l'avons vu précédemment, la sous-unité beta de l'hCG est codée par un « *cluster* » de six gènes regroupés en deux types : le type I (CG  $\beta$ 7) et le type II (CG  $\beta$ 3, 5 et 8). Dans un premier temps, la suite de cet article nous est apparue comme évidente : étudier la régulation des deux types de gènes de la sous-unité beta de l'hCG par le PPAR $\gamma$ , et cela dans les trophoblastes villeux et extravilleux. Dans un second temps, nous avons cherché à comprendre pourquoi la régulation par le PPAR $\gamma$  est opposée entre les deux types de trophoblastes. Nous avons émis l'hypothèse que cette régulation opposée proviendrait de l'expression d'un panel de facteurs de transcription différents et nous avons choisi de réaliser une approche globale par « *arrays* » pour confirmer ou infirmer cette hypothèse.

### **A. Régulation de la sous-unité beta de l'hCG de type I ou de type II par le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$ .**

#### **1) Matériels et méthodes**

L'obtention des tissus placentaires, la culture primaire des cytotrophoblastes villeux, la Q-PCR et le dosage de l'hCG dans les surnageants de culture ont été réalisés dans les mêmes conditions que celles présentées dans la première partie des résultats (Résultat 1ère partie, I-)

Les cytotrophoblastes extravilleux n'ont pas été obtenus à partir des mêmes villosités choriales que les cytotrophoblastes villeux. En effet, depuis que la méthode de production de la trypsine (enzyme que nous utilisons pour extraire les cytotrophoblastes des villosités) a été modifiée, la formulation commerciale que nous utilisons (Difco / lot 0274451) est toxique pour les cellules trophoblastiques. Nous n'obtenons plus de cellules viables lors de la double extraction des trophoblastes extravilleux et villeux du fait d'une trop longue exposition des



villosités à cette formulation commerciale. Rapidement, le protocole d'extraction des cytotrophoblastes extravilleux est le suivant : Les villosités choriales disséquées sont incubées 30 minutes à 37°C dans une solution de trypsine à 0,1% dans de l'HBSS, additionné de 4,2 mM de MgSO<sub>4</sub>, 25 mM d'Hepes et 20 U/mL de DNase de type IV (Sigma) à raison de 5 mL de solution de trypsine par gramme de tissu. Les villosités sont ensuite incubées 4 à 6 fois dans le l'HBSS 1X chaud à 37°C. Les surnageants sont collectés, filtrés, poolés et l'action de la trypsine est stoppée par l'ajout de 10% de SVF. La suspension cellulaire obtenue est déposée sur un gradient discontinu de percoll afin de purifier les cytotrophoblastes, puis centrifugée à 2500 rpm (rotation par minute) pendant 25 minutes. La bande correspondant au cytotrophoblastes (40-45% de percoll) est prélevée, lavée dans de l'HBSS et reprise dans du milieu de culture DMEM/F12 glutamax supplémenté avec 10% de SVF, 100 UI/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine, afin d'ensemencer à une densité de 50 000 cellules/cm<sup>2</sup> sur une matrice extracellulaire (Matrigel, 5mg/mL, BD biosciences).

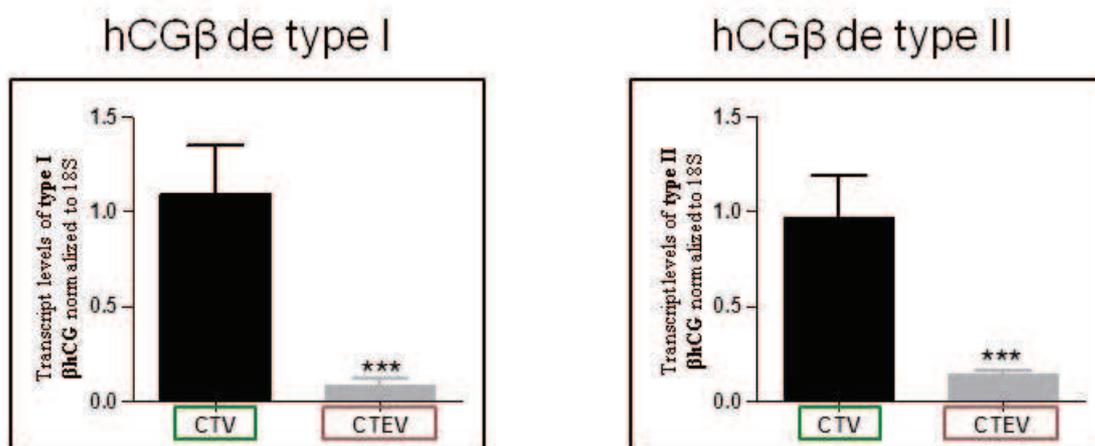
Les cytotrophoblastes villeux et extravilleux ont été traités après 24h de culture pendant 24h par 1µM de Rosiglitazone (agoniste synthétique de PPAR $\gamma$ ) ou par 10µM de GW9662 (antagoniste de PPAR $\gamma$  dans le cas des CTEV), par 1µM de T0070907 (antagoniste de PPAR $\gamma$ ) dans le cas des CTV, ou par 100µM de 8 CPT (3',5'-cyclic monophosphate), analogue de l'AMP<sub>c</sub>.

Les ARN totaux ont été extraits avec le kit commercial « *RNeasy mini kit* » de Quiagen suivant le protocole fourni.

## 2) Résultats

### 2-a) Comparaison de l'expression des gènes de l'hCG beta de type I et de type II entre les cytotrophoblastes villeux et extravilleux.

Afin d'analyser l'expression des gènes de l'hCG beta de type I et de type II et de les comparer dans les deux types de trophoblastes, nous avons choisi d'utiliser les cellules dans leur état différencié (syncytiotrophoblaste et cytotrophoblastes extravilleux invasifs), stade où leur production d'hCG est la plus élevée. Nous avons étudié par Q-PCR en temps réel suivant



**Figure 52 : Comparaison de l'expression des gènes de la sous-unité  $\beta$  de type I ou de type II entre les trophoblastes villos et extravilloux.**

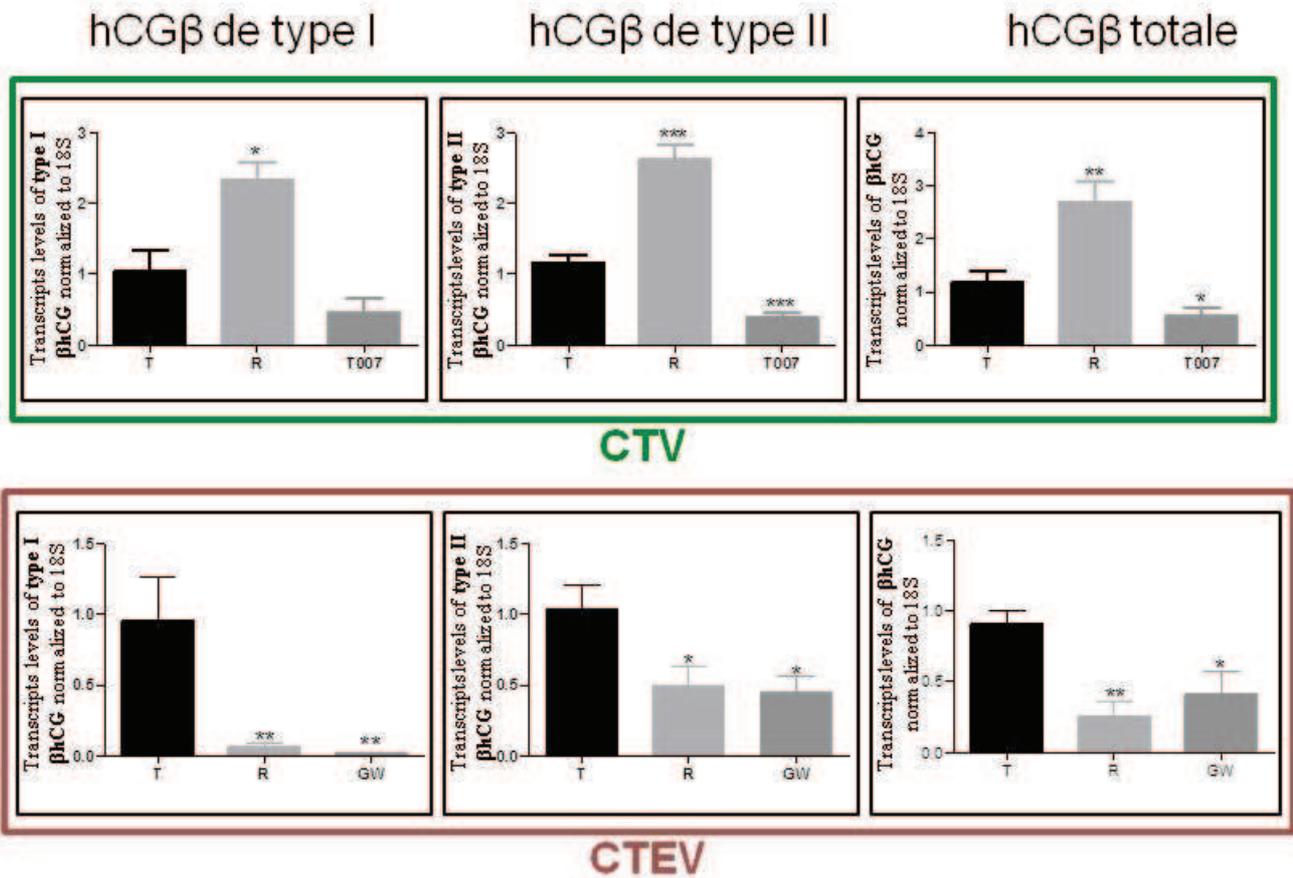
Les transcrits codant pour la sous-unité  $\beta$  de type I ou de type II de l'hCG ont été quantifiés par Q-PCR relative (CTV : n=5 ; CTEV : n=4). Les valeurs des taux de transcrits ont été normalisées par rapport au 18S. Le test statistique "Mann and Whitney" a été utilisé pour comparer les taux de transcrits dans les trophoblastes extravilloux par rapport aux villos : \*\*\* p < 0,001

la méthode décrite dans la partie précédente, les taux de transcrits normalisés par rapport au 18S. Les résultats montrent une très grande différence d'expression de ces deux groupes de gènes entre les trophoblastes villeux et extravilleux (*Cf.* Figure 52). En effet, la sous-unité beta de type I de l'hCG est 35 fois moins exprimée dans le trophoblaste extravilleux par rapport au syncytiotrophoblaste. Cette forte différence est également observée dans une moindre mesure pour la sous-unité beta de type II de l'hCG qui est 7 fois moins exprimée par le trophoblaste extravilleux que par le syncytiotrophoblaste. Dans les deux types de trophoblastes, la comparaison des résultats bruts (Cts) permet de mettre en évidence que l'hCG beta de type II est plus exprimée que la sous-unité beta de type I (6 à 8 Cts de différence).

#### 2-b) Régulation différentielle des gènes de type I et II de la sous-unité beta de l'hCG par le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$ .

Dans un deuxième temps nous avons voulu savoir si le PPAR $\gamma$  régulait de la même façon les gènes de l'hCG beta de type I et de type II et ce dans les deux types de trophoblastes. Après 24h de culture, les trophoblastes villeux et extravilleux ont été traités pendant 24h par un agoniste (Rosiglitazone) ou un antagoniste (T0070907 ou GW9662) de PPAR $\gamma$ . Nous avons réalisé une Q-PCR en temps réel dans les mêmes conditions que précédemment afin de quantifier l'expression des gènes de la sous-unité beta de l'hCG de type I ou de type II (*Cf.* Figure 53). L'activation de PPAR $\gamma$  par son agoniste induit la même modulation pour les gènes de l'hCG beta de type I ou de type II, à savoir une augmentation de leur expression d'environ 2 fois dans les trophoblastes villeux et une diminution de 50% (sous-unité beta de type II) à 70% (sous-unité beta de type I) dans les trophoblastes extravilleux. La régulation opposée de l'hCG par le PPAR $\gamma$  entre les deux types de trophoblastes est donc conservée pour les gènes des deux types de sous-unité beta de l'hCG.

Pour la première fois nous avons cherché à mettre en évidence que l'inhibition de PPAR $\gamma$  par un antagoniste induisait l'effet inverse de celui d'un agoniste sur l'expression de l'hCG. Nous avons utilisé tout d'abord le GW9662 sur les cultures de CTEV. Après 24h de culture, 10  $\mu$ M de GW9662 ont été ajoutés au milieu de culture, puis 24h après la culture a été stoppée. Comme précédemment nous avons quantifié par Q-PCR l'expression des gènes de l'hCG beta de type I ou II. Les résultats obtenus sont surprenants et nous ont fait mettre en



**Figure 53 : Effet de PPAR $\gamma$  sur l'expression des gènes de la sous-unité  $\beta$  de l'hCG dans les cytotrophoblastes villeux et extravilleux.**

T : témoin ; R : Rosiglitazone ; GW : GW9662 ; T007 : T0070907

Les transcrits codant pour la sous-unité  $\beta$  de type I ou de type II de l'hCG ont été quantifiés par Q-PCR relative (CTV : n=5 ; CTEV : n=4). Les valeurs des taux de transcrits ont été normalisées par rapport au 18S. Le test statistique "Mann and Whitney" a été utilisé pour comparer les taux de transcrits dans les trophoblastes traités par rapport aux témoins : \* p < 0.05, \*\* p < 0,01

doute la spécificité de l'antagoniste de PPAR $\gamma$ . En effet, l'utilisation du GW9662 dans les cultures de trophoblastes extravilleux n'induit pas l'effet inverse de la rosiglitazone sur l'expression de l'hCG beta mais au contraire le même effet. Le GW9662 induit une inhibition d'au moins 50% de l'expression de l'hCG beta de type I et de type II (Cf. Figure 53). Pour les trophoblastes villeux nous avons décidé d'utiliser un autre antagoniste plus récent de PPAR $\gamma$ , le T0070907. C'est un inhibiteur puissant et sélectif de PPAR $\gamma$ , irréversible puisqu'il modifie covalamment la structure de la poche ligand de PPAR $\gamma$ . Il bloque le recrutement des agonistes et des co-activateurs de PPAR $\gamma$  et favorise le recrutement du co-represseur NCor. L'inhibition de PPAR $\gamma$  par le T0070907 dans les trophoblastes villeux induit bien des effets opposés à ceux de la rosiglitazone. Après 24h de traitement, on observe une diminution de l'expression de l'hCG beta, sans distinction. Cette diminution significative est également observée pour les gènes de l'hCG beta de type II. En revanche, pour l'expression des gènes de l'hCG beta de type I, la diminution observée n'est pas significative (Cf. Figure 53).

### 3) Discussion

La comparaison *in vitro* de l'expression de l'hCG beta de type I et de type II entre les cytotrophoblastes villeux et extravilleux a permis de compléter les résultats que nous venions de publier sur l'expression de l'hCG alpha et l'hCG beta (sans distinction de type) dans les deux sous-populations trophoblastiques. Nous confirmons ici que les trophoblastes extravilleux produisent moins d'hCG beta, que ce soit de type I ou de type II, que les trophoblastes villeux. Cette différence d'expression est particulièrement marquée pour l'hCG beta de type I puisque les CTEV l'expriment 35 fois moins que le ST. L'hCG beta de type II est plus fortement exprimée par rapport à l'hCG beta de type I dans les deux types de trophoblastes. Les données obtenues en Q-PCR indiquent que la proportion d'hCG beta de type II par rapport à l'hCG beta de type I est plus forte dans les CTEV par rapport au CTV (comparaison des Ct). Or il a été montré qu'hormis dans les tissus trophoblastiques sains, l'expression de l'hCG beta de type II était réactivée dans certaines tumeurs (Bellet et coll, 1997). Les auteurs montrent que dans les tissus non-trophoblastiques sains (le sein, la vessie, la prostate et la thyroïde) l'hCG beta de type I est exprimée alors que si ces tissus deviennent tumoraux l'hCG beta de type II devient la forme majoritaire. Il est intéressant de noter que les



CTEV envahissant la décidue et présentant un profil d'invasion pseudo-tumorale, expriment 35 fois moins l'hCG beta de type I que les CTV et seulement 7 fois moins d'hCG beta de type II.

Dans un second temps nous avons étudié la régulation par PPAR $\gamma$  des deux types de sous-unités beta de l'hCG. L'activation de PPAR $\gamma$  par la rosiglitazone induit l'expression de l'hCG beta de type I et de type II dans les CTV alors qu'elle induit l'inhibition de leur expression dans les CTEV. Nous retrouvons la régulation opposée par le PPAR $\gamma$  dans les deux types de trophoblastes de l'hCG alpha et beta, que nous avons étudiée au préalable sans faire la distinction des deux types d'hCG beta. Pour la première fois, nous montrons dans les CTV que l'inhibition de PPAR $\gamma$  par un antagoniste (T0070907) inhibe de 50% à 70% l'expression de l'hCG beta, quelque soit le type. Ce résultat nous indique qu'une partie de l'expression basale de l'hCG beta est due à l'activation de PPAR $\gamma$  par ses ligands endogènes. Ce résultat associé aux travaux de Seargent nous permet d'expliquer les effets du GW9662, un autre inhibiteur de PPAR $\gamma$ , sur l'expression de l'hCG beta dans les CTEV. Ces auteurs montrent qu'il est possible que le GW9662 agissent en synergie avec l'agoniste de PPAR $\gamma$ , la rosiglitazone (Seargent et coll, 2004). Nous montrons dans les CTEV, que le GW9662 inhibe l'expression de l'hCG beta de type I et de type II comme la rosiglitazone, et donc n'induit pas l'effet inverse (une augmentation de leur expression) comme on l'attendait. Nous posons donc l'hypothèse suivante : l'activation endogène de PPAR $\gamma$  dans les CTEV réduit l'expression de l'hCG beta, l'ajout du GW9662 potentialise les effets de ces ligands endogènes du PPAR $\gamma$  et accentue l'inhibition de l'expression de l'hCG beta. Pour confirmer cette hypothèse deux séries d'expériences seraient nécessaires :

- Traiter des CTEV avec l'antagoniste de PPAR $\gamma$  T0070907 et quantifier l'expression de l'hCG après 24h de traitement. Si l'expression de l'hCG beta de type I et de type II est augmentée, on confirme que le GW9662 ne fonctionne pas comme un antagoniste de PPAR $\gamma$  dans ce modèle cellulaire.
- Traiter des CTEV avec le GW9662 et la rosiglitazone, quantifier l'expression de l'hCG après 24h de traitement et la comparer à son expression dans les cellules non traitées mais aussi traitées uniquement avec le GW9662 ou uniquement avec la rosiglitazone. Si l'on observe un effet synergique des deux produits, c'est-à-dire une plus forte inhibition de l'expression de l'hCG beta de type I et de type II dans les CTEV, l'hypothèse sera confirmée.



Pour résumer, les hCG beta de type I et de type II sont différenciellement régulées par le PPAR $\gamma$  dans les cytotrophoblastes vilieux et les cytotrophoblastes extravilieux, et une partie de l'expression basale de l'hCG beta dans les cytotrophoblastes vilieux pourrait être due à l'activation endogène de ce récepteur nucléaire.

## B. Etude des facteurs de transcription exprimés dans les deux types de cytotrophoblastes au cours de leur différenciation.

### 1) Matériels et méthodes

#### 1-a) Culture cellulaire

Les cultures primaires de cytotrophoblastes vilieux et extravilieux ont été réalisées comme décrites précédemment, de même pour les traitements à la Rosiglitazone, au GW9662, au T0070907 et au 8 CPT.

La lignée JEG-3 est cultivée dans le milieu DMEM F-12-glutamax, additionné de 10% SVF décomplémenté (Fisher Scientific) et de 1% de streptomycine et pénicilline. Quant à la lignée BeWo, elle est cultivée au sein du milieu F-12K, additionné de 10% SVF décomplémenté (Fisher Scientific) et de 1% de streptomycine et pénicilline. Ces différentes lignées cellulaires sont mises en culture sur un support en plastique dans leur milieu respectif. Lorsqu'elles sont à confluence, 6 à 7 millions de cellules par flasque ventilée T75, elles sont trypsinées et réensemencées à raison de 20 000 cellules/cm<sup>2</sup>. À sub-confluence, les cellules sont traitées pendant 24 heures par ajout d'un milieu neuf contenant soit 1 $\mu$ M de rosiglitazone, soit 1 $\mu$ M de T0070907, soit 10 $\mu$ M de GW9662, soit 100 $\mu$ M de 8 CPT.



## 1-b) Array « facteurs de transcription humains »

### 1-b-i) Extraction d'ARN

Les ARN totaux ont été obtenus en utilisant le kit commercial « *RNeasy mini kit* » ou « *RNeasy micro kit* » (Quiagen). L'intégrité et la pureté des ARN ont été vérifiées par électrophorèse. La reverse-transcription a été réalisée sur 2 µg d'ARN totaux en utilisant des *random primers* (Invitrogen) et la *SuperScript III reverse transcriptase* (Invitrogen), suivant le protocole fourni.

### 1-b-ii) Array « facteurs de transcription humains »

Le profil transcriptomique des trophoblastes villeux et extravilleux a été déterminé en utilisant un *array TaqMan*® (format 96 puits, *array* facteurs de transcription humain (non-HOX) Cat# 4414139, Life Technologies, Australia). Cet *array* représente 84 gènes humains de facteurs de transcription appartenant aux principales voies de signalisation régulant les fonctions trophoblastiques, dont la différenciation, la prolifération et la migration, telles que les voies du TGFβ /BMP, du VEGF, des MAPK et de WNT. Il a été réalisé suivant le protocole fourni. Brièvement, les ADNc dilués (12,5ng/µL) sont ajoutés au mélange contenant tous les réactifs (*Universal master mix*, *life Technologies, Australia*). Le mélange obtenu est distribué entre les 96 puits de l'*array* dont 84 contiennent un couple de primer spécifique d'un gène de facteurs de transcription humains. Les plaques (une pour chaque CTV (n=3) et chaque CTEV (n=6)) sont placées dans l'appareil à Q-PCR en temps réel ABI Prism 7700 (PerkinElmer-Applied Biosystems, Victoria, Australia), pour la quantification de l'expression génique, avec le paramétrage suivant : 10 minutes à 95°C, suivi de 40 cycles de dénaturation à 95°C pendant 15 secondes et d'élongation à 60°C pendant 1 minute. Chaque plaque contient un panel de 5 couples de primers correspondant à 5 gènes de ménage pour normaliser les résultats et estimer l'efficacité de l'expérience : la β2-microglobuline (B2M), l'hypoxanthine phosphoribosyltransférase 1 (HPRT1), la protéine ribosomale L13a (RPL13A), la glyceraldéhyde-3-phosphate déhydrogénase (GAPDH) et la β-actine (ACTB). De plus, pour chaque réaction, un contrôle négatif (absence d'enzyme reverse-transcriptase) et un contrôle de la plaque (absence d'ADNc) sont inclus. Les résultats sont enregistrés et analysés par le logiciel « *ABI Sequence Detector System software version 1.0* » (PerkinElmer-Applied Biosystems) pour calculer la valeur du seuil de fluorescence. Les valeurs de l'expression



relative des gènes (*x fold*) sont déterminées suivant les instructions du fabricant. Si le « *x fold* » est supérieur à 1, l'expression du gène est augmentée, s'il est inférieur à 1, l'expression du gène est diminuée.

#### 1-c) *Reverse Transcription*, PCR et Q-PCR relative en temps réel

Les ARN totaux ont été extraits avec le kit commercial « *RNeasy mini kit* » de Qiagen suivant le protocole fourni. La *Reverse Transcription* a été réalisée avec la même méthode que précédemment (Cf. Résultats 1<sup>ère</sup> partie, I-) mais sur 1µg d'ARN pour les lignées JEG et BeWo, les villosités et le foie. La PCR est réalisée sur 1µL ADNc en utilisant le kit Promega ainsi que les amorces à 20µM. Le programme d'amplification est le suivant : 5 minutes à 94°C puis 40 cycles de trente secondes à 94°C (dénaturation), trente secondes à 60°C (hybridation), trente secondes à 72°C (élongation) et enfin une phase d'élongation finale de 5 minutes à 72°C. Le produit de PCR est mis en évidence par électrophorèse (gel d'agarose 2% dans du Tris (Trishydroxyméthylaminométhane) / Borate / EDTA (*Ethylene Diamine Tetra Acetic acid*) (TBE) 1X, en présence de bromure d'éthidium (BET) 25µg/mL) et visualisé à l'aide d'une lampe à UV (Minibis). La Q-PCR a été réalisée comme décrit précédemment.

gène	Amorce sens	Amorce anti-sens
HNF4 $\alpha$	5' GGTGTCCATACGCATCCT 3'	5' CAA GGT GGG CAG CAG CAG 3'

#### 1-d) Immunohistochimie

Les échantillons de placenta du premier trimestre de grossesse sont fixés dans une solution de paraformaldéhyde à 4% pendant 4 heures à 4°C, puis conservés dans de l'éthanol à 70% jusqu'à leur inclusion en paraffine. Les coupes de paraffine (5µm) sont déparaffinées dans un solvant (safesolv, LaboNord) et réhydratées par des solutions d'alcool de moins en moins concentrées. Les échantillons sont ensuite perméabilisés dans une solution de Triton X-100 à 0,3%. Après le démasquage des sites antigéniques (incubation de 45 minutes à 85°C



dans un tampon citrate à 20%), le marquage est réalisé avec le kit Dako LSAB + peroxydase (réf. KO679) et en utilisant les anticorps primaires cités dans le tableau « anticorps primaires » p. Les échantillons sont montés entre lame et lamelle dans un milieu de montage aqueux (*Aqueous Mounting Medium*, DAKO), observés et photographiés à l'aide d'un microscope Olympus BX60.

