



HAL
open science

EG-VEGF, nouvel acteur du développement placentaire : implications physiologiques et pathologiques

Sophie Brouillet

► To cite this version:

Sophie Brouillet. EG-VEGF, nouvel acteur du développement placentaire : implications physiologiques et pathologiques. Biologie cellulaire. Université de Grenoble, 2011. Français. NNT : 2011GREN038 . tel-01138898

HAL Id: tel-01138898

<https://theses.hal.science/tel-01138898>

Submitted on 2 Apr 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Biologie cellulaire**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Sophie BROUILLET

Thèse co-dirigée par le Dr. Nadia ALFAIDY
et par le Dr. Jean-Jacques FEIGE

préparée au sein du **Laboratoire Biologie du Cancer
et de l'Infection**
dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

EG-VEGF, nouvel acteur du développement placentaire : *implications physiologiques et pathologiques*

Thèse soutenue publiquement le **lundi 26 septembre 2011**,
devant le jury composé de :

Dr. Thierry FOURNIER

DR2 INSERM, rapporteur

Dr. Michel SAMSON

CR1 INSERM, rapporteur

Dr. Sophie ROUSSEAU

DR2 INSERM, examinateur

Dr. Daniel VAIMAN

DR2 INSERM, examinateur

Dr. Nadia ALFAIDY

CR1 INSERM, co-directrice de thèse

Dr. Jean-Jacques FEIGE

DR1 INSERM, co-directeur de thèse



TABLE DES MATIÈRES

| | |
|--|-----------|
| TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX | 5 |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS | 7 |
| INTRODUCTION | 9 |
| I. LE PLACENTA | 10 |
| 1.1 La grossesse humaine | 10 |
| 1.2 Mise en place du placenta humain | 11 |
| A. Phase préimplantatoire | 11 |
| B. Phase implantatoire | 11 |
| C. La placentation | 12 |
| ▪ Le stade pré-villeux | 12 |
| ▪ Le stade vilieux | 12 |
| 1.3 La phase de mise en place des structures villositaires | 13 |
| A. Le développement des villosités placentaires | 13 |
| B. Villosités crampons et villosités flottantes | 14 |
| 1.4 La coque et les bouchons trophoblastiques | 14 |
| 1.5 Remodelage des artères spiralées maternelles | 15 |
| 1.6 Evolution des villosités | 17 |
| 1.7 Morphologie du placenta à terme | 19 |
| 1.8 Conséquences d'un développement placentaire humain pathologique : le Retard de Croissance Intra-Utérin (RCIU) et la Toxémie Gravidique (TG) | 19 |
| A. Le Retard de Croissance Intra-Utérin (RCIU) | 19 |
| B. La Toxémie Gravidique (TG) | 21 |
| II. L'angiogenèse placentaire | 23 |
| 2.1 Le réseau vasculaire | 23 |
| A. La formation des vaisseaux sanguins | 24 |
| a) La vasculogenèse | 24 |
| b) L'angiogenèse | 25 |
| ▪ Angiogenèse et expansion du réseau primaire | 25 |
| ▪ Remodelage et maturation du réseau vasculaire | 26 |
| B. Les différents types de vaisseaux | 27 |
| C. Acteurs principaux de l'angiogenèse | 29 |
| a) La famille des VEGFs | 29 |
| ▪ VEGF-A | 29 |
| ▪ VEGF-B | 31 |
| ▪ Le VEGF-C | 31 |
| ▪ Le VEGF-D | 31 |
| ▪ Le VEGF-E | 31 |
| ▪ Le PlGF | 31 |
| b) Les autres facteurs | 32 |
| ▪ Les FGFs | 32 |
| ▪ Les PDGFs | 33 |
| ▪ Les Angiopoïétines | 33 |
| ▪ Les TGF- β | 33 |
| c) L'hypoxie et HIF | 34 |
| ▪ Régulation de HIF-1 dépendante de l'hypoxie | 34 |
| ▪ Régulation de HIF-1 indépendante de l'hypoxie | 35 |
| 2.2 Développement vasculaire placentaire | 36 |
| A. Vasculogenèse placentaire | 36 |
| B. L'angiogenèse placentaire | 37 |

| | |
|---|-----------|
| a) Du 32 ^{ème} JPF à la 27 ^{ème} SA | 37 |
| b) De la 17 ^{ème} à la 34 ^{ème} SA | 38 |
| c) De la 27 ^{ème} SA au terme | 38 |
| 2.3 Régulation de l'angiogenèse placentaire | 39 |
| A. Les facteurs de croissance | 39 |
| ▪ VEGF-A | 39 |
| ▪ PIGF | 40 |
| ▪ Les angiopoïétines | 41 |
| B. L'hypoxie | 41 |
| C. Les hormones | 42 |
| ▪ L'hCG | 42 |
| III. Hormone chorionique Gonadotrope humaine (hCG) | 43 |
| 3.1 Structure | 43 |
| A. Structure des gènes | 43 |
| B. Structure de la protéine | 43 |
| 3.2 Sécrétion | 43 |
| ▪ hCG chez l'homme et la femme non enceinte | 45 |
| 3.3 Fonctions | 45 |
| 3.4 hCG hyperglycosylée | 46 |
| 3.5 Récepteur LH/hCG (LH/CGR) | 46 |
| 3.6 Domaine de la reproduction et hCG | 47 |
| IV. Les Prokinéticines | 49 |
| 4.1 Les Prokinéticines et leurs récepteurs | 49 |
| A. Découverte des prokinéticines | 49 |
| B. Les gènes des prokinéticines | 50 |
| C. Les protéines des prokinéticines | 50 |
| D. Les récepteurs des prokinéticines | 52 |
| 4.2 Signalisation des prokinéticines | 52 |
| A. Voies de signalisation | 52 |
| a) Activation des récepteurs couplés aux protéines G | 52 |
| b) Régulation négative de la réponse induite par l'agoniste | 53 |
| ▪ Diminution de la concentration en agoniste | 54 |
| ▪ Désensibilisation des RCPG | 54 |
| ▪ Régulation négative de l'expression du récepteur | 54 |
| ▪ Internalisation des RCPG | 55 |
| c) Différentes protéines G | 55 |
| d) Les voies de signalisation connues des PROKRs | 55 |
| B. Affinités des prokinéticines pour leurs récepteurs | 56 |
| C. Rôles spécifiques des PROKRs | 56 |
| D. Dimérisation des récepteurs | 56 |
| 4.3 Localisation des prokinéticines et de leurs récepteurs | 57 |
| 4.4 Régulation des prokinéticines | 57 |
| A. Régulation par l'hypoxie | 57 |
| B. Régulation par les stéroïdes | 58 |
| C. Régulation par l'hCG | 58 |
| 4.5 Fonctions des prokinéticines | 59 |
| A. Le rythme circadien | 59 |
| B. Neurogenèse | 60 |
| C. Le système gastro-intestinal | 61 |
| D. Développement des cellules de la crête neurale | 61 |
| E. L'hématopoïèse et régulation de la réponse immune | 62 |
| F. La nociception | 62 |
| G. L'angiogenèse | 63 |
| a) Appareil reproducteur masculin : les testicules | 63 |

| | |
|---|-----------|
| b) Appareil reproducteur féminin _____ | 64 |
| ▪ Les ovaires _____ | 64 |
| ▪ L'endomètre _____ | 65 |
| c) Des effets angiogènes qui diffèrent selon l'origine vasculaire _____ | 66 |
| 4.6 PROK1/EG-VEGF et placenta _____ | 66 |
| A. Expression sérique d'EG-VEGF au cours de la grossesse _____ | 66 |
| B. Expression placentaire des prokinétines et de leurs récepteurs au 1 ^{er} trimestre _____ | 67 |
| a) Profil d'expression placentaire au 1 ^{er} trimestre de grossesse _____ | 67 |
| b) Localisation et expression cellulaire au 1 ^{er} trimestre _____ | 67 |
| C. Expression d'EG-VEGF et de ses récepteurs au 3 ^{ème} trimestre _____ | 68 |
| D. Régulation d'EG-VEGF et des PROKRs dans le placenta humain _____ | 68 |
| E. Rôle d'EG-VEGF sur les trophoblastes extravilloux (TEV) _____ | 68 |
| OBJECTIFS | 70 |
| RÉSULTATS | 72 |
| I. Effet d'EG-VEGF sur l'angiogenèse placentaire (première publication) | 73 |
| 1.1 Contexte _____ | 73 |
| 1.2 Discussion _____ | 76 |
| A. Bref résumé des résultats _____ | 76 |
| a) Expression des PROKRs dans les HPEC et les HUVEC _____ | 76 |
| b) Effet d'EG-VEGF sur la prolifération, la migration et la survie des HPEC et les HUVEC _____ | 76 |
| c) Effets angiogènes d'EG-VEGF sur les HPEC et les HUVEC _____ | 76 |
| d) Effet d'EG-VEGF sur la perméabilité des HPEC _____ | 77 |
| e) Implication des PROKRs dans l'angiogenèse et la perméabilité des HPEC _____ | 77 |
| f) Conclusion _____ | 77 |
| B. Discussion des résultats _____ | 78 |
| a) EG-VEGF a des effets différents sur les HPEC et les HUVEC _____ | 78 |
| ▪ les HPEC expriment plus fortement les PROKRs _____ | 78 |
| ▪ Différents répertoires de protéines G _____ | 78 |
| ▪ Une induction plus importante des P-MAP et P-AKT chez les HPEC _____ | 80 |
| ▪ Dimérisation des récepteurs _____ | 80 |
| b) Les PROKRs induisent des processus physiologiques différents _____ | 81 |
| c) Faible effet de VEGF sur les HPEC _____ | 81 |
| C. Conclusion des résultats _____ | 82 |
| II. Effet de l'hCG sur EG-VEGF et ses récepteurs (deuxième publication) | 83 |
| 2.1 Contexte _____ | 83 |
| A. Cultures primaires de trophoblastes = cultures in vitro _____ | 84 |
| B. Cultures organotypiques placentaires = cultures ex vivo _____ | 84 |
| 2.2 Discussion _____ | 85 |
| A. Bref résumé des résultats _____ | 85 |
| a) Expression du récepteur LH/CG dans les trophoblastes _____ | 85 |
| b) Régulation de l'expression protéique et de la sécrétion d'EG-VEGF par l'hCG _____ | 85 |
| ▪ Profil de sécrétion pour des placentas de 6-8 SA _____ | 85 |
| ▪ Profil de sécrétion pour des placentas de 9-11 SA _____ | 86 |
| c) Etude des mécanismes de régulation de l'hCG sur EG-VEGF _____ | 86 |
| ▪ Effet de l'hCG sur l'expression en ARNm d'EG-VEGF _____ | 86 |
| ▪ Voie de signalisation de l'hCG dans l'augmentation d'EG-VEGF _____ | 87 |
| d) Régulation de l'expression des PROKRs par l'hCG _____ | 87 |
| ▪ Régulation de l'expression de PROKR1 par l'hCG _____ | 87 |
| ▪ Régulation de l'expression de PROKR2 par l'hCG _____ | 88 |
| e) Conclusion : Schéma de synthèse des principales données _____ | 88 |
| B. Discussion des résultats _____ | 89 |
| a) Récepteur LH/CG dans le placenta humain _____ | 89 |
| ▪ Régulation de l'expression du récepteur LH/CG par l'hCG _____ | 89 |
| ▪ Fonctionnalité des récepteurs LH/CG au cours du 1 ^{er} trimestre : une explication possible pour l'existence des deux profils 6-8 SA et 9-11 SA. _____ | 89 |
| ▪ Régulation de l'activité des récepteurs LH/CG : une explication possible pour l'augmentation inversement proportionnelle d'EG-VEGF sous hCG à 9-11 SA. _____ | 90 |

| | |
|---|------------|
| b) Sécrétion de l'hCG par le placenta _____ | 90 |
| ▪ Justification des doses d'hCG utilisées dans les expériences _____ | 90 |
| ▪ Sécrétion endogène d'hCG par les trophoblastes en culture _____ | 91 |
| c) Effet de l'hCG sur l'expression d'EG-VEGF au 1 ^{er} trimestre de grossesse : deux profils différents selon l'âge gestationnel des placentas _____ | 91 |
| ▪ Les placentas de 9-11 SA répondent à des doses plus faibles d'hCG (dès 10 U.I./mL) _____ | 91 |
| ▪ L'augmentation d'EG-VEGF est inversement proportionnelle aux doses d'hCG utilisées pour les placentas de 9-11 SA _____ | 92 |
| d) Implication de ces résultats dans l'expression placentaire d'EG-VEGF dans la physiologie humaine au cours du 1 ^{er} trimestre de grossesse _____ | 94 |
| e) Sécrétion endogène d'EG-VEGF par les explants placentaires _____ | 95 |
| f) Effet de l'hCG sur les PROKRs _____ | 95 |
| C. Conclusion des résultats _____ | 96 |
| III. EG-VEGF et ses récepteurs dans les pathologies de la grossesse : cas du Retard de Croissance Intra-Utérin (troisième publication)..... | 97 |
| 3.1 Contexte _____ | 97 |
| 3.2 Discussion _____ | 99 |
| A. Bref résumé des résultats _____ | 99 |
| a) Effet d'EG-VEGF sur les trophoblastes _____ | 99 |
| b) Expression d'EG-VEGF et des PROKRs dans les grossesses RCIU _____ | 99 |
| c) Conclusion _____ | 99 |
| B. Discussion des résultats _____ | 100 |
| a) Rôle différentiel d'EG-VEGF sur les trophoblastes villosus et extravillous _____ | 100 |
| b) Facteur(s) responsable(s) de l'augmentation d'EG-VEGF dans les grossesses RCIU _____ | 100 |
| c) Augmentation d'EG-VEGF : cause ou conséquence du RCIU ? _____ | 101 |
| C. Conclusion des résultats _____ | 102 |
| IV. Conclusion générale _____ | 103 |
| DISCUSSION _____ | 105 |
| I. EG-VEGF dans la physiologie placentaire _____ | 106 |
| 1.1 EG-VEGF, un effet différentiel sur les TV et les TEV _____ | 106 |
| A. Implication potentielle dans le maintien d'une faible pO ₂ au cours du 1 ^{er} trimestre _____ | 106 |
| B. Implication potentielle d'EG-VEGF dans l'établissement de la normoxie placentaire _____ | 108 |
| 1.2 Implication potentielle d'EG-VEGF dans les échanges fœto-maternels _____ | 110 |
| II. EG-VEGF dans la reproduction _____ | 112 |
| 2.1 Implication dans la réceptivité endométriale _____ | 112 |
| 2.2 Implication dans la parturition _____ | 113 |
| III. Conclusion _____ | 114 |
| PERSPECTIVES _____ | 115 |
| I. Perspective n°1 : implication d'EG-VEGF dans les effets angiogènes de l'hCG _____ | 116 |
| II. Perspective n°2 : régulation d'EG-VEGF par l'hCG hyperglycosylée _____ | 117 |
| III. Perspective n°3 : Implication dans les pathologies de la grossesse _____ | 118 |
| 3.1 Taux d'EG-VEGF au 1^{er} trimestre dans la TG et le RCIU - Etude EGEVE _____ | 118 |
| 3.2 Effet d'un maintien pathologique d'EG-VEGF – Modèle murin _____ | 119 |
| CONCLUSION _____ | 120 |
| BIBLIOGRAPHIE _____ | 122 |

TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Le placenta humain | 10 |
| Figure 2 : La grossesse humaine | 10 |
| Figure 3 : De la fécondation à la morula | 11 |
| Figure 4 : Blastocyste | 11 |
| Figure 5 : Implantation du blastocyste | 12 |
| Figure 6 : Mise en place du placenta | 13 |
| Figure 7 : Formation des villosités choriales | 14 |
| Figure 8 : Barrière placentaire | 14 |
| Figure 9 : Représentation schématique des villosités choriales | 15 |
| Figure 10 : Coque trophoblastique | 15 |
| Figure 11 : Morphologie du placenta au 1er trimestre | 16 |
| Figure 12 : Les trophoblastes extravilleux | 16 |
| Figure 13 : Remodelage des artères spiralées maternelles à la fin du 1 ^{er} trimestre de grossesse | 17 |
| Figure 14 : Circulation utéro-placentaire | 17 |
| Figure 15 : Villosités d'un placenta de plus de 4 mois | 18 |
| Figure 16 : Organisation des capillaires fœtaux | 18 |
| Figure 17 : Vascularisation fœtale d'une villosité terminale | 19 |
| Figure 18 : Le placenta à terme | 19 |
| Figure 19 : Schéma classique des principales étapes nécessaires à la survenue de la TG | 21 |
| Figure 20 : Les différentes étapes de la vasculogénèse et de l'angiogénèse | 23 |
| Figure 21 : La vasculogénèse | 24 |
| Figure 22 : L'angiogénèse par bourgeonnement et intussusception | 25 |
| Figure 23 : Angiogénèse avec les phases d'activation et de stabilisation/maturation | 25 |
| Figure 24 : Représentation schématique du processus d'angiogénèse par intussusception | 25 |
| Figure 25 : Artérioles, veinules et capillaires | 27 |
| Figure 26 : Artère et veine | 28 |
| Figure 27 : Les artérioles, les veinules et les capillaires | 28 |
| Figure 28 : Différenciation de l'endothélium | 28 |
| Figure 29 : Récepteurs des VEGFs et fonctions biologiques associées | 29 |
| Figure 30 : Régulation d'HIF-1 α par hydroxylation | 34 |
| Figure 31 : Principales étapes de vasculogénèse et angiogénèse placentaire | 36 |
| Figure 32 : Angiogénèse arborescente à 8 SA | 37 |
| Figure 33 : Angiogénèse arborescente à 20 SA | 37 |
| Figure 34 : Angiogénèse sans branchement à terme avec allongement des capillaires | 38 |
| Figure 35 : Séquence en acides aminés des sous unités α et β de l'hCG | 43 |
| Figure 36 : Sécrétion plasmatique de l'hCG durant la grossesse normale | 43 |
| Figure 37 : Production d'hCG-H au cours de la grossesse | 46 |
| Figure 38 : Structure des gènes prokr1 et prokr2 | 50 |
| Figure 39 : Séquence d'acides aminés des protéines matures de la famille AVIT dans différentes espèces. | 50 |
| Figure 40 : Structure secondaire de MIT-1 et de la colipase | 51 |
| Figure 41 : Structure d'un RCPG avec les sept hélices alpha transmembranaires | 52 |
| Figure 42 : Alignement des séquences protéiques des récepteurs humains PROKR1 et PROKR2 | 52 |
| Figure 43 : Activation d'un RCPG | 53 |
| Figure 44 : Mécanismes de régulation de l'activité des RCPG | 54 |
| Figure 45 : L'activation des PROKRs peut impliquer de nombreuses voies intracellulaires de signalisation | 56 |
| Figure 46 : Affinités de PROK1 et PROK2 pour leurs récepteurs | 56 |
| Figure 47 : Schéma des étapes du cycle ovarien | 64 |
| Figure 48 : Expression de PROK1 dans l'endomètre au cours du cycle ovarien | 65 |
| Figure 49 : Profil d'expression sérique d'EG-VEGF au cours de la grossesse | 66 |
| Figure 50 : Expression d'EG-VEGF en ARNm et protéine au 1 ^{er} trimestre de grossesse | 67 |
| Figure 51 : Effet inhibiteur d'EG-VEGF sur l'invasion des TEV | 68 |
| Figure 52 : Expression d'EG-VEGF et VEGF dans le placenta au 1 ^{er} trimestre de grossesse | 73 |
| Figure 53 : Morphologie de cellules endothéliales HUVEC et HPEC | 74 |
| Figure 54 : Localisation des HPEC et des HUVEC | 74 |
| Figure 55 : Test de formation de réseaux pseudo-vasculaires | 75 |
| Figure 56 : Test de bourgeonnement de sphéroïdes | 75 |
| Figure 57 : EG-VEGF n'induit pas les mêmes effets sur les HPEC et les HUVEC | 78 |

| | |
|--|-----|
| Figure 58 : Effet de la toxine pertussique (PTX) sur les HPEC | 79 |
| Figure 59 : Voies de signalisation d'EG-VEGF | 80 |
| Figure 60 : Effet différentiel EG-VEGF dans les HPEC | 81 |
| Figure 61 : Expression de l'hCG et d'EG-VEGF au cours de la grossesse humaine | 83 |
| Figure 62 : Cinétique de traitement par l'hCG sur des CT et des ST | 84 |
| Figure 63 : Culture des explants placentaires | 84 |
| Figure 64 : Voie de signalisation de l'hCG dans le trophoblaste | 87 |
| Figure 65 : Schéma récapitulatif de la publication n°2 | 88 |
| Figure 66 : Extrapolation de nos résultats dans la physiologie placentaire | 94 |
| Figure 67 : Affiche de l'étude clinique EGEVE | 103 |
| Figure 68 : Schéma récapitulatif des effets d'EG-VEGF dans la villosité chorale | 106 |
| Figure 69 : Implication de nos résultats dans la placentation au 1 ^{er} trimestre | 107 |
| Figure 70 : Implication de nos résultats dans la placentation au 1 ^{er} et 2 ^{ème} trimestre | 108 |
| Figure 71 : Participation des différents types d'angiogenèse | 110 |
| Figure 72 : Les effets de l'hCG sur l'angiogenèse placentaire passeraient-ils par EG-VEGF ? | 117 |
| Figure 73 : L'hCG augmente le bourgeonnement des sphéroïdes d'HPEC | 117 |

| | |
|--|----|
| Tableau 1 : Localisation des PROKs et des PROKRs | 58 |
|--|----|