#### 1-e) Co- immunoprécipitation

Les billes magnétiques sur lesquelles sont fixées des protéines de fusion des protéines A et G (Bio-Adembeads pAG 04630, Ademtech) sont mises en présence de 2µg de l'anticorps d'intérêt. Ces billes ont la particularité de fixer la partie Fc des anticorps quelque soit l'animal immunisé. Afin de lier de manière covalente les anticorps aux billes, un agent cross-linkant, le diméthyl pimelimidate 2 HCl (DMP) est utilisé. C'est un imidoester réagissant avec les amines primaires afin de créer un lien amide avec une lysine en milieu basique. La réaction est arrêtée en milieu acide. Après plusieurs lavages, les billes sont mises en contact avec le lysat protéique pendant une nuit à 4°C. Les protéines retenues sont éluées à l'aide du tampon « *PAG Elution Buffer* » (Ademtech) qui induit un choc acide séparant l'anticorps de son antigène. L'éluat est analysé par électrophorèse et les protéines sont visualisées par Western Blot.

#### 1-e) immunocytochimie

*Cf.* protocole Résultats 1<sup>ère</sup> partie, II – A.

ST / CTV		CTEVi / CTEV	
<b>Gène</b>	<b>x fold</b>	<b>Gène</b>	<b>x fold</b>
MYOD1	695,7	FOXA2	8
HAND2	106,92	HNF1A	5,43
RELB	72,61	HNF4A	3,6
CEBPB	24,82	PPARG	3,6
ELK1	22,92	PPARA	3,5
STAT4	22,73	MYOD1	3,01
STAT1	19,14	RB1	2,84
HNF4A	13,47	SP1	2
MEF2B	11,31	STAT3	1,99
CEBPA	8,81	RPLP0	0,67
NFYB	7,73	JUN	0,19
STAT2	6,93	NFYB	0,17
STAT3	6,84	POU2AF1	0,17
STAT5A	6,52	CEBPB	0,15
YY1	6,49	AR	0,14
STAT6	6,06	ATF3	0,13
HDAC1	6,03	ATF4	0,13
NR3C1	5,67	HOXA5	0,12
IRF1	5,01	NR3C1	0,11
STAT5B	4,85	NFKB1	0,1
GATA2	4,73	MYC	0,09
ARNT	4,61	ESR1	0,08
MAX	4,35	MYB	0,07
TBP	3,95	ETS1	0,05
HIF1A	3,43	HAND2	0,05
HMBS	3,01	REL	0,05
SP1	2,96	STAT4	0,01
E2F6	2,9		
MEF2C	2,57		
TFAP2A	2,41		
HAND1	2,3		
SMAD9	2,03		
SMAD1	1,93		
PPARG	0,19		
TGIF1	0,14		
PPARA	0,11		
MYC	0,09		
JUN	0,07		
E2F1	0,06		
EGR1	0,06		
GTF2B	0,03		

**Figure 54 : Tableaux résumés des résultats significatifs de l'array « facteurs de transcription ».**

SMAD1c	Gène augmenté
PPARG	Gène diminué

A. Facteurs de transcription différentiellement exprimés dans le syncytiotrophoblaste par rapport aux cytotrophoblastes villosus mononucléés.

B. Facteurs de transcription différentiellement exprimés dans les CTEV invasifs (CTEVi) par rapport au CTEV fraîchement isolés.

Les valeurs des taux de transcrits ont été quantifiées par Q-PCR relative et normalisées par rapport aux 5 gènes de ménage. Les résultats sont significatifs lorsque  $x \text{ fold} > 2$  (expression augmentée) ou  $0,01 < x \text{ fold} < 0,2$  (expression diminuée).

## 2) Résultats

### 2-a) Expression d'un panel de facteurs de transcriptions dans les trophoblastes villeux et extravilleux.

#### 2-a-i) Résultats de l'*array* « facteurs de transcription humains »

Dans un premier temps, cet *array* a permis de comparer l'expression de facteurs de transcription au cours de la différenciation du cytotrophoblaste villeux et extravilleux. Les gènes modulés significativement sont présentés dans les tableaux de la figure 54. On peut observer que 33 gènes sont régulés positivement dans les CTV, en particulier MYOD1 et HAND2, et 8 gènes sont régulés négativement sur les 84 testés, en particulier MYC. L'expression de HIF-1 $\alpha$  (HIF1A), facteur connu pour être important dans la différenciation trophoblastique (Cf. Figure 20), est augmentée de 3,4 fois avec la syncytialisation. Cet *array* met aussi en évidence que les facteurs connus pour réguler l'hCG présents dans l'*array* sont significativement modifiés au cours de la différenciation du CTV en ST. En effet, le facteur Sp1 est augmenté 3 fois, le facteur AP-2 $\alpha$  (TFAP2A) est augmenté 2,4 fois dans le ST, produisant massivement de l'hCG, par rapport au CTV. Le facteur PPAR $\gamma$ , lui, est diminué de 50% dans le ST par rapport au CTV. On observe également que le facteur HNF4 $\alpha$  (HNF4A) est augmenté de 13,5 fois au cours de la différenciation du trophoblaste villeux, or ce facteur partage des caractéristiques avec PPAR $\gamma$  (mêmes domaines fonctionnels, liaison à l'ADN sur des séquences de type DR1). Cette forte augmentation dans le syncytiotrophoblaste, nous l'indique comme potentiellement important pour la régulation de l'expression de l'hCG.

Au cours de la différenciation du trophoblaste extravilleux, l'*array* met en évidence 9 gènes augmentés et 27 gènes diminués sur les 84 testés. Au niveau des facteurs connus pour réguler l'hCG, on observe que Sp1 et PPAR $\gamma$  sont augmentés dans les CTEV invasifs par rapport au CTEV fraîchement isolés. L'expression du facteur HNF4 $\alpha$  est augmentée comme dans le trophoblaste avec l'acquisition du phénotype différencié, capable de produire de l'hCG. On remarquera aussi que contrairement au lignage villeux, le facteur HAND2 est largement diminué (20 fois) dans les CTEV invasifs par rapport aux cellules fraîchement isolées.

CTEV / CTV		CTEV <sub>i</sub> / ST	
Gène	x fold	Gène	x fold
STAT4	38,03	ACTB	34,6
POU2AF1	22,37	PPARA	8,82
<b>HAND2</b>	<b>13,73</b>	NFATC1	4,36
GATA1	7,32	B2M	3,7
NFATC1	5,41	RB1	3,05
ETS1	5,2	HPRT1	1,94
STAT6	4,77	HAND1	0,19
MEF2C	4,43	JUNB	0,17
MYOD1	3,53	SMAD5	0,17
HOXA5	3,52	SMAD1	0,16
ESR1	3,45	<b>SP1</b>	<b>0,15</b>
IRF1	3,44	TBP	0,13
B2M	3,32	NFATC2	0,12
NFATC4	3,11	YY1	0,12
STAT5A	2,92	ARNT	0,11
RELB	2,83	ATF4	0,11
SMAD9	2,65	HIF1A	0,11
MYF5	2	E2F6	0,09
STAT1	1,99	<b>TFAP2A</b>	<b>0,09</b>
PPARA	0,19	MAX	0,08
ATF1	0,17	STAT5B	0,06
SMAD4	0,17	AR	0,05
CEBPA	0,16	ATF3	0,05
ETS2	0,16	GATA2	0,05
FOS	0,16	HDAC1	0,05
SMAD1	0,16	HMBS	0,05
E2F1	0,15	MEF2B	0,04
ATF3	0,14	STAT4	0,04
HAND1	0,14	CEBPA	0,03
<b>SP1</b>	<b>0,14</b>	MYOD1	0,03
EGR1	0,13	NR3C1	0,023
CTNNB1	0,09	ELK1	0,02
GTF2B	0,09	RELB	0,018
JUN	0,08	NFYB	0,015
<b>PPARG</b>	<b>0,04</b>	<b>HAND2</b>	<b>0,01</b>
		CEBPB	0,009

**Figure 55 : Tableaux résumés des résultats significatifs de l'array « facteurs de transcription ».**

<b>SMAD1c</b>	Gène augmenté
<b>PPARG</b>	Gène diminué

A. Facteurs de transcription différenciellement exprimés dans le CTEV fraîchement isolé par rapport au cytotrophoblaste villositaire mononucléé.

B. Facteurs de transcription différenciellement exprimés dans les CTEV invasifs par rapport au syncytiotrophoblaste.

Les valeurs des taux de transcrits ont été quantifiées par Q-PCR relative et normalisées par rapport aux 5 gènes de ménage. Les résultats sont significatifs lorsque  $x \text{ fold} > 2$  (expression augmentée) ou  $0,01 < x \text{ fold} < 0,2$  (expression diminuée).

Dans un deuxième temps nous avons comparé l'expression des facteurs de transcription entre les deux sous-populations trophoblastiques, les deux types cellulaires fraîchement isolés d'une part, les deux types cellulaires différenciés d'autre part (Cf. Figure 55).

Dans les CTEV fraîchement isolés par rapport aux CTV mononucléés, l'expression de 19 gènes est augmentée et celle de 15 gènes est diminuée sur les 84 testés. On remarquera en particulier que HAND2 est 13,7 fois plus exprimé dans le CTEV par rapport au CTV et que l'expression de Sp1 et de PPAR $\gamma$  est diminuée, de 7 et 25 fois respectivement, dans le CTEV par rapport au CTV fraîchement isolés. Lorsqu'on compare les deux types cellulaires dans leur état différencié, on observe que l'expression de 6 gènes est augmentée et celle de 30 gènes est diminuée dans les CTEV invasifs par rapport au ST. L'expression des facteurs de transcription Sp1 et AP-2 $\alpha$  est diminuée, de 7 et 11 fois respectivement dans les CTEV invasifs par rapport au ST. Le facteur HAND2 est aussi largement diminué, de 100 fois, dans les CTEV invasifs. L'expression de HIF-1 $\alpha$  est diminuée de 9 fois dans les trophoblastes extravilloux par rapport au syncytiotrophoblaste.

#### 2-a-ii) Analyse et discussion des résultats

Le facteur MYC a été initialement découvert pour sa capacité à réguler la prolifération cellulaire en augmentant l'expression de la cycline E et en inhibant p27 (Perez-Roger et coll, 1997). Secondairement il a été montré que l'inhibition de MYC par un oligonucléotide anti-sens induisait la différenciation terminale des cellules traitées et un retrait permanent du cycle cellulaire (pour revue Facchini et Penn, 1998). MYC est également impliqué dans la régulation de la croissance cellulaire, l'apoptose et la différenciation cellulaire. L'importante diminution du facteur de transcription MYC au cours de la différenciation des deux types de trophoblastes, observée dans l'*array*, confirme des résultats obtenus *in situ*. En effet, Roncalli et coll montre par immunohistochimie une diminution de la présence de MYC dans le syncytiotrophoblaste par rapport aux cytotrophoblastes villeux sous-jacents au premier trimestre de grossesse (Roncalli et coll, 1994). De plus, cette observation valide la qualité des cultures cellulaires. Les cellules fraîchement isolées ont encore des caractéristiques de cellules prolifératives et expriment MYC, et la différenciation en ST ou en cellules invasives induit une diminution de l'expression de MYC.



L'expression de HAND1 et 2 évolue au cours de la différenciation des deux types de trophoblastes de façon opposée. La comparaison de l'expression de HAND1 et 2 dans des cytotrophoblastes villeux et extravilleux fraîchement isolés montre qu'elle est complètement différente entre les deux types cellulaires. Initialement les CTEV expriment 13 fois plus de HAND2 et 7 fois moins de HAND1 que les trophoblastes villeux. L'évolution de leur expression avec la différenciation cellulaire aboutit également à une expression différente entre les deux types de trophoblastes différenciés. Dans les CTV, l'expression de HAND1 double et celle de HAND2 augmente de plus de 100 fois avec la syncytialisation alors que l'acquisition du phénotype invasif par les CTEV s'accompagne d'une diminution de l'expression de HAND2 de plus de 20 fois. Les facteurs HAND ont été mis en évidence chez la souris comme cruciaux pour le développement placentaire (pour revue : A.B. Firulli, 2003). Ces résultats semblent indiquer qu'ils seraient également importants pour la différenciation des trophoblastes humains et demanderaient de plus amples investigations.

Le Facteur HIF-1 $\alpha$  a été décrit comme important initialement pour la différenciation trophoblastique (Loregger et coll, 2003). Dans cet *array*, on met en évidence que son expression augmente avec la syncytialisation et que le trophoblaste invasif en exprime 9 fois moins que le syncytiotrophoblaste, ce qui suggère un rôle de ce facteur plutôt dans la différenciation du trophoblaste villeux.

Il est impossible de ne pas noter la très forte augmentation de l'expression du facteur MYOD1, de près de 700 fois, dans les trophoblastes villeux fusionnés en syncytiotrophoblaste. Ce facteur est connu pour réguler la différenciation des cellules musculaires en induisant l'arrêt du cycle cellulaire, pré-requis pour l'initiation de la myogenèse. Cette protéine est aussi impliquée dans la régénération du muscle. Aucune donnée sur ce facteur de transcription n'a été publiée dans le trophoblaste à ce jour. Or les cellules trophoblastiques villeuses fusionnent comme les cellules musculaires et des protéines décrites dans la fusion des cellules musculaires comme la myoferline et la dysferline, sont mises en évidence dans les cellules trophoblastiques (Robinson et coll, 2009). Il semblerait donc que leur capacité commune à fusionner soit associée à une expression commune de protéines, dont MYOD1 pourrait faire partie.

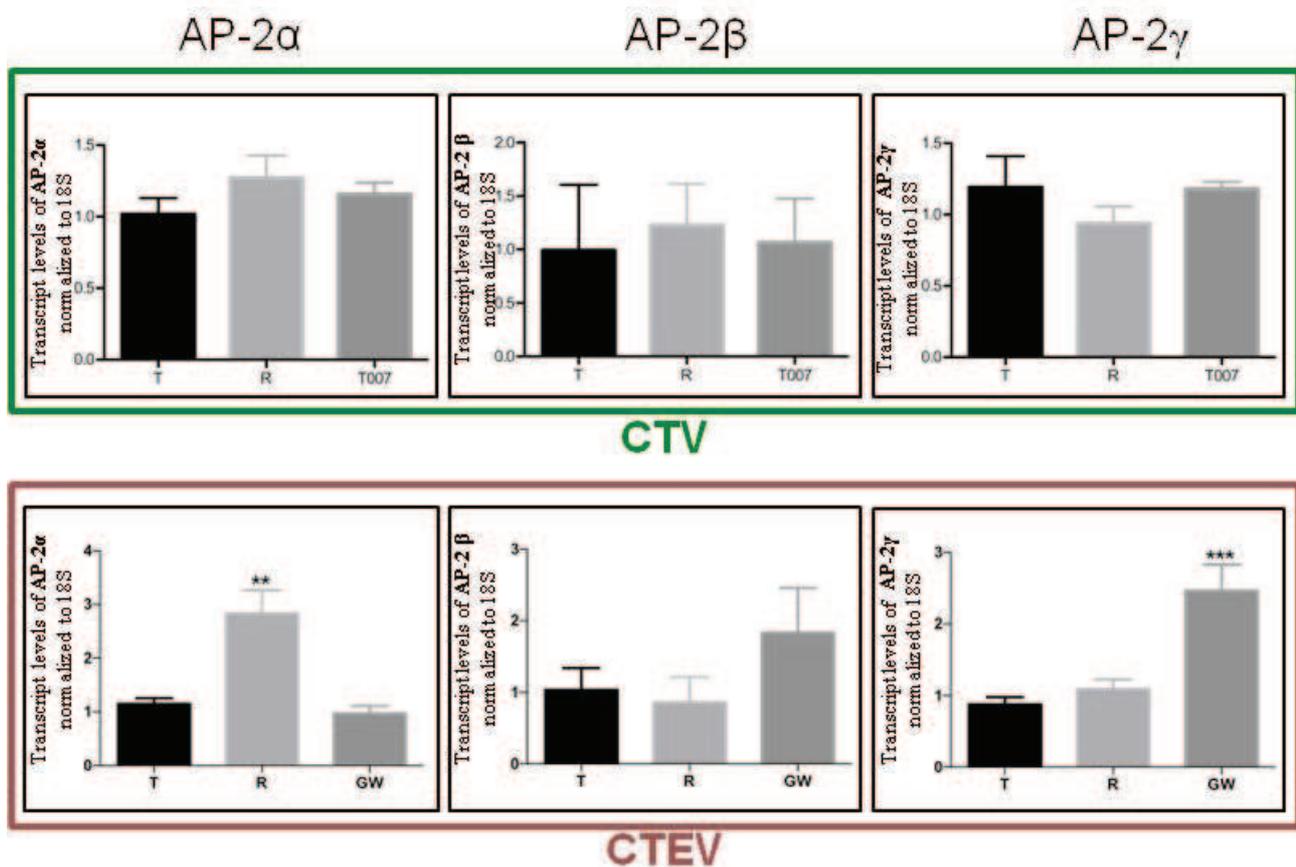
Cet *array* a permis de mettre en évidence que les facteurs de transcription connus pour réguler l'hCG que nous avons étudiés dans la partie précédente sans résultat probant, sont bien modulés au cours de la différenciation des deux types de trophoblastes. L'expression de



Sp1 et d'AP-2 $\alpha$  double avec la syncytialisation. L'acquisition du phénotype invasif et de la capacité à synthétiser de l'hCG est également concomitante à un doublement de l'expression de Sp1 dans les CTEV. Ces facteurs sont également différenciellement exprimés entre les CTEV et les CTV. Les CTEV invasifs expriment moins de Sp1 et d'AP-2 $\alpha$  que le syncytiotrophoblaste. Ces facteurs de transcription constituent donc toujours de bons candidats pour expliquer la régulation opposée de l'hCG par PPAR $\gamma$  dans les deux types de trophoblastes. Nous allons donc chercher un ou des facteurs de transcription de la famille AP-2 ou de la famille Sp, qui seraient également modifier par l'activation ou l'inhibition de PPAR $\gamma$  dans les trophoblastes villos et extravilloux.

Cette analyse montre un autre facteur de transcription dont l'expression augmente avec l'acquisition du phénotype différencié capable de sécréter de l'hCG, le facteur HNF4 $\alpha$ , « *Hepatocyte nuclear factor 4* ». C'est un récepteur nucléaire présent chez les mammifères sous deux isotypes: HNF4 $\alpha$  et HNF4 $\gamma$ . HNF4 $\alpha$  est un gène essentiel aussi bien au niveau du développement embryonnaire que chez l'adulte, il joue en particulier un rôle central dans le développement et la différenciation du foie. Comme PPAR $\gamma$ , HNF4 $\alpha$  est organisé suivant les mêmes domaines fonctionnels caractéristiques des récepteurs nucléaires. Il se lie sous forme d'homodimères préférentiellement à des séquences d'ADN de type DR1 correspondant à la répétition directe de deux motifs hexanucléotidiques séparés par un nucléotide. Le demi-site en 3' de l'élément de réponse a pour séquence consensus AGGTCA qui est également celle reconnue par les récepteurs nucléaires non stéroïdiens tel que PPAR $\gamma$ . La séquence du demi-site situé en 5' est moins définie. Ce facteur de transcription active l'expression génique en se fixant à l'ADN exclusivement sous forme d'homodimère. Il présente également une forte activité d'homodimérisation en l'absence d'ADN et ne peut pas s'hétérodimériser avec RXR $\alpha$ . Aucune étude à ce jour n'a montré la présence de HNF4 $\alpha$  dans le placenta, ni l'existence de ligand connu. Nous mettons donc ici en évidence pour la première fois que HNF4 $\alpha$  est exprimé par les cellules trophoblastiques *in vitro* et que son expression augmente de 13 fois avec la syncytialisation et de 3,6 fois avec l'acquisition du phénotype invasif. Nous avons donc décidé d'approfondir l'étude de l'expression d'HNF4 $\alpha$  dans le placenta et de déterminer son rôle éventuel dans la régulation opposée de l'hCG par PPAR $\gamma$ .

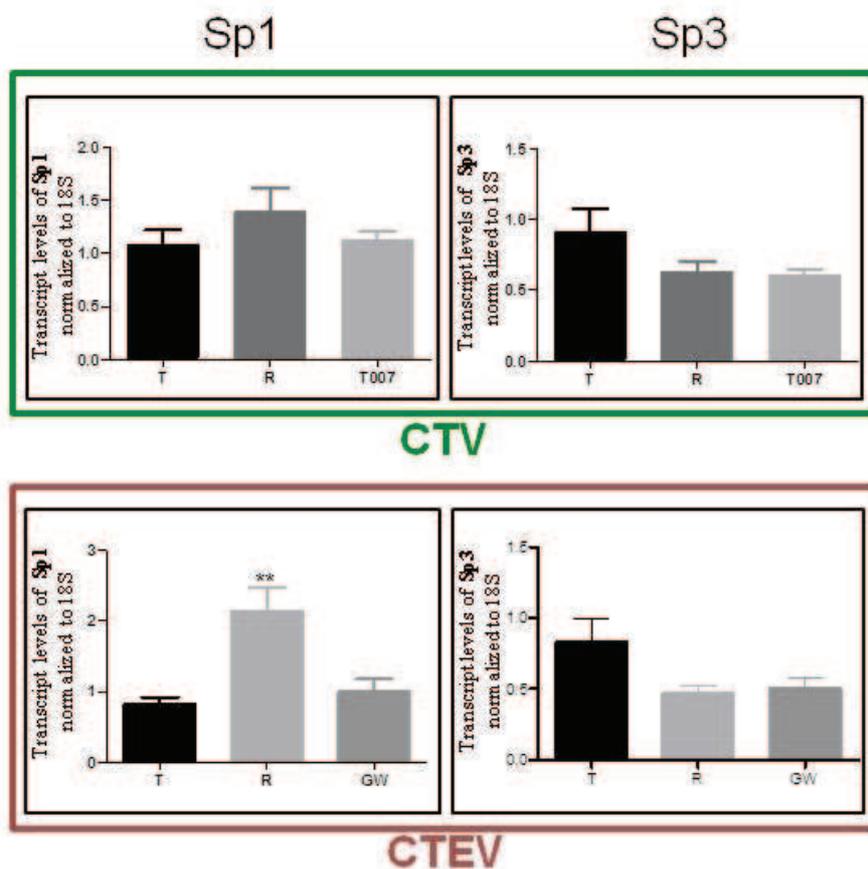




**Figure 56 : Effet de l'activation ou l'inhibition de PPAR $\gamma$  sur l'expression des gènes des facteurs de transcription de la famille AP-2 dans les cytotrophoblastes villeux et extravilleux.**

T : témoin ; R : Rosiglitazone ; GW : GW9662 ; T007 : T0070907

Les transcrits codant pour AP-2 $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  ont été quantifiés par Q-PCR relative (CTV : n=3 ; CTEV : n=4). Les valeurs des taux de transcrits ont été normalisées par rapport au 18S. Le test statistique "Mann and Whitney" a été utilisé pour comparer les taux de transcrits dans les trophoblastes traités par rapport aux témoins : \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001



**Figure 57 : Effet de l'activation ou l'inhibition de PPAR $\gamma$  sur l'expression des gènes des facteurs de transcription de la famille Sp dans les cytotrophoblastes villeux et extravilleux.**

T : témoin ; R : Rosiglitazone ; GW : GW9662 ; T007 : T0070907

Les transcrits codant pour Sp1 et Sp3 ont été quantifiés par Q-PCR relative (CTV : n=5 ; CTEV : n=4). Les valeurs des taux de transcrits ont été normalisées par rapport au 18S. Le test statistique "Mann and Whitney" a été utilisé pour comparer les taux de transcrits dans les trophoblastes traités par rapport aux témoins : \*\* p < 0,01

## 2-b) Régulation des facteurs de transcription de la famille AP-2 ou Sp par le PPAR $\gamma$ dans les trophoblastes villeux et extravilleux.

Après 24 heures de culture, les trophoblastes villeux et extravilleux ont été traités avec un agoniste ou un antagoniste de PPAR $\gamma$  pendant 24 heures. Nous avons ensuite étudié l'expression des facteurs de transcription de la famille AP-2 et de la famille Sp décrits dans la partie précédente, en fonction de l'activation ou l'inhibition de PPAR $\gamma$ .