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AC : Adenylyl Cyclase
ACTX : MIT-like AtracoToXin
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ADNc : ADN complémentaire
AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique
Ang : Angiopoïétines
ARN : Acide RiboNucléique
ARNm : ARN messenger
BAEC : Bovine Aorta Endothelial Cells
BCEC : Bovine Capillary Endothelial Cells
bFGF : basic Fibroblast Growth Factor (= FGF-2)
bHLH : basic Helix-Loop-Helix
BO : Bulbe Olfactif
Bv8 : Bombina variegata 8
CD-31 : Cluster of Differentiation 31
CITED : CBP Interacting Transactivator ED-rich tail
CT : CytoTrophoblaste
EGF : Epidermal Growth Factor
EG-VEGF : Endocrine Gland-derived Vascular Endothelial Growth Factor
FGF : Fibroblast Growth Factor
FIH : Factor Inhibiting HIF
Flk-1 : Fetal liver kinase-1 (=VEGFR-2)
Flt-1 : Fms like tyrosine kinase-1 (=VEGFR-1)
FSH : Follicle-Stimulating Hormone
GAG : GlycosAminoGlycanes
GAP : GTPase-Activating Protein
GC : Guanylyl Cyclase
GDP : Guanosine DiPhosphate
Gi : protéine G inhibitrice
GnRH : Gonadotropin-Releasing Hormone
GRK : G protein-coupled Receptor Kinase
GTP : Guanosine TriPhosphate
hCG : human Chorionic Gonadotropin
hCG-H : hCG Hyperglycosylé
hCS : human Chorionic Somatomammotropic hormone
HELLP : Hemolysis Elevated Liver enzymes & Low Platelet count
HIF : Hypoxia-Inducible Factor
HPEC : Human Placental Endothelial Cell
hPL : human Placental Lactogen
HRE : Hypoxia Response Element
HSPG : ProtéoGlycanes à Sulfate d'Héparane
HUVEC : Human Umbilical Vein Endothelial Cells
IL-1 : InterLeukine-1
JPF : Jours Post-Fécondation
LDL : Low Density Lipoprotein
LEC : Luteal Endothelial Cells
LH : Luteinizing Hormone

LH/CGR : Luteinizing Hormone/ChorioGonadotropin Receptor
LIF : Leukemia Inhibiting Factor
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
MFIU : Mort Fœtale *In Utero*
min : minute(s)
MIT : Mamba Intestinal Toxin
MMP : Matrix MetalloProteinase
NRP : NeuRoPiline
NSC : Noyau SupraChiasmaticque
ODD : Oxygen-dependent Degradation Domain
PDGF : Platelet-Derived Growth Factor
PHD : Prolyl Hydroxylase Domain
PI3K : PhosphoInositide 3-Kinase
PKA : Protein Kinase A
PKC : Protein Kinase C
PLA2 : PhosphoLipase A2
PLC : PhosphoLipase C
PIGF : Placental Growth Factor
P-MAPK : Phosphorylated Mitogen-Activated Protein Kinase
pO₂ : pression en Oxygène
PPAR-γ : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-**gamma**
PROK : PROKineticin
PROKR : PROKineticin Receptor
RCIU : Retard de Croissance IntraUtérin
RCPG : Récepteurs Couplés aux Protéines G
SA : Semaine(s) d'Aménorrhée
SF : Souffrance Fœtale
SF1 : Steroidogenic Factor-1
SG : Semaine(s) de Grossesse
ST : SyncytioTrophoblaste
sVEGFR : soluble VEGFR
TEV : Trophoblastes Extra-Villeux
TG : Toxémie Gravidique
TGF-β : Transforming Growth Factor-**beta**
TNF-α : Tumor Necrosis Factor-**alpha**
TSH : Thyroid-Stimulating Hormone
UEA : Ulex EuropAeus
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
VHL : Von Hippel Lindau
VPF : Vascular Permeability Factor
VPRA : Venom PRotein A

INTRODUCTION

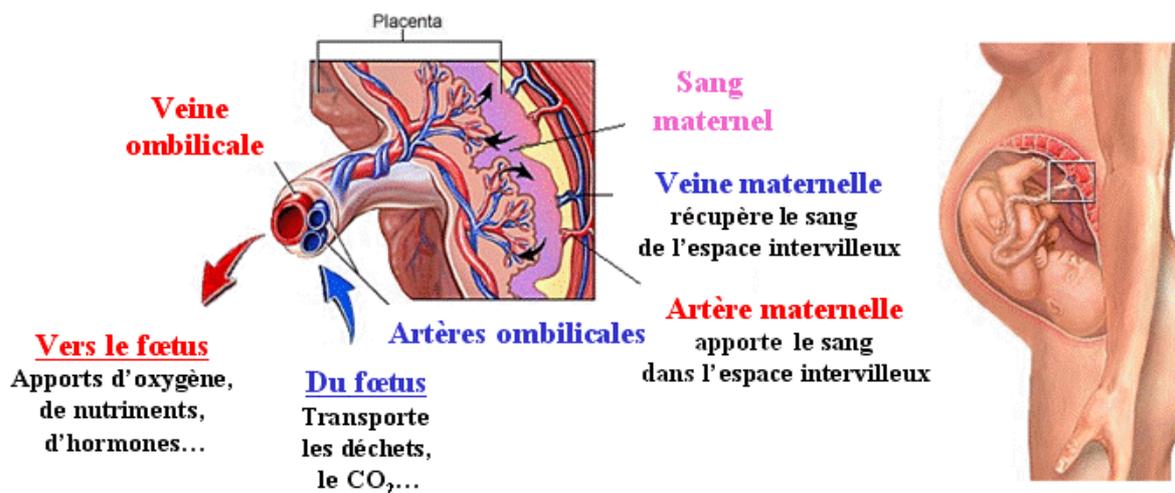


Figure 1 : Le placenta humain. Schéma adapté de <http://www.lifespan.org/adam/graphics/images/es/19505.jpg>

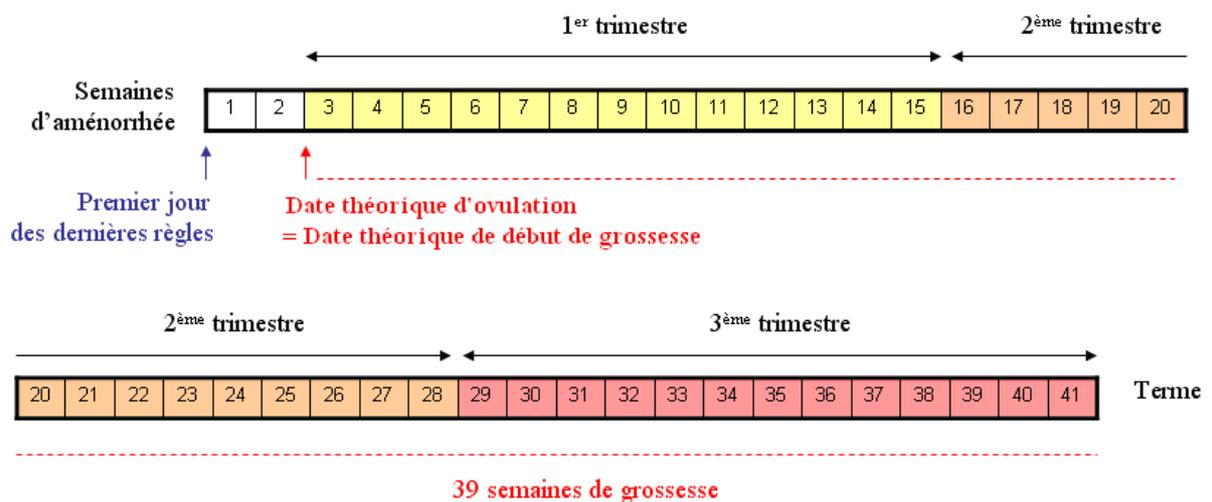


Figure 2 : La grossesse humaine. Elle se déroule sur 41 semaines d'aménorrhée ou 39 semaines de grossesse.

I. LE PLACENTA

Le placenta est un organe permettant les échanges sanguins et nutritionnels entre le fœtus et la mère au cours de la grossesse. Cet organe est transitoire. Il connecte physiquement et biologiquement l'embryon à la paroi utérine (voir figure 1). Il fait partie des annexes embryofœtales, qui sont composées du cordon ombilical, du placenta, et des membranes amniotiques dont l'amnios, qui est en contact avec le liquide amniotique, et le chorion, qui est en contact avec la muqueuse utérine. Le placenta se fond en partie avec la muqueuse utérine, on le dit *fœto-maternel*. Chez les primates et d'autres groupes comme les rongeurs, le placenta est dit *hémochorial*, car les villosités placentaires sont directement en contact avec le sang maternel. Bien plus qu'un simple organe protecteur, il assure plusieurs fonctions essentielles pour le développement fœtal. Le placenta est une annexe embryonnaire caractéristique des mammifères dits euthériens (ou mammifères placentaires), mais il existe également sous d'autres formes chez les mammifères marsupiaux et chez certains reptiles (Gilbert 2006, Mossman 1987). Le placenta assure plusieurs fonctions essentielles pour le développement fœtal : des fonctions nutritives, respiratoires, excrétrices, endocrines, immunologiques, et de protection contre certains agents toxiques et/ou pathogènes.

1.1 La grossesse humaine

La grossesse humaine dure environ 39 semaines entre la fécondation et l'accouchement. Elle se divise en trois périodes de trois mois chacune, période communément appelée *trimestre*. Il existe deux façons de calculer l'âge d'une grossesse : les *semaines d'aménorrhée* (SA) et les *semaines de grossesse* (SG) (voir figure 2). La semaine d'aménorrhée, terme qui signifie l'absence de menstruation, est une unité de mesure du temps utilisée en Obstétrique. Elle représente le nombre de semaines écoulées depuis le premier jour des dernières règles de la femme enceinte. En utilisant cette unité de mesure, la grossesse humaine se déroule donc sur 41 SA (correspondant à 39 semaines de grossesse plus 2 semaines entre le premier jour des dernières règles et la fécondation). Par contre, lorsque l'on s'exprime en semaines de grossesse (ou en semaines de développement), on ne compte que le nombre de semaines qui suivent la fécondation. Par convention, on estime que cette dernière se produit généralement au début de la troisième semaine d'aménorrhée : il y a donc un décalage de deux semaines entre les SA et les SG.

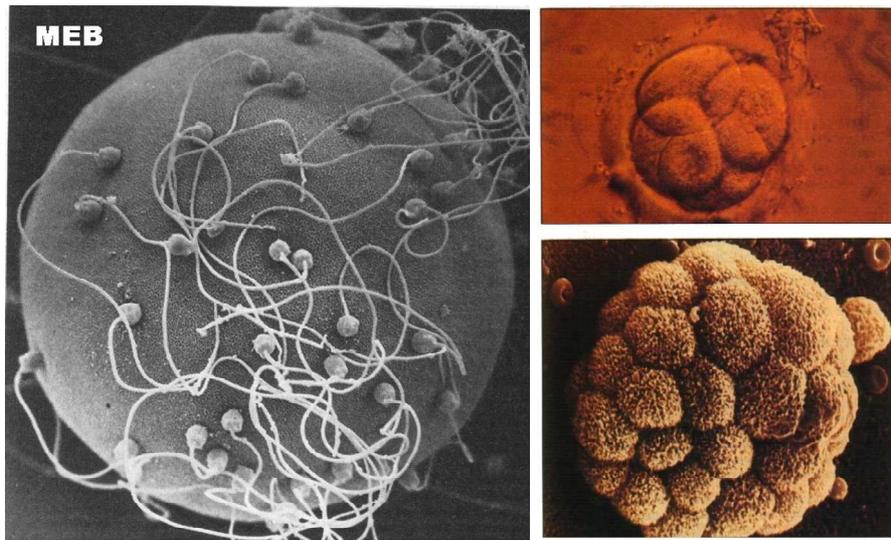


Figure 3 : De la fécondation à la morula. Embryon (150 μ m) à 2 jours après fécondation (en haut à droite) et à 4 jours après fécondation (en bas à droite).
 Images de <http://imagesbiogeolfxm.free.fr/reproduction/thumb.html>

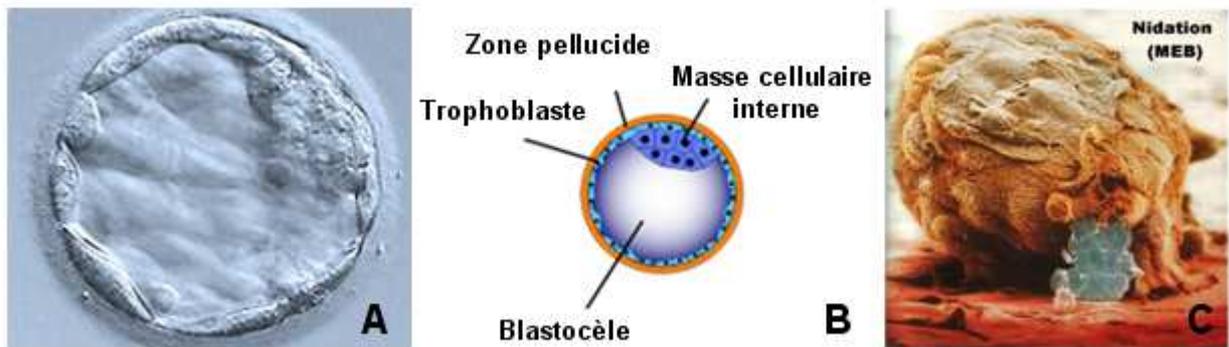


Figure 4 : Blastocyste. A- Image de © *Institute of Human Genetics/Newcastle University*. B- Schéma adapté de <http://commons.wikimedia.org/wiki/Accueil>. C- Nidation du blastocyste. Image de <http://imagesbiogeolfxm.free.fr/reproduction/thumb.html>

J'utiliserai dans un premier temps les *jours post-fécondation* (JPF) comme unité de mesure du temps de la grossesse dans mon manuscrit de thèse, puis dans un deuxième temps les semaines d'aménorrhée (sauf indication contraire exceptionnelle) pour les stades plus avancés de la grossesse. Ce choix en faveur des SA s'est fait en raison de la connaissance précise du premier jour des règles, contrairement au jour de la fécondation, qui est estimé, et qui peut varier selon les femmes.

1.2 Mise en place du placenta humain

A. Phase préimplantatoire

La fécondation de l'ovule par le spermatozoïde dans la trompe de Fallope se produit 24h à 48h après l'ovulation (voir figure 3). Durant les premiers jours de développement, le zygote humain se divise sans augmentation de taille à l'intérieur de la zone pellucide¹. Il avance progressivement dans la trompe et pénètre dans la cavité utérine 2 à 3 jours après la fécondation. Le stade *morula*, correspondant à un embryon de 16 cellules environ, est atteint au 4^{ème} JPF. Les divisions cellulaires se poursuivent sans augmentation de taille au stade *morula*, et mènent à la transformation de l'embryon par un phénomène de compaction en blastocyste². Les cellules localisées à la surface se différencient alors en trophoblastes, et forme le trophoctoderme. Ces cellules donneront par la suite les structures extra-embryonnaires, avec le placenta entre autres. Les cellules de la masse interne du blastocyste donneront quant à elles l'embryon (voir figure 4). A partir du stade blastocyste, l'embryon va alors grossir et sortir de la zone pellucide, permettant alors le contact direct entre les trophoblastes du blastocyste et l'endomètre³ de l'utérus.

B. Phase implantatoire

Au contact de l'endomètre maternel, correspondant au 6^{ème} JPF environ, les cytotrophoblastes entourant le blastocyste se différencient, fusionnent et forment le syncytiotrophoblaste (ST) (voir figure 5). Les ST sont en contact direct avec la circulation maternelle dès la deuxième semaine de développement (correspondant à 4 SA), et participent à la séparation des circulations maternelle et fœtale, ainsi qu'au contrôle des échanges fœto-maternels.

¹ coque glycoprotéique qui entoure l'ovocyte.

² stade embryonnaire caractérisé par la formation d'une cavité interne remplie de fluide, le blastocèle.

³ tapis tissulaire et sécrétoire qui enrobe l'intérieur de la cavité utérine.

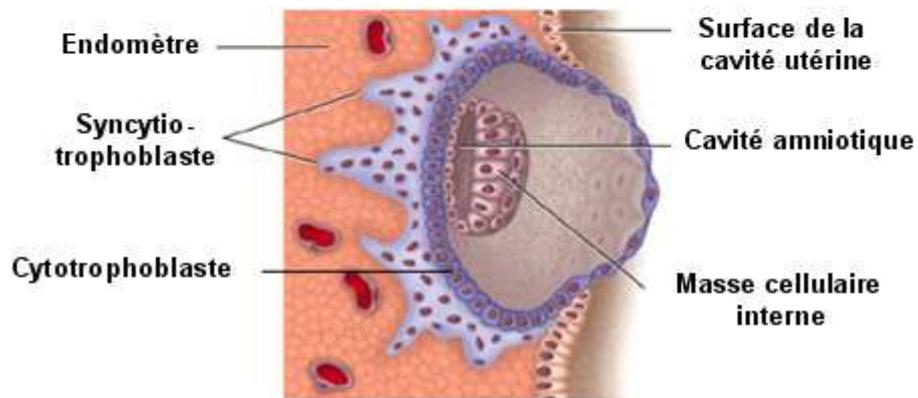
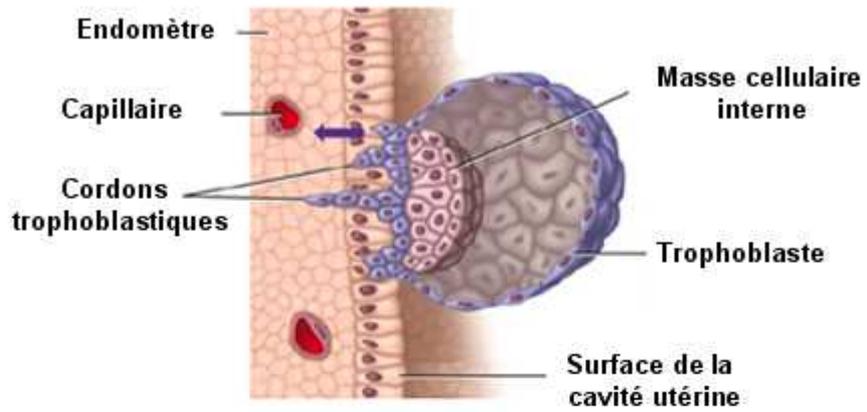


Figure 5 : Implantation du blastocyste. Schémas adaptés de la figure 20-25, Sherwood 2007 Human physiology: from cells to systems.

C. La placentation

La placentation commence avec l'implantation du blastocyste dans la muqueuse utérine. Le bouton embryonnaire se différencie alors en tissus embryonnaires, et les trophoblastes en tissus extra-embryonnaires. Les trophoblastes prolifèrent, se ramifient comme des racines, en érodant la muqueuse utérine (voir figure 5). Il y a deux stades dans le développement placentaire : un stade pré-villeux (entre le 6^{ème} et le 13^{ème} JPF), et un stade villeux (du 13^{ème} JPF à l'accouchement) (voir figure 6).

▪ Le stade pré-villeux

Au contact de la muqueuse utérine, les cytotrophoblastes qui dérivent du trophoctoderme du blastocyste se différencient et fusionnent pour former le syncytiotrophoblaste, couche multinucléée qui ne se divise pas et qui va envahir l'endomètre. Le ST tient le rôle de l'unité endocrine placentaire, puisqu'il sécrète de nombreuses hormones de la grossesse, en particulier l'hCG (human Chorionic Gonadotropin). Si l'embryon se nourrit par simple diffusion au cours de la 1^{ère} semaine de développement, sa croissance rapide rend indispensable la mise en place d'un système d'échange plus performant. Il s'agit du développement de la *circulation utéro-placentaire*, permettant les échanges des gaz et des métabolites. Ce système se met en place dès le 9^{ème} JPF, et commence par le stade dit *lacunaire* (voir figure 6-JPF 9). Des lacunes vont se former rapidement dans le syncytiotrophoblaste et se remplir peu à peu de sang grâce à l'érosion des vaisseaux maternels, mettant ainsi en contact les cellules trophoblastiques avec les composants sanguins de la mère. Ce contact va cesser avec l'établissement de la coque trophoblastique aux alentours de la 5^{ème} SA (voir partie I-1.4 pour plus de détails).

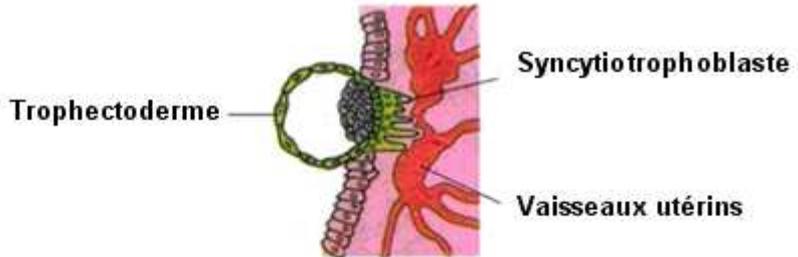
▪ Le stade villeux

L'unité structurale et fonctionnelle du placenta est la *villosité choriale*. La mise en place des structures villositaires commence dès le stade lacunaire. Les lacunes du syncytiotrophoblaste vont progressivement communiquer entre elles pour former une cavité unique, limitée par du syncytiotrophoblaste, appelée l'*espace intervilloux* (voir figure 6-JPF 18). Le stade villeux se met en place à partir du 13^{ème} JPF environ, et se poursuit jusqu'à l'accouchement.

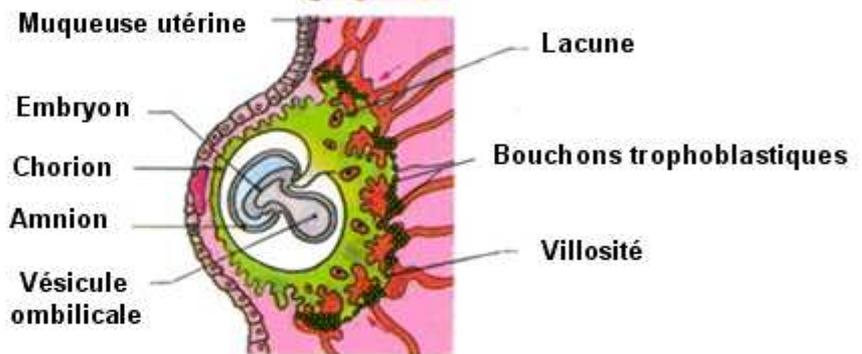
JPF 5 ou 6



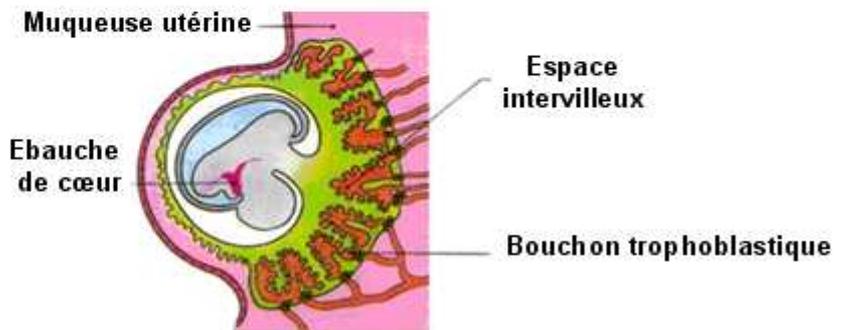
JPF 7



JPF 9



JPF 18



1 mois

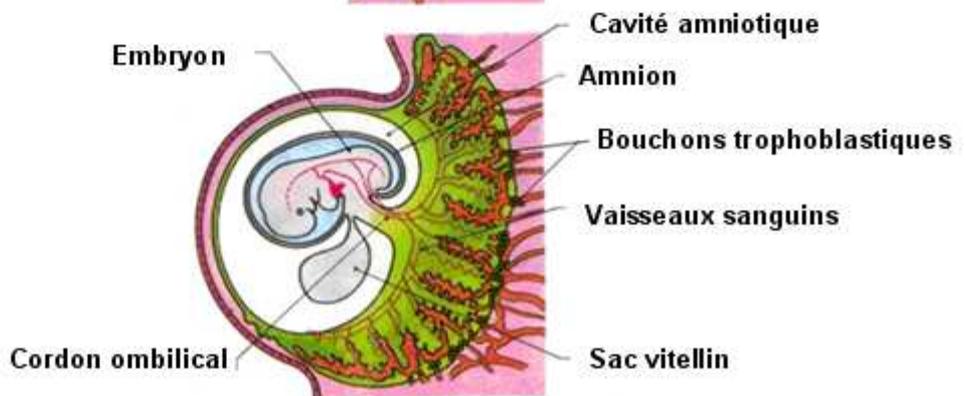


Figure 6 : Mise en place du placenta. Les jours et les mois correspondent ici au temps écoulé depuis la fécondation. Image adaptée de <http://imagesbiogeolfxm.free.fr/reproduction/thumb.htm>

1.3 La phase de mise en place des structures villositaires

A. Le développement des villosités placentaires

Le stade vilieux du développement placentaire comprend deux périodes : une période d'*élaboration placentaire*, du 13^{ème} JPF à la fin du quatrième mois, et une période *stationnaire*, où le placenta est formé et se développe par croissance du système vasculaire principalement, du cinquième mois au terme (Mihu et al. 2009). La période d'élaboration placentaire est caractérisée par la formation des villosités choriales (voir figure 7).

- Formation des villosités primaires

La formation de ces structures villositaires commence dès le stade lacunaire, lorsque les cytotrophoblastes débutent une multiplication cellulaire intense, s'insinuent et poussent les travées de syncytiotrophoblastes, formant alors des excroissances qui envahissent la paroi utérine. Aussi longtemps que ces excroissances sont composées de cytotrophoblastes seulement, elles sont dénommées *villosités primaires*.

- Formation des villosités secondaires

Dès le 16^{ème} JPF, le mésoblaste extra-embryonnaire bordé de cytotrophoblastes pénètre dans le tronc de ces villosités primaires, transformant celles-ci en *villosités secondaires* (voir Figure 7). Ces villosités s'étendent peu à peu jusqu'aux lacunes remplies de sang maternel.

- Formation des villosités tertiaires

Vers le 21^{ème} JPF, le mésoblaste extra-embryonnaire se différencie en tissu conjonctif et en vaisseaux sanguins par un processus de vasculogénèse, fournissant ainsi des vaisseaux sanguins connectés avec ceux de l'embryon (Demir et al. 1989). Les villosités contenant des vaisseaux sanguins différenciés sont appelées *villosités tertiaires* (voir Figure 7). Une fois formées, elles peuvent se ramifier et générer d'autres villosités. A partir de ce moment, les diffusions des gaz, des éléments nutritifs, et des déchets se font à travers quatre couches de tissus :

- ⇒ l'endothélium capillaire des villosités placentaires,
- ⇒ le tissu conjonctif lâche qui en occupe l'axe,
- ⇒ le cytotrophoblaste,
- ⇒ et le syncytiotrophoblaste.

L'ensemble de ces éléments forme la *barrière placentaire* (voir figure 8).

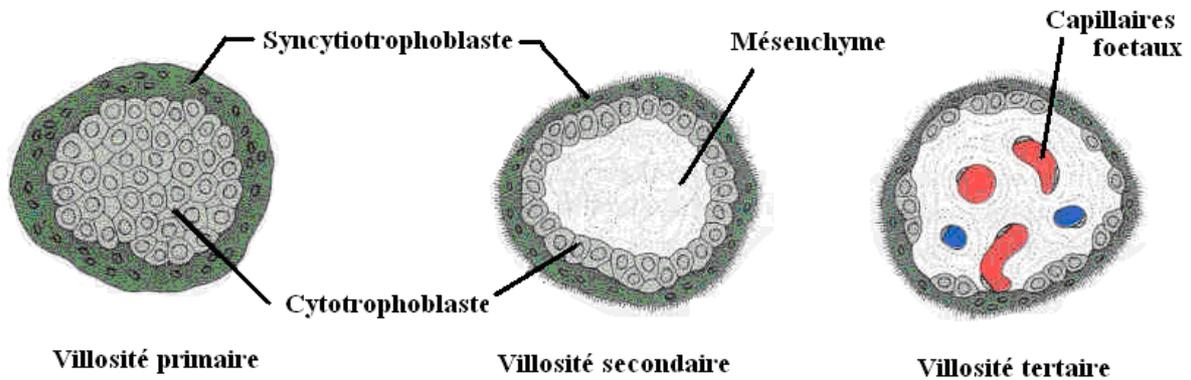


Figure 7 : Formation des villosités chorales. Schéma adapté de <http://www.md.ucl.ac.be/didac/anat110/Chapitre1/placenta1.png>

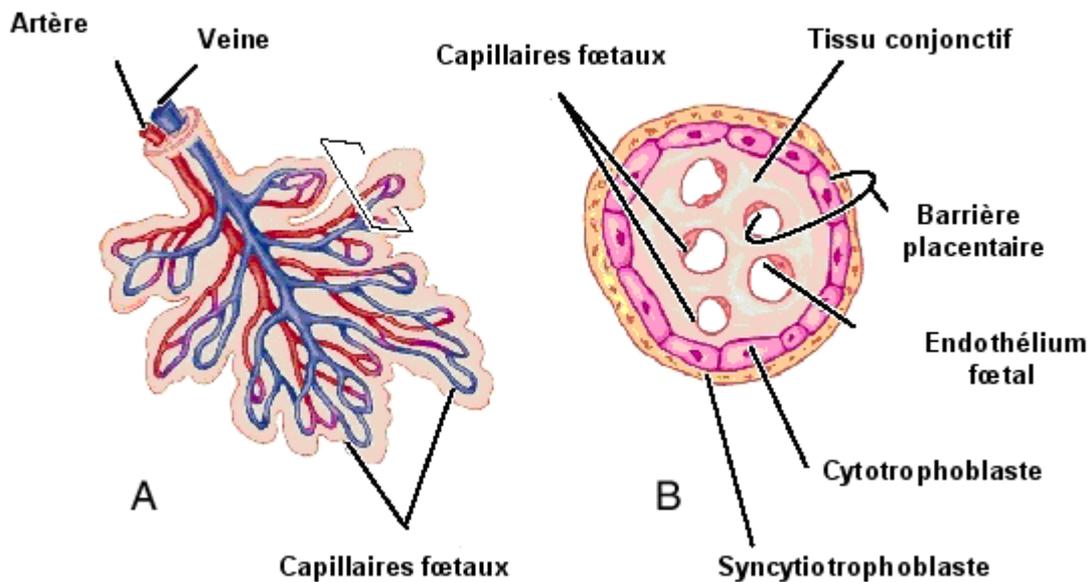


Figure 8 : Barrière placentaire. Elle sépare le sang des capillaires fœtaux du sang maternel contenu dans l'espace intervilloux. A- Les villosités chorales contiennent des vaisseaux fœtaux et baignent dans le sang maternel dans l'espace intervilloux. B- Coupe transversale d'une villosité chorale. On peut voir les différentes couches de la barrière placentaire qui sépare la circulation fœtale de la circulation maternelle. Schéma adapté de http://img.tfd.com/dorland/membrane_placental.jpg

B. Villosités crampons et villosités flottantes

Le placenta humain est caractérisé par l'invasion de la muqueuse utérine par les cellules trophoblastiques, créant ainsi une zone de contact direct entre le sang maternel et les cellules du placenta, c'est la *placentation hémochoriale*. Certaines villosités tertiaires du placenta sont ancrées dans la muqueuse utérine, ce sont les *villosités crampons*. Les *villosités flottantes*, quant à elles, baignent librement dans l'espace intervilloux (voir figure 9). Pendant le développement placentaire, les cytotrophoblastes peuvent se différencier selon deux voies distinctes (Cross J. C. et al. 1994). Dans les villosités flottantes, les CT peuvent uniquement fusionner pour former le syncytiotrophoblaste, couche cellulaire externe de la villosité en contact direct avec le sang maternel. Le syncytiotrophoblaste ne possède pas d'activité mitotique mais se renouvelle en permanence par l'incorporation de cytotrophoblastes qui fusionnent avec la couche préexistante (Huppertz and Kingdom 2004). Ces trophoblastes villositaires tapissent alors l'ensemble de la villosité chorale. Dans les villosités crampons, les CT peuvent se différencier en ST, et former également des colonnes de trophoblastes extravilloux (TEV) à la base des villosités crampons (voir figure 9 et 10).

1.4 La coque et les bouchons trophoblastiques

Le développement placentaire se déroule en milieu hypoxique pendant le 1^{er} trimestre de grossesse, protégeant ainsi les villosités chorales du stress oxydant. Pendant la première partie du 1^{er} trimestre de grossesse, les cytotrophoblastes extravilloux vont s'étendre et s'intercaler entre la couche syncytiotrophoblastique et la muqueuse utérine, recouvrant ainsi l'ensemble de la face maternelle du placenta d'une *coque trophoblastique* (voir figure 9 et figure 10). Elle semble présente à partir de la 5^{ème} SA et disparaît graduellement à partir de la 10^{ème} SA. Les cytotrophoblastes extravilloux de cette coque trophoblastique vont également proliférer à l'intérieur des artères spiralées maternelles, ce sont les *cytotrophoblastes extravilloux endovasculaires*. Ils vont former rapidement des *bouchons trophoblastiques*, obstruant les artères spiralées et empêchant ainsi le sang maternel fortement oxygéné de pénétrer dans l'espace intervilloux (voir figure 10). Un percolât dépourvu d'éléments figurés sanguins remplit alors l'espace intervilloux, grâce à la filtration du sang maternel au travers des bouchons trophoblastiques, maintenant l'espace intervilloux dans un environnement hypoxique (Burton et al. 2002, Hustin and Schaaps 1987). Ces bouchons ont pour fonction de protéger le placenta d'une oxygénation trop précoce, et ainsi de lui permettre de bénéficier

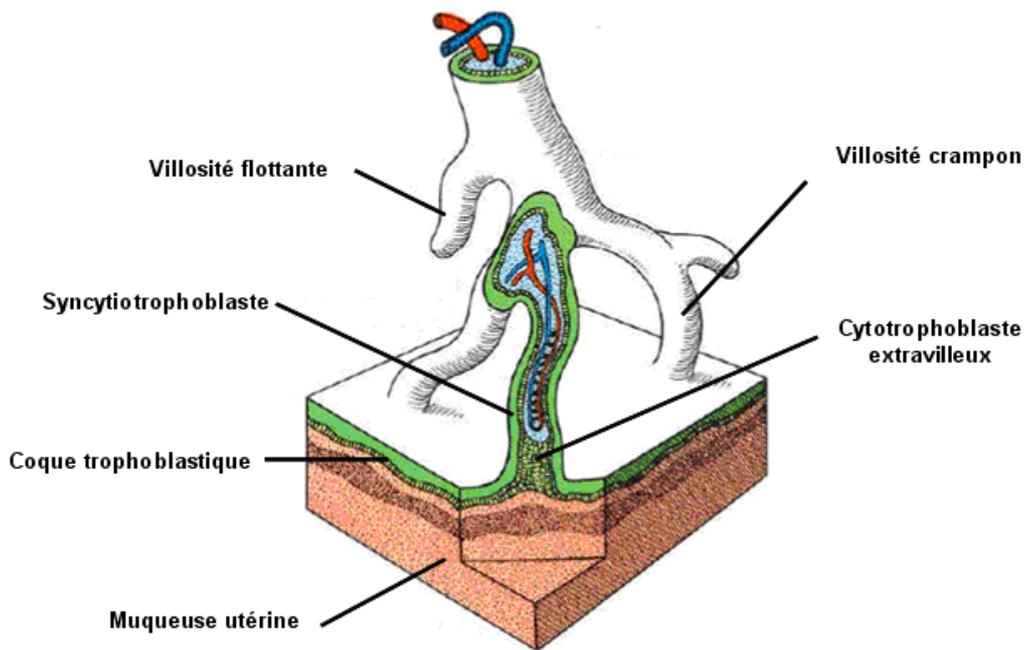


Figure 9 : Représentation schématique des villosités choriales. Schéma adapté de <http://homepage.mac.com/danielbalas/EMBRYO/embdes/embdes22.jpg>

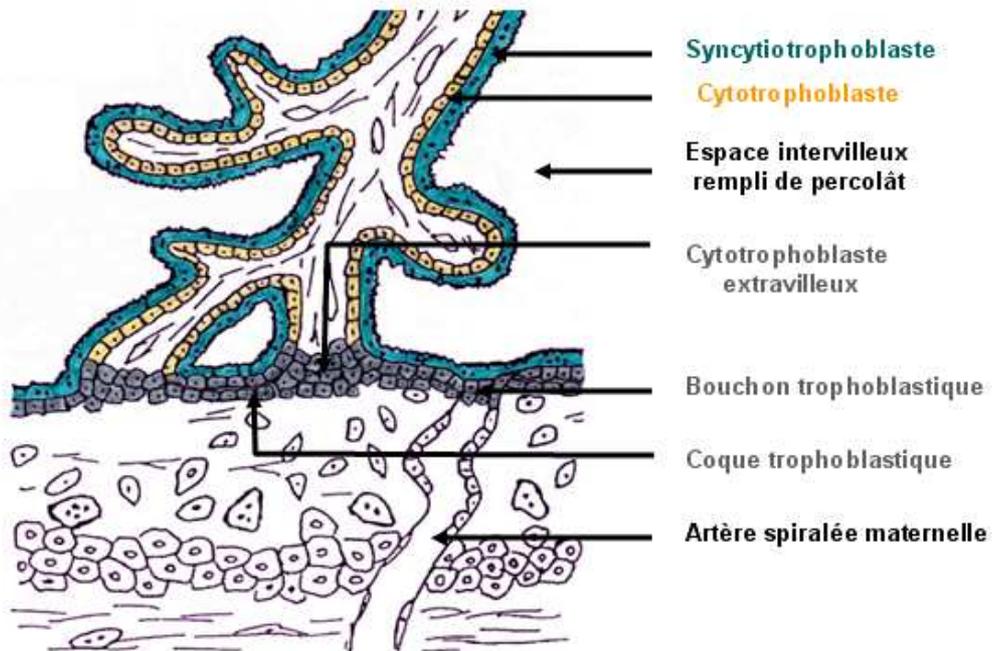


Figure 10 : Coque trophoblastique (en gris). Schéma adapté de (Fournier et al. 2007).

d'un environnement pauvre en oxygène jusqu'à la fin du 1^{er} trimestre environ, ce qui est nécessaire à la poursuite d'une grossesse normale.