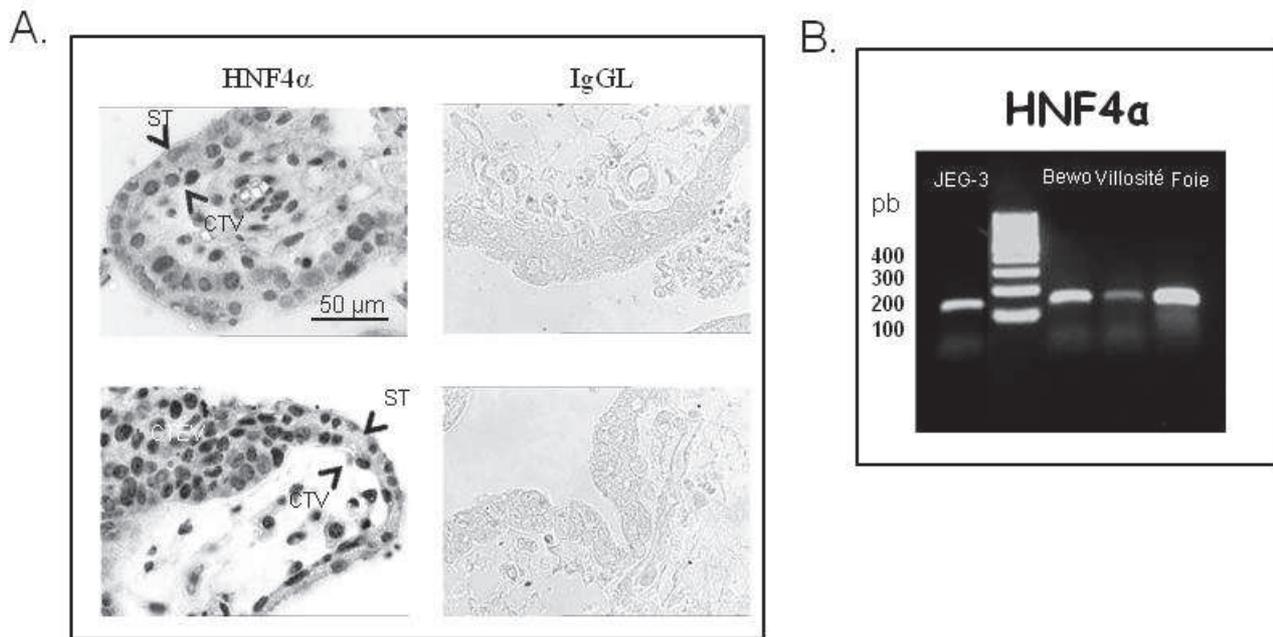
Dans les CTV, nous mettons en évidence que ni l'expression des facteurs de transcription de la famille AP-2 (Cf. Figures 56 et 57) ni celle des membres de la famille Sp n'est modifiée par l'activation ou l'inhibition de PPAR $\gamma$ . En revanche, dans les CTEV, l'activation de PPAR $\gamma$  par la rosiglitazone induit une augmentation de l'expression d'AP-2 $\alpha$  et de Sp1. Étonnamment l'inhibition de PPAR $\gamma$  par le GW9662 n'induit pas d'effet sur ces deux facteurs alors qu'il augmente l'expression d'AP-2 $\gamma$ , facteur sur lequel le traitement par la rosiglitazone n'induit aucun effet. Il semblerait donc que l'hypothèse posée précédemment (II-A-3) d'un effet synergique entre le GW9662 et les ligands endogènes de PPAR $\gamma$  ne soit pas valide pour la régulation de ces facteurs de transcription. Cette molécule semble donc complètement à proscrire ou du moins à tester pour savoir exactement quels sont ses effets sur PPAR $\gamma$ .

## 2-c) Expression placentaire du facteur de transcription HNF4 $\alpha$

L'analyse des résultats de l'*array* a mis en évidence que l'expression du facteur de transcription HNF4 $\alpha$  augmentait avec la différenciation dans les deux types de trophoblastes. Du fait des interactions possibles entre HNF4 $\alpha$  et PPAR $\gamma$  et de la possibilité pour HNF4 $\alpha$  de se fixer sur les mêmes séquences consensus que PPAR $\gamma$ , nous avons voulu détailler son expression dans le placenta au premier trimestre de grossesse.

Dans un premier temps nous avons cherché à mettre en évidence ce facteur *in situ* par immunohistochimie puis par RT-PCR. L'immunomarquage d'HNF4 $\alpha$  sur des coupes placentaires du 1<sup>er</sup> trimestre de grossesse met en évidence sa présence dans le noyau des cytotrophoblastes villeux, du syncytiotrophoblaste et des cytotrophoblastes extravilleux. Il est également présent dans les noyaux des cellules de l'axe mésenchymateux de la villosité chorale (Cf. Figure 58A).





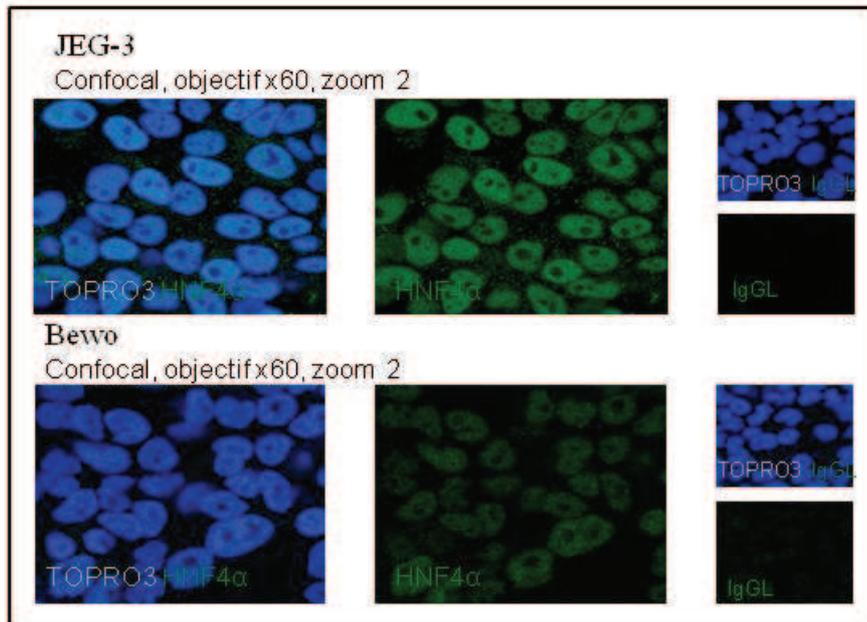
**Figure 58 : Expression et localisation d'HNF4 $\alpha$  dans le placenta du premier trimestre de grossesse.**

pb : paires de bases

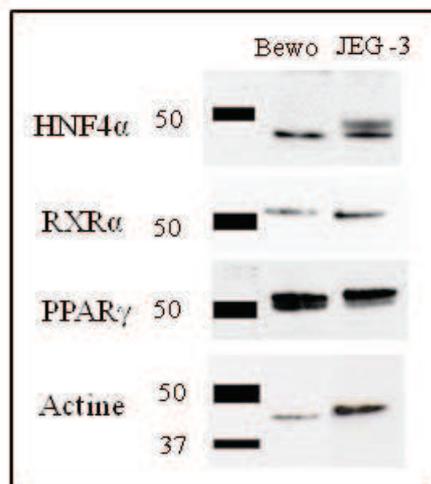
A. Localisation d'HNF4 $\alpha$  par immunohistochimie sur des coupes en paraffine de placenta humain du premier trimestre de grossesse (n = 4)

B. RT-PCR d'HNF4 $\alpha$  sur des villosités chorales du premier trimestre (villosité), deux lignées trophoblastiques (JEG-3, Bewo) et du foie (contrôle positif).

A.



B.



**Figure 59 : Expression et localisation d'HNF4α dans les lignées trophoblastiques JEG-3 et BeWo.**

A. Localisation d'HNF4α (en vert) par immunocytochimie dans des cellules JEG-3 ou BeWo.(noyau marqué en bleu).

B. Western blot de HNF4α, RXRα et PPARγ sur des extraits protéiques totaux de cellules BeWo ou JEG-3

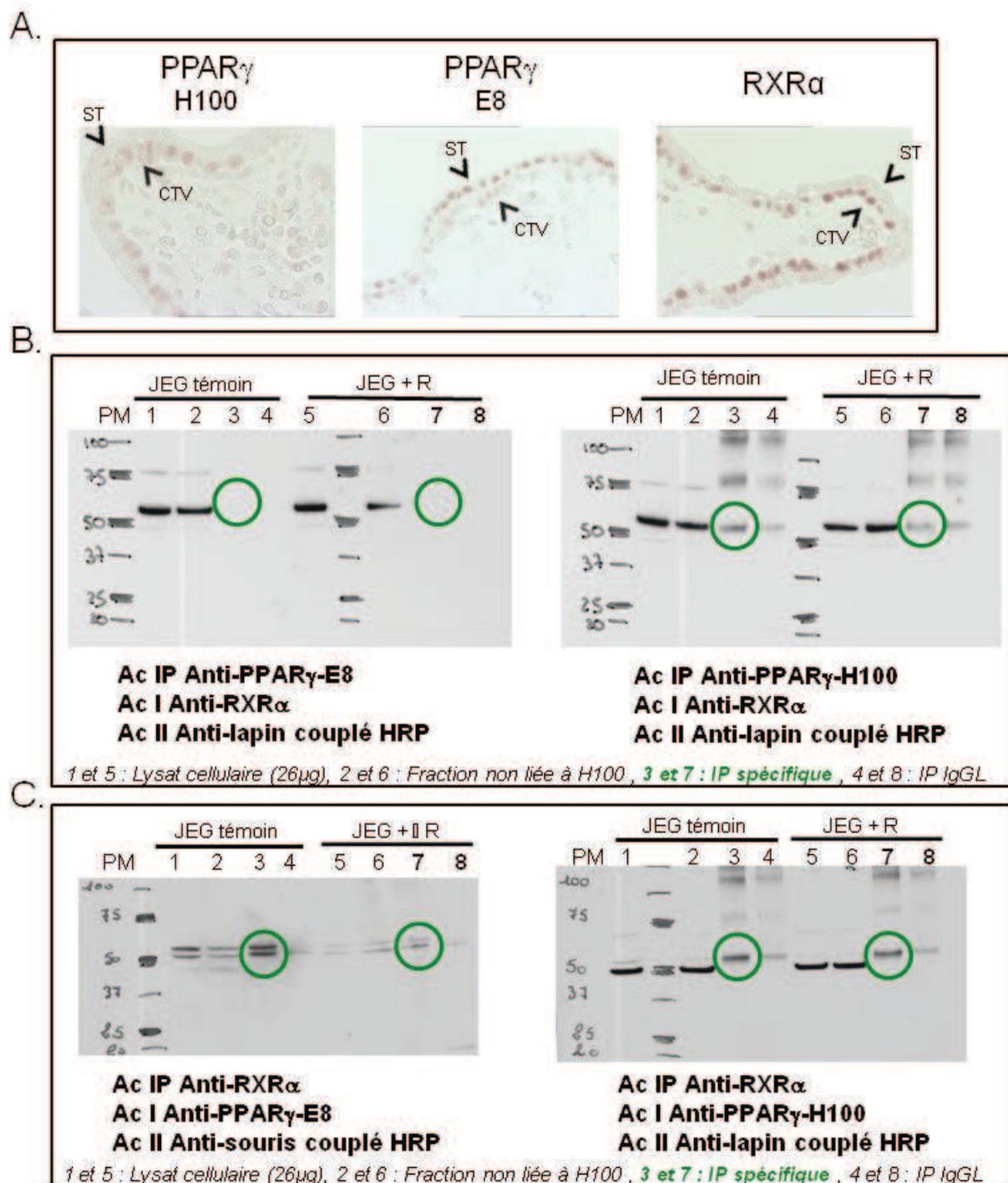
L'amplification réalisée avec le couple d'amorces choisi nous a permis d'obtenir une bande correspondant à la taille attendue dans tous les modèles cellulaires où nous l'avons recherchée. Nous avons utilisé un extrait d'ARN de foie comme contrôle positif (Cf. Figure 58B, 5<sup>ème</sup> dépôt). HNF4 $\alpha$  a été amplifié comme attendu dans un extrait de villosité placentaire (répété sur 3 extraits obtenus de 3 placentas différents) mais aussi dans deux lignées trophoblastiques, JEG-3 et BeWo (Cf. Figure 58B). L'expression de la protéine HNF4 $\alpha$  dans ces deux lignées cellulaires a été vérifiée par immunocytochimie (Cf. Figure 59A) et par Western Blot (Cf. Figure 59B). On peut voir sur la figure, qu'HNF4 $\alpha$  est exprimé au niveau nucléaire dans les JEG-3 et dans les BeWo, mais plus faiblement dans ces dernières semble-t-il. HNF4 $\alpha$ , comme PPAR $\gamma$  et RXR $\alpha$ , a été mis en évidence par Western Blot sur des extraits protéiques totaux de JEG-3 et de BeWo (Cf. Figure 59B). Nous avons essayé de mettre en évidence une interaction entre HNF4 $\alpha$  et PPAR $\gamma$  par co-immunoprécipitation mais les deux anticorps dirigés contre HNF4 $\alpha$  choisis (ref : 2803-1 chez Epitomics, ref : sc-101059 chez Santa Cruz Biotechnology) se sont révélés non-immunoprécipitants dans nos modèles. Les résultats des co-immunoprécipitations de PPAR $\gamma$  ont donné des résultats suprenants qui vont être présentés dans la partie suivante.

#### 2-d) Localisation cytotrophoblastique de PPAR $\gamma$ au premier trimestre de grossesse.

Pour étudier l'expression protéique de PPAR $\gamma$  dans le placenta et ses interactions avec RXR $\alpha$  ou HNF4 $\alpha$  en fonction de son activation nous avons choisi deux anticorps dirigés contre deux épitopes différents de PPAR $\gamma$  :

- L'anticorps anti-PPAR $\gamma$  H100 de chez Santa Cruz Biotechnology dirigé contre la séquence d'acides aminés 8-106, en N-terminale.
- L'anticorps anti-PPAR $\gamma$  E8 de chez Santa Cruz Biotechnology dirigé contre l'extrémité C-terminale de la protéine.

L'utilisation de ces deux anticorps en immunohistochimie sur des coupes placentaires du premier trimestre de grossesse met en évidence des marquages différents. L'anticorps H100 met en évidence PPAR $\gamma$  dans les noyaux des cytotrophoblastes alors que l'anticorps E8 le met en évidence dans les noyaux du syncytiotrophoblaste (Cf. Figure 60A). Il est intéressant



**Figure 60 : Immunolocalisation de PPAR $\gamma$  et RXR $\alpha$  *in situ* et étude de leurs interactions par co-immunoprécipitation.**

A. Localisation de PPAR $\gamma$  et RXR $\alpha$  par immunohistochimie sur des coupes en paraffine de placenta humain du premier trimestre de grossesse (n = 4).

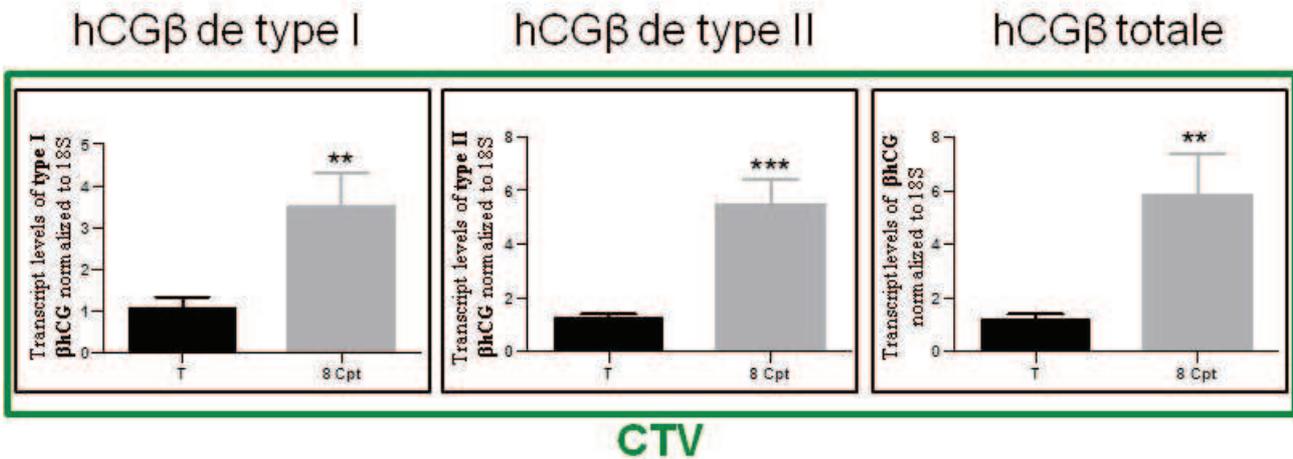
B. Immunoprécipitation de PPAR $\gamma$  par l'anticorps (Ac IP) E8 ou H100, révélation de RXR $\alpha$  (Ac I)

C. Immunoprécipitation de RXR $\alpha$ , révélation PPAR $\gamma$  par l'anticorps (Ac I) E8 ou H100

de noter que l'immunomarquage de RXR $\alpha$  permet de le mettre en évidence dans les noyaux des cytotrophoblastes mais pas dans le syncytiotrophoblaste. Les différences des résultats en fonction de l'anticorps dirigé contre PPAR $\gamma$  utilisé, ont été retrouvées lorsque nous avons réalisé des co-immunoprécipitations. Ces Co-immunoprécipitations ont été au départ réalisées pour mettre au point les conditions de l'expérience mais les résultats obtenus ont demandé une analyse plus approfondie. En effet, il a été montré de nombreuses fois que PPAR $\gamma$  nécessite obligatoirement une hétérodimérisation avec RXR $\alpha$  afin de se lier à l'ADN. Dans ce contexte, ces deux protéines interagissent entre elles et par conséquent devraient coimmunoprécipiter. Le modèle utilisé est la lignée JEG-3 pour sa facilité d'accès et la possibilité d'obtenir de grandes quantités de protéines. Toutes les co-immunoprécipitations suivantes ont été réalisées 3 fois sur 3 extractions protéiques totales différentes correspondant à des passages de JEG-3 différents.

Lorsque l'on immunoprécipite PPAR $\gamma$  avec l'anticorps E8 et que l'on révèle RXR $\alpha$ , nous n'observons aucune diminution de l'intensité de la bande correspondant à la fraction non liée, ni l'apparition d'une bande au niveau de l'éluat spécifique (Cf. Figure 60B). Alors que ces deux protagonistes devraient interagir. En revanche, la même expérience avec l'emploi de l'anticorps H100 montre que la coIP fonctionne, malgré la présence de bruit de fond (Cf. Figure 60B). Interaction mise également en évidence si on réalise la co-immunoprécipitation inverse, c'est à dire si on immunoprécipite RXR $\alpha$  et que l'on révèle PPAR $\gamma$  soit avec l'anticorps E8 soit avec l'anticorps H100. Quelque soit l'anticorps anti-PPAR $\gamma$  utilisé pour révéler on observe une diminution de l'intensité de la bande dans la fraction non liée en comparaison au lysat protéique et la présence d'une bande de même poids moléculaire dans l'éluat spécifique (Cf. Figure 60C). Cependant, ces anticorps semblent révéler des isoformes de PPAR $\gamma$  différentes puisque les poids moléculaires observés semblent légèrement différents. De plus, RXR $\alpha$  ne semble pas interagir avec les deux isoformes révélées par l'anticorps H100 puisque seule la bande de plus haut poids moléculaire est immunoprécipitée. En revanche, les deux formes révélées par l'anticorps E8 co-immunoprécipitent avec RXR $\alpha$  et interagissent donc très probablement avec lui.

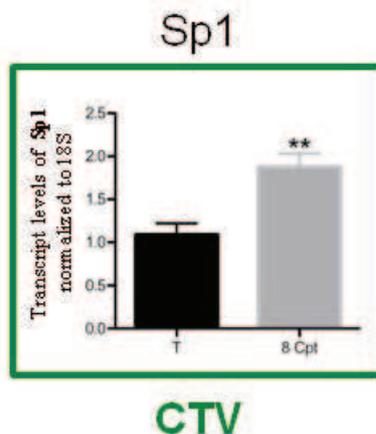
Toutes ces co-immunoprécipitations ont été réalisées en parallèle sur des extraits protéiques de JEG-3 traitées 24h avec 1  $\mu$ M de rosiglitazone. Les résultats ne sont pas différents de ceux obtenus avec les JEG-3 non traités.



**Figure 61 : Effet d'un analogue de l'AMP<sub>c</sub> sur l'expression des gènes de la sous-unité β de l'hCG dans les cytotrophoblastes villosus.**

T : témoin ; 8 Cpt : analogue de l'AMP<sub>c</sub>

Les transcrits codant pour la sous-unité β de type I ou de type II de l'hCG ont été quantifiés par Q-PCR relative (CTV : n=5). Les valeurs des taux de transcrits ont été normalisées par rapport au 18S. Le test statistique "Mann and Whitney" a été utilisé pour comparer les taux de transcrits dans les trophoblastes traités par rapport aux témoins : \*\* p < 0,01 ; \*\*\* p < 0,001



**Figure 62 : Effet d'un analogue de l'AMP<sub>c</sub> sur l'expression du facteur de transcription Sp1 dans les trophoblastes villosus.**

T : témoin ; 8 Cpt : analogue de l'AMP<sub>c</sub>

Les transcrits codants pour Sp1 ont été quantifiés par Q-PCR relative (CTV : n=5). Les valeurs des taux de transcrits ont été normalisées par rapport au 18S. Le test statistique "Mann and Whitney" a été utilisé pour comparer les taux de transcrits dans les trophoblastes traités par rapport aux témoins : \*\* p < 0,01

## 2-e) Régulation de l'hCG par l'AMP<sub>c</sub>

Pour compléter cette partie sur la régulation de l'hCG beta de type I et II nous avons voulu vérifier que ces deux types de sous-unité beta étaient régulées par l'AMP<sub>c</sub>. Pour cela nous avons traité, après 24h de culture, des trophoblastes villeux avec 100µM de 8 CPT, un analogue de l'AMP<sub>c</sub> pendant 24h. Les taux de transcrits des deux types de sous-unité beta de l'hCG ont été quantifiés par Q-PCR relative et normalisés par rapport au 18S (*Cf.* Figure 61). L'expression de l'hCG beta de type I et de type II est augmentée par le traitement avec l'analogue de l'AMP<sub>c</sub> par rapport au témoin, de 3,5 fois et de 5,5 fois respectivement.

Nous avons également regardé si le traitement au 8 CPT modifiait l'expression des facteurs de transcription de la famille AP-2 et Sp étudiés précédemment. Seule l'expression du facteur de transcription Sp1 est modifiée de manière significative par ce traitement, elle est pratiquement doublée (*Cf.* Figure 62).

## 3) Discussion des résultats

L'analyse globale par « *array* » des facteurs de transcription exprimés *in vitro* au cours de la différenciation trophoblastique selon les deux voies a été réalisée sur des cellules extraites de placentas du 1<sup>er</sup> trimestre (8-14 SA) avec la méthode Taqman. Cette analyse a été réalisée pour étudier le panel de facteurs de transcription exprimé par chaque type de cellules trophoblastiques mais aussi pour comparer les panels obtenus entre eux.

L'« *array* » permet de mettre en évidence des évolutions différentes de l'expression de PPAR $\gamma$  en fonction du type de trophoblaste considéré. En effet, l'expression de PPAR $\gamma$  augmente dans les CTEV alors qu'elle diminue dans les CTV au cours de leur différenciation *in vitro*. Cette diminution dans les CTV n'avait pas encore été mise en évidence dans les trophoblastes. Tarrade et coll, ont montré que l'expression de PPAR $\gamma$  ne varie pas avec la syncytialisation mais les techniques utilisées (Northern Blot et Western Blot) sont moins sensibles (Tarrade et coll, 2001a).



Cette analyse par « *array* » montre un autre facteur de transcription qui augmente avec l'acquisition du phénotype différencié capable de sécréter de l'hCG, le facteur HNF4 $\alpha$ . Ce facteur nous a intéressé car HNF4 $\alpha$  est organisé suivant les mêmes domaines fonctionnels que PPAR $\gamma$  et parce que comme lui il se lie sous forme d'homodimères préférentiellement à des séquences d'ADN de type DR1 et pourrait agir comme cofacteur en se fixant à l'hétérodimère PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$  comme cela a déjà été montré pour l'hétérodimère PPAR $\alpha$ /RXR $\alpha$  (Chamouton et coll, 2011 ; Dongol et col, 2007). Il pourrait donc être impliqué dans la régulation de l'hCG par le PPAR $\gamma$ . De plus, c'est la première fois que son expression est mise en évidence dans le placenta. Nous avons donc poursuivi l'étude de ce facteur de transcription dans le placenta au 1<sup>er</sup> trimestre de grossesse et ce par différentes techniques. Les résultats de l'*array* nous indiquent que l'expression d'HNF4 $\alpha$  augmente dans le CTV et dans le CTEV au cours de leur différenciation en syncytium et en cellule invasive respectivement, sans toutefois révéler de différence d'expression entre les deux types de trophoblastes. Par immunohistochimie, nous mettons en évidence HNF4 $\alpha$  dans toutes les cellules placentaires. Nous révélons son expression par RT-PCR de nouveau dans les villosités placentaires mais aussi dans deux lignées trophoblastiques. L'expression d'HNF4 $\alpha$  a été mise en évidence également par immunocytochimie et par Western Blot dans ces deux lignées. Ce travail est un travail préliminaire à la recherche d'un rôle d'HNF4 $\alpha$  dans la régulation de l'hCG dans les trophoblastes humains, à associer à la régulation par PPAR $\gamma$  de cette protéine, et devra être poursuivi.

Il est important de noter que nous avons obtenu des résultats intéressants sur la localisation de PPAR $\gamma$  et RXR $\alpha$  dans les trophoblastes villositaires du 1<sup>er</sup> trimestre de grossesse par des techniques d'immunohistochimie, sur des coupes en paraffine de placentas, et de coimmunoprécipitation, dans le modèle JEG-3. Nous avons utilisé deux anticorps anti-PPAR $\gamma$ , reconnaissant la protéine par des épitopes diamétralement opposés (extrémité N-terminale et C-terminale). Dans un cas, il est localisé sur le site d'hétérodimérisation avec RXR $\alpha$ , ne permettant pas la reconnaissance de PPAR $\gamma$  hétérodimérisé. Nous avons ainsi mis en évidence que l'hétérodimère PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$  était uniquement présent dans les cytotrophoblastes villositaires alors que PPAR $\gamma$  seul est présent dans le syncytiotrophoblaste. Ces différences de localisation seront à considérer lors des prochaines études dans le placenta impliquant PPAR $\gamma$  et HNF4 $\alpha$ .