Au début du développement placentaire, les villosités se développent tout autour de l'embryon et forment une « boule chevelue » (voir 6 SA figure 11, à gauche). Vers la fin du 1^{er} trimestre, les villosités vont régresser sur une grande partie de cette sphère, ne laissant plus que les membranes fœtales, formées de l'amnion et du chorion (voir *Trois mois* figure 11, à droite). Les mécanismes régulant ces événements sont encore mal connus, mais seraient liés à la fonctionnalité des bouchons trophoblastiques qui obstruent les artères spiralées maternelles pendant la première partie du 1^{er} trimestre de grossesse. En effet, la profondeur de l'invasion trophoblastique serait différente selon les régions placentaires, avec une invasion superficielle à la périphérie et une invasion plus profonde au centre du placenta (Pijnenborg et al. 1980, Pijnenborg et al. 1981). C'est l'oxygène et ses dérivés actifs qui induiraient l'apoptose des trophoblastes et provoqueraient une involution des villosités (Jauniaux et al. 2003). L'invasion différentielle des artères spiralées par les cytotrophoblastes extravilleux endovasculaires participerait à la formation de bouchons trophoblastiques moins fonctionnels au fur et à mesure que l'on s'éloigne du centre du disque placentaire. Un flux sanguin maternel oxygéné toucherait alors en premier les villosités situées en périphérie du disque placentaire en développement, ce qui ne permettrait qu'aux villosités les plus proches de l'insertion du cordon ombilical de se développer et de se protéger de l'oxygène transporté par le sang maternel. (Burton et al. 2003, Jauniaux et al. 2000b, Jauniaux et al. 2003).

1.5 Remodelage des artères spiralées maternelles

Dès la fin du 1^{er} trimestre de la grossesse, les bouchons trophoblastiques s'ouvrent progressivement et permettent au sang maternel oxygéné de pénétrer dans la chambre intervillieuse. Cet afflux de sang maternel dans l'espace intervillieux est un processus progressif, où la communication avec les artères spiralées maternelles est établie au départ pour un faible nombre de vaisseaux aux alentours de 10 SA, puis augmente rapidement (Burchell 1967). A partir des 10-12^{ème} SA, les TEV vont se différencier, acquérir un phénotype invasif transitoire et envahir l'endomètre ainsi que le premier tiers du myomètre⁴.

⁴ couche musculieuse interne de la paroi utérine.

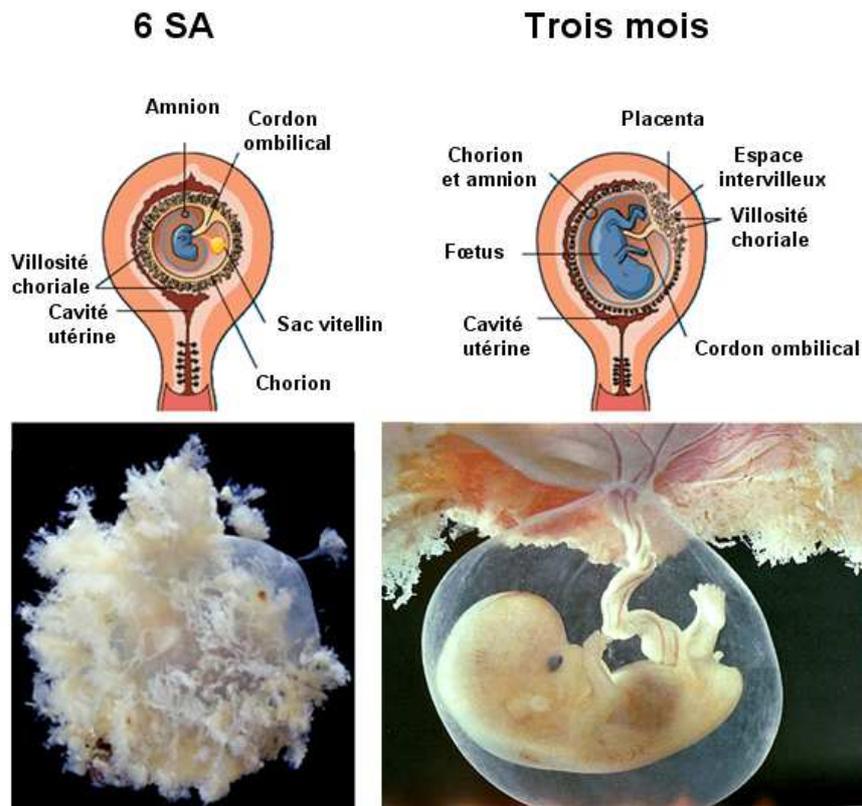


Figure 11: Morphologie du placenta au 1^{er} trimestre. Boule chevelue (à gauche). Régression des villosités sauf celles situées autour du cordon (à droite). Schémas adaptés de © *Encyclopaedia Britannica, Inc.* Image de la boule chevelue <http://www.embryology.ch/anglais/fplacenta/villosite07.html>. Embryon de <http://www.medgadget.com/archives/img/placenta.GIF>

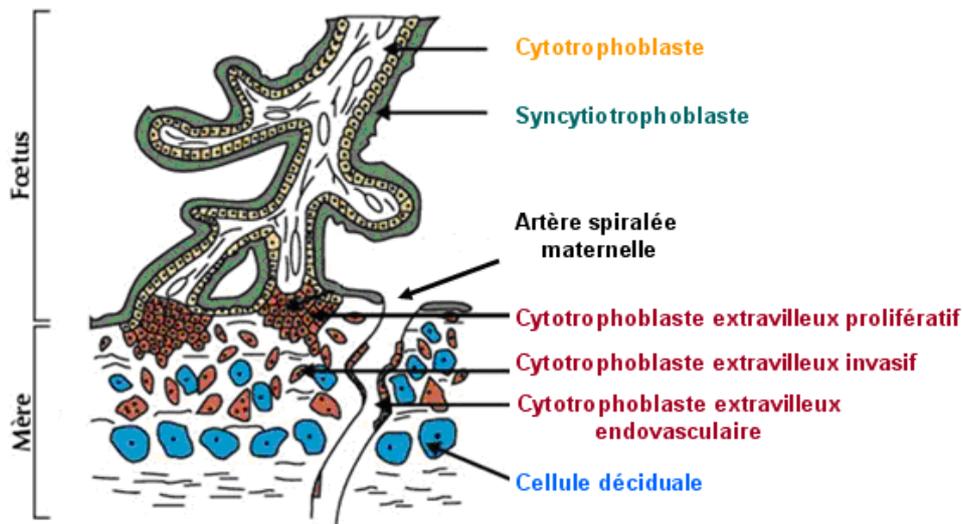


Figure 12 : Les trophoblastes extravilloux. Ils migrent et viennent coloniser les artères spiralées maternelles. Schéma adapté de (Fournier et al. 2007).

On distingue deux populations de TEV : les *cytotrophoblastes extravilleux endovasculaires* et les *cytotrophoblastes extravilleux interstitiels*, qui participent ensemble au remodelage des artères spiralées (voir figure 12) (Kaufmann et al. 2003). Les TEV endovasculaires migrent en suivant la lumière vasculaire pendant le 1^{er} trimestre et la première moitié du 2^{ème} trimestre de la grossesse, et remplacent progressivement les cellules endothéliales. Les TEV interstitiels quant à eux envahissent la muqueuse utérine, migrent et érodent les parois des artères spiralées. Cette infiltration trophoblastique nécessite la mise en œuvre de mécanismes permettant aux trophoblastes d'adhérer aux matrices extracellulaires, de les dégrader localement et de migrer aux travers des zones digérées. La répétition de ces trois étapes fondamentales assure la progression continue du trophoblaste.

La migration trophoblastique est soumise à un strict contrôle spatio-temporel. Avant l'invasion des TEV, la paroi des artères spiralées est modifiée avec une infiltration de leucocytes, une vacuolisation des cellules endothéliales, une désorganisation et une hypertrophie des cellules musculaires lisses (Craven et al. 1998, Harris 2010). L'invasion trophoblastique est contrôlée par de nombreux facteurs comme la concentration en oxygène, avec une inhibition de la différenciation et de l'invasion sous condition hypoxique (2% d'O₂) (Genbacev et al. 1997, Zhou Y. et al. 1998), le Transforming Growth Factor β (TGF- β), qui inhibe la migration des TEV (Irving and Lala 1995), alors que l'Epidermal Growth Factor (EGF) induit l'invasion (Bass et al. 1994). Cet envahissement trophoblastique est responsable de la modification des caractéristiques d'élasticité des artères spiralées, les transformant en vaisseaux dilatés, de plus basse résistance et de haut débit (voir figure 13). Le remodelage de la paroi artérielle se caractérise par un œdème, un remplacement des cellules endothéliales par les trophoblastes, ainsi qu'une destruction de la tunique musculaire et des lames élastiques internes, qui sont alors remplacées par du tissu fibreux. La paroi fibreuse devient alors atone, insensible aux éléments vasoactifs, ce qui permet un flux constant dans l'espace intervilloux (Harris and Aplin 2007, Pijnenborg et al. 1983). Ainsi, seules les artères entourées de trophoblastes montrent d'importantes altérations de leurs structures.

Lors du remodelage des artères spiralées maternelles, les TEV endovasculaires se transforment alors en véritables cellules endothéliales, et expriment diverses protéines d'adhésion considérées comme spécifiques des cellules endothéliales vasculaires. Les cellules trophoblastiques sont donc capables d'un véritable mimétisme moléculaire, leur permettant d'envahir et de détruire les segments distaux des artères utérines (Zhou Y. et al. 1997b).

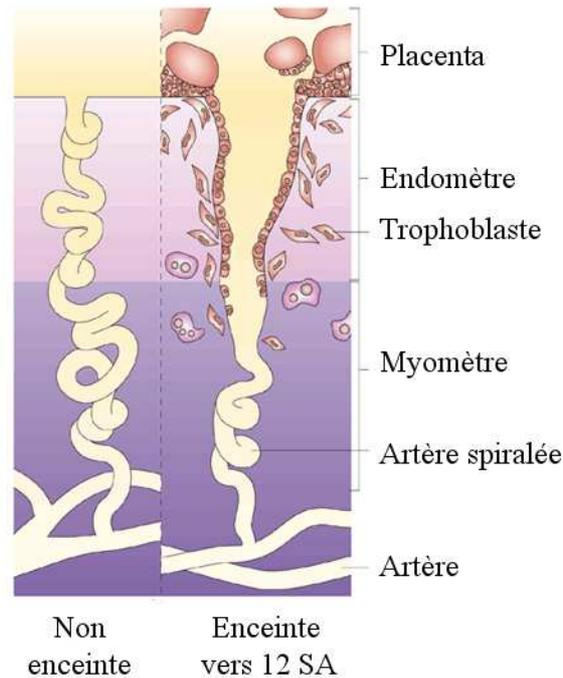


Figure 13: Remodelage des artères spiralées maternelles à la fin du 1^{er} trimestre de grossesse. Les trophoblastes extravilloux les transforment en vaisseaux dilatés à haut débit. Schéma adapté de <http://www.nature.com/nri/journal/v2/n9/images/nri886-f2.gif>

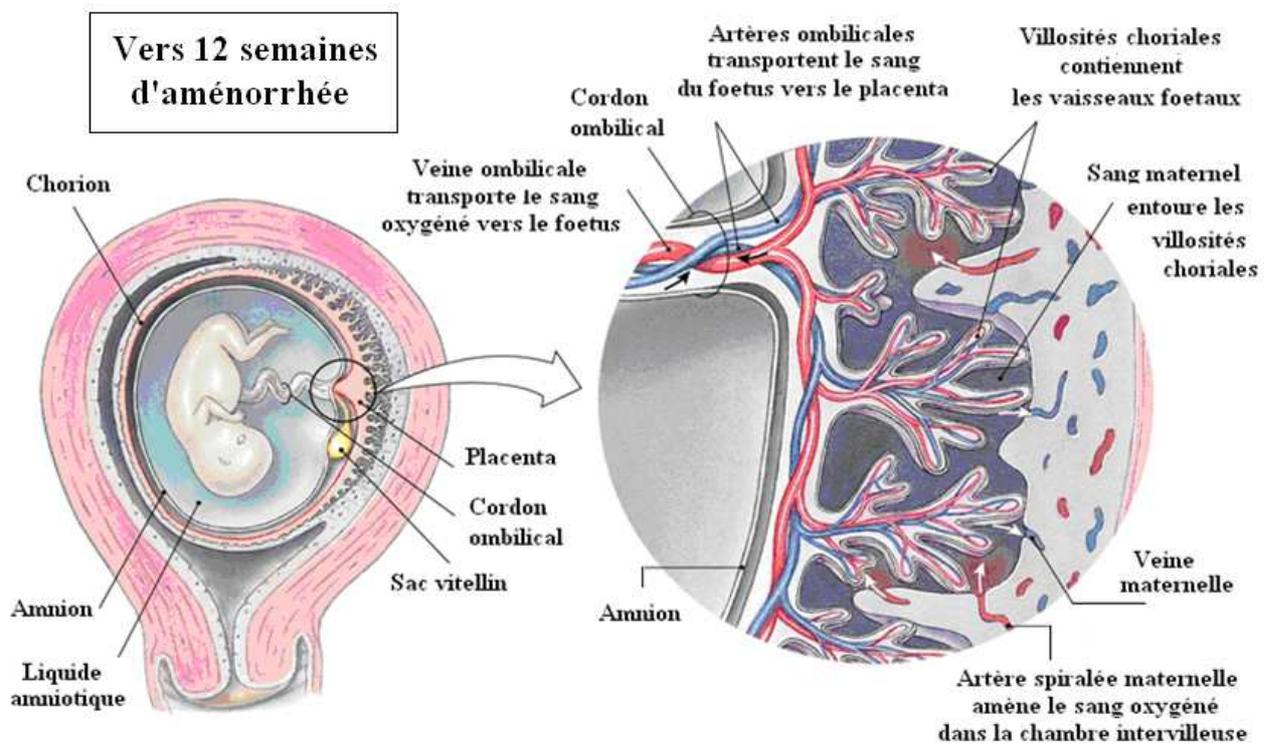


Figure 14: Circulation utéro-placentaire. Schéma adapté de <http://www.colorado.edu/intphys/Class/IPHY3430-200/image/26-19.jpg>

Ce remodelage les transforme en vaisseaux à faible résistance, permettant ainsi un fort débit sanguin dans l'espace intervilloux (voir figure 13). Il a pour conséquence directe l'augmentation du débit sanguin en faveur du placenta. La circulation provenant des artères utérines se dirige alors au travers des vaisseaux remodelés vers l'espace placentaire, où le sang est désaturé pour être repris par les veines efférentes du placenta (voir figure 14). Cette conversion doit se dérouler à la fin du 1^{er} trimestre pour que la grossesse continue de manière optimale (Zhou Y. et al. 1997a).

1.6 Evolution des villosités

Par définition, toutes les villosités vascularisées détaillées plus loin sont des sous-classes des villosités tertiaires. Les *villosités mésoenchymateuses* possèdent une couche de cytotrophoblastes complète, une couche de syncytiotrophoblastes, un stroma abondant et lâche, et quelques cellules de Hofbauer⁵. Les capillaires fœtaux sont peu développés et peu nombreux. L'enveloppe trophoblastique génère de nombreux *bourgeons trophoblastiques* constitués initialement par des syncytiotrophoblastes, mais rapidement colonisés par des cytotrophoblastes et du mésoenchyme. L'évolution de ces villosités tertiaires va se faire vers un nouveau type de villosités mieux adaptées aux besoins accrus de l'embryon (voir figure 15). De la 9^{ème} et jusqu'à la 16^{ème} SA, les villosités tertiaires s'allongent, se ramifient et se modifient pour constituer les *villosités intermédiaires immatures*, qui génèrent à leur tour des bourgeons trophoblastiques, donnant naissance à de nouvelles villosités (Castellucci et al. 1990). Elles ont une structure proche des villosités mésoenchymateuses avec une couche importante de cytotrophoblastes, une couche de syncytiotrophoblastes parfois dispersée, des cellules de Hofbauer nombreuses, mais un stroma lâche et moins abondant que dans les villosités mésoenchymateuses. On trouve un réseau vasculaire fœtal complet avec artérioles, capillaires et veinules, mais qui occupe une petite partie de l'axe villositaire. Les villosités intermédiaires immatures assurent une croissance rapide des villosités choriales.

⁵ macrophages fœtaux.

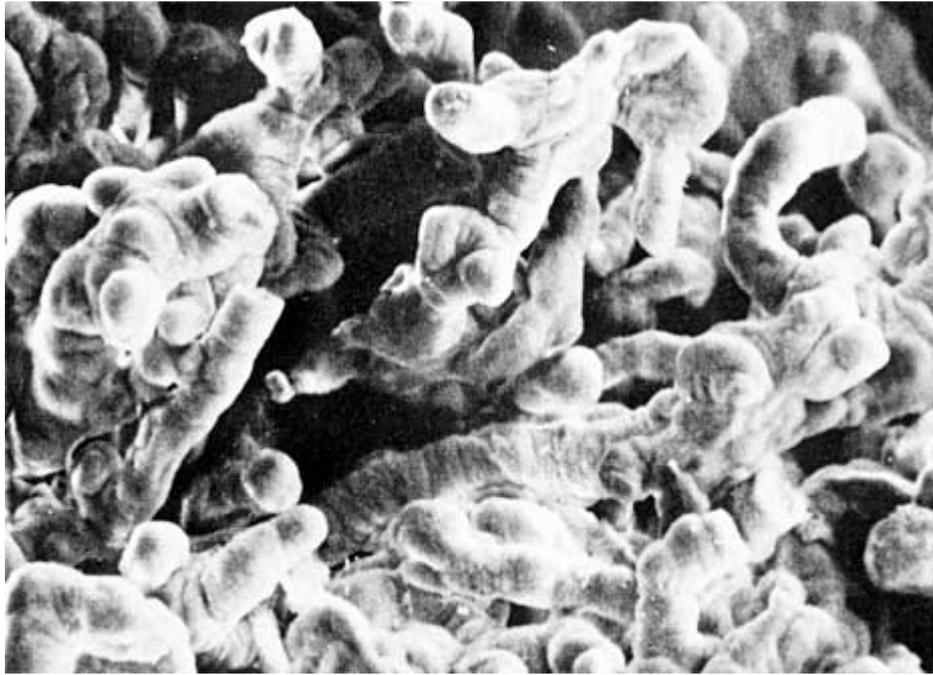


Figure 15 : Villosités d'un placenta de plus de 4 mois. Image de <http://www.embryology.ch/images/fimgplacenta/villosite/villplacem.jpg>

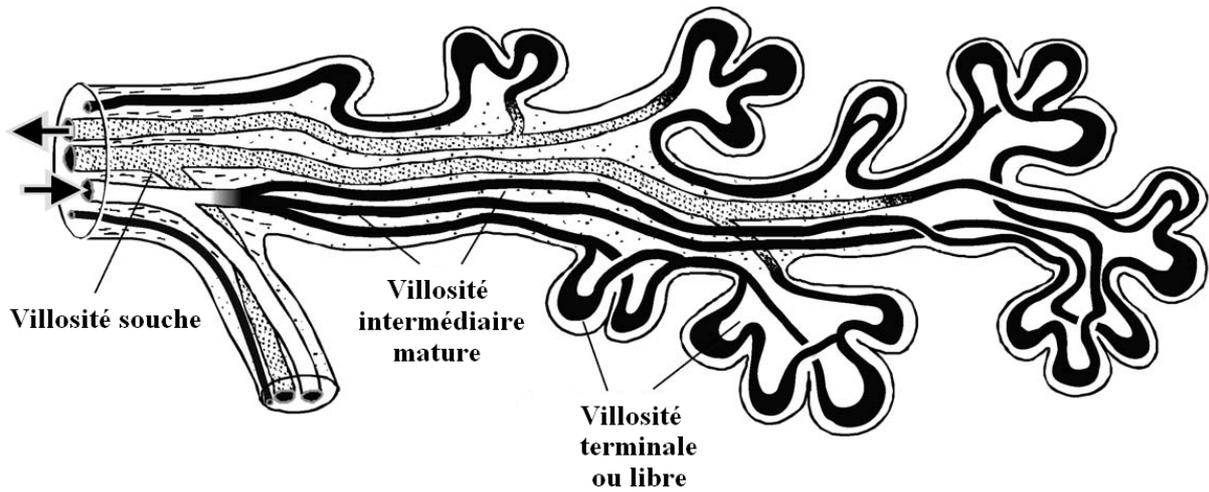


Figure 16 : Organisation des capillaires fœtaux. Ils sont ici en boucles dans un groupe de villosités terminales (ou libres) d'une villosité centrale intermédiaire mature. Schéma adapté de (Benirschke K and P. 2000)

Les bourgeonnements de ces villosités sont dans un premier temps des villosités mésoenchymateuses.

La transformation progressive des villosités intermédiaires immatures en *villosités souches*, qui servent d'échafaudage à la structure placentaire, commence dès le 1^{er} trimestre de grossesse, et continue jusqu'au terme. De ce fait, le nombre de villosités intermédiaires immatures décroît au fur et à mesure que la grossesse avance. Les villosités souches sont caractérisées par une fibrose stromale autour des vaisseaux fœtaux centraux. A partir de la 26^{ème} SA se développent des villosités plus longues et grêles à partir des villosités intermédiaires immatures, et dans lesquelles le réseau capillaire fœtal est encore renforcé : il s'agit des *villosités intermédiaires matures* (Kaufmann 1982, Kaufmann et al. 1985). Elles représentent 25% des villosités retrouvées dans un placenta à terme. Les vaisseaux fœtaux représentent la moitié de l'axe villositaire dans un stroma très lâche. La couche syncytiale est régulière et les cytotrophoblastes encore bien présents. Jusqu'à la fin du 2^{ème} trimestre, l'augmentation de la surface d'échange se fait par bourgeonnement. A partir de la formation des villosités intermédiaires matures, il n'y a plus de maturation possible en villosités souches, et elles développent alors des petites ramifications : les *villosités terminales ou libres*, qui forment une structure en grappe hautement vascularisée (voir figure 16 et 17). Le réseau vasculaire occupe alors presque toute la place et se retrouve très proche de la couche syncytiale : c'est la formation de membranes vasculo-syncytiales avec un amincissement de la barrière fœto-placentaire. Les villosités terminales représentent environ 60% des villosités retrouvées dans le placenta à terme.

A la fin de la grossesse on trouvera donc dans le placenta des zones hétérogènes, composées de parts variables de chacune des six types de villosités :

- *les villosités souches*
- *les villosités mésoenchymateuses*
- *les villosités intermédiaires immatures*
- *les villosités intermédiaires matures*
- *les villosités terminales ou libres*
- *les bourgeons trophoblastiques*

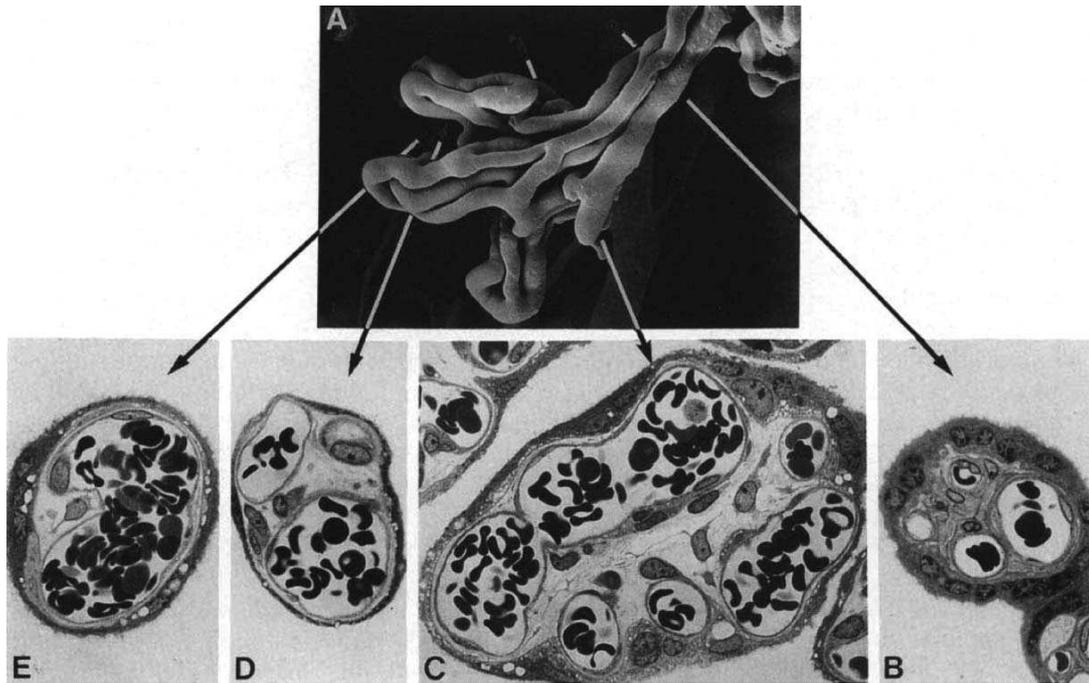


Figure 17 : Vascularisation fœtale d'une villosité terminale. (A, x 650) Vaisseaux de trois villosités terminales (ou libres) d'une villosité intermédiaire mature. (B-C-D-E, x 800) Coupes transversales à différents niveaux de la villosité. On note que le réseau vasculaire est hautement développé et occupe presque toute la place dans les villosités terminales (D, E) contrairement aux villosités intermédiaires matures (B). A l'extrémité des villosités terminales, les capillaires se retrouvent très proches de la couche syncytiale, c'est la formation de membranes vasculo-syncytiales (E). (Benirschke K and P. 2000)

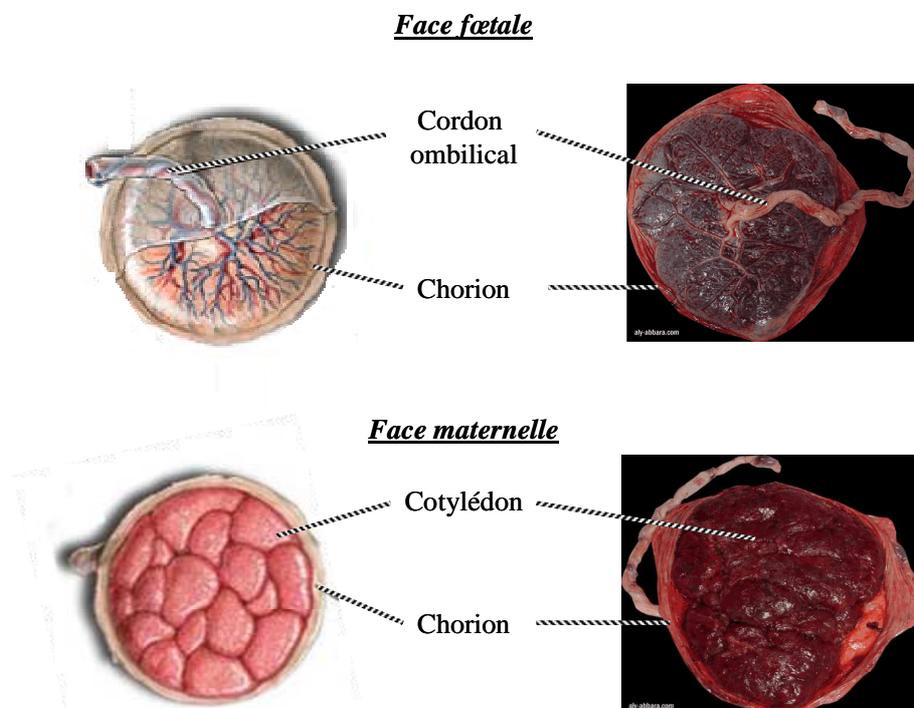


Figure 18 : Le placenta à terme constitué d'une face fœtale (en haut) et d'une face maternelle (en bas). Schémas adaptés de <http://z.about.com/f/p/440/graphics/tnail/17010t.jpg>. Photos de [http://www.aly-abbara.com/livre gyn obs/images/gif/annexes foetales/placenta 2faces.gif](http://www.aly-abbara.com/livre_gyn_obs/images/gif/annexes_foetales/placenta_2faces.gif)

Les villosités souches assurent une stabilité mécanique de l'arbre villositaire, les villosités intermédiaires immatures sont le lieu de prolifération du trophoblaste et des bourgeons trophoblastiques. Les villosités tertiaires génèrent la croissance en longueur de l'arbre villositaire. Enfin, les villosités intermédiaires matures, dont sont issues les villosités libres ou terminales avec une vascularisation fœtale maximale, constituent 40% du volume, et 50% de la surface d'échange du placenta à terme (Gruenwald 1977).

1.7 Morphologie du placenta à terme

A la naissance, le placenta est constitué de deux surfaces (voir figure 18).

- la face maternelle s'insère sur la muqueuse tapissant la paroi de la cavité utérine et est composée de multiples cotylédons (en moyenne entre 15 et 28). Ils ne sont pas en contact avec la poche des eaux. Ils sont généralement individualisés et forment sur la face externe une galette bien identifiable. Ces cotylédons sont fragiles, et sont souvent lésés au moment de la délivrance du placenta.

- La face fœtale, face sur laquelle s'insère le cordon ombilical, donne sur la cavité du sac amniotique.

1.8 Conséquences d'un développement placentaire humain pathologique : le Retard de Croissance Intra-Utérin (RCIU) et la Toxémie Gravidique (TG)

A. Le Retard de Croissance Intra-Utérin (RCIU)

Cette pathologie est caractérisée par une croissance insuffisante du fœtus par rapport à un potentiel génétique et nutritionnel de départ. En général, il est défini par un poids de naissance inférieur au 10^{ème} percentile pour le sexe et l'âge gestationnel du fœtus, ce qui signifie que le poids de naissance du nouveau-né appartient aux 10% des plus petits poids pour ce sexe et cet âge gestationnel donné (Battaglia and Lubchenco 1967, Usher and McLean 1969). Il peut parfois être défini par un poids inférieur au 3^{ème} percentile pour les RCIU sévères, mais il n'existe pas de consensus à ce jour. Les courbes de référence changent en fonction de la population étudiée, car il est important de faire la différence entre le RCIU et les fœtus petits constitutionnels. Pour cela, il existe des tables pour le situer en fonction des mesures observées *in utero*, de la taille des parents, de son poids de naissance, de son origine ethnique etc.

Le RCIU affecte 8% des grossesses en moyenne et est en relation étroite avec un développement anormal du placenta (Krebs et al. 1996, Regnault et al. 2002, Sibley et al. 2005). Les causes d'un RCIU peuvent également être d'origine fœtale (aneuploïdie, anomalies fœtales, etc.) ou maternelle avec des maladies préexistantes d'origine endocrine, cardiovasculaire, ou encore des infections (Cetin and Alvino 2009). Lorsque le placenta contribue au RCIU, aucune thérapie « placentaire » n'existe pour remédier à ce défaut qui met en jeu le pronostic fœtal, et laisse de ce fait deux issues possibles pour la grossesse :

- poursuivre son déroulement au risque d'augmenter la probabilité d'anomalies de développement et/ou de mort pour le fœtus ;
- ou provoquer l'accouchement avec tous les risques associés à la prématurité.

Le RCIU est à l'origine de nombreuses complications à court et long terme, et influence l'état de santé à l'âge adulte. En effet, le RCIU est non seulement une cause majeure de morbidité et mortalité périnatales, mais il peut également participer à l'apparition de nombreuses pathologies à l'âge adulte, comme le diabète, l'hypertension, ou les maladies cardiovasculaires (Barker 1992, Bernstein et al. 2000, Henriksen 1999). Pendant la grossesse, le placenta est au cœur des échanges de nutriments et d'oxygène nécessaires au développement optimal du fœtus. Il a été démontré que les placentas de grossesses RCIU possédaient de nombreuses caractéristiques pathologiques, avec entre autres, une augmentation de l'apoptose placentaire, une augmentation de l'épaisseur de la barrière placentaire, une invasion et transformation incomplète des artères spiralées maternelles, un défaut de différenciation trophoblastique (avec une baisse de la prolifération des cytotrophoblastes et une diminution de l'aire syncytiotrophoblastique) et une angiogenèse anormale (Allaire et al. 2000, Arroyo and Winn 2008, Chen C. P. et al. 2002, DiFederico et al. 1999, Ishihara et al. 2002, Jackson et al. 1995, Khong et al. 1986, Levy and Nelson 2000, Mayhew et al. 2003, Smith et al. 1997, Torry et al. 2004).

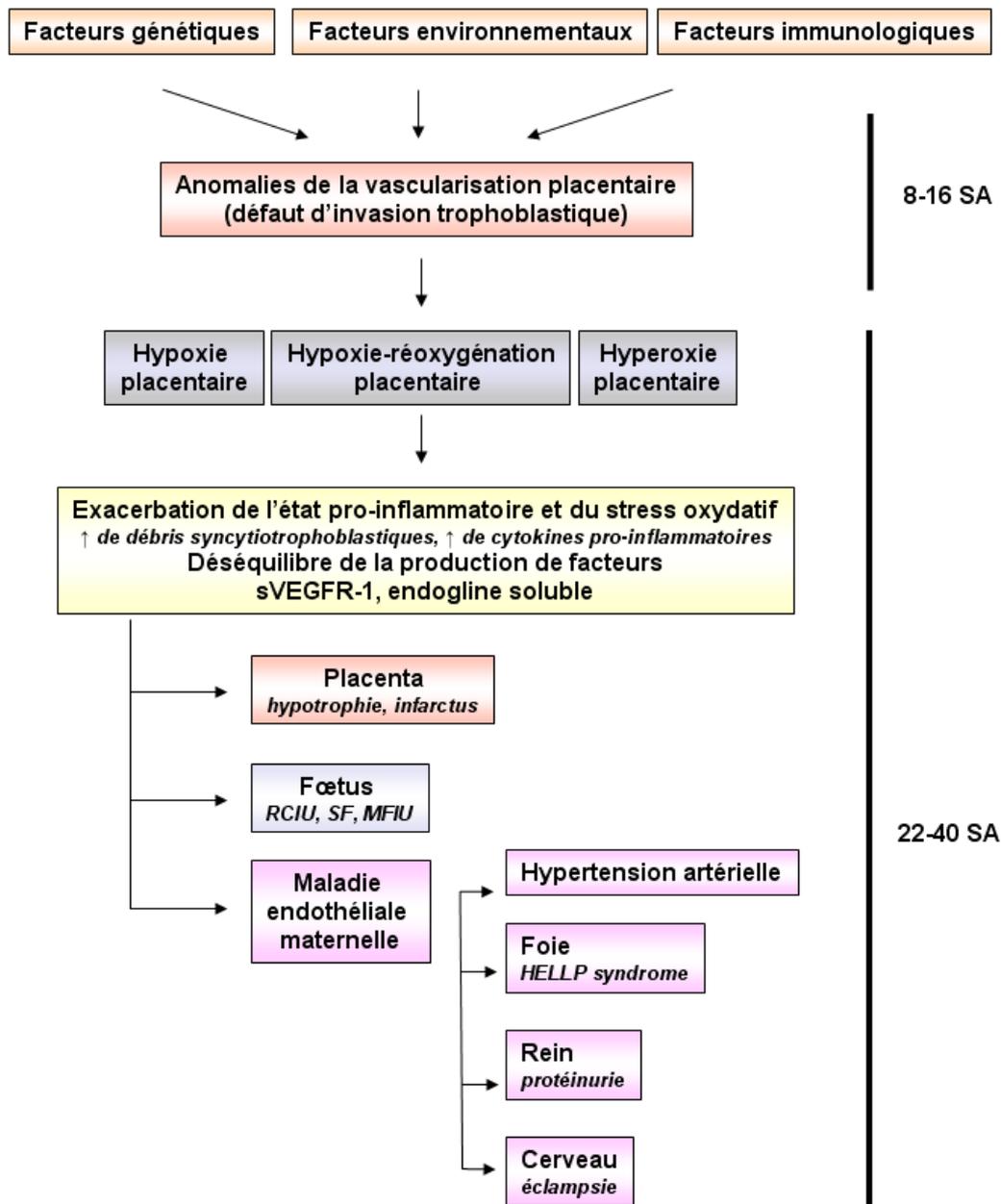


Figure 19 : Schéma classique des principales étapes nécessaires à la survenue de la TG.
 sVEGFR-1 : récepteur soluble de type 1 au VEGF ; SF : souffrance fœtale ; MFIU : mort fœtale *in utero* ;
 HELLP⁶ : Hemolysis Elevated Liver enzymes & Low Platelet count.