Cet « *array* » met de nouveau en évidence des variations d'expression des facteurs de transcription Sp1 et AP-2 $\alpha$  au cours de la différenciation des trophoblastes villos et extravilloux, semblant ainsi insister sur leur rôle capital dans cette différenciation. Dans la 1<sup>ère</sup> partie des résultats nous avons également montré que l'expression de Sp1 augmente avec la syncytialisation, ce qui est retrouvé dans l' « *array* ». En revanche, nous n'avons pas mis en évidence d'augmentation d'AP-2 $\alpha$ , peut être du fait de la moins bonne sensibilité de la méthode SYBR Green par rapport à la méthode Taqman. Dans les CTEV nous retrouvons également une augmentation de l'expression de Sp1 avec l'acquisition du phénotype invasif. Les niveaux d'expression de Sp1 et d'AP-2 $\alpha$  dans les deux types de cellules différenciées, sécrétant l'hCG, sont très différents. Les CTEV invasifs expriment 7 et 11 fois moins que le ST Sp1 et AP-2 $\alpha$ , respectivement. Il est possible que ce résultat explique la différence de niveau d'expression d'hCG entre ces deux types cellulaires. Dans le but de déterminer le ou les facteurs clés de la régulation de la différenciation trophoblastique et de l'hCG, par ailleurs essentielle dans la différenciation trophoblastique, nous avons choisi de poursuivre l'étude des facteurs de transcription de la famille AP-2 et Sp. Leur expression est différente entre les deux types de trophoblastes, tout comme celle de PPAR $\gamma$ , ils pourraient donc être impliqués dans la régulation opposée de l'hCG par le PPAR $\gamma$  dans les deux populations trophoblastiques.

Nous avons cherché à savoir s'ils étaient eux-mêmes modulés par le PPAR $\gamma$ , et si cette modulation était différente entre les CTV et les CTEV, ce que nos expériences ont en effet révélé. Dans les CTV les traitements n'ont aucun effet alors que dans les CTEV l'activation de PPAR $\gamma$  entraîne une augmentation de l'expression de Sp1 et d'AP-2 $\alpha$ . Il est surprenant de mettre en évidence dans les CTEV que l'activation de PPAR $\gamma$ , qui inhibe l'expression de l'hCG, augmente l'expression de facteurs de transcription décrits pour augmenter l'expression de l'hCG. Les hypothèses envisagées pour expliquer l'effet opposé au rôle connu de ces facteurs de transcription sont des modifications post-traductionnelles d'AP-2 $\alpha$  et de Sp1 qui bloqueraient leur action. On peut envisager des phosphorylations ou des sumoylations, que l'on chercherait à mettre en évidence par Western blot. Il est possible aussi que la chromatine soit compactée et rende les gènes alpha et/ou beta de l'hCG inaccessibles aux facteurs de transcription dans les CTEV. En effet, le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  associé à des co-répresseurs peut recruter un complexe co-répresseur comprenant des HDAC qui clivent les groupements acétyl des histones et entraînent une compaction de la chromatine.



Suivant la même idée, nous avons cherché à savoir si ces facteurs de transcription étaient régulés par un autre facteur connu pour contrôler l'expression de l'hCG, l'AMP<sub>c</sub>. Nous avons dans un premier temps vérifié que les deux types de sous-unités beta de l'hCG étaient régulées par l'AMP<sub>c</sub>. Pour cela nous avons utilisé un analogue de l'AMP<sub>c</sub>, le 8 CPT et mis en évidence dans les CTV qu'après 24h de traitement l'expression des deux types d'hCGβ était augmentée. En revanche, il a été surprenant de mettre en évidence que l'ajout de cet analogue entraînait une augmentation de l'expression du facteur de transcription Sp1 uniquement. En effet, il a été montré dans la lignée JEG-3 que l'effet de l'AMP<sub>c</sub> impliquait principalement AP-2α puisque l'AMP<sub>c</sub> augmentait sa capacité de liaison (Johnson and Jameson, 1999). Une autre équipe montre également que l'AMP<sub>c</sub> augmente l'expression d'AP-2α dans les JEG-3 (LiCalsi et coll, 2000) contrairement à d'autres auteurs qui ne montrent pas de changement d'expression de ce facteur dans les cellules HeLa sous l'action de l'AMP<sub>c</sub> (Luscher et coll, 1989). Les facteurs Ap-2 possèdent des sites de phosphorylation à la PKA, les auteurs proposent donc plutôt une modulation de l'activité des facteurs AP-2 par cette voie. Dans notre modèle nous ne mettons pas en évidence de modification d'expression d'AP-2α sous l'action de l'AMP<sub>c</sub>, ce qui ne signifie donc pas que ce facteur n'a pas de rôle dans la voie de signalisation de l'AMP<sub>c</sub>. Comme nous mettons en évidence une augmentation de l'expression de Sp1 sous l'action de l'AMP<sub>c</sub>, il serait intéressant de vérifier si l'augmentation de l'hCG que l'AMP<sub>c</sub> induit est due, ou en partie due à l'augmentation de Sp1. Pour cela il faudrait transférer un dominant négatif de Sp1 dans les trophoblastes villeux, stimuler avec un analogue de l'AMP<sub>c</sub> et quantifier l'expression de l'hCG beta. Si l'augmentation de l'expression de l'hCG induite par l'AMP<sub>c</sub> diminue dans les cellules transfectées par le dominant négatif de Sp1 c'est que cette augmentation est en partie due à Sp1. Ces travaux devront également être complétés par une étude similaire dans les CTEV.

Dans cette deuxième partie de résultats, nous avons montré que l'hCGα et l'hCGβ de type I et de type II étaient régulées de façon opposée par le récepteur nucléaire PPARγ dans les deux types de trophoblastes. L'expression basale de l'hCG beta de type I et de type II dans les trophoblastes villeux est en partie contrôlée par PPARγ, cela reste à mettre en évidence dans les CTEV. L'analyse globale du panel de facteurs de transcription exprimés par les CTV et les CTEV au cours de leur différenciation a mis de nouveau en évidence que les facteurs Sp1 et AP-2α augmentaient avec la différenciation des cellules trophoblastiques, comme le facteur de transcription HNF4α nouvellement mis en évidence dans le placenta.



L'étude de la régulation des facteurs AP-2 et Sp par des facteurs connus pour réguler l'hCG a permis de montrer que :

- l'activation de PPAR $\gamma$  ne modifie pas leur expression dans les CTV alors qu'elle augmente leur expression dans les CTEV. C'est un phénomène auquel nous n'avons pas encore trouvé d'explication puisque ces facteurs ont été décrits comme stimulant la transcription de l'hCG dans les CTV, et que l'activation de PPAR $\gamma$  dans les CTEV inhibe son expression.
- la stimulation par un analogue de l'AMP<sub>c</sub> dans les CTV induit une augmentation de l'expression de Sp1 ce qui n'avait jusqu'à maintenant pas été montré. Le rôle de Sp1 comme effecteur de l'AMP<sub>c</sub> dans la régulation de l'hCG devra être démontré.



## *Discussion et Perspectives*



Au cours du développement précoce du placenta humain, le cytotrophoblaste se différencie selon deux voies : la voie villeuse et la voie extravilleuse. Ces deux populations ont des fonctions et des devenir différents. La fonction endocrine du placenta est principalement assurée par le syncytiotrophoblaste, issu de la fusion des cytotrophoblastes vilieux. Il est responsable notamment de la majorité de la production placentaire d'hCG. C'est une hormone polypeptidique constituée de deux sous-unités, la sous-unité alpha qui est commune aux autres gonadotrophines, et la sous-unité beta qui lui confère sa spécificité. Il est bien établi que le syncytiotrophoblaste (ST) sécrète de l'hCG dans le compartiment maternel tout le long de la grossesse où elle joue un rôle endocrine essentiel à son maintien, mais également localement où elle stimule la différenciation en ST de façon autocrine. Il est maintenant admis que le cytotrophoblaste extravilleux exprime et sécrète également de l'hCG et cette hCG stimule de manière spécifique l'invasion trophoblastique. Un pic d'hCG dans le sang maternel est observé à 10-12 semaines d'aménorrhée, période où le statut oxydatif placentaire change. En effet, le délitement des bouchons trophoblastiques dans les artères spirallées utérines induit l'arrivée du sang maternel dans la chambre intervillieuse, comprenant les hématies véhiculant l'oxygène, et aboutit à l'oxygénation des villosités placentaires. Ainsi, dans une grossesse normale, un environnement du placenta faible en oxygène est physiologique au 1<sup>er</sup> trimestre précoce. Cet environnement est même nécessaire au bon développement du fœtus puisqu'elle minimise la production de radicaux libres dérivés de l'oxygène, très tératogènes, et au développement placentaire par la stimulation de l'angiogenèse et la prolifération des cytotrophoblastes. En revanche, le maintien d'un environnement hypoxique pendant la grossesse est pathologique et associé à des complications obstétricales comme la pré-clampsie et le RCIU.



## **I - Expression trophoblastique de l'hCG au premier trimestre de grossesse avant et après l'oxygénation de la chambre intervillieuse.**

Le rôle de l'oxygène sur l'invasion des cytotrophoblastes extravillieux a été étudié à de nombreuses reprises puisque celle-ci a lieu physiologiquement dans un environnement pauvre en oxygène. Cependant, le rôle positif ou négatif de l'hypoxie sur l'invasion trophoblastique n'a pu être clairement établi. Les résultats des différentes études sont en effet contradictoires, probablement à cause des différences d'expérimentations (composition du milieu de culture, concentration d'oxygène utilisée, âge gestationnel des trophoblastes) (pour revue Pringle et coll, 2010). Au niveau de la fusion trophoblastique et des phénomènes endocrines beaucoup moins d'études sont répertoriées. Il a été montré qu'une hypoxie modérée (8 % d'oxygène) imposée à des cytotrophoblastes villeux en culture primaire issus de placentas à terme entraîne une diminution de la fusion et parallèlement de la sécrétion d'hCG et d'hPL (Alsat et coll, 1996). Des études similaires menées sur le modèle de lignée cellulaire BeWo montre le même effet (Jiang et coll, 2000). Des BeWo mises en culture à 2%, 8% et 20% d'O<sub>2</sub> sécrètent d'autant moins d'hCG que la quantité d'O<sub>2</sub> est faible et ce après 24h de culture (Li et coll, 2011).

A notre connaissance, aucune étude de l'effet de l'oxygène sur des trophoblastes villeux du 1<sup>er</sup> trimestre n'a été menée, malgré le fait que ces cellules soient directement exposées aux variations physiologiques de la concentration en oxygène dans la chambre intervillieuse au cours de cette période de la grossesse. Nous avons choisi d'étudier l'impact induit par l'oxygénation de la chambre intervillieuse sur la fusion, sur l'expression et la sécrétion de l'hCG par les trophoblastes villeux et de déterminer l'origine (type I ou type II) de l'hCG beta produite. Pour cela nous avons travaillé sur du tissu placentaire total et des cultures de trophoblastes villeux issus de placentas du 1<sup>er</sup> trimestre précoce ou tardif. Ces cultures ont été réalisées à 20% d'O<sub>2</sub> car la culture des trophoblastes villeux en hypoxie comporte un biais. De la collecte du placenta à la mise en culture, les cellules sont à 20% d'oxygène et ont subi un stress oxydatif. Le passage à 2 ou 8% d'O<sub>2</sub> représentera donc un nouveau stress et probablement pas à un retour à un environnement physiologique. Par cette méthode nous avons mis en évidence *in vitro*, et lorsque c'est possible *in situ* (expression de



l'hCG), que les trophoblastes villosités du 1<sup>er</sup> trimestre précoce et tardif ont des caractéristiques différentes. Les trophoblastes villosités mononucléés du 1<sup>er</sup> trimestre précoce expriment moins de SOD1, sécrètent plus d'hCG beta de type I et II, fusionnent plus et expriment un panel différent de lysyl oxydases et d'enzymes de la glycosylation par rapport aux trophoblastes villosités du 1<sup>er</sup> trimestre tardif (observations par d'autres membres du laboratoire, résultats non publiés). Ces résultats ont donc été obtenus après une période de culture de 72 heures à 20% d'O<sub>2</sub>, suggérant l'existence d'un microenvironnement cellulaire physiologique qui serait conservé. Cependant, toutes les caractéristiques ne sont pas conservées. En effet, nous avons également étudié l'expression des facteurs de transcription connus pour réguler l'hCG et mis en évidence *in situ* que leur localisation dépendait du terme des placentas étudiés et que l'expression d'AP-2β diminuait après l'oxygénation de la chambre intervillieuse. *In vitro* nous retrouvons les mêmes niveaux d'expression en début de culture, mais les différences observées entre les deux termes disparaissent au cours de la culture. L'évolution de ces facteurs de transcription au cours de la syncytialisation semble différente et ne pas être conservée *in vitro*. Ce système semble donc plus sensible aux variations d'environnement.

Les effecteurs les plus connus de l'hypoxie sont les facteurs HIFs. Ce sont des hétérodimères dont la sous-unité alpha est inductible. Chez les mammifères, trois gènes codant pour la sous-unité alpha ont été décrits et HIF-1α est la forme la mieux connue. Dans le placenta HIF-1α et HIF-2α sont constitutivement exprimés, majoritairement au 1<sup>er</sup> trimestre de grossesse ce qui est en accord avec l'environnement pauvre en oxygène du placenta à cette période (Genbacev et coll, 2001). La régulation de ces facteurs est très complexe et n'est pas uniquement dépendante de l'oxygène. En effet, ils peuvent être régulés par des stimuli non-hypoxiques dont un certain nombre sont présents dans le placenta (progestérone, œstrogène, IGF I et II, TGFβ1...) (pour revue : Pringle et coll, 2010). Dans les cellules endothéliales, dans les cellules de neuroblastomes humains et dans des lignées cellulaires fibroblastiques ou épithéliales il a été mis en évidence que ces deux facteurs ne répondaient pas de la même façon à l'hypoxie en fonction de sa sévérité et de sa durée (Wiesener et coll, 1998 ; Holmquist-Mengelbier et coll, 2006). Le modèle proposé est que la stabilisation de HIF-1α par l'hypoxie serait une réponse aiguë et transitoire à cette hypoxie alors que la protéine HIF-2α s'accumulerait graduellement et régulerait l'activation de gènes sur une période d'hypoxie prolongée. Cette différence de réponse à l'hypoxie, aiguë puis à long terme, n'a pas encore été étudiée dans le placenta. Le facteur majoritairement étudié dans le placenta (et dans la plupart des systèmes) est le facteur HIF-1α alors qu'au vu de ses dernières données, l'hypoxie relative



du 1<sup>er</sup> trimestre précoce correspond à une période d'hypoxie prolongée et demanderait plutôt l'étude du facteur HIF-2 $\alpha$ . On peut envisager l'hypothèse suivante : l'accumulation d'HIF-2 $\alpha$  dans les trophoblastes villosus issus de placentas du 1<sup>er</sup> trimestre précoce permettrait de maintenir les effets de l'environnement faible en oxygène, dont ils sont issus, dans les cultures primaire *in vitro*. La quantification de l'expression de HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$ , et le calcul de leur proportion, dans des extraits placentaires du 1<sup>er</sup> trimestre précoce et tardif permettrait de valider la nécessité de cette étude et serait un premier pas vers la validation de cette hypothèse. Nous avons analysé les promoteurs de CGB3, CGB5, CGB7 et CGB8 *in silico* (genomatix software) et mis en évidence des éléments de réponse à HIF dans chacun d'eux. La surexpression de HIF-1 $\alpha$  ou de HIF-2 $\alpha$  dans des cultures de trophoblastes villosus du 1<sup>er</sup> trimestre précoce et tardif, suivi du dosage et de la quantification des transcrits des hCG beta de type I et II permettraient de savoir si ces deux facteurs ont un rôle inhibiteur ou activateur dans la régulation des deux types d'hCG beta et si ce rôle varie en fonction du terme dont sont issus les trophoblastes.

Les différences de production de l'hCG beta entre le 1<sup>er</sup> trimestre précoce et tardif pourraient aussi être expliquées par la fonctionnalité des récepteurs LH/CG pendant cette même période. En effet, il a été décrit que le récepteur LH/CG serait tronqué et probablement peu fonctionnel avant neuf semaines de gestation (Rao, 1996). Il a également été décrit que l'hCG exerce un rétro-contrôle négatif sur sa propre synthèse via le récepteur LH/CG à terme et que ce rétro-contrôle n'existe pas au 1<sup>er</sup> trimestre de grossesse (Licht et coll, 1993). Ce dernier résultat conforte l'idée d'un récepteur peu fonctionnel en début de grossesse et permettrait d'expliquer la plus forte expression d'hCG par les trophoblastes villosus du premier trimestre précoce par rapport au premier trimestre tardif. Cependant, nous avons montré que les trophoblastes villosus du premier trimestre précoce fusionnaient plus rapidement que ceux du premier trimestre tardif et supposé que cette fusion plus rapide serait en partie due à la production plus importante d'hCG. Si notre hypothèse se vérifie, il serait nécessaire d'étudier avec attention par quelle voie de signalisation l'hCG exerce cet effet, si elle passe par le récepteur LH/CG, prouvant ainsi sa fonctionnalité, ou par un récepteur non-canonique comme le récepteur au mannose.

Les différences observées entre les trophoblastes du premier trimestre précoce et ceux du premier trimestre tardif peuvent aussi être en partie expliquées par les forces de cisaillement induites par l'arrivée du flux sanguin maternel dans la chambre intervillieuse (mécanotransduction).



## II - Régulation de l'hCG dans les trophoblastes villeux et extravilleux

Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons mené une étude comparative de l'expression et de la régulation de l'hCG entre les cytotrophoblastes villeux et extravilleux. Nous montrons que les hCG beta de type I et de type II sont exprimées dans les deux types de trophoblastes. Dans les deux cas, l'hCG beta de type II est majoritairement exprimée, mais dans les trophoblastes extravilleux la proportion d'hCG beta de type II par rapport à l'hCG beta de type I est plus importante. Or il a été montré dans les tissus non trophoblastiques que le passage d'un état sain à un état tumoral s'accompagne d'un « *switch* » du type d'hCG beta exprimé, c'est-à-dire du type I vers le type II (Bellet et coll, 1997). Les trophoblastes extravilleux présentent un phénotype pseudo tumoral, il n'est donc pas étonnant que l'expression du type I soit très faible. Il serait d'ailleurs intéressant de savoir quel type d'hCG beta un CTEV fraîchement isolé exprime et si l'expression de l'hCG beta de type I diminue avec l'acquisition du phénotype invasif et si à l'inverse celle de l'hCG beta de type II augmente. Nous n'avons d'ailleurs pas détecté d'hCG beta de type I dans les trophoblastes tumoraux (JEG-3) mais uniquement du type II.

Au niveau de la régulation, nous mettons en évidence de façon surprenante que l'activation du PPAR $\gamma$  régule différenciellement l'expression de l'hCG $\alpha$  et des deux types d'hCG $\beta$  dans les trophoblastes villeux et extravilleux. L'activation de PPAR $\gamma$  augmente l'expression des deux sous-unités de l'hCG dans les trophoblastes villeux alors qu'elle la diminue dans les trophoblastes extravilleux. Pour expliquer cet effet opposé nous avons réalisé un « *array* » des facteurs de transcription humains pour déterminer le panel de facteurs de transcription exprimé par chaque type de trophoblaste au cours de sa différenciation. Cet *array* met en évidence que les facteurs AP-2 $\alpha$ , Sp1 et HNF4 $\alpha$  augmentent avec la différenciation (syncytialisation et invasion) mais sont plus faiblement exprimés dans le trophoblaste extravilleux par rapport au trophoblaste villeux. Sachant que les facteurs Sp et AP-2 ont été décrits pour réguler l'hCG et que HNF4 $\alpha$  pourrait être un cofacteur de PPAR $\gamma$  nous avons approfondi leur étude dans le placenta. Les facteurs des deux premières familles ne semblent pas régulés par le PPAR $\gamma$  dans le trophoblaste villeux mais l'expression d'AP-2 $\alpha$  et Sp1 est augmentée dans les trophoblastes extravilleux. Ces résultats sont surprenants car ces facteurs



sont connus pour activer l'expression de l'hCG alors que nous montrons que PPAR $\gamma$  l'inhibe dans les CTEV. Il semblerait donc que d'autres systèmes de régulation entrent en jeu. Il est possible que les facteurs de transcription AP-2 $\alpha$  et Sp1 se comportent comme des dominants négatifs suite à des modifications post traductionnelles. Par exemple, Sp1 possède au minimum neuf sites de O-GlcNAcylation et les O-GlcNAcylation de son domaine d'activation (cinq sites) entraînent soit une inhibition soit une activation de son activité transcriptionnelle sans que le mécanisme ne soit connu (Yang et coll, 2001 ; Goldberg et coll, 2002). Récemment une équipe a mis en évidence que l'activation de PPAR $\gamma$  par la rosiglitazone entraînait une diminution de la O-GlcNAcylation des sites du domaine d'activation de Sp1 et aboutissait à une diminution de l'activité transcriptionnelle de ce facteur (Chung et coll, 2008). De plus, il a été montré que les thiazolidinediones pouvaient induire un effet rapide non-génomique. PPAR $\gamma$  activé par un de ses ligands synthétiques peut interagir physiquement avec des protéines kinases et moduler leurs activités. Par exemple dans les cellules endothéliales, le traitement par la rosiglitazone entraîne des effets anti-inflammatoires via une rapide inhibition de la voie ERK 1/2 (Luconi et coll, 2010). L'existence d'une telle régulation dans les trophoblastes est également envisageable, l'inhibition de la voie ERK 1/2 pourrait entraîner la déphosphorylation des facteurs de transcription et inhiber leur activité.

Pour expliquer la régulation opposée de l'hCG par PPAR $\gamma$  dans les deux types de trophoblastes, il faut également considérer les modifications post-traductionnelles propres à PPAR $\gamma$  (pour revue : Van Beekum et coll, 2009) et les différents types de complexes protéiques auxquels il peut être lié. En effet, il a été mis en évidence que PPAR $\gamma$  possédait un site unique de phosphorylation (Ser 112) et deux sites de sumoylation (lys 107 et lys 395). La phosphorylation de PPAR $\gamma$  diminue son activité transcriptionnelle si elle est médiée par ERK 1/2 ou par p38/JNK par contre si elle est médiée par cdk7 elle stimule cette activité. Il serait donc particulièrement intéressant d'étudier l'état de phosphorylation de PPAR $\gamma$  ainsi que la présence de ces trois enzymes dans les trophoblastes villeux et extravilleux afin de déterminer si la phosphorylation de PPAR $\gamma$  peut être à l'origine de la régulation opposée de l'hCG. La sumoylation de PPAR $\gamma$  entraîne une répression de la transcription des gènes cibles de PPAR $\gamma$  par le recrutement de complexes co-répresseurs. Il faudrait vérifier si PPAR $\gamma$  est sumoylé et associé à des complexes répresseurs dans les CTEV et si dans les CTV cette forme de PPAR $\gamma$  est absente ou en plus faible proportion. Il a également été montré que l'hétérodimère PPAR $\gamma$ /RXR activé par ses ligands inhibe la production de TNF $\alpha$  en interagissant avec la voie



NFκB (Uchimura et coll, 2001). Or le TNFα inhibe la transcription de l'hCGβ dans les cytotrophoblastes vilieux (Leisser et coll, 2006). A partir de ces observations, on peut poser l'hypothèse suivante : l'activation du PPARγ stimule l'expression et la sécrétion d'hCG dans les cytotrophoblastes vilieux par une levée de l'inhibition liée au TNFα. Dans les cytotrophoblastes extravilleux, l'hétérodimère PPARγ/RXR inhibe l'hCG suggérant que la voie NFκB/TNFα n'est pas un mécanisme de régulation du PPARγ dans ces cellules. Afin de tester cette hypothèse, nous devons mettre en évidence les niveaux d'expression des facteurs NFκB et TNFα dans les deux types de cytotrophoblastes, analyser en détail les interactions physiques entre PPARγ et NFκB et tester l'effet du TNFα sur l'expression de l'hCG beta de type I ou de type II dans les cytotrophoblastes vilieux et extravilleux. Enfin il a été mis en évidence que PPARγ pouvait en absence de ligand recruter soit des co-répresseurs (N-Cor, SMR) soit des co-activateurs (SRC-1) associés à des complexes multiprotéiques contenant des HDAC (co-répresseur) ou des HAT (co-activateur) et ainsi agir sur l'état de compaction de la chromatine (Guan et coll, 2005). Nous avons mis en évidence dans les trophoblastes vilieux que l'expression basale des hCG beta de type I et II était due en partie à l'activation endogène de PPARγ. En revanche, dans les CTEV nous ignorons si l'expression de l'hCG est en partie réprimée de façon constitutive par PPARγ. Il serait intéressant de répondre à cette question en utilisant l'inhibiteur spécifique T0070907 de PPARγ mais aussi en étudiant l'expression des co-répresseurs et co-activateurs de PPARγ et leurs interactions dans ces cellules.

Le rôle potentiel de HNF4α dans la régulation de l'expression de l'hCG beta type I et type II est également à considérer. En effet, il a été montré que ce facteur de transcription régulait l'expression génique de différente manière. Soit de façon directe en se fixant à l'ADN sous forme d'homodimère (Jiang et coll, 1995), soit de façon indirecte sous forme d'homodimère, ou d'hétérodimère en absence d'ADN, par l'interaction avec d'autres facteurs de transcription. Par exemple l'interaction entre HNF4α et SREBP2, ou HNF1α, ou Sp1 ou Is1 a été mise en évidence dans différents modèles cellulaires (Misawa et coll, 2003 ; Eeckhoutte et coll, 2004 et 2006 ; Takahashi et coll, 2002), cette interaction pouvant avoir des effets positifs ou négatifs sur la transcription des gènes concernés. Récemment, il a également été mis en évidence dans le foie, que HNF4α pouvait agir en synergie avec l'hétérodimère PPARα/RXRα sans se lier directement à l'ADN, mais en agissant comme un coactivateur de PPARα (Chamouton et coll, 2011). Nous mettons en évidence que HNF4α est exprimé (ARN<sub>m</sub> et protéine) dans les trophoblastes au niveau nucléaire. Nous souhaiterions mettre en



évidence le même type d'interaction mais avec l'hétérodimère PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$ . Ce travail a été débuté à la fin de ma thèse et demande beaucoup plus d'approfondissement. Il faudrait mettre en évidence dans les CTV et/ou dans les CTEV une interaction entre PPAR $\gamma$  et HNF4 $\alpha$ , tout d'abord par immunoprécipitation et colocalisation (technologie Duolink), puis plus spécifiquement par CHIP sur les promoteurs de l'hCG beta soit de type I soit de type II.

### **III - L'hCG beta de type I et de type II dans la pré-éclampsie et le retard de croissance intra-utérin**

La pré-éclampsie (PE) est une pathologie obstétricale spécifique à l'espèce humaine. Elle reste encore aujourd'hui difficile à prévenir et à traiter et met en jeu le pronostic vital de la mère et du fœtus. Le RCIU est la 3<sup>ème</sup> cause de mortalité périnatale, son étiologie est assez mal connue et il est comme la pré-éclampsie difficile à prévenir et à traiter. L'origine de ces pathologies, quand elles surviennent précocement dans la grossesse, est une dysfonction placentaire pouvant provenir d'un défaut d'invasion trophoblastique, d'anomalie du développement villositaire ou d'anomalie du développement de la vascularisation utéro-placentaire. La dysfonction aura toujours pour conséquence un RCIU qui sera accompagné en cas de facteurs prédisposant d'un syndrome prééclamptique.

Au cours de ces pathologies obstétricales, il n'est pas clairement établi si l'hCG est augmentée, non modifiée ou diminuée (pour revue : Romoscanu, Ilinca, Thèse de Doctorat de Médecine, 2007, Odibo et coll, 2011 ; Newhouse et coll, 2007). Je me suis intéressée à l'expression placentaire de l'hCG beta de type I et de type II dans ces pathologies. J'ai mis en évidence, sur une petite cohorte d'échantillon, que l'hCG beta de type I était diminuée dans les placentas de RCIU et de pré-éclampsie alors que l'hCG beta de type II est diminuée dans les placentas de RCIU et augmentée dans les placentas de pré-éclampsie. Une récente étude montre que le *turn-over* des trophoblastes villositaires est altéré dans les placentas de RCIU (augmentation de l'apoptose et diminution de la prolifération) ce qui aboutit à un vieillissement prématuré du syncytiotrophoblaste et à une diminution de sa surface (Heazell et



coll, 2011). Nous savons que le syncytiotrophoblaste est responsable de la majorité de la production d'hCG placentaire. L'observation de son vieillissement prématuré et de la diminution de sa surface est cohérente avec une diminution de la production d'hCG, comme nous le mettons en évidence dans les RCIU. Cependant, ces auteurs montrent également que la protéine p53 et ses transcrits sont augmentés dans les placentas de RCIU alors qu'une seconde étude met en évidence que p53 induit directement et spécifiquement l'expression du gène CGB7 (Sohr et coll). Ces deux résultats seraient donc plutôt en faveur d'une augmentation de l'expression de CGB7 (= hCG beta de type I) dans les placentas de RCIU, ce que nous ne mettons pas en évidence. Il est important de noter que ces deux études ont été réalisées dans des conditions très différentes : l'étude sur le RCIU a été menée sur des villosités totales de placentas à terme de RCIU (n =6) et sains (n=6) alors que l'étude de la régulation de CGB7 par p53 a été menée sur des cultures enrichies en cytotrophoblastes du 1<sup>er</sup> trimestre de la grossesse (n=3) et sur deux lignées de carcinome de colon. Nous devons donc vérifier s'il existe une corrélation entre l'expression de p53 et de CGB7 sur notre propre cohorte de RCIU et dans des cultures primaires de trophoblastes villositaires issus de placentas du premier trimestre et de placentas à terme.



## *Conclusion*



L'ensemble de nos travaux permet de mettre en évidence que les trophoblastes vilieux du premier trimestre précoce et du premier trimestre tardif possédaient des caractéristiques propres. Plus précisément, nous avons montré que les trophoblastes vilieux du premier trimestre précoce produisent plus d'hCG beta de type I et de type II, en particulier les trophoblastes vilieux mononucléés, qu'ils fusionnent plus rapidement et qu'ils n'expriment pas le même répertoire de facteurs de transcription que les trophoblastes vilieux du premier trimestre tardif. De plus, nous montrons que ces caractéristiques sont conservées par les trophoblastes vilieux *in vitro* cultivés à 20% d'O<sub>2</sub> pendant environ 48h. Cependant, l'expression des facteurs de transcription ne semble pas aussi bien maintenue, expliquant probablement la conservation éphémère du phénotype *in vitro*.

Nous avons montré que les cytotrophoblastes extravilleux produisent moins d'hCG beta de type I et de type II que les cytotrophoblastes vilieux et que ces deux types d'hCG beta sont différenciellement régulés par le PPAR $\gamma$  dans les deux sous-populations trophoblastiques. Ces deux sous-populations de trophoblastes expriment un panel de facteurs de transcription différents au cours de leur différenciation qui pourrait expliquer cette régulation opposée par PPAR $\gamma$ . Nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux facteurs de transcription de la famille Sp et AP-2. Leur expression augmente au cours de la différenciation selon la voie vilieuse endocrine et extravilleuse invasive. Ils sont plus fortement exprimés dans les trophoblastes vilieux par rapport aux trophoblastes extravilleux. Toutefois nous n'avons pas encore pu mettre en évidence de lien avec la régulation opposée de l'hCG par PPAR $\gamma$ .

Finalement, nous avons mis en évidence une expression anormale des hCG beta de type I et II dans les placentas de pré-éclampsie ou de RCIU. L'expression des hCG beta de type I et II est diminuée dans les RCIU alors que dans la pré-éclampsie nous mettons en évidence une diminution de l'hCG de type I uniquement et une augmentation de l'hCG de type II. Ces résultats doivent être confirmés sur une plus grande cohorte et approfondis mais on peut espérer qu'une telle étude permette à l'avenir de diagnostiquer précocément un risque de RCIU.



## Liste de publications et de communications

### Publications :

**Expression and regulation by PPARgamma of hCG alpha- and beta-subunits: comparison between villous and invasive extravillous trophoblastic cells.**

Handschuh K, Guibourdenche J, Cocquebert M, Tsatsaris V, Vidaud M, Evain-Brion D, Fournier T.

Placenta. 2009 Dec ; 30(12):1016-22.

**Homeobox gene distal-less 3 is expressed in proliferating and differentiating cells of the human placenta.**

Chui A, Pathirage NA, Johnson B, Cocquebert M, Fournier T, Evain-Brion D, Roald B, Manuelpillai U, Brennecke SP, Kalionis B, Murthi P.

Placenta. 2010 Aug ; 31(8):691-7.

**Homeobox gene Distal-Less 3 is a regulator of villous cytotrophoblast differentiation and its expression is increased in human idiopathic foetal growth restriction.**

Chui A, Tay C, Cocquebert M, Sheehan P, Pathirage NA, Donath S, Fournier T, Badet J, Evain-Brion D, Brennecke SP, Kalionis B, Murthi P.

J Mol Med (Berl). 2011 Nov 24. [Epub ahead of print]

**Review: Human trophoblast fusion and differentiation: Lessons from trisomy 21**

G. Pidoux, P. Gerbaud, M. Cocquebert, N. Segond, J. Badet, T. Fournier, J. Guibourdenche, D. Evain-Brion

Placenta 33, Supplement A, Trophoblast Research, Vol. 26 (2012) S81eS86



## Communications :

Communication orale au congrès de l'IFPA (International Federation of Placenta Associations), le 10-13 septembre 2008, en Autriche (Seggau).

**« Expression and regulation by the nuclear receptor PPAR $\gamma$  of the alpha and beta subunits of human chorionic gonadotropin : comparative study between villous and invasive extravillous trophoblastic cells. »**

Mélanie Cocquebert, Karen Handschuh, Jean Guibourdenche, Vassilis Tsatsaris, Daniele Evain-Brion, and Thierry Fournier.

Communication sous forme d'affiche au congrès de l'IFPA, le 19-22 octobre 2010, au Chili (Santiago).

**« Comparative expression of hCG in villous trophoblast from early and late first trimester of pregnancy »**

Mélanie Cocquebert, Padma Murthi, Jean Guibourdenche, Nadine Segond, Audrey Chissey, Vassilis Tsatsaris, Daniele Evain-Brion, and Thierry Fournier.

**« Homeobox genes are differentially expressed in primary villous and extravillous trophoblast cell lineages during early pregnancy. »**

P Murthi, NA Pathirage, RJ Keogh, M Cocquebert, N Segond, SP Brennecke, T Fournier, D Evain-Brion and B Kalionis.



## *Bibliographie*



- Adler R. R., Ng A. K., Rote N. S. (1995), Monoclonal antiphosphatidylserine antibody inhibits intercellular fusion of the choriocarcinoma line, *JAR. Biol Reprod*, **53**, 4, pp. 905-10.
- Al-Lamki R. S., Skepper J. N., Burton G. J. (1999), Are human placental bed giant cells merely aggregates of small mononuclear trophoblast cells? An ultrastructural and immunocytochemical study. *Hum Reprod*, **14**, 2, pp. 496-504.
- Al-Shali K., Cao H., Knoers N., *et al.* (2004), A single-base mutation in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma4 promoter associated with altered in vitro expression and partial lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab*, **89**, 11, pp. 5655-60.
- Albanese C., Kay T. W., Troccoli N. M., *et al.* (1991), Novel cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element in the human chorionic gonadotropin beta-subunit gene. *Mol Endocrinol*, **5**, 5, pp. 693-702.
- Alders M., Hodges M., Hadjantonakis A. K., *et al.* (1997), The human Achaete-Scute homologue 2 (ASCL2, HASH2) maps to chromosome 11p15.5, close to IGF2 and is expressed in extravillous trophoblasts. *Hum Mol Genet*, **6**, 6, pp. 859-67.
- Alfthan H., Haglund C., Dabek J., *et al.* (1992), Concentrations of human choriogonadotropin, its beta-subunit, and the core fragment of the beta-subunit in serum and urine of men and nonpregnant women. *Clin Chem*, **38**, 10, pp. 1981-7.
- Alfthan H., Stenman U. H. (1990), Pregnancy serum contains the beta-core fragment of human choriogonadotropin. *J Clin Endocrinol Metab*, **70**, 3, pp. 783-7.
- Alsat E., Guibourdenche J., Couturier A., *et al.* (1998), Physiological role of human placental growth hormone. *Mol Cell Endocrinol*, **140**, 1-2, pp. 121-7.
- Alsat E., Haziza J., Evain-Brion D. (1993), Increase in epidermal growth factor and its messenger ribonucleic acid levels with differentiation of human of human trophoblast cells in culture. *J Cell Physiol*, **154**, pp. 122-128.
- Alsat E., Wyplosz P., Malassine A., *et al.* (1996), Hypoxia impairs cell fusion and differentiation process in human cytotrophoblast, in vitro. *J Cell Physiol*, **168**, 2, pp. 346-53.
- Ambrus G., Rao C. V. (1994), Novel regulation of pregnant human myometrial smooth muscle cell gap junctions by human chorionic gonadotropin. *Endocrinology*, **135**, 6, pp. 2772-9.
- Andersen B., Kennedy G. C., Nilson J. H. (1990), A cis-acting element located between the cAMP response elements and CCAAT box augments cell-specific expression of the glycoprotein hormone alpha subunit gene. *J Biol Chem*, **265**, 35, pp. 21874-80.
- Andersen B., Milsted A., Kennedy G., *et al.* (1988), Cyclic AMP and phorbol esters interact synergistically to regulate expression of the chorionic gonadotropin genes. *J Biol Chem*, **263**, 30, pp. 15578-83.
- Anteby E. Y., Greenfield C., Natanson-Yaron S., *et al.* (2004), Vascular endothelial growth factor, epidermal growth factor and fibroblast growth factor-4 and -10 stimulate trophoblast plasminogen activator system and metalloproteinase-9. *Mol Hum Reprod*, **10**, 4, pp. 229-35.
- Aplin J. D. (1993), Expression of integrin alpha 6 beta 4 in human trophoblast and its loss from extravillous cells. *Placenta*, **14**, 2, pp. 203-15.

Aplin J. D., Haigh T., Jones C. J., *et al.* (1999), Development of cytotrophoblast columns from explanted first-trimester human placental villi: role of fibronectin and integrin alpha5beta1. *Biol Reprod*, **60**, 4, pp. 828-38.

Aplin J. D., Straszewski-Chavez S. L., Kalionis B., *et al.* (2006), Trophoblast differentiation: progenitor cells, fusion and migration -- a workshop report. *Placenta*, **27 Suppl A**, pp. S141-3.

Apparailly F., Combarous Y. (1994), Role of sialic acid residues in the in vitro superactivity of human choriogonadotropin (hCG) in rat Leydig cells. *Biochim Biophys Acta*, **1224**, 3, pp. 559-65.

Apps R., Murphy S. P., Fernando R., *et al.* (2009), Human leucocyte antigen (HLA) expression of primary trophoblast cells and placental cell lines, determined using single antigen beads to characterize allotype specificities of anti-HLA antibodies. *Immunology*, **127**, 1, pp. 26-39.

Ascoli M., Fanelli F., Segaloff D. L. (2002), The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective. *Endocr Rev*, **23**, 2, pp. 141-74.

Auwerx J., Staels B. (1998), Leptin. *Lancet*, **351**, 9104, pp. 737-42.

Baczyk D., Drewlo S., Proctor L., *et al.* (2009), Glial cell missing-1 transcription factor is required for the differentiation of the human trophoblast. *Cell Death Differ*, **16**, 5, pp. 719-27.

Baczyk D., Satkunaratanam A., Nait-Oumesmar B., *et al.* (2004), Complex patterns of GCM1 mRNA and protein in villous and extravillous trophoblast cells of the human placenta. *Placenta*, **25**, 6, pp. 553-9.

Bahl O. P., Carlsen R. B., Bellisario R., *et al.* (1972), Human chorionic gonadotropin: amino acid sequence of the alpha and beta subunits. *Biochem Biophys Res Commun*, **48**, 2, pp. 416-22.

Bainbridge S. A., Farley A. E., McLaughlin B. E., *et al.* (2002), Carbon monoxide decreases perfusion pressure in isolated human placenta. *Placenta*, **23**, 8-9, pp. 563-9.

Barak Y., Nelson M., Ong E. S., *et al.* (1999), PPAR $\gamma$  is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell*, **4**, pp. 585-595.

Barbour L. A., Shao J., Qiao L., *et al.* (2004), Human placental growth hormone increases expression of the p85 regulatory unit of phosphatidylinositol 3-kinase and triggers severe insulin resistance in skeletal muscle. *Endocrinology*, **145**, 3, pp. 1144-50.

Bellet D., Lazar V., Bieche I., *et al.* (1997), Malignant transformation of nontrophoblastic cells is associated with the expression of chorionic gonadotropin beta genes normally transcribed in trophoblastic cells. *Cancer Res*, **57**, 3, pp. 516-23.

Benaitreau D., Dos Santos E., Leneveu M. C., *et al.* (2010), Effects of adiponectin on human trophoblast invasion. *J Endocrinol*, **207**, 1, pp. 45-53.

Benirschke K., Kaufmann P. (2000). Nonvillous part and trophoblast invasion. *In: Pathology of the human placenta. Benirschke K., Kaufmann P. eds., Springer-Verlag, New York, pp. 171-280.*

Benirschke K., Kaufmann, P., Baergen, R. (2006). Architecture of normal villous trees. *In: Pathology of the Human Placenta. Benirschke K., Kaufmann, P., Baergen, R. ed.*, Springer, New York, pp. 160–164.

Berndt S., Blacher S., Perrier d'Hauterive S., *et al.* (2009), Chorionic gonadotropin stimulation of angiogenesis and pericyte recruitment. *J Clin Endocrinol Metab*, **94**, 11, pp. 4567-74.

Berndt S., Perrier d'Hauterive S., Blacher S., *et al.* (2006), Angiogenic activity of human chorionic gonadotropin through LH receptor activation on endothelial and epithelial cells of the endometrium. *FASEB J*, **20**, 14, pp. 2630-2.

Bidart J. M., Baudin E., Troalen F., *et al.* (1997), Eutopic and ectopic production of glycoprotein hormones alpha and beta subunits. *Ann Endocrinol (Paris)*, **58**, 2, pp. 125-8.

Bidart J. M., Puisieux A., Troalen F., *et al.* (1988), Characterization of a cleavage product in the human choriogonadotropin beta-subunit. *Biochem Biophys Res Commun*, **154**, 2, pp. 626-32.

Bigbee W. L., Day R. D., Grant S. G., *et al.* (1999), Impact of maternal lifestyle factors on newborn HPRT mutant frequencies and molecular spectrum--initial results from the Prenatal Exposures and Preeclampsia Prevention (PEPP) Study. *Mutat Res*, **431**, 2, pp. 279-89.

Birchmeier W. (1995), E-cadherin as a tumor (invasion) suppressor gene. *Bioessays*, **17**, 2, pp. 97-9.

Birken S. (2005), Specific measurement of o-linked core 2 sugar-containing isoforms of hyperglycosylated human chorionic gonadotropin by antibody b152. *Tumour Biol*, **26**, 3, pp. 131-41.

Birken S., Armstrong E. G., Kolks M. A., *et al.* (1988), Structure of the human chorionic gonadotropin beta-subunit fragment from pregnancy urine. *Endocrinology*, **123**, 1, pp. 572-83.

Birken S., Gawinowicz M. A., Kardana A., *et al.* (1991), The heterogeneity of human chorionic gonadotropin (hCG). II. Characteristics and origins of nicks in hCG reference standards. *Endocrinology*, **129**, 3, pp. 1551-8.

Birken S., Krichevsky A., O'Connor J., *et al.* (1999), Development and characterization of antibodies to a nicked and hyperglycosylated form of hCG from a choriocarcinoma patient: generation of antibodies that differentiate between pregnancy hCG and choriocarcinoma hCG. *Endocrine*, **10**, 2, pp. 137-44.

Bischof P., Haenggeli L., Campana A. (1995), Effect of leukemia inhibitory factor on human cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway. *Am J Reprod Immunol*, **34**, 4, pp. 225-30.

Bischof P., Meisser A., Campana A. (1998), Involvement of trophoblast in embryo implantation: regulation by paracrine factors. *J Reprod Immunol*, **39**, 1-2, pp. 167-77.

Bischof P., Meisser A., Campana A. (2000a), Paracrine and autocrine regulators of trophoblast invasion--a review. *Placenta*, **21 Suppl A**, pp. S55-60.

Bischof P., Campana A. (2000b), Molecular mediators of implantation. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, **14**, 5, pp. 801-14.

Bjorn S., Hastrup N., Larsen J., *et al.* (2000), Messenger RNA for membrane-type 2 matrix metalloproteinase, MT2-MMP, is expressed in human placenta of first trimester. *Placenta*, **21**, pp. 170-176.

Black S., Kadyrov M., Kaufmann P., *et al.* (2004), Syncytial fusion of human trophoblast depends on caspase 8. *Cell Death Differ*, **11**, 1, pp. 90-8.

Blaise S., de Parseval N., Benit L., *et al.* (2003), Genomewide screening for fusogenic human endogenous retrovirus envelopes identifies syncytin 2, a gene conserved on primate evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 22, pp. 13013-8.

Blithe D. L. (1990), N-linked oligosaccharides on free alpha interfere with its ability to combine with human chorionic gonadotropin-beta subunit. *J Biol Chem*, **265**, 35, pp. 21951-6.

Blithe D. L., Nisula B. C. (1985), Variations in the oligosaccharides on free and combined alpha-subunits of human choriogonadotropin in pregnancy. *Endocrinology*, **117**, 5, pp. 2218-28.

Bo M., Boime I. (1992), Identification of the transcriptionally active genes of the chorionic gonadotropin beta gene cluster in vivo. *J Biol Chem*, **267**, 5, pp. 3179-84.

Bonduelle M. L., Dodd R., Liebaers I., *et al.* (1988), Chorionic gonadotrophin-beta mRNA, a trophoblast marker, is expressed in human 8-cell embryos derived from tripronucleate zygotes. *Hum Reprod*, **3**, 7, pp. 909-14.

Boudjelal M., Taneja R., Matsubara S., *et al.* (1997), Overexpression of Stra13, a novel retinoic acid-inducible gene of the basic helix-loop-helix family, inhibits mesodermal and promotes neuronal differentiation of P19 cells. *Genes Dev*, **11**, 16, pp. 2052-65.

Boyd J. D., Hamilton W. J. (1967), Development and structure of the human placenta from the end of the 3rd month of gestation. *J Obstet Gynaecol Br Commonw*, **74**, 2, pp. 161-226.

Brosens I., Robertson W. B., Dixon H. G. (1967), The physiological response of the vessels of the placental bed to normal pregnancy. *J Pathol Bacteriol*, **93**, 2, pp. 569-79.

Brouillet S., Hoffmann P., Benharouga M., *et al.* (2010), Molecular characterization of EG-VEGF-mediated angiogenesis: differential effects on microvascular and macrovascular endothelial cells. *Mol Biol Cell*, **21**, 16, pp. 2832-43.

Brouillet S., Hoffmann P., Chauvet S., *et al.* (2011), Revisiting the role of hCG: new regulation of the angiogenic factor EG-VEGF and its receptors. *Cell Mol Life Sci*, pp.

Burrows T. D., King A., Loke Y. W. (1993), Expression of integrins by human trophoblast and differential adhesion to laminin or fibronectin. *Hum Reprod*, **8**, 3, pp. 475-84.

Burrows T. D., King A., Loke Y. W. (1994), Expression of adhesion molecules by endovascular trophoblast and decidual endothelial cells: implications for vascular invasion during implantation. *Placenta*, **15**, 1, pp. 21-33.

Burton G. J. (2009), Oxygen, the Janus gas; its effects on human placental development and function. *J Anat*, **215**, 1, pp. 27-35.

- Burton G. J., Jauniaux E., Charnock-Jones D. S. (2007), Human early placental development: potential roles of the endometrial glands. *Placenta*, **28 Suppl A**, pp. S64-9.
- Cameo P., Bischof P., Calvo J. C. (2003), Effect of leptin on progesterone, human chorionic gonadotropin, and interleukin-6 secretion by human term trophoblast cells in culture. *Biol Reprod*, **68**, 2, pp. 472-7.
- Cameo P., Srisuparp S., Strakova Z., *et al.* (2004), Chorionic gonadotropin and uterine dialogue in the primate. *Reprod Biol Endocrinol*, **2**, pp. 50.
- Caniggia I., Grisaru-Gravnosky S., Kuliszewsky M., *et al.* (1999), Inhibition of TGF-beta 3 restores the invasive capability of extravillous trophoblasts in preeclamptic pregnancies. *J Clin Invest*, **103**, 12, pp. 1641-50.
- Caniggia I., Mostachfi H., Winter J., *et al.* (2000), Hypoxia-inducible factor-1 mediates the biological effects of oxygen on human trophoblast differentiation through TGFbeta(3). *J Clin Invest*, **105**, 5, pp. 577-87.
- Cariappa R., Heath-Monnig E., Smith C. H. (2003), Isoforms of amino acid transporters in placental syncytiotrophoblast: plasma membrane localization and potential role in maternal/fetal transport. *Placenta*, **24**, 7, pp. 713-26.
- Cartwright J. E., Kenny L. C., Dash P. R., *et al.* (2002), Trophoblast invasion of spiral arteries: a novel in vitro model. *Placenta*, **23**, 2-3, pp. 232-5.
- Castellucci M., De Matteis R., Meisser A., *et al.* (2000), Leptin modulates extracellular matrix molecules and metalloproteinases: possible implications for trophoblast invasion. *Mol Hum Reprod*, **6**, 10, pp. 951-8.
- Cervar-Zivkovic M., Dieber-Rotheneder M., Barth S., *et al.* (2011), Endothelin-1 stimulates proliferation of first-trimester trophoblasts via the A- and B-type receptor and invasion via the B-type receptor. *J Clin Endocrinol Metab*, **96**, 11, pp. 3408-15.
- Cervar M., Kainer F., Jones C. J., *et al.* (1996), Altered release of endothelin-1,2 and thromboxane B2 from trophoblastic cells in pre-eclampsia. *Eur J Clin Invest*, **26**, 1, pp. 30-7.
- Chamouton J., Hansmannel F., Bonzo J. A., *et al.* (2010), The Peroxisomal 3-keto-acyl-CoA thiolase B Gene Expression Is under the Dual Control of PPARalpha and HNF4alpha in the Liver. *PPAR Res*, **2010**, pp. 352957.
- Chappell L. C., Seed P. T., Briley A. L., *et al.* (1999), Effect of antioxidants on the occurrence of pre-eclampsia in women at increased risk: a randomised trial. *Lancet*, **354**, 9181, pp. 810-6.
- Chardonens D., Cameo P., Aubert M. L., *et al.* (1999), Modulation of human cytotrophoblastic leptin secretion by interleukin-1alpha and 17beta-oestradiol and its effect on HCG secretion. *Mol Hum Reprod*, **5**, 11, pp. 1077-82.
- Cheng Y. H., Aronow B. J., Hossain S., *et al.* (2004), Critical role for transcription factor AP-2alpha in human trophoblast differentiation. *Physiol Genomics*, **18**, 1, pp. 99-107.
- Chennakesava C. S., Di Santo S., Ziemiecki A., *et al.* (2006), Differential expression of the receptor tyrosine kinase EphB4 and its ligand Ephrin-B2 during human placental development. *Placenta*, **27**, 9-10, pp. 959-67.