⁶association syndromique d'une anémie hémolytique (destruction excessive des hématies), d'une cytolysé hépatique (destruction des cellules hépatiques = les hépatocytes) et d'une thrombopénie (diminution du nombre de plaquettes sanguines) chez une femme enceinte.

B. La Toxémie Gravidique (TG)

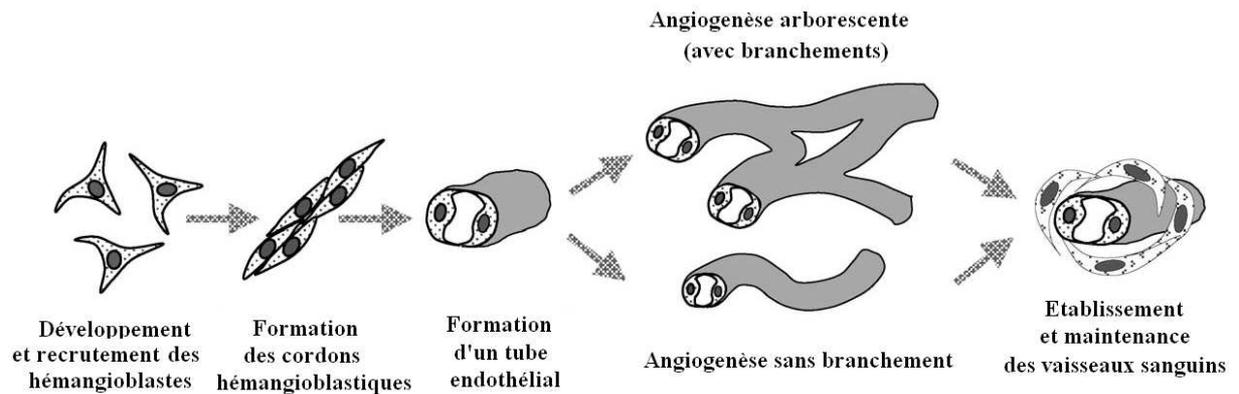
La TG, ou pré-éclampsie (PE), est une pathologie spécifiquement humaine caractérisée par une hypertension artérielle (supérieure à 14/9 cmHg) et une protéinurie (supérieure à 0,3g/24h) qui apparaissent à partir de 20 SA. C'est une pathologie fréquente qui touche 2 à 10 % des grossesses, selon la définition choisie et la population étudiée (Roberts 2000, Roberts and Cooper 2001, Sibai et al. 2005, Walker 2000). Les symptômes apparaissent à partir du 2^{ème} trimestre de grossesse et représentent une menace maternelle et fœtale très sérieuse. L'interruption de la grossesse avec extraction du placenta, et donc de l'enfant, associée à un traitement général puissant (anti-hypertenseurs, sulfate de magnésium pour limiter l'apparition de l'éclampsie⁷), visera à éviter la mort de la mère, et si possible du fœtus. De ce fait, elle est responsable de 50% de la prématurité induite, et représente la première cause de morbidité foeto-maternelle. Les causes de la TG sont encore mal comprises à ce jour et aucun traitement n'est pour l'instant disponible. Il est néanmoins établi que la présence du placenta est à la fois nécessaire et suffisante à l'apparition de cette pathologie (Redman 1991). De ce fait, seule l'extraction placentaire permet actuellement la guérison.

La physiopathologie de la TG reste encore imparfaitement comprise. Les causes de cette maladie apparaissent au cours du 1^{er} trimestre de la grossesse, dès la formation du placenta, et seraient dues à la succession de plusieurs étapes. Premièrement, un défaut de remodelage vasculaire utérin, lié en grande partie à un envahissement trophoblastique trop superficiel des artères spiralées maternelles, entraînerait une perfusion insuffisante de la chambre intervillieuse, qui resterait dans un environnement hypoxique (Roberts 2000). De manière défensive, l'organisme maternel compenserait ce défaut par une augmentation de la tension artérielle, maintenant ainsi un niveau suffisant de perfusion du placenta, et permettant la poursuite de la grossesse. L'hypoxie placentaire ainsi installée entraînerait à son tour un stress oxydant, et participerait à la dysfonction généralisée du placenta, avec une libération accrue de débris syncytiotrophoblastiques et de facteurs dans la circulation maternelle (comme des radicaux libres, des lipides oxydés, le récepteur soluble de type 1 au VEGF ou l'endogline soluble par exemple). L'ensemble de ces altérations participerait à la dysfonction endothéliale maternelle généralisée, ce qui explique l'atteinte de plusieurs organes dans la TG (cerveau, reins, foie, poumon ...) (voir figure 19) (Roberts et al. 1989, Roberts 2000).

⁷ complication grave de la grossesse qui se caractérise par des convulsions.

Il est classiquement admis que la cause de la dysfonction placentaire serait l'hypoxie placentaire, mais aucune preuve directe n'a été mise en évidence jusqu'à présent (comme par exemple la mesure de pO_2 de l'espace intervilloux lors de grossesses avec TG). Il existe néanmoins des éléments indirects en faveur de l'hypoxie placentaire comme la surexpression de HIF-1 α par exemple. D'autres hypothèses concernant les causes de la dysfonction placentaire ont été proposées comme des phénomènes d'hypoxie-réoxygénation (Hung et al. 2002, Hung et al. 2004) ou d'hyperoxie (Kingdom J. C. and Kaufmann 1997). Actuellement, la TG est considérée comme une pathologie maternelle secondaire à une dysfonction placentaire dont les origines sont diverses, et qui est responsable de la libération de facteurs dans la circulation maternelle déclenchant une dysfonction endothéliale systémique (Redman and Sargent 2000, 2001).

La TG peut être associée avec le RCIU dans une grossesse, mais chacune de ces pathologies peut également exister seule. Malgré les similitudes dans les anomalies de développement placentaire dans le RCIU et la TG, ce sont deux pathologies distinctes qui possèdent des caractéristiques qui leur sont propres (Boyd and Scott 1985, Egbor et al. 2006, Long et al. 1980, Mayhew et al. 2003, Mayhew et al. 2004a, Mayhew et al. 2004b).



VASCULOGENESE

ANGIOGENESE

Figure 20 : Les différentes étapes de la vasculogénèse et de l'angiogénèse. Schéma adapté de (Charnock-Jones et al. 2004).

II. L'angiogenèse placentaire

Le système reproducteur de la femme est le siège de processus d'angiogenèse, tant au niveau des organes (comme les ovaires, l'utérus, ou la glande mammaire) que pour les processus d'implantation et de placentation. La naissance à terme d'un bébé en bonne santé dépend grandement des processus d'angiogenèse, qui sont régulés finement dans l'espace et dans le temps. Dans certaines pathologies de la grossesse, l'angiogenèse est perturbée et peut entraîner de nombreuses complications de la grossesse : des fausses couches précoces et tardives, des morts *in utero*, des RCIU, une prématurité et des TG (Kingdom J. et al. 2000). Le placenta est un organe qui présente un réseau vasculaire particulièrement développé (Burton and Jauniaux 1995), ce qui est essentiel pour les échanges fœto-maternels, mais aussi pour l'architecture même de la villosité chorionale via un rôle mécanique sur la croissance placentaire (Burton et al. 2009). La compréhension de la physiologie de l'angiogenèse et des facteurs de croissance impliqués pourrait non seulement améliorer la prévention et le traitement des pathologies obstétricales, dont les conséquences sont lourdes, mais aussi permettre d'élargir les connaissances dans de nombreux autres domaines médicaux, y compris les maladies tumorales.

2.1 Le réseau vasculaire

Les organismes unicellulaires, et ceux dont la taille ne dépasse pas les capacités de diffusion des gaz et des substances solubles, n'ont pas de système vasculaire. La limite de diffusion de l'oxygène est de 100 à 200 μm (Carmeliet and Jain 2000). La vie cellulaire est alors uniquement dépendante des concentrations de gaz et solutés dans le liquide environnant la cellule ou le micro-organisme. L'embryon de mammifère ne se compose au début que d'un amas de cellules, mais l'apparition d'un réseau vasculaire apparaît rapidement nécessaire pour la croissance de l'embryon. Le développement de ce réseau repose sur *la vasculogenèse*, qui comprend la formation *de novo* de vaisseaux sanguins à partir de précurseurs dérivés du mésoderme ; et de *l'angiogenèse*, qui implique la création de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux préexistants (voir figure 20) (Folkman and Shing 1992, Risau and Flamme 1995, Risau 1997).

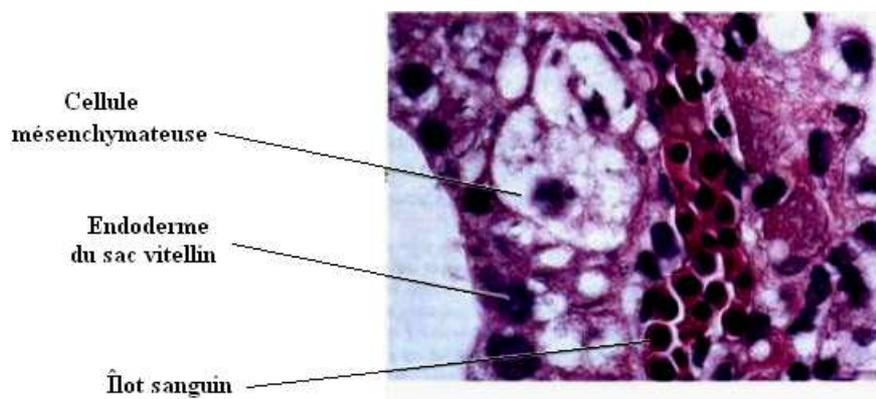
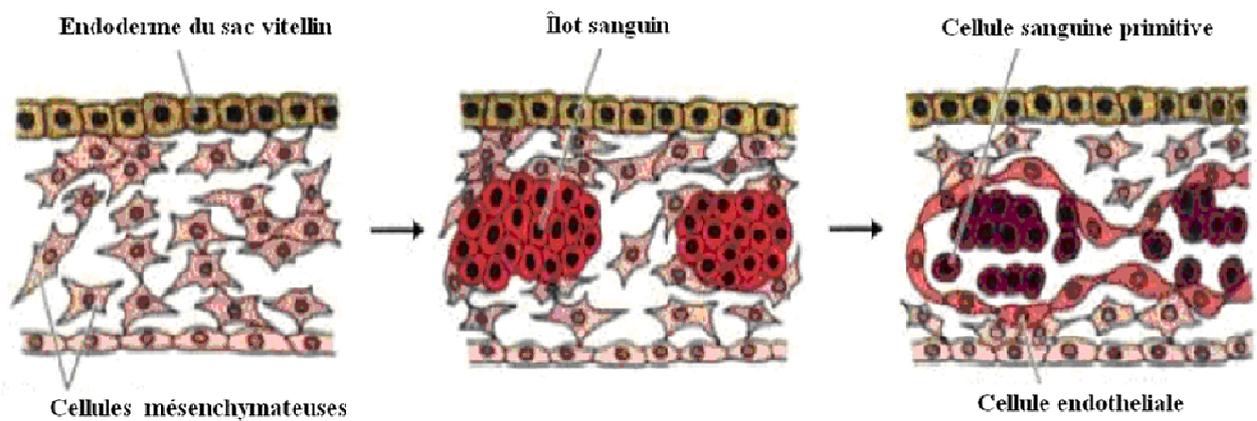


Figure 21 : La vasculogenèse. Elle comprend la formation d'îlots sanguins et leur assemblage en réseaux de capillaires. Schéma et image adaptés du livre *Biologie du développement*, De Boeck et Larcier, 2^{ème} édition, 2004.

A. La formation des vaisseaux sanguins

Les vaisseaux sanguins peuvent se former selon deux processus : la vasculogenèse et l'angiogenèse (voir figure 20) (pour revue voir (Patan 2000)). La vasculogenèse est à l'origine de la formation de ces vaisseaux durant le développement embryonnaire pour donner un réseau vasculaire primitif grâce à la différenciation d'hémangioblastes (Poole and Coffin 1989), précurseurs des cellules endothéliales et hématopoïétiques à partir du mésenchyme embryonnaire (voir figure 21). Il s'ensuit une prolifération et une migration des cellules endothéliales pour former l'arbre vasculaire primitif.

a) La vasculogenèse

Les premières cellules vasculaires apparaissent dans le sac vitellin⁸, en dehors de l'embryon lui-même, sous forme de cellules mésenchymateuses qui se différencient en hémangioblastes, donnant naissance à une première structure vasculaire appelée *îlots sanguins*. Au centre de cette structure, les hémangioblastes se différencient en cellules souches hématopoïétiques, précurseurs de tous les types de cellules sanguines. Les hémangioblastes en périphérie de ces îlots se différencient en angioblastes, précurseurs des cellules endothéliales. Pendant la deuxième phase de la vasculogenèse, les angioblastes prolifèrent et se différencient en cellules endothéliales, migrent et fusionnent les îlots sanguins entre eux, puis se remodelent en structures tubulaires, les *cordons hémangioblastiques*, qui se connectent en un réseau de capillaires : le *plexus capillaire primaire*.

Chez les amniotes⁹, les réseaux vasculaires primaires naissent dans deux régions distinctes et indépendantes : la vasculogenèse extra-embryonnaire se produit dans les îlots sanguins du sac vitellin et s'étend rapidement dans les villosités chorales ; et la vasculogenèse intra-embryonnaire, issue de précurseurs d'angioblastes isolés, se situe dans le mésoderme entourant l'organe en développement. Ces cellules ne participent pas à la formation des cellules sanguines, comme c'est le cas dans les îlots sanguins extra-embryonnaires (Noden 1989, Pardanaud et al. 1989, Risau 1995). Dans certains cas, les organes en développement produisent des facteurs paracrines qui induisent les vaisseaux sanguins à se former uniquement dans leur propre mésenchyme (Auerbach et al. 1985, LeCouter et al. 2001).

⁸ une des annexes embryonnaires des amniotes⁹. Il apparaît vers le 10^{ème} JPF.

⁹ vertébrés tétrapodes qui possèdent un sac amniotique qui protège l'embryon, puis le fœtus.

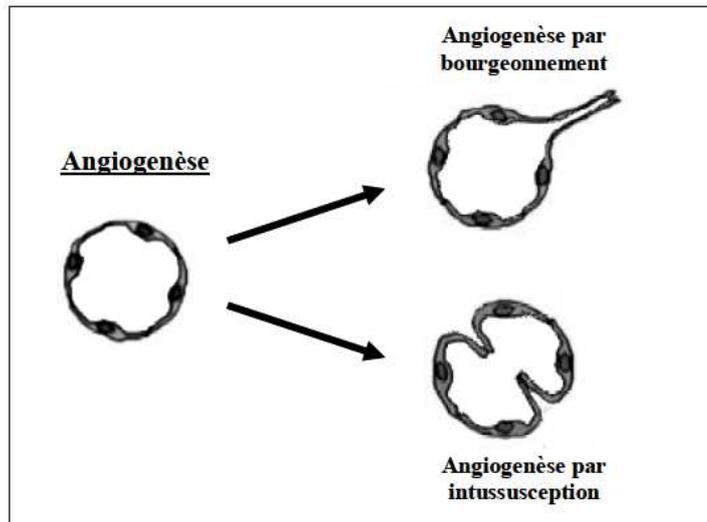


Figure 22 : L'angiogenèse par bourgeonnement et intussusception.

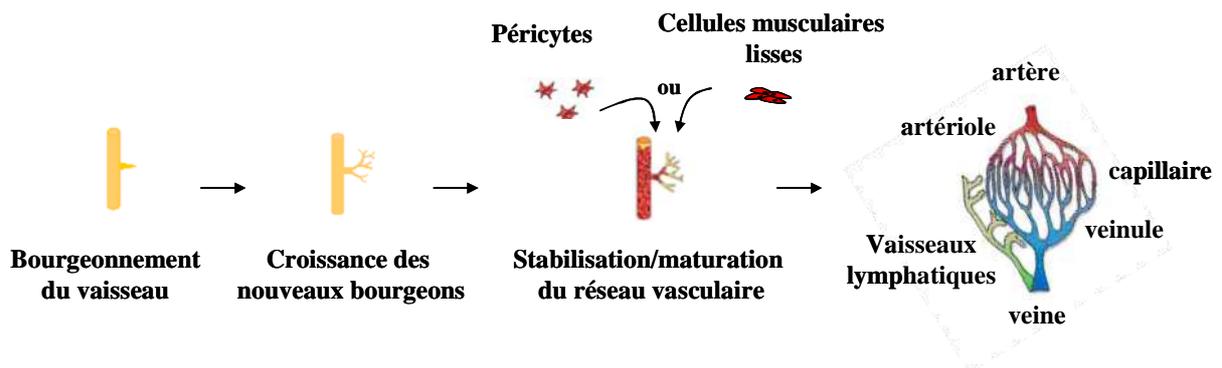


Figure 23 : Angiogenèse avec les phases d'activation et de stabilisation/maturation.

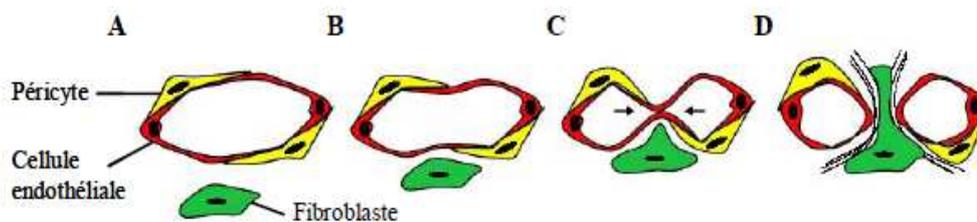


Figure 24 : Représentation schématique du processus d'angiogenèse par intussusception. Schéma adapté de (Djonov et al. 2003).

b) L'angiogenèse

Contrairement à la vasculogénèse, l'angiogenèse consiste en la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir d'un réseau vasculaire préexistant. Elle se produit également pendant le développement embryonnaire et permet de créer des connections dans le réseau vasculaire initial, permettant une vascularisation mature. Elle permet également la formation de nouveaux vaisseaux sanguins chez l'adulte. L'angiogenèse a lieu en trois phases : initiation, prolifération-invasion et maturation-différentiation. Elle est impliquée dans de nombreuses situations physiologiques, avec un rôle important dans le cycle de la reproduction chez la femme, au cours de l'inflammation, et lors de la régénération tissulaire suite à une blessure. Elle peut également engendrer une néo-vascularisation excessive, et être impliquée dans l'apparition et/ou la progression de nombreuses pathologies comme le cancer, l'arthrite rhumatoïde, le diabète, les rétinopathies, ou encore le psoriasis (Carmeliet and Jain 2000, Carmeliet 2003).