- Chinetti-Gbaguidi G., Fruchart J. C., Staels B. (2005), Pleiotropic effects of fibrates. *Curr Atheroscler Rep*, **7**, 5, pp. 396-401.
- Choy M. Y., Manyonda I. T. (1998), The phagocytic activity of human first trimester extravillous trophoblast. *Hum Reprod*, **13**, 10, pp. 2941-9.
- Chui A., Evseenko D. A., Brennecke S. P., *et al.* (2011), Homeobox gene Distal-less 3 (DLX3) is a regulator of villous cytotrophoblast differentiation. *Placenta*, **32**, 10, pp. 745-51.
- Chui A., Pathirage N. A., Johnson B., *et al.* (2010), Homeobox gene distal-less 3 is expressed in proliferating and differentiating cells of the human placenta. *Placenta*, **31**, 8, pp. 691-7.
- Chung S. S., Kim J. H., Park H. S., *et al.* (2008), Activation of PPARgamma negatively regulates O-GlcNAcylation of Sp1. *Biochem Biophys Res Commun*, **372**, 4, pp. 713-8.
- Church H. J., Vicovac L. M., Williams J. D., *et al.* (1996), Laminins 2 and 4 are expressed by human decidual cells. *Lab Invest*, **74**, 1, pp. 21-32.
- Clark D. E., Smith S. K., Licence D., *et al.* (1998), Comparison of expression patterns for placenta growth factor, vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF-B and VEGF-C in the human placenta throughout gestation. *J Endocrinol*, **159**, 3, pp. 459-67.
- Cohen M., Meisser A., Bischof P. (2006), Metalloproteinases and human placental invasiveness. *Placenta*, **27**, 8, pp. 783-93.
- Cohen M., Meisser A., Haenggeli L., *et al.* (2007), Status of p53 in first-trimester cytotrophoblastic cells. *Mol Hum Reprod*, **13**, 2, pp. 111-6.
- Colbern G. T., Chiang M. H., Main E. K. (1994), Expression of the nonclassic histocompatibility antigen HLA-G by preeclamptic placenta. *Am J Obstet Gynecol*, **170**, 5 Pt 1, pp. 1244-50.
- Cole L. A. (1987), The O-linked oligosaccharide structures are strikingly different on pregnancy and choriocarcinoma HCG. *J Clin Endocrinol Metab*, **65**, 4, pp. 811-3.
- Cole L. A. (1997), Immunoassay of human chorionic gonadotropin, its free subunits, and metabolites. *Clin Chem*, **43**, 12, pp. 2233-43.
- Cole L. A. (2009), New discoveries on the biology and detection of human chorionic gonadotropin. *Reprod Biol Endocrinol*, **7**, pp. 8.
- Cole L. A., Kardana A., Andrade-Gordon P., *et al.* (1991), The heterogeneity of human chorionic gonadotropin (hCG). III. The occurrence and biological and immunological activities of nicked hCG. *Endocrinology*, **129**, 3, pp. 1559-67.
- Cole L. A., Kardana A., Park S. Y., *et al.* (1993), The deactivation of hCG by nicking and dissociation. *J Clin Endocrinol Metab*, **76**, 3, pp. 704-10.
- Corbetta S., Bulfamante G., Cortelazzi D., *et al.* (2005), Adiponectin expression in human fetal tissues during mid- and late gestation. *J Clin Endocrinol Metab*, **90**, 4, pp. 2397-402.
- Coutifaris C., Kao L. C., Sehdev H. M., *et al.* (1991), E-cadherin expression during the differentiation of human trophoblasts. *Development*, **113**, 3, pp. 767-77.

- Cowden Dahl K. D., Robertson S. E., Weaver V. M., *et al.* (2005), Hypoxia-inducible factor regulates alphavbeta3 integrin cell surface expression. *Mol Biol Cell*, **16**, 4, pp. 1901-12.
- Craven C. M., Morgan T., Ward K. (1998), Decidual spiral artery remodelling begins before cellular interaction with cytotrophoblasts. *Placenta*, **19**, 4, pp. 241-52.
- Crocker I. P., Strachan B. K., Lash G. E., *et al.* (2001), Vascular endothelial growth factor but not placental growth factor promotes trophoblast syncytialization in vitro. *J Soc Gynecol Investig*, **8**, 6, pp. 341-6.
- Cronier L., Bastide B., Defamie N., *et al.* (2001), Involvement of gap junctional communication and connexin expression in trophoblast differentiation of the human placenta. *Histol Histopathol*, **16**, 1, pp. 285-95.
- Cronier L., Bastide B., Herve J. C., *et al.* (1994), Gap junctional communication during human trophoblast differentiation: influence of human chorionic gonadotropin. *Endocrinology*, **135**, 1, pp. 402-8.
- Cronier L., Dubut A., Guibourdenche J., *et al.* (1999b), Effects of endothelin on villous trophoblast differentiation and free intracellular calcium. *Trophoblast Research*, **13**, pp. 69-86.
- Cronier L., Guibourdenche J., Niger C., *et al.* (1999a), Oestradiol stimulates morphological and functional differentiation of human villous cytotrophoblast. *Placenta*, **20**, 8, pp. 669-76.
- Cronier L., Herve J. C., Deleze J., *et al.* (1997), Regulation of gap junctional communication during human trophoblast differentiation. *Microsc Res Tech*, **38**, 1-2, pp. 21-8.
- Currie A. J., Fraser H. M., Sharpe R. M. (1981), Human placental receptors for luteinizing hormone releasing hormone. *Biochem Biophys Res Commun*, **99**, 1, pp. 332-8.
- Damsky C. H., Librach C., Lim K. H., *et al.* (1994), Integrin switching regulates normal trophoblast invasion. *Development*, **120**, 12, pp. 3657-66.
- Damsky C. H., M. L. Fitzgerald, and S. J. Fisher (1992), Distribution patterns of extracellular matrix components and adhesion receptors are intricately modulated during first trimester cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway, in vivo. *J Clin Invest*, **89**, pp. 210-22.
- Daoud G., Amyot M., Rassart E., *et al.* (2005), ERK1/2 and p38 regulate trophoblasts differentiation in human term placenta. *J Physiol*, **566**, Pt 2, pp. 409-23.
- Delerive P., De Bosscher K., Besnard S., *et al.* (1999), Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J Biol Chem*, **274**, 45, pp. 32048-54.
- Demir R., Kayisli U. A., Cayli S., *et al.* (2006), Sequential steps during vasculogenesis and angiogenesis in the very early human placenta. *Placenta*, **27**, 6-7, pp. 535-9.
- Devchand P. R., Keller H., Peters J. M., *et al.* (1996), The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature*, **384**, 6604, pp. 39-43.

Diaz-Cueto L., Barrios-de-Tomasi J., Timossi C., *et al.* (1996), More in-vitro bioactive, shorter-lived human chorionic gonadotrophin charge isoforms increase at the end of the first and during the third trimesters of gestation. *Mol Hum Reprod*, **2**, 9, pp. 643-50.

Dong M., Ding G., Zhou J., *et al.* (2008), The effect of trophoblasts on T lymphocytes: possible regulatory effector molecules--a proteomic analysis. *Cell Physiol Biochem*, **21**, 5-6, pp. 463-72.

Dongol B., Shah Y., Kim I., *et al.* (2007), The acyl-CoA thioesterase I is regulated by PPARalpha and HNF4alpha via a distal response element in the promoter. *J Lipid Res*, **48**, 8, pp. 1781-91.

Douglas G. C., King B. F. (1990), Differentiation of human trophoblast cells in vitro as revealed by immunocytochemical staining of desmoplakin and nuclei. *J Cell Sci*, **96 ( Pt 1)**, pp. 131-41.

Duley L., Henderson-Smart D. J., Knight M., *et al.* (2004), Antiplatelet agents for preventing pre-eclampsia and its complications. *Cochrane Database Syst Rev*, 1, pp. CD004659.

Eeckhoutte J., Briche I., Kurowska M., *et al.* (2006), Hepatocyte nuclear factor 4 alpha ligand binding and F domains mediate interaction and transcriptional synergy with the pancreatic islet LIM HD transcription factor Isl1. *J Mol Biol*, **364**, 4, pp. 567-81.

Eeckhoutte J., Formstecher P., Laine B. (2004), Hepatocyte nuclear factor 4alpha enhances the hepatocyte nuclear factor 1alpha-mediated activation of transcription. *Nucleic Acids Res*, **32**, 8, pp. 2586-93.

Egeblad M., Werb Z. (2002), New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*, **2**, 3, pp. 161-74.

Ellery P. M., Cindrova-Davies T., Jauniaux E., *et al.* (2009), Evidence for transcriptional activity in the syncytiotrophoblast of the human placenta. *Placenta*, **30**, 4, pp. 329-34.

Esnault C., Priet S., Ribet D., *et al.* (2008), A placenta-specific receptor for the fusogenic, endogenous retrovirus-derived, human syncytin-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 45, pp. 17532-7.

Evans R. M. (1988), The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, **240**, 4854, pp. 889-95.

Facchini L. M., Penn L. Z. (1998), The molecular role of Myc in growth and transformation: recent discoveries lead to new insights. *FASEB J*, **12**, 9, pp. 633-51.

Fajas L., Auboeuf D., Raspe E., *et al.* (1997), The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *J Biol Chem*, **272**, 30, pp. 18779-89.

Feinman M. A., Kliman H. J., Caltabiano S., *et al.* (1986), 8-Bromo-3',5'-adenosine monophosphate stimulates the endocrine activity of human cytotrophoblasts in culture. *J Clin Endocrinol Metab*, **63**, 5, pp. 1211-7.

Feng H. C., Choy M. Y., Deng W., *et al.* (2005), Establishment and characterization of a human first-trimester extravillous trophoblast cell line (TEV-1). *J Soc Gynecol Investig*, **12**, 4, pp. e21-32.

Ferretti C., Bruni L., Dangles-Marie V., *et al.* (2007), Molecular circuits shared by placental and cancer cells, and their implications in the proliferative, invasive and migratory capacities of trophoblasts. *Hum Reprod Update*, **13**, 2, pp. 121-41.

Fiddes J. C., Goodman H. M. (1981), The gene encoding the common alpha subunit of the four human glycoprotein hormones. *J Mol Appl Genet*, **1**, 1, pp. 3-18.

Firulli A. B. (2003), A HANDful of questions: the molecular biology of the heart and neural crest derivatives (HAND)-subclass of basic helix-loop-helix transcription factors. *Gene*, **312**, pp. 27-40.

Fisher S. J., Damsky C. H. (1993), Human cytotrophoblast invasion. *Semin Cell Biol*, **4**, 3, pp. 183-8.

Fogarty N. M., Mayhew T. M., Ferguson-Smith A. C., *et al.* (2011), A quantitative analysis of transcriptionally active syncytiotrophoblast nuclei across human gestation. *J Anat*, **219**, 5, pp. 601-10.

Forman B. M., Tontonoz P., Chen J., *et al.* (1995), 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell*, **83**, 5, pp. 803-12.

Fournier T., Handschuh K., Tsatsaris V., *et al.* (2008), Role of nuclear receptors and their ligands in human trophoblast invasion. *J Reprod Immunol*, **77**, 2, pp. 161-70.

Fournier T., Tsatsaris V., Handschuh K., *et al.* (2007), PPARs and the placenta. *Placenta*, **28**, 2-3, pp. 65-76.

Frank H. G., Genbacev O., Blaschitz A., *et al.* (2000), Cell culture models of human trophoblast--primary culture of trophoblast--a workshop report. *Placenta*, **21 Suppl A**, pp. S120-2.

Frankenne F., Closset J., Gomez F., *et al.* (1988), The physiology of growth hormones (GHs) in pregnant women and partial characterization of the placental GH variant. *J Clin Endocrinol Metab*, **66**, 6, pp. 1171-80.

Frankenne F., Scippo M. L., Van Beeumen J., *et al.* (1990), Identification of placental human growth hormone as the growth hormone-V gene expression product. *J Clin Endocrinol Metab*, **71**, 1, pp. 15-8.

Frendo J. L., Cronier L., Bertin G., *et al.* (2003), Involvement of connexin 43 in human trophoblast cell fusion and differentiation. *J Cell Sci*, **116**, Pt 16, pp. 3413-21.

Frendo J. L., Cronier L., Bertin G., *et al.* (2003a), Involvement of connexin 43 in human trophoblast cell fusion and differentiation. *J Cell Sci*, **116**, Pt 16, pp. 3413-21.

Frendo J. L., Olivier D., Cheynet V., *et al.* (2003), Direct involvement of HERV-W Env glycoprotein in human trophoblast cell fusion and differentiation. *Mol Cell Biol*, **23**, 10, pp. 3566-74.

Frendo J. L., Olivier D., Cheynet V., *et al.* (2003b), Direct involvement of HERV-W Env glycoprotein in human trophoblast cell fusion and differentiation. *Mol Cell Biol*, **23**, 10, pp. 3566-74.

- Frendo J. L., Therond P., Bird T., *et al.* (2001), Overexpression of copper zinc superoxide dismutase impairs human trophoblast cell fusion and differentiation. *Endocrinology*, **142**, 8, pp. 3638-48.
- Frendo J. L., Therond P., Guibourdenche J., *et al.* (2000), Modulation of copper/zinc superoxide dismutase expression and activity with in vitro differentiation of human villous cytotrophoblasts. *Placenta*, **21**, 8, pp. 773-81.
- Fuh V. L., Burrin J. M., Jameson J. L. (1989), Cyclic AMP (cAMP) effects on chorionic gonadotropin gene transcription and mRNA stability: labile proteins mediate basal expression whereas stable proteins mediate cAMP stimulation. *Mol Endocrinol*, **3**, 7, pp. 1148-56.
- Gaber L. W., Spargo B. H., Lindheimer M. D. (1994), Renal pathology in pre-eclampsia. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol*, **8**, 2, pp. 443-68.
- Garcia-Lloret M. I., Morrish D. W., Wegmann T. G., *et al.* (1994), Demonstration of functional cytokine-placental interactions: CSF-1 and GM-CSF stimulate human cytotrophoblast differentiation and peptide hormone secretion. *Exp Cell Res*, **214**, 1, pp. 46-54.
- Gauster M., Berghold V. M., Moser G., *et al.* (2011), Fibulin-5 expression in the human placenta. *Histochem Cell Biol*, **135**, 2, pp. 203-13.
- Gauster M., Siwetz M., Orendi K., *et al.* (2010), Caspases rather than calpains mediate remodelling of the fodrin skeleton during human placental trophoblast fusion. *Cell Death Differ*, **17**, 2, pp. 336-45.
- Genbacev O., Joslin R., Damsky C. H., *et al.* (1996), Hypoxia alters early gestation human cytotrophoblast differentiation/invasion in vitro and models the placental defects that occur in preeclampsia. *J Clin Invest*, **97**, 2, pp. 540-50.
- Genbacev O., McMaster M. T., Fisher S. J. (2000), A repertoire of cell cycle regulators whose expression is coordinated with human cytotrophoblast differentiation. *Am J Pathol*, **157**, 4, pp. 1337-51.
- Genbacev O., Zhou Y., Ludlow J. W., *et al.* (1997), Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science*, **277**, 5332, pp. 1669-72.
- Genolet R., Wahli W., Michalik L. (2004), PPARs as drug targets to modulate inflammatory responses? *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, **3**, 4, pp. 361-75.
- Ghosh D., Ezashi T., Ostrowski M. C., *et al.* (2003), A central role for Ets-2 in the transcriptional regulation and cyclic adenosine 5'-monophosphate responsiveness of the human chorionic gonadotropin-beta subunit gene. *Mol Endocrinol*, **17**, 1, pp. 11-26.
- Goldberg G. I., Strongin A., Collier I. E., *et al.* (1992), Interaction of 92-kDa type IV collagenase with the tissue inhibitor of metalloproteinases prevents dimerization, complex formation with interstitial collagenase, and activation of the proenzyme with stromelysin. *J Biol Chem*, **267**, 7, pp. 4583-91.
- Goldberg H. J., Whiteside C. I., Fantus I. G. (2002), The hexosamine pathway regulates the plasminogen activator inhibitor-1 gene promoter and Sp1 transcriptional activation through protein kinase C-beta I and -delta. *J Biol Chem*, **277**, 37, pp. 33833-41.

Goldman-Wohl D. S., Ariel I., Greenfield C., *et al.* (2000), Lack of human leukocyte antigen-G expression in extravillous trophoblasts is associated with pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod*, **6**, 1, pp. 88-95.

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**, 1, pp. 13-22.

Graham C. H., Hawley T. S., Hawley R. G., *et al.* (1993), Establishment and characterization of first trimester human trophoblast cells with extended lifespan. *Exp Cell Res*, **206**, 2, pp. 204-11.

Graham C. H., McCrae K. R. (1996), Altered expression of gelatinase and surface-associated plasminogen activator activity by trophoblast cells isolated from placentas of preeclamptic patients. *Am J Obstet Gynecol*, **175**, 3 Pt 1, pp. 555-62.

Green S., Chambon P. (1988), Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation. *Trends Genet*, **4**, 11, pp. 309-14.

Greene M. E., Blumberg B., McBride O. W., *et al.* (1995), Isolation of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma cDNA: expression in hematopoietic cells and chromosomal mapping. *Gene Expr*, **4**, 4-5, pp. 281-99.

Guan H. P., Ishizuka T., Chui P. C., *et al.* (2005), Corepressors selectively control the transcriptional activity of PPARgamma in adipocytes. *Genes Dev*, **19**, 4, pp. 453-61.

Guibourdenche J., Alsat E., Soncin F., *et al.* (1998), Retinoid receptors expression in human term placenta: involvement of RXR alpha in retinoid induced-hCG secretion. *J Clin Endocrinol Metab*, **83**, 4, pp. 1384-7.

Guibourdenche J., Handschuh K., Tsatsaris V., *et al.* (2010), Hyperglycosylated hCG is a marker of early human trophoblast invasion. *J Clin Endocrinol Metab*, **95**, 10, pp. E240-4.

Gupta R. A., Tan J., Krause W. F., *et al.* (2000), Prostacyclin-mediated activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 24, pp. 13275-80.

Hagen G., Muller S., Beato M., *et al.* (1992), Cloning by recognition site screening of two novel GT box binding proteins: a family of Sp1 related genes. *Nucleic Acids Res*, **20**, 21, pp. 5519-25.

Hagen G., Muller S., Beato M., *et al.* (1994), Sp1-mediated transcriptional activation is repressed by Sp3. *EMBO J*, **13**, 16, pp. 3843-51.

Hallast P., Nagirnaja L., Margus T., *et al.* (2005), Segmental duplications and gene conversion: Human luteinizing hormone/chorionic gonadotropin beta gene cluster. *Genome Res*, **15**, 11, pp. 1535-46.

Hamilton G. S., Lysiak J. J., Han V. K., *et al.* (1998), Autocrine-paracrine regulation of human trophoblast invasiveness by insulin-like growth factor (IGF)-II and IGF-binding protein (IGFBP)-1. *Exp Cell Res*, **244**, 1, pp. 147-56.

Hands Schuh K., Guibourdenche J., Guesnon M., *et al.* (2006), Modulation of PAPP-A expression by PPARgamma in human first trimester trophoblast. *Placenta*, **27 Suppl A**, pp. S127-34.

Hands Schuh K., Guibourdenche J., Tsatsaris V., *et al.* (2007a), Human chorionic gonadotropin expression in human trophoblasts from early placenta: comparative study between villous and extravillous trophoblastic cells. *Placenta*, **28**, 2-3, pp. 175-84.

Hands Schuh K., Guibourdenche J., Tsatsaris V., *et al.* (2007b), Human chorionic gonadotropin produced by the invasive trophoblast but not the villous trophoblast promotes cell invasion and is down-regulated by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Endocrinology*, **148**, 10, pp. 5011-9.

Handwerger S. (2010), New insights into the regulation of human cytotrophoblast cell differentiation. *Mol Cell Endocrinol*, **323**, 1, pp. 94-104.

Handwerger S., Freemark M. (2000), The roles of placental growth hormone and placental lactogen in the regulation of human fetal growth and development. *J Pediatr Endocrinol Metab*, **13**, 4, pp. 343-56.

Harris L. K., Keogh R. J., Wareing M., *et al.* (2006), Invasive trophoblasts stimulate vascular smooth muscle cell apoptosis by a fas ligand-dependent mechanism. *Am J Pathol*, **169**, 5, pp. 1863-74.

Haupt Y., Barak Y., Oren M. (1996), Cell type-specific inhibition of p53-mediated apoptosis by mdm2. *EMBO J*, **15**, 7, pp. 1596-606.

Heazell A. E., Sharp A. N., Baker P. N., *et al.* (2011), Intra-uterine growth restriction is associated with increased apoptosis and altered expression of proteins in the p53 pathway in villous trophoblast. *Apoptosis*, **16**, 2, pp. 135-44.

Herr F., Baal N., Reisinger K., *et al.* (2007), HCG in the regulation of placental angiogenesis. Results of an in vitro study. *Placenta*, **28 Suppl A**, pp. S85-93.

Herrlich A., Kuhn B., Grosse R., *et al.* (1996), Involvement of Gs and Gi proteins in dual coupling of the luteinizing hormone receptor to adenylyl cyclase and phospholipase C. *J Biol Chem*, **271**, 28, pp. 16764-72.

Hiby S. E., Walker J. J., O'Shaughnessy K M., *et al.* (2004), Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. *J Exp Med*, **200**, 8, pp. 957-65.

Hirsch B., Kudo M., Naro F., *et al.* (1996), The C-terminal third of the human luteinizing hormone (LH) receptor is important for inositol phosphate release: analysis using chimeric human LH/follicle-stimulating hormone receptors. *Mol Endocrinol*, **10**, 9, pp. 1127-37.

Hladunewich M., Karumanchi SA., Lafayette R., (2007), Pathophysiology of the clinical manifestations of preeclampsia. *Clin J Am Soc Nephrol*, **2**, 3, pp. 543-9.

Hoffmann P., Feige J. J., Alfaidy N. (2006), Expression and oxygen regulation of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor/prokineticin-1 and its receptors in human placenta during early pregnancy. *Endocrinology*, **147**, 4, pp. 1675-84.

- Hoffmann P., Saudi Y., Benharouga M., *et al.* (2009), Role of EG-VEGF in human placentation: Physiological and pathological implications. *J Cell Mol Med*, **13**, 8B, pp. 2224-35.
- Holmquist-Mengelbier L., Fredlund E., Lofstedt T., *et al.* (2006), Recruitment of HIF-1alpha and HIF-2alpha to common target genes is differentially regulated in neuroblastoma: HIF-2alpha promotes an aggressive phenotype. *Cancer Cell*, **10**, 5, pp. 413-23.
- Hsu CD G. L., Meaddough E, Basheera H, Lu LC, Copel JA, *et al.* (1999), Expression of FasL by pre-eclamptic placenta. *Am. J. Obstet. Gynecol.* , **180**, pp. 43S.
- Hu Z. Y., Liu Y. X., Liu K., *et al.* (1999), Expression of tissue type and urokinase type plasminogen activators as well as plasminogen activator inhibitor type-1 and type-2 in human and rhesus monkey placenta. *J Anat*, **194 ( Pt 2)**, pp. 183-95.
- Hubel C. A. (1999), Oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia. *Proc Soc Exp Biol Med*, **222**, 3, pp. 222-35.
- Huppertz B., Frank H. G., Reister F., *et al.* (1999), Apoptosis cascade progresses during turnover of human trophoblast: analysis of villous cytotrophoblast and syncytial fragments in vitro. *Lab Invest*, **79**, 12, pp. 1687-702.
- Huppertz B., Kadyrov M., Kingdom J. C. (2006), Apoptosis and its role in the trophoblast. *Am J Obstet Gynecol*, **195**, 1, pp. 29-39.
- Huppertz B., Kertschanska S., Demir A. Y., *et al.* (1998), Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases (MMP), their substrates, and their inhibitors (TIMP) during trophoblast invasion in the human placenta. *Cell Tissue Res*, **291**, 1, pp. 133-48.
- Hurskainen T., Hoyhtya M., Tuuttila A., *et al.* (1996), mRNA expressions of TIMP-1, -2, and -3 and 92-KD type IV collagenase in early human placenta and decidual membrane as studied by in situ hybridization. *J Histochem Cytochem*, **44**, 12, pp. 1379-88.
- Hurskainen T., Seiki M., Apte S. S., *et al.* (1998), Production of membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT-MMP-1) in early human placenta. A possible role in placental implantation? *J Histochem Cytochem*, **46**, 2, pp. 221-9.
- Hussa R. O., Pattillo R. A., Ruckert A. C., *et al.* (1978), Effects of butyrate and dibutyryl cyclic AMP on hCG-secreting trophoblastic and non-trophoblastic cells. *J Clin Endocrinol Metab*, **46**, 1, pp. 69-76.
- Ikle F. A. (1964), Dissemination of Syncytial Trophoblastic Cells in the Maternal Blood Stream during Pregnancy. *Bull Schweiz Akad Med Wiss*, **20**, pp. 62-72.
- Irving J. A., Lysiak J. J., Graham C. H., *et al.* (1995), Characteristics of trophoblast cells migrating from first trimester chorionic villus explants and propagated in culture. *Placenta*, **16**, 5, pp. 413-33.
- Islami D., Bischof P., Chardonens D. (2003), Modulation of placental vascular endothelial growth factor by leptin and hCG. *Mol Hum Reprod*, **9**, 7, pp. 395-8.
- Ivan M., Kondo K., Yang H., *et al.* (2001), HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing. *Science*, **292**, 5516, pp. 464-8.

Jaakkola P., Mole D. R., Tian Y. M., *et al.* (2001), Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation. *Science*, **292**, 5516, pp. 468-72.

Jacquemin P., Martial J. A., Davidson I. (1997), Human TEF-5 is preferentially expressed in placenta and binds to multiple functional elements of the human chorionic somatomammotropin-B gene enhancer. *J Biol Chem*, **272**, 20, pp. 12928-37.

Jaffe R., Jauniaux E., Hustin J. (1997), Maternal circulation in the first-trimester human placenta--myth or reality? *Am J Obstet Gynecol*, **176**, 3, pp. 695-705.

Janatpour M. J., Utset M. F., Cross J. C., *et al.* (1999), A repertoire of differentially expressed transcription factors that offers insight into mechanisms of human cytotrophoblast differentiation. *Dev Genet*, **25**, 2, pp. 146-57.

Jauniaux E., Hempstock J., Greenwold N., *et al.* (2003), Trophoblastic oxidative stress in relation to temporal and regional differences in maternal placental blood flow in normal and abnormal early pregnancies. *Am J Pathol*, **162**, 1, pp. 115-25.

Jauniaux E., Watson A. L., Hempstock J., *et al.* (2000), Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress. A possible factor in human early pregnancy failure. *Am J Pathol*, **157**, 6, pp. 2111-22.

Jiang B., Kamat A., Mendelson CR., (2000), Hypoxia prevents induction of aromatase expression in human trophoblast cells in culture: potential inhibitory role of the hypoxia-inducible transcription factor Mash-2 (mammalian achaete-scute homologous protein-2). *Mol Endocrinol*, **14**, 10, pp. 1661-73.

Jiang G., Nepomuceno L., Hopkins K., *et al.* (1995), Exclusive homodimerization of the orphan receptor hepatocyte nuclear factor 4 defines a new subclass of nuclear receptors. *Mol Cell Biol*, **15**, 9, pp. 5131-43.

Johnson W., Jameson J. L. (1999), AP-2 (activating protein 2) and Sp1 (selective promoter factor 1) regulatory elements play distinct roles in the control of basal activity and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate responsiveness of the human chorionic gonadotropin-beta promoter. *Mol Endocrinol*, **13**, 11, pp. 1963-75.

Juriscicova A., Antenos M., Kapasi K., *et al.* (1999), Variability in the expression of trophoblastic markers beta-human chorionic gonadotrophin, human leukocyte antigen-G and pregnancy specific beta-1 glycoprotein by the human blastocyst. *Hum Reprod*, **14**, 7, pp. 1852-8.

Kane N., Kelly R., Saunders P. T., *et al.* (2009), Proliferation of uterine natural killer cells is induced by human chorionic gonadotropin and mediated via the mannose receptor. *Endocrinology*, **150**, 6, pp. 2882-8.

Kar M., Ghosh D., Sengupta J. (2007), Histochemical and morphological examination of proliferation and apoptosis in human first trimester villous trophoblast. *Hum Reprod*, **22**, 11, pp. 2814-23.

Kardana A., Cole L. A. (1997), The stability of hCG and free beta-subunit in serum samples. *Prenat Diagn*, **17**, 2, pp. 141-7.

- Kaufmann P., Black S., Huppertz B. (2003), Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biol Reprod*, **69**, 1, pp. 1-7.
- Kaufmann P., Castellucci M. (1997), Extravillous trophoblast in the human placenta. *Trophoblast Research*, **10**, pp. 21-65.
- Kaufmann P., Mayhew T. M., Charnock-Jones D. S. (2004), Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. II. Changes during normal pregnancy. *Placenta*, **25**, 2-3, pp. 114-26.
- Kayisli U. A., Selam B., Guzeloglu-Kayisli O., *et al.* (2003), Human chorionic gonadotropin contributes to maternal immunotolerance and endometrial apoptosis by regulating Fas-Fas ligand system. *J Immunol*, **171**, 5, pp. 2305-13.
- Kennedy G. C., Andersen B., Nilson J. H. (1990), The human alpha subunit glycoprotein hormone gene utilizes a unique CCAAT binding factor. *J Biol Chem*, **265**, 11, pp. 6279-85.
- Keryer G., Alsat E., Tasken K., *et al.* (1998), Cyclic AMP-dependent protein kinases and human trophoblast cell differentiation in vitro. *J Cell Sci*, **111 ( Pt 7)**, pp. 995-1004.
- Kessler M. J., Mise T., Ghai R. D., *et al.* (1979a), Structure and location of the O-glycosidic carbohydrate units of human chorionic gonadotropin. *J Biol Chem*, **254**, 16, pp. 7909-14.
- Kessler M. J., Reddy M. S., Shah R. H., *et al.* (1979b), Structures of N-glycosidic carbohydrate units of human chorionic gonadotropin. *J Biol Chem*, **254**, 16, pp. 7901-8.
- Khalil R. A., Granger J. P. (2002), Vascular mechanisms of increased arterial pressure in preeclampsia: lessons from animal models. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **283**, 1, pp. R29-45.
- Kharfi A., Giguere Y., Sapin V., *et al.* (2003), Trophoblastic remodeling in normal and preeclamptic pregnancies: implication of cytokines. *Clin Biochem*, **36**, 5, pp. 323-31.
- Khoo N. K. S., Zhang Y., Bechberger J. F., *et al.* (1998), SV40 Tag Transformation of the Normal Invasive Trophoblast Results in a Premalignant Phenotype.II. Changes in Gap Junctional Intercellular Communication. *Int J Cancer*, **77**, pp. 440-448.
- King A., Burrows T., Hiby S., *et al.* (2000), Surface expression of HLA-C antigen by human extravillous trophoblast. *Placenta*, **21**, pp. 376-387.
- Kliwer S. A., Sundseth S. S., Jones S. A., *et al.* (1997), Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 9, pp. 4318-23.
- Kliwer S. A., Umesono K., Mangelsdorf D. J., *et al.* (1992), Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D3 signalling. *Nature*, **355**, pp. 446-449.
- Knerr I., Schubert S. W., Wich C., *et al.* (2005), Stimulation of GCMA and syncytin via cAMP mediated PKA signaling in human trophoblastic cells under normoxic and hypoxic conditions. *FEBS Lett*, **579**, 18, pp. 3991-8.

Knight M., Redman C. W., Linton E. A., *et al.* (1998), Shedding of syncytiotrophoblast microvilli into the maternal circulation in pre-eclamptic pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol*, **105**, 6, pp. 632-40.

Knofler M., Saleh L., Bauer S., *et al.* (2004), Transcriptional regulation of the human chorionic gonadotropin beta gene during villous trophoblast differentiation. *Endocrinology*, **145**, 4, pp. 1685-94.

Knofler M., Saleh L., Bauer S., *et al.* (2000), Promoter elements and transcription factors involved in differentiation-dependent human chorionic gonadotrophin-alpha messenger ribonucleic acid expression of term villous trophoblasts. *Endocrinology*, **141**, 10, pp. 3737-48.

Knofler M., Saleh L., Strohmer H., *et al.* (1999), Cyclic AMP- and differentiation-dependent regulation of the proximal alphaHCG gene promoter in term villous trophoblasts. *Mol Hum Reprod*, **5**, 6, pp. 573-80.

Korhonen M., Virtanen I. (1997), The distribution of laminins and fibronectins is modulated during extravillous trophoblastic cell differentiation and decidual cell response to invasion in the human placenta. *J Histochem Cytochem*, **45**, pp. 569-581.

Kornyei J. L., Lei Z. M., Rao C. V. (1993), Human myometrial smooth muscle cells are novel targets of direct regulation by human chorionic gonadotropin. *Biol Reprod*, **49**, 6, pp. 1149-57.

Kubota N., Terauchi Y., Miki H., *et al.* (1999), PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell*, **4**, pp. 597-609.

Kudo Y., Boyd C. A. (2004), RNA interference-induced reduction in CD98 expression suppresses cell fusion during syncytialization of human placental BeWo cells. *FEBS Lett*, **577**, 3, pp. 473-7.

Kuhnen C., Mentzel T., Haas V. (1999), [Primary synovial sarcoma of the lung]. *Pathologe*, **20**, 2, pp. 130-4.

Lachmeijer A. M., Dekker G. A., Pals G., *et al.* (2002), Searching for preeclampsia genes: the current position. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, **105**, 2, pp. 94-113.

Lacroix M. C., Guibourdenche J., Fournier T., *et al.* (2005), Stimulation of human trophoblast invasion by placental growth hormone. *Endocrinology*, **146**, 5, pp. 2434-44.

Lain K. Y., Powers R. W., Krohn M. A., *et al.* (1999), Urinary cotinine concentration confirms the reduced risk of preeclampsia with tobacco exposure. *Am J Obstet Gynecol*, **181**, 5 Pt 1, pp. 1192-6.

Lala P. K., Graham C. H. (1990), Mechanisms of trophoblast invasiveness and their control: the role of proteases and protease inhibitors. *Cancer Metastasis Rev*, **9**, 4, pp. 369-79.

Lard L. R., Mul F. P., de Haas M., *et al.* (1999), Neutrophil activation in sickle cell disease. *J Leukoc Biol*, **66**, 3, pp. 411-5.

Lazar V., Diez S. G., Laurent A., *et al.* (1995), Expression of human chorionic gonadotropin beta subunit genes in superficial and invasive bladder carcinomas. *Cancer Res*, **55**, 17, pp. 3735-8.

- LeCouter J., Kowalski J., Foster J., *et al.* (2001), Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium. *Nature*, **412**, 6850, pp. 877-84.
- Lefort G. P., Stolk J. M., Nisula B. C. (1986), Renal metabolism of the beta-subunit of human choriogonadotropin in the rat. *Endocrinology*, **119**, 2, pp. 924-31.
- Lehmann J. M., Moore L., Smith-Oliver T., *et al.* (1995), An Antidiabetic Thiazolidinedione Is a High Affinity Ligand for Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma (PPARgamma). *J. Biol. Chem.*, **270**, pp. 12953-12956.
- Leisser C., Saleh L., Haider S., *et al.* (2006), Tumour necrosis factor-alpha impairs chorionic gonadotrophin beta-subunit expression and cell fusion of human villous cytotrophoblast. *Mol Hum Reprod*, **12**, 10, pp. 601-9.
- Lewis M. P., Clements M., Takeda S., *et al.* (1996), Partial characterization of an immortalized human trophoblast cell-line, TCL-1, which possesses a CSF-1 autocrine loop. *Placenta*, **17**, pp. 137-146.
- Li M. D., Ford J. J. (1998), A comprehensive evolutionary analysis based on nucleotide and amino acid sequences of the alpha- and beta-subunits of glycoprotein hormone gene family. *J Endocrinol*, **156**, 3, pp. 529-42.
- Librach C. L., Werb Z., Fitzgerald M. L., *et al.* (1991), 92-kD type IV collagenase mediates invasion of human cytotrophoblasts. *J Cell Biol*, **113**, 2, pp. 437-49.
- LiCalsi C., Christophe S., Steger D. J., *et al.* (2000), AP-2 family members regulate basal and cAMP-induced expression of human chorionic gonadotropin. *Nucleic Acids Res*, **28**, 4, pp. 1036-43.
- Licht P., Cao H., Lei Z. M., *et al.* (1993), Novel self-regulation of human chorionic gonadotropin biosynthesis in term pregnancy human placenta. *Endocrinology*, **133**, 6, pp. 3014-25.
- Licht P., Russu V., Wildt L. (2001), On the role of human chorionic gonadotropin (hCG) in the embryo-endometrial microenvironment: implications for differentiation and implantation. *Semin Reprod Med*, **19**, 1, pp. 37-47.
- Linnemann K., Malek A., Sager R., *et al.* (2000), Leptin production and release in the dually in vitro perfused human placenta. *J Clin Endocrinol Metab*, **85**, 11, pp. 4298-301.
- Liu J., Chakraborty C., Graham C. H., *et al.* (2003), Noncatalytic domain of uPA stimulates human extravillous trophoblast migration by using phospholipase C, phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase. *Exp Cell Res*, **286**, 1, pp. 138-51.
- Logan k., Fisher J., Damsky H. (1992), Human placental cells transformed with temperature-sensitive Simian Virus 40 are immortalized and mimic the phenotype of invasive cytotrophoblasts at both permissive and nonpermissive temperatures. *Cancer Res*, **52**, pp. 6001-6009.
- Loke Y. W., King A. (2000), Immunological aspects of human implantation. *J Reprod Fertil Suppl*, **55**, pp. 83-90.
- Lopata A., Hay D. L. (1989), The potential of early human embryos to form blastocysts, hatch from their zona and secrete HCG in culture. *Hum Reprod*, **4**, 8 Suppl, pp. 87-94.

- Loregger T., Pollheimer J., Knofler M. (2003), Regulatory transcription factors controlling function and differentiation of human trophoblast--a review. *Placenta*, **24 Suppl A**, pp. S104-10.
- Luconi M., Cantini G., Serio M. (2010), Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma): Is the genomic activity the only answer? *Steroids*, **75**, 8-9, pp. 585-94.
- Luscher B., Mitchell P. J., Williams T., *et al.* (1989), Regulation of transcription factor AP-2 by the morphogen retinoic acid and by second messengers. *Genes Dev*, **3**, 10, pp. 1507-17.
- Lyall F., Barber A., Myatt L., *et al.* (2000), Hemeoxygenase expression in human placenta and placental bed implies a role in regulation of trophoblast invasion and placental function. *FASEB J*, **14**, 1, pp. 208-19.
- Lyall F., Nicola Bulmer J., Kelly H., *et al.* (1999), Human Trophoblast Invasion and Spiral Artery Transformation: The Role of Nitric Oxide. *Am J Pathol*, **154**, pp. 1105-1114.
- Magarinos M. P., Sanchez-Margalet V., Kotler M., *et al.* (2007), Leptin promotes cell proliferation and survival of trophoblastic cells. *Biol Reprod*, **76**, 2, pp. 203-10.
- Malassine A., Cronier L. (2005), Involvement of gap junctions in placental functions and development. *Biochim Biophys Acta*, **1719**, 1-2, pp. 117-24.
- Malassine A., Handschuh K., Tsatsaris V., *et al.* (2005), Expression of HERV-W Env glycoprotein (syncytin) in the extravillous trophoblast of first trimester human placenta. *Placenta*, **26**, 7, pp. 556-62.
- Manyonda I. T., Whitley G. S., Cartwright J. E. (2001), Trophoblast cell lines: a response to the Workshop Report by King *et al.* *Placenta*, **22**, 2-3, pp. 262-3.
- Marcillac I., Cottu P., Theodore C., *et al.* (1993), Free hCG-beta subunit as tumour marker in urothelial cancer. *Lancet*, **341**, 8856, pp. 1354-5.
- Martin B. J., Spicer S. S. (1973), Ultrastructural features of cellular maturation and aging in human trophoblast. *J Ultrastruct Res*, **43**, 1, pp. 133-49.
- Martin D., Conrad K. P. (2000), Expression of endothelial nitric oxide synthase by extravillous trophoblast cells in the human placenta. *Placenta*, **21**, 1, pp. 23-31.
- Masuzaki H., Ogawa Y., Isse N., *et al.* (1995), Human obese gene expression. Adipocyte-specific expression and regional differences in the adipose tissue. *Diabetes*, **44**, 7, pp. 855-8.
- Masuzaki H., Ogawa Y., Sagawa N., *et al.* (1997), Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med*, **3**, pp. 1029-1033.
- Matsuzaki N., Li Y., Masuhiro K., *et al.* (1992), Trophoblast-derived transforming growth factor-beta 1 suppresses cytokine-induced, but not gonadotropin-releasing hormone-induced, release of human chorionic gonadotropin by normal human trophoblasts. *J Clin Endocrinol Metab*, **74**, 1, pp. 211-6.
- Mayhew T. M., Leach L., McGee R., *et al.* (1999), Proliferation, differentiation and apoptosis in villous trophoblast at 13-41 weeks of gestation (including observations on annulate lamellae and nuclear pore complexes). *Placenta*, **20**, 5-6, pp. 407-22.

McFarland K. C., Sprengel R., Phillips H. S., *et al.* (1989), Lutropin-choriogonadotropin receptor: an unusual member of the G protein-coupled receptor family. *Science*, **245**, 4917, pp. 494-9.

McKinnon T., Chakraborty C., Gleeson LM, *et al.* (2001), Stimulation of human extravillous trophoblast migration by IGF-II is mediated by IGF type 2 receptor involving inhibitory G protein(s) and phosphorylation of MAPK. *J Clin Endocrinol Metab*, **86**, 8, pp. 3665-74.

Meekins J. W., Pijnenborg R., Hanssens M., *et al.* (1994), A Study of Placental Bed Spiral Arteries and Trophoblast Invasion in Normal and Severe Pre-eclamptic Pregnancies. **101**, pp. 669-674.

Meisser A., Cameo P., Islami D., *et al.* (1999b), Effects of interleukin-6 (IL-6) on cytotrophoblastic cells. *Mol Hum Reprod*, **5**, 11, pp. 1055-8.

Meisser A., Chardonens D., Campana A., *et al.* (1999a), Effects of tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1 alpha, macrophage colony stimulating factor and transforming growth factor beta on trophoblastic matrix metalloproteinases. *Mol Hum Reprod*, **5**, 3, pp. 252-60.

Mi S., Lee X., Li X., *et al.* (2000), Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature*, **403**, 6771, pp. 785-9.

Misawa K., Horiba T., Arimura N., *et al.* (2003), Sterol regulatory element-binding protein-2 interacts with hepatocyte nuclear factor-4 to enhance sterol isomerase gene expression in hepatocytes. *J Biol Chem*, **278**, 38, pp. 36176-82.

Morgan F. J., Birken S., Canfield R. E. (1975), The amino acid sequence of human chorionic gonadotropin. The alpha subunit and beta subunit. *J Biol Chem*, **250**, 13, pp. 5247-58.

Morgan T., Craven C., Ward K. (1998), Human spiral artery renin-angiotensin system. *Hypertension*, **32**, 4, pp. 683-7.

Morrish D. W., Bhardwaj D., Dabbagh L. K., *et al.* (1987), Epidermal growth factor induces differentiation and secretion of human chorionic gonadotropin and placental lactogen in normal human placenta. *J Clin Endocrinol Metab*, **65**, 6, pp. 1282-90.

Morrish D. W., Bhardwaj D., Paras M. T. (1991), Transforming growth factor beta 1 inhibits placental differentiation and human chorionic gonadotropin and human placental lactogen secretion. *Endocrinology*, **129**, 1, pp. 22-6.

Moyle W. R., Bahl O. P., Marz L. (1975), Role of carbohydrate of human chorionic gonadotropin in the mechanism of hormone action. *J Biol Chem*, **250**, 23, pp. 9163-9.

Mugnaini E. N., Haaheim L. L., Sannes M., *et al.* (1999), In vivo expansion coincident with excessive in vitro cell death within the memory subset of CD8+ T cells in HIV type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses*, **15**, 3, pp. 265-72.

Mühlhauser J., Crescimanno C., Kaufmann P., *et al.* (1993), Differentiation and proliferation patterns in human trophoblast revealed by c-erbB2 oncogene product and EGF-R. *J Histochem Cytochem*, **41**, pp. 165-173.

Mukherjee R., Jow L., Croston G., *et al.* (1997), Identification, Characterization, and Tissue Distribution of Human Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR) Isoforms

PPARgamma2 versus PPARgamma1 and Activation with Retinoid X Receptor Agonists and Antagonists. *J. Biol. Chem.*, **272**, pp. 8071-8076.

Murthi P., Said J. M., Doherty V. L., *et al.* (2006), Homeobox gene DLX4 expression is increased in idiopathic human fetal growth restriction. *Mol Hum Reprod*, **12**, 12, pp. 763-9.

Myatt L., Brewer A., Brockman D. E. (1991), The action of nitric oxide in the perfused human fetal-placental circulation. *Am J Obstet Gynecol*, **164**, 2, pp. 687-92.

Nagy L., Tontonoz P., Alvarez J. G., *et al.* (1998), Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell*, **93**, 2, pp. 229-40.

Nait-Oumesmar B., Copperman A. B., Lazzarini R. A. (2000), Placental expression and chromosomal localization of the human Gcm 1 gene. *J Histochem Cytochem*, **48**, 7, pp. 915-22.

Nanaev A., Chwalisz K., Frank H. G., *et al.* (1995), Physiological dilation of uteroplacental arteries in the guinea pig depends on nitric oxide synthase activity of extravillous trophoblast. *Cell Tissue Res*, **282**, 3, pp. 407-21.

Newhouse S. M., Davidge S. T., Winkler-Lowen B., *et al.* (2007), In vitro differentiation of villous trophoblasts from pregnancies complicated by intrauterine growth restriction with and without pre-eclampsia. *Placenta*, **28**, 10, pp. 999-1003.

Nishioka Y., Higuchi T., Sato Y., *et al.* (2003), Human migrating extravillous trophoblasts express a cell surface peptidase, carboxypeptidase-M. *Mol Hum Reprod*, **9**, 12, pp. 799-806.

Niu R., Okamoto T., Iwase K., *et al.* (2000), Quantitative analysis of matrix metalloproteinases-2 and -9, and their tissue inhibitors-1 and -2 in human placenta throughout gestation. *Life Sci*, **66**, 12, pp. 1127-37.

Odibo A. O., Zhong Y., Longtine M., *et al.* (2011), First-trimester serum analytes, biophysical tests and the association with pathological morphometry in the placenta of pregnancies with preeclampsia and fetal growth restriction. *Placenta*, **32**, 4, pp. 333-8.

Palmer M. E., Watson A. L., Burton G. J. (1997), Morphological analysis of degeneration and regeneration of syncytiotrophoblast in first trimester placental villi during organ culture. *Hum Reprod*, **12**, 2, pp. 379-82.

Pang Z. J., Xing F. Q. (2003), Expression profile of trophoblast invasion-associated genes in the pre-eclamptic placenta. *Br J Biomed Sci*, **60**, 2, pp. 97-101.

Pascual G., Fong A. L., Ogawa S., *et al.* (2005), A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma. *Nature*, **437**, 7059, pp. 759-63.

Pavan L., Hermouet A., Tsatsaris V., *et al.* (2004), Lipids from oxidized low-density lipoprotein modulate human trophoblast invasion: involvement of nuclear liver X receptors. *Endocrinology*, **145**, 10, pp. 4583-91.

Pavan L., Tarrade A., Hermouet A., *et al.* (2003), Human invasive trophoblasts transformed with simian virus 40 provide a new tool to study the role of PPARgamma in cell invasion process. *Carcinogenesis*, **24**, 8, pp. 1325-36.

- Pavlov N., Hatzi E., Bassaglia Y., *et al.* (2003), Angiogenin distribution in human term placenta, and expression by cultured trophoblastic cells. *Angiogenesis*, **6**, 4, pp. 317-30.
- Perez-Perez A., Gambino Y., Maymo J., *et al.* (2010), MAPK and PI3K activities are required for leptin stimulation of protein synthesis in human trophoblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **396**, 4, pp. 956-60.
- Perez-Roger I., Solomon D. L., Sewing A., *et al.* (1997), Myc activation of cyclin E/Cdk2 kinase involves induction of cyclin E gene transcription and inhibition of p27(Kip1) binding to newly formed complexes. *Oncogene*, **14**, 20, pp. 2373-81.
- Pestell R. G., Hollenberg A. N., Albanese C., *et al.* (1994), c-Jun represses transcription of the human chorionic gonadotropin alpha and beta genes through distinct types of CREs. *J Biol Chem*, **269**, 49, pp. 31090-6.
- Pidoux G., Gerbaud P., Gnidehou S., *et al.* (2010), ZO-1 is involved in trophoblastic cell differentiation in human placenta. *Am J Physiol Cell Physiol*, **298**, 6, pp. C1517-26.
- Pierce J. G., Parsons T. F. (1981), Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu Rev Biochem*, **50**, pp. 465-95.
- Pijnenborg R., Bland J. M., Robertson W. B., *et al.* (1983), Uteroplacental arterial changes related to interstitial trophoblast migration in early human pregnancy. *Placenta*, **4**, 4, pp. 397-413.
- Pijnenborg R., Vercruyssen L., Hanssens M. (2006), The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies. *Placenta*, **27**, 9-10, pp. 939-58.
- Polette M., Nawrocki B., Pintiaux A., *et al.* (1994), Expression of gelatinases A and B and their tissue inhibitors by cells of early and term human placenta and gestational endometrium. *Lab Invest.*, **71**, pp. 838-846.
- Policastro P. F., Daniels-McQueen S., Carle G., *et al.* (1986), A map of the hCG beta-LH beta gene cluster. *J Biol Chem*, **261**, 13, pp. 5907-16.
- Pringle K. G., Kind K. L., Sferruzzi-Perri A. N., *et al.* (2010), Beyond oxygen: complex regulation and activity of hypoxia inducible factors in pregnancy. *Hum Reprod Update*, **16**, 4, pp. 415-31.
- Pröll J., Blaschitz A., Hutter H., *et al.* (1999), First Trimester Human Endovascular Trophoblast Cells Express Both HLA-C and HLA-G. *Am J Reprod Immunol*, **42**, pp. 30-36.
- Puigserver P., Adelmant G., Wu Z., *et al.* (1999), Activation of PPARgamma coactivator-1 through transcription factor docking. *Science*, **286**, 5443, pp. 1368-71.
- Qiu Q., Yang M., Tsang B. K., *et al.* (2004), EGF-induced trophoblast secretion of MMP-9 and TIMP-1 involves activation of both PI3K and MAPK signalling pathways. *Reproduction*, **128**, 3, pp. 355-63.
- Quinn L. M., Johnson B. V., Nicholl J., *et al.* (1997), Isolation and identification of homeobox genes from the human placenta including a novel member of the Distal-less family, DLX4. *Gene*, **187**, 1, pp. 55-61.