▪ Angiogenèse et expansion du réseau primaire

La croissance, l'expansion et le remodelage du plexus vasculaire primaire en un réseau vasculaire mature se produisent lors de deux types de processus d'angiogenèse (voir figure 22) : l'angiogenèse par bourgeonnement (voir figure 23), et l'angiogenèse par intussusception (voir figure 24) (Carmeliet and Jain 2000, Risau 1997).

- L'angiogenèse bourgeonnante

L'angiogenèse bourgeonnante nécessite la prolifération et migration des cellules endothéliales de la paroi du vaisseau pour former de nouveaux capillaires, par la suite stabilisés par le recrutement de cellules péri-endothéliales.

Les étapes nécessaires pour l'angiogenèse bourgeonnante sont relativement bien connues (Carmeliet 2003, Cleaver and Melton 2003, Jain 2003). On distingue deux phases : la *phase d'activation* et la *phase de stabilisation/maturation*.

La phase d'activation implique :

- ⇒ la vasodilatation et l'augmentation de la perméabilité vasculaire,
- ⇒ l'activation des protéases et la dégradation de la membrane basale,
- ⇒ la prolifération et la migration des cellules endothéliales,
- ⇒ et la formation d'un cordon endothélial, puis d'un tube avec lumière.

La phase de stabilisation/maturation quant à elle implique :

- ⇒ la reconstruction d'une membrane basale, ainsi que le recrutement de péricytes autour du capillaire pour former un vaisseau stable, ou de cellules de muscle lisse pour les artères et les veines.

Ces étapes sont sous la dépendance de facteurs pro-angiogéniques et anti-angiogéniques (Papetti and Herman 2002). Les cellules endothéliales, les cellules de muscle lisse, les péricytes, les cellules inflammatoires et les fibroblastes participent toutes à ce processus.

- L'angiogenèse par intussusception

Contrairement à l'angiogenèse par bourgeonnement, l'angiogenèse par intussusception ne nécessite pas une prolifération importante des cellules endothéliales, mais plutôt un réarrangement des structures préformées (voir Figure 23). L'intussusception est un processus angiogénique au cours duquel un vaisseau existant peut se scinder en deux vaisseaux par compartimentation (Burri and Tarek 1990, Patan et al. 1996a, Patan et al. 1996b). Ce processus est initié par une invagination de la paroi du capillaire à l'intérieur de la lumière, et aboutit à la création d'une zone de contact entre les deux parois opposées du capillaire. Ce contact entraîne une réorganisation des jonctions entre les cellules endothéliales et la formation d'une séparation interstitielle, qui est rapidement envahie par des péricytes ou des myofibroblastes. Ces cellules péri-capillaires vont alors synthétiser une matrice extracellulaire permettant d'augmenter la séparation entre les deux vaisseaux fils (Djonov et al. 2003). L'intussusception permet également une diversification du diamètre des vaisseaux et de leur angle de branchement, ainsi qu'une hiérarchisation du réseau vasculaire (Djonov et al. 2003).

▪ Remodelage et maturation du réseau vasculaire

- Le remodelage vasculaire

Le profil final du réseau vasculaire est déterminé par la croissance, l'extension ou la régression des différents segments qui le composent. On obtient ainsi un réseau continu constitué par la succession de vaisseaux de petits et gros diamètres (Risau 1997). Ce processus de remodelage est dépendant de l'environnement tissulaire dans lequel les vaisseaux se forment. Par exemple, la suppression du flux sanguin dans les capillaires en excès entraîne leur régression (Meeson et al. 1999, Resnick and Gimbrone 1995).

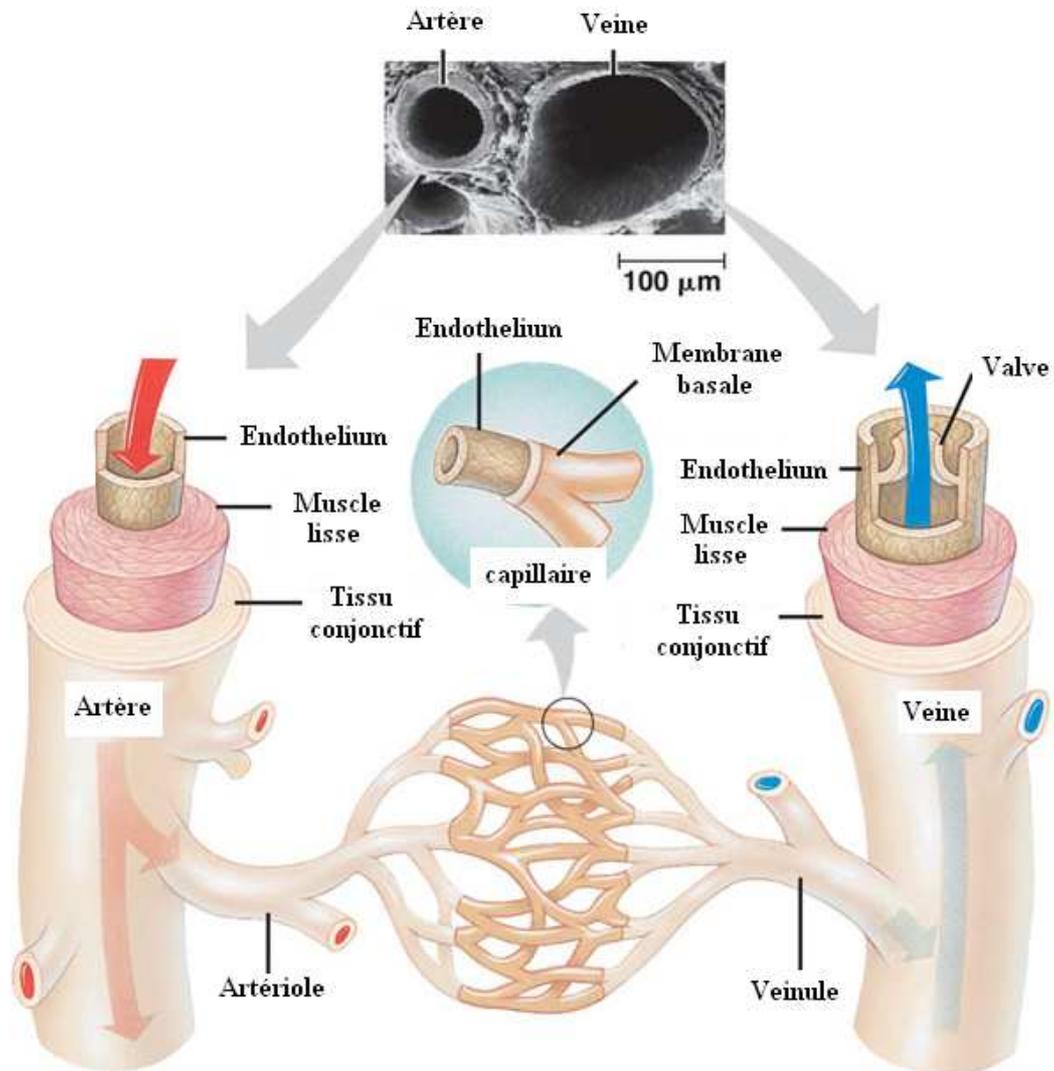


Figure 25 : Artérioles, veinules et capillaires. Schéma adapté de http://kvhs.nbed.nb.ca/gallant/biology/blood_vessels.jpg

- **La stabilisation du réseau vasculaire**

Les vaisseaux naissants sont stabilisés par deux processus : le recrutement de cellules accessoires ou cellules murales et l'élaboration d'une matrice extracellulaire commune aux cellules endothéliales et aux cellules accessoires.

Les cellules murales, péricytes et les cellules de muscle lisse participent à la stabilisation vasculaire en inhibant la prolifération et la migration des cellules endothéliales (Darland and D'Amore 2001). Les précurseurs des cellules murales proviennent des tissus mésenchymateux chez l'embryon, de la moelle et du stroma osseux chez l'adulte (Carmeliet 2000).

B. Les différents types de vaisseaux

Le réseau vasculaire est formé de vaisseaux sanguins dont la morphologie diffère en fonction de leur nature (voir figure 25). Les capillaires sont les plus petits vaisseaux, et permettent la diffusion de l'oxygène et des nutriments vers les tissus environnants. Le sang arrive du cœur aux capillaires par des artères, des vaisseaux de plus grand calibre, et repart des organes vers le cœur par les veines. Ces trois types de vaisseaux sanguins diffèrent par la constitution de leur paroi vasculaire. En effet, suite au battement du cœur, un flux sanguin traverse les vaisseaux induisant les cellules endothéliales à émettre un signal vers les cellules mésenchymateuses environnantes. Ces dernières vont être induites à proliférer, migrer vers les cellules endothéliales puis se différencier en cellules péri-vasculaires, appelées péricytes pour les capillaires, et cellules de muscle lisse pour les artères et les veines. Il s'ensuit une phase de maturation pendant laquelle une interaction s'établit entre les cellules endothéliales et les cellules péri-vasculaires. Le contact entre ces deux types de cellules induit une stabilisation des cellules endothéliales en les rendant réfractaires aux stimuli pro- ou anti-angiogéniques (Benjamin et al. 1998, Benjamin et al. 1999). Les cellules de muscle lisse vont s'apposer concentriquement autour des tubes de cellules endothéliales, afin de former une paroi vasculaire fonctionnelle.

La paroi des gros vaisseaux, artères et veines, est composée de 3 couches différentes (voir figure 25 et 26). La *tunica intima* comprenant une couche pavimenteuse de cellules endothéliales en contact direct avec la circulation sanguine, la membrane basale et une couche interne élastique. La présence de valves anti-retour dans les veines facilite la circulation sanguine en empêchant le retour sanguin. Entourant cette structure, la *tunica media* est constituée de cellules de muscle lisse qui participent au contrôle du diamètre des vaisseaux, et

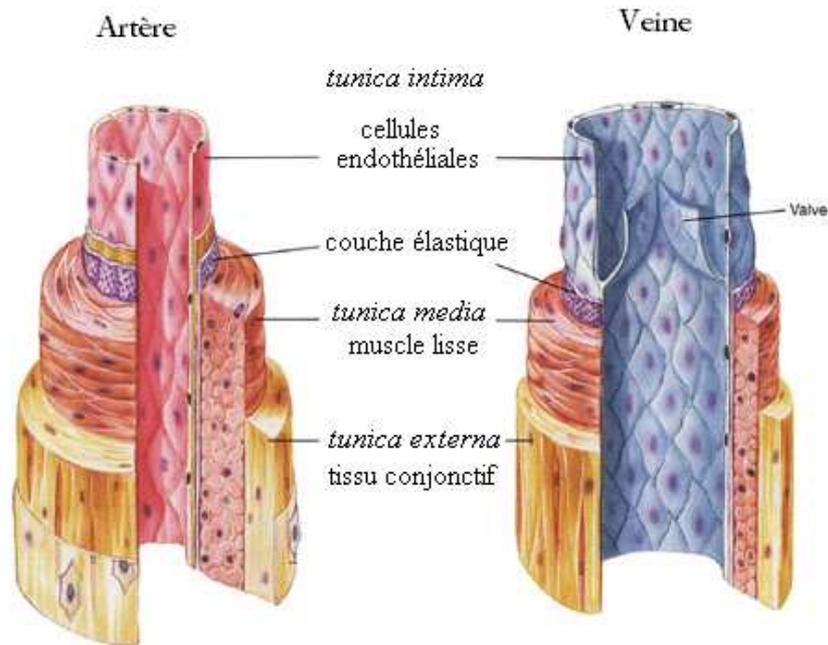


Figure 26 : Artère et veine. Schéma adapté de Fox, Stuart I. Human Physiology 4th Brown Publishers <http://www.nicksnowden.net/images/artery-vein%20diagram.jpg>

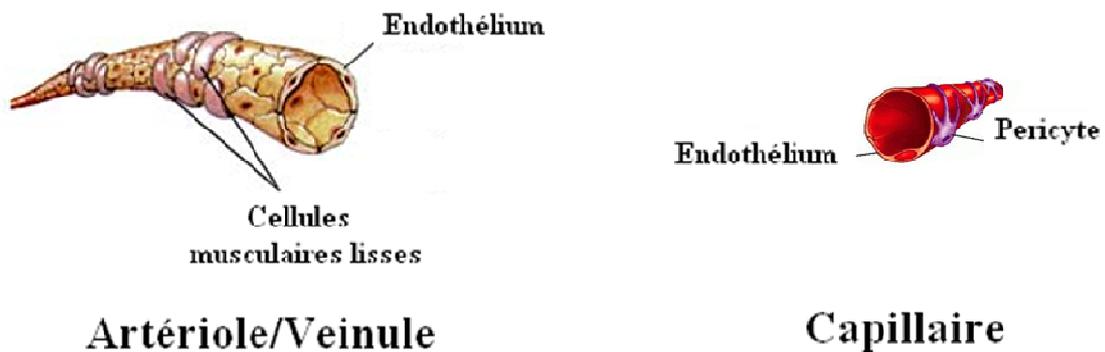


Figure 27 : Les artérioles, les veinules et les capillaires. Les artérioles et les veinules sont entourées des cellules de muscle lisse, alors que les capillaires sont entourés de péricytes (forme étoilée). Schéma adapté de <http://img.tfd.com/dorland/thumbs/pericyte.jpg> et <http://www.biosbcc.net/doohan/sample/images/vessels/arteriole1.jpg>

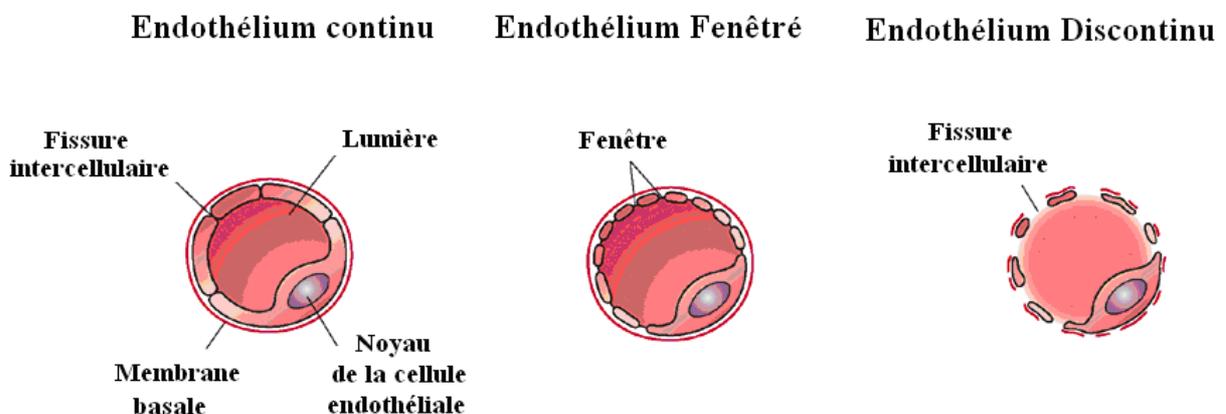


Figure 28 : Différenciation de l'endothélium. Schéma adapté de (Clever and Melton 2003)

contribue à la régulation du tonus vasculaire. L'épaisseur de la couche de cellules de muscle lisse est plus importante dans les artères, ce qui permet un maintien dynamique des vaisseaux exposés à une forte pression sanguine. La dernière couche est la *tunica adventitia*, composée d'une couche de tissu conjonctif, qui contient des fibroblastes et des fibres de collagène.

La vascularisation de l'organisme est essentiellement assurée par un réseau complexe d'artérioles et de veinules, ramifications des artères et veines, qui acheminent le sang et les nutriments à travers l'organisme (voir figure 27). Les artérioles et les veinules sont constituées d'une monocouche de cellules endothéliales et de cellules de muscle lisse plus ou moins éparées, implantées dans la lame basale des cellules endothéliales. Cependant, les échanges sanguins avec les tissus environnants se passent au sein d'un réseau complexe de capillaires, qui font le lien entre les artérioles et les veinules, et représentent la part la plus importante des vaisseaux sanguins. Les capillaires sont essentiellement constitués d'une monocouche de cellules endothéliales. Lors de leur ramification en capillaires, les cellules de muscle lisse des artérioles et des veinules sont remplacées par les péricytes, qui ont la même origine ontogénique, et partagent des caractéristiques phénotypiques communes avec les cellules de muscle lisse, mais diffèrent essentiellement par leur forme étoilée. Les capillaires eux-mêmes présentent des différences morphologiques importantes. En effet, les besoins particuliers des différents tissus de l'organisme, en termes de qualité et de quantité d'échanges, définissent un niveau de différenciation particulier en fonction des organes considérés (endothélium fenêtré dans certaines glandes endocrines ou continu dans le cerveau par exemple) (voir figure 28).

Plus tardivement par rapport à la formation des vaisseaux sanguins, les vaisseaux lymphatiques se développent en bourgeonnant, puis en se détachant des veines préexistantes pour former un réseau parallèle, selon un processus que l'on appelle lymphangiogenèse. Les vaisseaux lymphatiques se forment aussi à partir de précurseurs des cellules endothéliales lymphatiques, les lymphangioblastes, qui se sont différenciés *in situ* dans le mésenchyme.

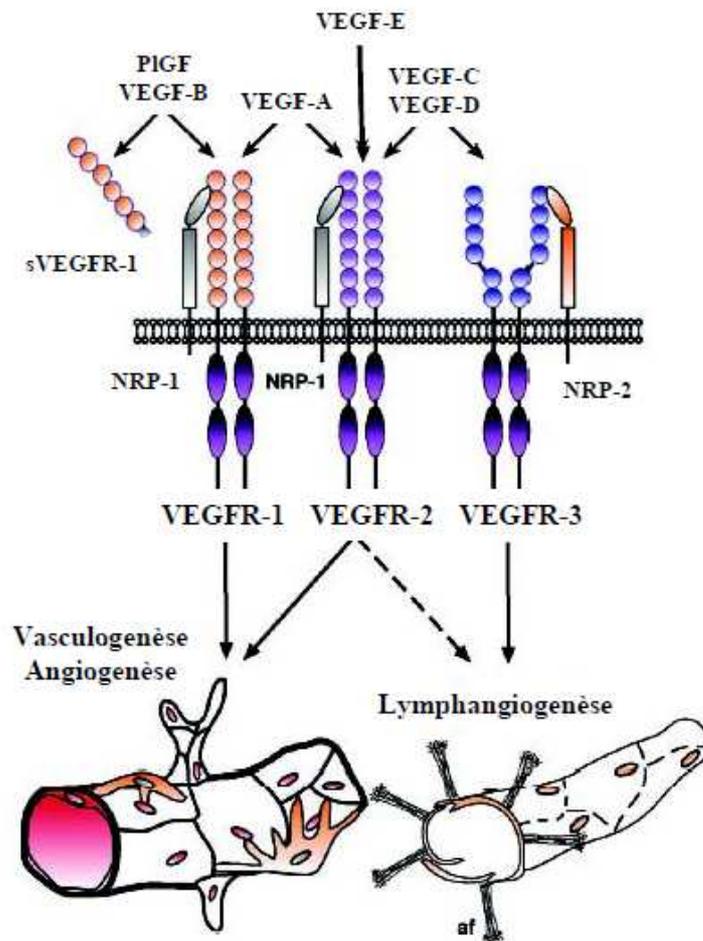


Figure 29 : Récepteurs des VEGFs et fonctions biologiques associées. sVEGFR-1 correspond à une forme soluble du VEGFR-1. Schéma adapté de (Jussila and Alitalo 2002).