- Quinn L. M., Latham S. E., Kalionis B. (1998), A distal-less class homeobox gene, DLX4, is a candidate for regulating epithelial-mesenchymal cell interactions in the human placenta. *Placenta*, **19**, 1, pp. 87-93.
- Rajakumar A., Whitelock K. A., Weissfeld L. A., *et al.* (2001), Selective overexpression of the hypoxia-inducible transcription factor, HIF-2alpha, in placentas from women with preeclampsia. *Biol Reprod*, **64**, 2, pp. 499-506.
- Rajaraman G., Murthi P., Leo B., *et al.* (2007), Homeobox gene HLX1 is a regulator of colony stimulating factor-1 dependent trophoblast cell proliferation. *Placenta*, **28**, 10, pp. 991-8.
- Rajaraman G., Murthi P., Pathirage N., *et al.* (2010), Downstream targets of homeobox gene HLX show altered expression in human idiopathic fetal growth restriction. *Am J Pathol*, **176**, 1, pp. 278-87.
- Rajaraman G., Murthi P., Quinn L., *et al.* (2008), Homeodomain protein HLX is expressed primarily in cytotrophoblast cell types in the early pregnancy human placenta. *Reprod Fertil Dev*, **20**, 3, pp. 357-67.
- Ramsey E. M., Martin C. B., Jr., McGaughey H. S., Jr., *et al.* (1966), Venous drainage of the placenta in rhesus monkeys: radiographic studies. *Am J Obstet Gynecol*, **95**, 7, pp. 948-55.
- Ramsey E. M. H., J. W. S. (1966), Comparison of uteroplacental vasculature and circulation in the rhesus monkey and man. *Contr. Embryol*, **38**, pp. 59-7.
- Rao C. (1996), The beginning of a new era in reproductive biology and medicine: Expression of low levels of functional luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptors in nongonadal tissues. *J. Physiol. Pharmacol*, **47** pp. 41-53.
- Rao C. V. (1979), Differential properties of human chorionic gonadotrophin and human luteinizing hormone binding to plasma membranes of bovine corpora lutea. *Acta Endocrinol (Copenh)*, **90**, 4, pp. 696-710.
- Red-Horse K., Kapidzic M., Zhou Y., *et al.* (2005), EPHB4 regulates chemokine-evoked trophoblast responses: a mechanism for incorporating the human placenta into the maternal circulation. *Development*, **132**, 18, pp. 4097-106.
- Redman C. (1997), Cytotrophoblasts: masters of disguise. *Nat Med*, **3**, pp. 610-611.
- Redman C. W. (1991), Current topic: pre-eclampsia and the placenta. *Placenta*, **12**, 4, pp. 301-8.
- Redman C. W., Sargent I. L. (2001), The pathogenesis of pre-eclampsia. *Gynecol Obstet Fertil*, **29**, 7-8, pp. 518-22.
- Roberts J. M. (1998), Endothelial dysfunction in preeclampsia. *Semin Reprod Endocrinol*, **16**, 1, pp. 5-15.
- Robillard P. Y., Dekker G. A., Hulsey T. C. (2002), Evolutionary adaptations to pre-eclampsia/eclampsia in humans: low fecundability rate, loss of oestrus, prohibitions of incest and systematic polyandry. *Am J Reprod Immunol*, **47**, 2, pp. 104-11.

- Robinson J. M., Ackerman W. E. t., Behrendt N. J., *et al.* (2009), While dysferlin and myoferlin are coexpressed in the human placenta, only dysferlin expression is responsive to trophoblast fusion in model systems. *Biol Reprod*, **81**, 1, pp. 33-9.
- Rodway M. R., Rao C. V. (1995), A novel perspective on the role of human chorionic gonadotropin during pregnancy and in gestational trophoblastic disease. *Early Pregnancy*, **1**, 3, pp. 176-87.
- Romoscanu I. (2007). L'hormone chorionique gonadotrophique et l'alpha-foetoprotéine : leur corrélation avec la pré-éclampsie., Univ. Genève,
- Roncalli M., Bulfamante G., Viale G., *et al.* (1994), C-myc and tumour suppressor gene product expression in developing and term human trophoblast. *Placenta*, **15**, 4, pp. 399-409.
- Rote N. S., Chakrabarti S., Stetzer B. P. (2004), The role of human endogenous retroviruses in trophoblast differentiation and placental development. *Placenta*, **25**, 8-9, pp. 673-83.
- Roth I., Fisher S. J. (1999), IL-10 is an autocrine inhibitor of human placental cytotrophoblast MMP-9 production and invasion. *Dev Biol*, **205**, 1, pp. 194-204.
- Ruck P., Marzusch K., Horny H. P., *et al.* (1996), The distribution of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) in the human placenta. *Placenta*, **17**, 4, pp. 263-6.
- Rull K., Hallast P., Uuskula L., *et al.* (2008), Fine-scale quantification of HCG beta gene transcription in human trophoblastic and non-malignant non-trophoblastic tissues. *Mol Hum Reprod*, **14**, 1, pp. 23-31.
- Safe S., Abdelrahim M. (2005), Sp transcription factor family and its role in cancer. *Eur J Cancer*, **41**, 16, pp. 2438-48.
- Sairam M. R., Bhargavi G. N. (1985), A role for glycosylation of the alpha subunit in transduction of biological signal in glycoprotein hormones. *Science*, **229**, 4708, pp. 65-7.
- Sakbun V., Ali S. M., Lee Y. A., *et al.* (1990), Immunocytochemical localization and messenger ribonucleic acid concentrations for human placental lactogen in amnion, chorion, decidua, and placenta. *Am J Obstet Gynecol*, **162**, 5, pp. 1310-7.
- Sato Y., Fujiwara H., Higuchi T., *et al.* (2002), Involvement of dipeptidyl peptidase IV in extravillous trophoblast invasion and differentiation. *J Clin Endocrinol Metab*, **87**, 9, pp. 4287-96.
- Sato Y., Higuchi T., Yoshioka S., *et al.* (2003), Trophoblasts acquire a chemokine receptor, CCR1, as they differentiate towards invasive phenotype. *Development*, **130**, 22, pp. 5519-32.
- Schaiff W., Carlson M., Smith S., *et al.* (2000), Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma modulates differentiation of human trophoblast in a ligand-specific manner. *J Clin Endocrinol Metab.*, **85**, pp. 3874-3881.
- Schaiff W. T., Bildirici I., Cheong M., *et al.* (2005), Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and retinoid X receptor signaling regulate fatty acid uptake by primary human placental trophoblasts. *J Clin Endocrinol Metab*, **90**, 7, pp. 4267-75.

- Schatz F., Krikun G., Runic R., *et al.* (1999), Implications of decidualization-associated protease expression in implantation and menstruation. *Semin Reprod Endocrinol*, **17**, 1, pp. 3-12.
- Schatz F., Lockwood C. J. (1993), Progesterin regulation of plasminogen activator inhibitor type 1 in primary cultures of endometrial stromal and decidual cells. *J Clin Endocrinol Metab*, **77**, 3, pp. 621-5.
- Schneider P., Schwenzer R., Haas E., *et al.* (1999), TWEAK can induce cell death via endogenous TNF and TNF receptor 1. *Eur J Immunol*, **29**, 6, pp. 1785-92.
- Seargent J. M., Yates E. A., Gill J. H. (2004), GW9662, a potent antagonist of PPARgamma, inhibits growth of breast tumour cells and promotes the anticancer effects of the PPARgamma agonist rosiglitazone, independently of PPARgamma activation. *Br J Pharmacol*, **143**, 8, pp. 933-7.
- Senaris R., Garcia-Caballero T., Casabiell X., *et al.* (1997), Synthesis of leptin in human placenta. *Endocrinol*, **138**, pp. 4501-4504.
- Senaris R., Garcia-Caballero T., Casabiell X., *et al.* (1997), Synthesis of leptin in human placenta. *Endocrinology*, **138**, 10, pp. 4501-4.
- Sher T., Yi H. F., McBride O. W., *et al.* (1993), cDNA cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human peroxisome proliferator activated receptor. *Biochemistry*, **32**, 21, pp. 5598-604.
- Shi L. Y., Zhang Z. W., Li W. X. (1994), Regulation of human chorionic gonadotropin secretion and messenger ribonucleic acid levels by follistatin in the NUCC-3 choriocarcinoma cell line. *Endocrinology*, **134**, 6, pp. 2431-7.
- Shi Q. J., Lei Z. M., Rao C. V., *et al.* (1993), Novel role of human chorionic gonadotropin in differentiation of human cytotrophoblasts. *Endocrinology*, **132**, pp. 1387-1395.
- Shih I. M., Kurman R. J. (1996), Expression of melanoma cell adhesion molecule in intermediate trophoblast. *Laboratory investigation*, **75**, pp. 377-388.
- Shimonovitz S., Hurwitz A., Hochner-Celnikier D., *et al.* (1998), Expression of gelatinase B by trophoblast cells: down-regulation by progesterone. *Am J Obstet Gynecol*, **178**, 3, pp. 457-61.
- Shiverick K. T., King A., Frank H.-G., *et al.* (2001), Cell Culture Models of Human Trophoblast II: Trophoblast Cell Lines - A Workshop Report. *Trophoblast*, **22 (suppl A)**, pp. S104-S106.
- Short A., Wong A. K., Finch A. M., *et al.* (1999), Effects of a new C5a receptor antagonist on C5a- and endotoxin-induced neutropenia in the rat. *Br J Pharmacol*, **126**, 3, pp. 551-4.
- Siler-Khodr T. M., Khodr G. S. (1981), Dose response analysis of GnRH stimulation of hCG release from human term placenta. *Biol Reprod*, **25**, 2, pp. 353-8.
- Simon C., Martin J. C., Pellicer A. (2000), Paracrine regulators of implantation. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, **14**, 5, pp. 815-26.

Sohr S., Engeland K. (2011), The tumor suppressor p53 induces expression of the pregnancy-supporting human chorionic gonadotropin (hCG) CGB7 gene. *Cell Cycle*, **10**, 21, pp. 3758-67.

ST-Jacques S., Forte M., Lye S., *et al.* (1994), Localization of endoglin, a TGF- $\beta$  binding protein, and of CD44 and integrins in placenta during the first trimester of pregnancy. *Biol Reprod*, **51**, pp. 405-413.

Staun-Ram E., Goldman S., Gabarin D., *et al.* (2004), Expression and importance of matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and -9) in human trophoblast invasion. *Reprod Biol Endocrinol*, **2**, pp. 59.

Steger D. J., Buscher M., Hecht J. H., *et al.* (1993), Coordinate control of the alpha- and beta-subunit genes of human chorionic gonadotropin by trophoblast-specific element-binding protein. *Mol Endocrinol*, **7**, 12, pp. 1579-88.

Steger DJ., Hecht JH., Mellon PL., (1994), GATA-binding proteins regulate the human gonadotropin alpha-subunit gene in the placenta and pituitary gland. *Mol Cell Biol*, **14**, 8, pp. 5592-602.

Stetler-Stevenson W. G., Kruttsch H. C., Liotta L. A. (1989), Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2). A new member of the metalloproteinase inhibitor family. *J Biol Chem*, **264**, 29, pp. 17374-8.

Stewart C. L., Kaspar P., Brunet L. J., *et al.* (1992), Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature*, **359**, 6390, pp. 76-9.

Sun Y., Lu X., Yin L., *et al.* (2006), Inhibition of DLX4 promotes apoptosis in choriocarcinoma cell lines. *Placenta*, **27**, 4-5, pp. 375-83.

Szony B. J., Bata-Csorgo Z., Bartfai G., *et al.* (1999), Interleukin-10 receptors are expressed by basement membrane anchored, alpha(6) integrin(+) cytotrophoblast cells in early human placenta. *Mol Hum Reprod*, **5**, 11, pp. 1059-65.

Tafuri A., Alferink J., Moller P., *et al.* (1995), T cell awareness of paternal alloantigens during pregnancy. *Science*, **270**, 5236, pp. 630-3.

Takahashi S., Matsuura N., Kurokawa T., *et al.* (2002), Co-operation of the transcription factor hepatocyte nuclear factor-4 with Sp1 or Sp3 leads to transcriptional activation of the human haem oxygenase-1 gene promoter in a hepatoma cell line. *Biochem J*, **367**, Pt 3, pp. 641-52.

Takemura Y., Osuga Y., Yamauchi T., *et al.* (2006), Expression of adiponectin receptors and its possible implication in the human endometrium. *Endocrinology*, **147**, 7, pp. 3203-10.

Tao Y. X., Lei Z. M., Hofmann G. E., *et al.* (1995), Human intermediate trophoblasts express chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptor gene. *Biol Reprod*, **53**, 4, pp. 899-904.

Tarrade A., Lai Kuen R., Malassine A., *et al.* (2001b), Characterization of human villous and extravillous trophoblasts isolated from first trimester placenta. *Lab Invest*, **81**, 9, pp. 1199-211.

- Tarrade A., Schoonjans K., Guibourdenche J., *et al.* (2001a), PPAR gamma/RXR alpha heterodimers are involved in human CG beta synthesis and human trophoblast differentiation. *Endocrinology*, **142**, 10, pp. 4504-14.
- Tarrade A., Schoonjans K., Pavan L., *et al.* (2001c), PPARgamma/RXRalpha heterodimers control human trophoblast invasion. *J Clin Endocrinol Metab*, **86**, 10, pp. 5017-24.
- Toki T., Horiuchi A., Ichikawa N., *et al.* (1999), Inverse relationship between apoptosis and Bcl-2 expression in syncytiotrophoblast and fibrin-type fibrinoid in early gestation. *Mol Hum Reprod*, **5**, 3, pp. 246-51.
- Tontonoz P., Hu E., Spiegelman B. M. (1994), Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell*, **79**, 7, pp. 1147-56.
- Tontonoz P., Singer S., Forman B. M., *et al.* (1997), Terminal differentiation of human liposarcoma cells induced by ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 1, pp. 237-41.
- Toth P., Li X., Rao C. V., *et al.* (1994), Expression of functional human chorionic gonadotropin/human luteinizing hormone receptor gene in human uterine arteries. *J Clin Endocrinol Metab*, **79**, 1, pp. 307-15.
- Toth P., Lukacs H., Gimes G., *et al.* (2001), Clinical importance of vascular LH/hCG receptors--a review. *Reprod Biol*, **1**, 2, pp. 5-11.
- Uchimura K., Nakamuta M., Enjoji M., *et al.* (2001), Activation of retinoic X receptor and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma inhibits nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha production in rat Kupffer cells. *Hepatology*, **33**, 1, pp. 91-9.
- Van Beekum O., Fleskens V., Kalkhoven E. (2009), Posttranslational modifications of PPAR-gamma: fine-tuning the metabolic master regulator. *Obesity (Silver Spring)*, **17**, 2, pp. 213-9.
- Van Dijk M., Mulders J., Poutsma A., *et al.* (2005), Maternal segregation of the Dutch preeclampsia locus at 10q22 with a new member of the winged helix gene family. *Nat Genet*, **37**, 5, pp. 514-9.
- Varanou A., Withington S. L., Lakasing L., *et al.* (2006), The importance of cysteine cathepsin proteases for placental development. *J Mol Med (Berl)*, **84**, 4, pp. 305-17.
- Vettraino I. M., Roby J., Tolley T., *et al.* (1996), Collagenase-I, stromelysin-I, and matrilysin are expressed within the placenta during multiple stages of human pregnancy. *Placenta*, **17**, 8, pp. 557-63.
- Visse R., Nagase H. (2003), Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*, **92**, 8, pp. 827-39.
- Walker W. H., Fitzpatrick S. L., Barrera-Saldana H. A., *et al.* (1991), The human placental lactogen genes: structure, function, evolution and transcriptional regulation. *Endocr Rev*, **12**, 4, pp. 316-28.
- Watson A. L., Palmer M. E., Jauniaux E., *et al.* (1997), Variations in expression of copper/zinc superoxide dismutase in villous trophoblast of the human placenta with gestational age. *Placenta*, **18**, 4, pp. 295-9.

- Watson A. L., Skepper J. N., Jauniaux E., *et al.* (1998), Changes in concentration, localization and activity of catalase within the human placenta during early gestation. *Placenta*, **19**, 1, pp. 27-34.
- Weier J. F., Weier H. U., Jung C. J., *et al.* (2005), Human cytotrophoblasts acquire aneuploidies as they differentiate to an invasive phenotype. *Dev Biol*, **279**, 2, pp. 420-32.
- Westerman B. A., Poutsma A., Maruyama K., *et al.* (2002), The proneural genes NEUROD1 and NEUROD2 are expressed during human trophoblast invasion. *Mech Dev*, **113**, 1, pp. 85-90.
- Williams T., Tjian R. (1991), Analysis of the DNA-binding and activation properties of the human transcription factor AP-2. *Genes Dev*, **5**, 4, pp. 670-82.
- Wilson E. A., Jawad M. J. (1982), Stimulation of human chorionic gonadotropin secretion by glucocorticoids. *Am J Obstet Gynecol*, **142**, 3, pp. 344-9.
- Winterhager E., Von Ostau C., Gerke M., *et al.* (1999), Connexin expression patterns in human trophoblast cells during placental development. *Placenta*, **20**, 8, pp. 627-38.
- Woessner J. F., Jr. (1991), Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J*, **5**, 8, pp. 2145-54.
- Wright J. K., Dunk C. E., Perkins J. E., *et al.* (2006), EGF modulates trophoblast migration through regulation of Connexin 40. *Placenta*, **27 Suppl A**, pp. S114-21.
- Xu J., Qiu Y., DeMayo F. J., *et al.* (1998), Partial hormone resistance in mice with disruption of the steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) gene. *Science*, **279**, 5358, pp. 1922-5.
- Xu P., Wang Y., Piao Y., *et al.* (2001), Effects of matrix proteins on the expression of matrix metalloproteinase-2, -9, and -14 and tissue inhibitors of metalloproteinases in human cytotrophoblast cells during the first trimester. *Biol Reprod*, **65**, 1, pp. 240-6.
- Yang J., Li Y., Ha Y., *et al.* (1999), [Study of a new kind of spectrometer coupled with flow injection and CCD diode array detection for multi-components simultaneous determination]. *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi*, **19**, 2, pp. 212-4.
- Yang M., Lei Z. M., Rao Ch V. (2003), The central role of human chorionic gonadotropin in the formation of human placental syncytium. *Endocrinology*, **144**, 3, pp. 1108-20.
- Yang X., Su K., Roos M. D., *et al.* (2001), O-linkage of N-acetylglucosamine to Sp1 activation domain inhibits its transcriptional capability. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 12, pp. 6611-6.
- Yarram S. J., Jenkins J., Cole L. A., *et al.* (2004), Epidermal growth factor contamination and concentrations of intact human chorionic gonadotropin in commercial preparations. *Fertil Steril*, **82**, 1, pp. 232-3.
- Yoshikawa T., Brkanac Z., Dupont B. R., *et al.* (1996), Assignment of the human nuclear hormone receptor, NUC1 (PPARD), to chromosome 6p21.1-p21.2. *Genomics*, **35**, 3, pp. 637-8.

Yu Q., Stamenkovic I. (2000), Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev*, **14**, 2, pp. 163-76.

Yuan C. X., Ito M., Fondell J. D., *et al.* (1998), The TRAP220 component of a thyroid hormone receptor- associated protein (TRAP) coactivator complex interacts directly with nuclear receptors in a ligand-dependent fashion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 14, pp. 7939-44.

Zdravkovic T., Genbacev O., McMaster M. T., *et al.* (2005), The adverse effects of maternal smoking on the human placenta: a review. *Placenta*, **26 Suppl A**, pp. S81-6.

Zenclussen A. C., Gerlof K., Zenclussen M. L., *et al.* (2006), Regulatory T cells induce a privileged tolerant microenvironment at the fetal-maternal interface. *Eur J Immunol*, **36**, 1, pp. 82-94.

Zhang X., Green K. E., Yallampalli C., *et al.* (2005), Adrenomedullin enhances invasion by trophoblast cell lines. *Biol Reprod*, **73**, 4, pp. 619-26.

Zhang Y., Proenca R., Maffei M., *et al.* (1994), Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, **372**, 6505, pp. 425-32.

Zhou Y., Damsky C. H., Chiu K., *et al.* (1993), Preeclampsia is associated with abnormal expression of adhesion molecules by invasive cytotrophoblasts. *J Clin Invest*, **91**, 3, pp. 950-60.

Zhou Y., Damsky C. H., Fisher S. J. (1997), Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. One cause of defective endovascular invasion in this syndrome? *J Clin Invest*, **99**, 9, pp. 2152-64.

Zhou Y., McMaster M., Woo K., *et al.* (2002), Vascular endothelial growth factor ligands and receptors that regulate human cytotrophoblast survival are dysregulated in severe preeclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome. *Am J Pathol*, **160**, 4, pp. 1405-23.

Zhu Y., Kan L., Qi C., *et al.* (2000), Isolation and characterization of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) interacting protein (PRIP) as a coactivator for PPAR. *J Biol Chem*, **275**, 18, pp. 13510-6.

Zhu Y., Qi C., Korenberg J. R., *et al.* (1995), Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPAR gamma) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR gamma isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 17, pp. 7921-5.

Zimmermann G., Ackermann W., Alexander H. (2011), Expression and Production of Human Chorionic Gonadotropin (hCG) in the Normal Secretory Endometrium: Evidence of CGB7 and/or CGB6 Beta hCG Subunit Gene Expression. *Biol Reprod*, pp.

Zybina T. G., Kaufmann P., Frank H. G., *et al.* (2002), Genome multiplication of extravillous trophoblast cells in human placenta in the course of differentiation and invasion into endometrium and myometrium. I. Dynamics of polyploidization. *Tsitologiia*, **44**, 11, pp. 1058-67.

Zygmunt M., Hahn D., Munstedt K., *et al.* (1998), Invasion of cytotrophoblastic JEG-3 cells is stimulated by hCG in vitro. *Placenta*, **19**, 8, pp. 587-93.

Zygmunt M., Herr F., Keller-Schoenwetter S., *et al.* (2002), Characterization of human chorionic gonadotropin as a novel angiogenic factor. *J Clin Endocrinol Metab*, 87, 11, pp. 5290-6.

Zygmunt M., McKinnon T., Herr F., *et al.* (2005), HCG increases trophoblast migration in vitro via the insulin-like growth factor-II/mannose-6 phosphate receptor. *Mol Hum Reprod*, **11**, 4, pp. 261-7.



Le placenta humain est un organe indispensable au maintien de la grossesse et au développement fœtal. Son unité structurale et fonctionnelle est la villosité choriale constituée principalement de trophoblastes qui se différencient selon la voie villeuse endocrine ou extravilleuse invasive. Ces deux populations trophoblastiques sécrètent de l'hormone chorionique gonadotrope humaine (hCG), hormone indispensable à la grossesse. C'est une glycoprotéine constituée de deux sous-unités : la sous-unité alpha commune avec la LH, FSH et la TSH et la sous-unité beta, spécifique à chaque hormone, codée par un cluster de gènes regroupés en type I (gène  $\beta 7$ ) et type II (gènes  $\beta 3$ , 5 et 8). L'hCG est sécrétée dans le compartiment maternel où elle joue un rôle endocrine essentiel au maintien de la grossesse en stimulant la production de progestérone par l'ovaire. L'hCG joue également un rôle localement en stimulant la différenciation de chaque type de trophoblaste. Elle présente, dans le sang maternel, un pic de sécrétion à 10-12 semaines d'aménorrhée (SA), période où le statut oxydatif placentaire change. En effet, les bouchons trophoblastiques obstruant la lumière des artères spiralées utérines se délitent à cette période, permettant l'entrée progressive du sang maternel dans la chambre intervillieuse. La pression en oxygène augmente de 18 mm Hg (8-9 SA, 1<sup>er</sup> trimestre précoce) à 60 mm Hg (12-14 SA, 1<sup>er</sup> trimestre tardif). Dans mon travail de thèse, j'ai cherché à mettre en évidence *in situ* et *in vitro* l'impact de ce changement de statut oxydatif sur la différenciation des trophoblastes villeux du 1<sup>er</sup> trimestre, et plus particulièrement sur l'expression des hCG beta de type I et de type II. J'ai ainsi mis en évidence que les trophoblastes villeux mononucléés du 1<sup>er</sup> trimestre précoce sécrétaient plus d'hCG beta de type I et II, fusionnaient plus rapidement et exprimaient un panel de facteurs de transcription différents par rapport aux trophoblastes villeux du 1<sup>er</sup> trimestre tardif. Dans un deuxième temps, j'ai comparé *in vitro* l'expression et la régulation des deux types d'hCG beta entre les trophoblastes villeux et extravilleux. J'ai montré que : 1) les trophoblastes villeux expriment plus d'hCG beta de type I et II que les trophoblastes extravilleux, 2) dans les deux cas l'hCG beta de type II est majoritaire et 3) PPAR $\gamma$  régule de façon opposée ces deux types d'hCG entre les trophoblastes villeux et extravilleux. Enfin j'ai mis en évidence que l'expression de ces deux types d'hCG était dérégulée dans la pré-éclampsie et le RCIU.

L'étude des mécanismes impliqués dans la régulation des gènes codants pour l'hCG représente un enjeu important pour la compréhension de la différenciation du trophoblaste humain, du développement précoce du placenta et des pathologies de la grossesse.

---

**Mots clés :** placenta humain, cytotrophoblastes villeux et extravilleux, 1<sup>er</sup> trimestre précoce et tardif, hCG beta de type I et de type II, PPAR gamma, Facteurs de transcription

---