C. Acteurs principaux de l'angiogenèse

Le développement des organes et la régénération tissulaire chez les mammifères sont sous le contrôle de signaux de communication cellulaire impliquant particulièrement les facteurs de croissances. Parmi les cytokines impliquées dans la formation de nouveaux vaisseaux sanguins et dans l'assemblage correct de la paroi vasculaire, on trouve la famille des Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), des Fibroblast Growth Factor (FGF), Platelet-Derived Growth Factor (PDGF), des Angiopoïétines (Ang) et les Transforming Growth Factor- β (TGF- β). Parmi les divers facteurs angiogéniques, la famille la plus étudiée est celle des VEGF, qui a pour cible principale les cellules endothéliales.

a) La famille des VEGFs

La famille des VEGFs, qui sont des facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire, est composée de cinq membres chez les mammifères : VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, et PlGF (Placental Growth Factor) (voir figure 29). Les homologues de VEGF produits par les virus Orf sont appelés VEGF-E, tandis qu'un autre homologue isolé du venin de serpent est dénommé VEGF-F. Ces facteurs se lient à trois récepteurs différents appelés VEGFR-1 (flt-1), VEGFR-2 (flk-1 ou KDR) et VEGFR-3 (flt-4). Ils peuvent également se fixer à des co-récepteurs appelés neuropiline-1 (NRP1) et neuropiline-2 (NRP2) et aux protéoglycanes à sulfate d'héparane¹⁰ (HSPG) dont font partie l'héparine¹¹ et les héparanes sulfates¹² (Cross M. J. et al. 2003, Neufeld et al. 1999). Les protéines VEGFs possèdent toutes un motif extrêmement conservé composé de 8 cystéines. Ce motif est impliqué dans des ponts disulfures intra ou inter-moléculaires qui permettent la formation des dimères de VEGF biologiquement actifs (Potgens et al. 1994). Les protéines VEGFs sont glycosylées et sécrétées (Salven et al. 1998).

▪ VEGF-A

Il est décrit comme un facteur clé du processus d'angiogenèse. Initialement, le VEGF-A a été mis en évidence comme étant un facteur de perméabilité vasculaire sécrété par les cellules tumorales (Senger et al. 1986), ce qui lui a valu son autre appellation de Vascular

¹⁰ macromolécules associées à la membrane cellulaire et à la matrice extracellulaire, qui ont un rôle majeur dans les interactions matrice-cellule, cellule-cellule, et ligand-récepteur.

¹¹ glycosaminoglycane et composant de la matrice extracellulaire.

¹² glycosaminoglycanes qui sont exprimés à la surface de la plupart des cellules et fixe de nombreuses protéines.

Permeability Factor (VPF) (Senger et al. 1983). En 1989, d'autres groupes ont identifié un facteur de croissance sécrété capable d'induire la prolifération spécifique des cellules endothéliales, ils le nommèrent Vasculotropine (Plouet et al. 1989) et VEGF (Ferrara and Henzel 1989). Ce facteur de croissance présente une activité angiogène importante (Leung et al. 1989) et s'est révélé être identique au VPF (Keck et al. 1989). Le clonage de la Vasculotropine et du VEGF démontra que ces deux protéines étaient identiques. Le VEGF est fortement conservé entre les espèces. Il existe plusieurs isoformes de VEGF-A produites par épissage alternatif (VEGF121, 145, 165, 183, 189, 206), la plus abondante et la plus étudiée étant celle constituée de 165 acides aminés. Ces isoformes diffèrent dans leur partie C-terminale, ce qui leur confère des affinités différentes pour les héparanes sulfates de la membrane basale, et joue sur leur distribution dans les tissus (Houck et al. 1992, Park et al. 1993). Les effets du VEGF-A sont modulés selon l'isoforme concerné. La sécrétion du VEGF-A est stimulée en réponse à l'hypoxie (Liu et al. 1995, Wang et al. 1995). VEGF-A tient un rôle central dans la phase d'activation de l'angiogenèse. En effet, il augmente la perméabilité des cellules endothéliales (Esser et al. 1998, Kevil et al. 1998, Kohn et al. 1992, Senger et al. 1983), stimule leur prolifération (Connolly et al. 1989, Ferrara and Henzel 1989, Gospodarowicz et al. 1989), leur migration (Dimmeler et al. 2000), et inhibe leur apoptose (Gerber et al. 1998). L'importance de VEGF-A dans l'angiogenèse a été montrée dans divers modèles expérimentaux *in vivo*. Chez la souris, l'inactivation d'un seul allèle du gène de VEGF-A conduit à une mort embryonnaire à E11-12 avec des défauts précoces de la vascularisation embryonnaire et du sac vitellin (Carmeliet et al. 1996, Ferrara et al. 1996). Le VEGF-A se lie avec une forte affinité sur ses deux récepteurs, le VEGFR-1 (flt-1) et le VEGFR-2 (flk-1, KDR) (de Vries et al. 1992, Terman et al. 1992). Les souris knock-out pour ces deux récepteurs meurent tôt au cours du développement embryonnaire à E8.5 et E9.5 à cause de défauts majeurs du développement des réseaux vasculaires vitellins et embryonnaires. En revanche, le VEGF-A ne montre pas d'affinité pour le VEGFR-3 (Shibuya and Claesson-Welsh 2006). Des nouvelles isoformes du VEGF-A ont été mises en évidence récemment et sont appelées isoformes b. Elles diffèrent dans les 6 derniers acides aminés de leur région C-terminale (Bates et al. 2002). Le VEGF165b est la première isoforme b à avoir été identifiée, puis d'autres ont également été décrites (Miller-Kasprzak and Jagodzinski 2008, Perrin et al. 2005). Ces isoformes ont été rapportées pour avoir des effets anti-angiogéniques (Konopatskaya et al. 2006, Woolard et al. 2004).

▪ **VEGF-B**

Le VEGF-B a été isolé à partir d'une banque d'ADN complémentaire issus de cœur de souris adultes et de cellules d'un fibrosarcome humain. Il se lie uniquement au VEGFR-1. Il est capable de former des hétérodimères avec le VEGF-A, qui lie le VEGFR-2. Il est mitogène pour les cellules endothéliales (Olofsson et al. 1996). Les souris déficientes en VEGF-B apparaissent normales à la naissance, mais présentent des anomalies dans le développement cardiaque post-natal. La mesure du flux coronarien suite à une ischémie/reperfusion montre que ces souris présentent des altérations dans la réponse physiologique à une ischémie cardiaque (Bellomo et al. 2000).

▪ **Le VEGF-C**

Isolé à partir de milieu de culture de cellules de carcinome de la prostate, c'est le premier ligand caractérisé de VEGFR-3 (Lee J. et al. 1996). Seule la forme mature peut se lier également au VEGFR-2 (Joukov et al. 1997). L'analyse du patron d'expression de VEGF-C et du VEGFR-3 (Kukk et al. 1996), ainsi que l'hyperplasie des vaisseaux lymphatiques engendrée par la surexpression de VEGF-C *in vivo* (Jeltsch et al. 1997), suggèrent un rôle important de ces molécules dans le développement des vaisseaux lymphatiques, ainsi qu'une forte implication dans la lymphangiogenèse tumorale et la dissémination des métastases (Pepper et al. 2003).

▪ **Le VEGF-D**

C'est le second ligand identifié de VEGFR-3. Ce facteur de croissance présente de fortes homologies structurelles et fonctionnelles avec le VEGF-C et constitue, avec celui-ci, une sous-classe dans la famille des VEGFs impliquée dans la régulation de la lymphangiogenèse (Achen et al. 1998). Leurs interventions au cours de l'angiogenèse par leur capacité à induire l'autophosphorylation de VEGFR-2 reste à établir (Byzova et al. 2002, Jeltsch et al. 1997).

▪ **Le VEGF-E**

Il a été cloné à partir du génome du parapoxvirus Orf et induit spécifiquement l'autophosphorylation de VEGFR-2 et non de VEGFR-1 (Meyer et al. 1999).

▪ **Le PlGF**

Le PlGF a été isolé à partir d'une banque d'ADN complémentaire de placenta humain, et présente une activité mitogène pour les cellules endothéliales (Maglione et al. 1991).

Le gène *plgf*, situé sur le chromosome 14, produit quatre isoformes, PIGF-1, PIGF-2, PIGF-3 et PIGF-4. PIGF se lie à VEGFR-1, à NRP-1 et NRP-2 (Adini et al. 2002, Persico et al. 1999). PIGF-1 et PIGF-2 sont capables de lier le VEGFR-1 (soluble ou non soluble) sous leur forme homodimérique PIGF/PIGF ou hétérodimérique PIGF/VEGF, formes qui ne sont pas nécessairement fonctionnelles (Eriksson et al. 2002). La possibilité de formation d'hétérodimères avec le VEGF peut constituer un niveau de régulation supplémentaire de l'activité biologique du VEGF, en forçant la formation du complexe de signalisation VEGF/VEGFR-2 (De Falco et al. 2002). PIGF stimule la prolifération, la migration et la survie des cellules endothéliales (Adini et al. 2002, Carmeliet et al. 2001, Fischer et al. 2007, Ziche et al. 1997). Il augmente également la prolifération des fibroblastes et des cellules de muscle lisse (Bellik et al. 2005). Il stimule l'angiogenèse et le recrutement de progéniteurs myéloïdes (Hattori et al. 2002, Luttun et al. 2002, Rafii et al. 2003). Récemment, l'implication de PIGF dans l'artériogenèse *via* son action sur l'activité des monocytes a été mise en évidence (Pipp et al. 2003). Contrairement au VEGF, il n'est capable de se lier qu'au VEGFR-1 (Park et al. 1994).

b) Les autres facteurs

Parmi les facteurs impliqués dans l'angiogenèse, on trouve également la famille des Fibroblast Growth Factor (FGF), Platelet-Derived Growth Factor (PDGF), des Angiopoïétines (Ang) et les Transforming Growth Factor- β (TGF- β).

▪ Les FGFs

La famille des FGFs chez les mammifères se compose de 18 membres. FGF-1 et FGF-2 (ou bFGF pour basic Fibroblast Growth Factor) ont une séquence identique de 120 acides aminés environ, qui leur donne la capacité de lier l'héparine ou les HSPGs. Ces HSPGs sont indispensables pour les liaisons avec les récepteurs FGFRs. Les récepteurs aux FGFs possèdent une activité tyrosine kinase et sont au nombre de 4 : FGFR-1, FGFR-2, FGFR-3, et FGFR-4. Le FGF-2 est le premier facteur de croissance identifié possédant une activité angiogène (Ferrara 2002). Ce facteur paraît important au cours de l'angiogenèse par sa capacité à favoriser la prolifération, la migration et l'organisation tubulaire des cellules endothéliales, ainsi qu'à induire l'angiogenèse *in vitro* (Montesano et al. 1986). Il est aussi, du moins en partie, responsable de la libération de protéases susceptibles de dégrader la membrane basale, permettant ainsi la pénétration des cellules endothéliales vers l'espace périvasculaire (Mignatti et al. 1991).

▪ Les PDGFs

Le PDGF fut initialement purifié à partir de plaquettes (Antoniades et al. 1979). Il existe 4 formes de ce facteur, codées par quatre gènes (*pdgf-a* à *d*). Ces facteurs sont fonctionnels sous formes dimériques (homo ou hétérodimères), et ont des séquences proches de celle du VEGF (Andrae et al. 2008). Les PDGFs stimulent la prolifération des cellules de muscle lisse et des péricytes (D'Amore and Smith 1993), et augmentent la stabilité de la paroi vasculaire, en attirant et en intégrant ces cellules murales aux néo-vaisseaux (Hellstrom et al. 1999, Lindahl et al. 1997).

▪ Les Angiopoïétines

Les angiopoïétines tiennent un rôle primordial dans l'angiogenèse, et plus particulièrement dans la phase d'activation et dans la phase de maturation. Il existe 4 angiopoïétines (Ang-1 à 4) et 2 récepteurs (Tie-1 et Tie-2) (Gale and Yancopoulos 1999, Runtig et al. 1993, Sato T. N. et al. 1993). Les récepteurs sont exprimés par les cellules endothéliales et hématopoïétiques (Sato T. N. et al. 1993). Ang-1, qui a été identifié comme agoniste du récepteur Tie-2 (Davis S. et al. 1996), induit l'autophosphorylation de Tie-2, ce qui déclenche alors la phosphorylation de la protéine kinase Akt, protéine reconnue pour induire la survie et la quiescence des cellules endothéliales (Fiedler and Augustin 2006). Quant à Ang-2, il a été décrit comme un antagoniste du récepteur Tie-2, ce qui a pour effet de bloquer la signalisation d'Ang-1 via Tie-2, et d'induire un relâchement des jonctions intercellulaires (Maisonpierre et al. 1997). Lors de la phase de maturation, l'arrêt de la sécrétion d'Ang-2 permet le rétablissement de la voie Ang-1/Tie-2, et ainsi l'induction du resserrement des jonctions intercellulaires et la quiescence de l'endothélium (Thurston et al. 2000).

▪ Les TGF- β

La superfamille du TGF- β comprend un nombre important de facteurs de croissance structurellement reliés. La famille des isoformes du TGF- β comporte 5 membres, dont 3 chez les mammifères. TGF- β 1 fut le premier membre de cette superfamille cloné (Derynck et al. 1985), puis TGF- β 2 (de Martin et al. 1987, Madisen et al. 1988), et enfin TGF- β 3 (ten Dijke et al. 1988). La superfamille du TGF- β régule une multitude de processus dont la prolifération, la différenciation, la mobilité, l'adhésion et la mort cellulaire. Les membres de la famille TGF- β signalisent via un complexe hétéromérique de récepteurs transmembranaires de type I et de type II à activité sérine/thréonine kinase.

Les combinaisons de récepteurs influent sur la spécificité de liaison des différents ligands (Shi Y. and Massague 2003). L'association d'un récepteur de type III dépourvu d'activité sérine/thréonine kinase, comme l'endogline, au complexe de récepteurs I et II peut favoriser l'effet biologique du ligand. La fonction majeure du TGF- β dans l'angiogenèse concerne la phase de maturation vasculaire (Hirschi et al. 1998, Sato Y. et al. 1990).

c) L'hypoxie et HIF

L'hypoxie correspond à la diminution de la pression partielle en oxygène. La réponse cellulaire à ce stress fait intervenir principalement le facteur de transcription HIF-1 (Hypoxia-inducible factor-1), qui active de nombreux gènes importants pour l'adaptation et la survie cellulaire et tissulaire. Les facteurs de transcription HIFs sont des hétérodimères formés d'une sous-unité nucléaire HIF-1 β , exprimée de manière constitutive et ubiquitaire, et d'une sous-unité inductible α (Chen L. et al. 2009, Lee J. W. et al. 2004). Il existe trois isoformes α : HIF-1 α , HIF-2 α et HIF-3 α . HIF-1 α est exprimé de façon ubiquitaire, HIF-2 α et HIF-3 α le sont de manière plus restrictive (Chen L. et al. 2009). HIF-1 α et HIF-1 β sont des protéines de 826 et 789 acides aminés, respectivement. Ces deux protéines contiennent une séquence de localisation nucléaire et un domaine bHLH (hélice boucle hélice basique). La région basique de ce domaine est essentielle à la fixation à l'ADN, alors que la région HLH est indispensable à la dimérisation de ces facteurs (Dunwoodie 2009). HIF-1 α possède un domaine de dégradation dépendant de l'oxygène (ODD) permettant sa protéolyse en normoxie (voir figure 30). Le facteur de transcription HIF-1 est situé à un carrefour de différentes voies de signalisation cellulaire. Son activité est régulée par un grand nombre de mécanismes et notamment par des modifications covalentes.

▪ Régulation de HIF-1 dépendante de l'hypoxie

L'activité des facteurs HIFs est majoritairement régulée au niveau post-traductionnel. L'expression du gène et la traduction de HIF-1 α sont constitutives. En revanche, cette protéine est extrêmement labile, et sa demi-vie est de moins de 5 minutes en normoxie (Jewell et al. 2001).

- **En condition « normoxique »** (c'est-à-dire supérieur à 5%)

HIF-1 α est hydroxylée sur les résidus proline 402 et 564 par trois hydroxylases dépendantes de l'oxygène (PHD1 à PHD3) possédant des activités biologiques distinctes (Schofield and Ratcliffe 2004). Une fois hydroxylée, HIF-1 α est reconnue par la protéine suppresseur de

tumeur VHL (Von Hippel Lindau), qui est un composant du complexe ubiquitine ligase E3 (Ivan et al. 2001, Jaakkola et al. 2001, Kaelin 2002). Cette reconnaissance va entraîner l'ubiquitination d'HIF-1 α , et son adressage au protéasome pour être dégradée. La présence d'oxygène est indispensable à l'activité des PHDs. L'inactivation de la PHD-2 est suffisante à la stabilisation de HIF-1 α . De plus, les PHD-2 et PHD-3 sont induites en hypoxie sous la dépendance de HIF, ce qui constitue un rétrocontrôle négatif de ce système (Berra *et al.* 2003). En condition de normoxie, l'acétylation de la lysine 532 de HIF-1 α conduit également à sa dégradation après interaction avec la protéine VHL (Jeong *et al.* 2002). D'autres facteurs protéiques interviennent dans le contrôle de l'activité de HIF-1 en condition de normoxie comme le Factor Inhibiting HIF-1 (FIH-1) et le p300/CBP interacting transactivator ED-rich tail 2 (CITED2) (Dunwoodie 2009).

- **En condition hypoxique**

Les différentes hydroxylations de HIF-1 α sont bloquées et son acétylation inhibée, ce qui permet sa stabilisation et son hétérodimérisation avec HIF-1 β pour former le facteur de transcription HIF-1 actif. Ce facteur se fixe sur les séquences HRE (hypoxia response element) présentes sur les promoteurs des gènes cibles (Semenza 2003). La stabilisation de HIF-1 est détectable pour des teneurs en oxygène inférieures à 5 %, et allant jusqu'à l'anoxie. Dans ces conditions, l'activité des PHDs diminue en fonction de la concentration en oxygène qui est un de leurs substrats. En dessous de 1,5 % d'oxygène, ces enzymes sont inhibées par des radicaux libres oxygénés (ROS) de type H₂O₂, ce qui contribue au blocage efficace de leurs activités (Brunelle *et al.* 2005; Guzy *et al.* 2005; Mansfield *et al.* 2005).

▪ **Régulation de HIF-1 indépendante de l'hypoxie**

Des stimulations cellulaires par des facteurs de croissance (Feldser *et al.* 1999; Richard *et al.* 2000), des cytokines (Hellwig-Burgel *et al.* 1999) et des hormones (Richard *et al.* 2000; Gorchach *et al.* 2001) peuvent également conduire à une induction et une activation de HIF-1 α . Beaucoup de ces facteurs sont augmentés pendant la grossesse, comme l'Angiotensine II (Irani and Xia 2008) ou le TGF- β 3 par exemple (Caniggia et al. 1999), et agissent ainsi sur le développement placentaire. Contrairement aux effets observés en hypoxie, l'activation de HIF est alors le résultat d'une augmentation de sa traduction, qui est alors plus importante que sa dégradation.

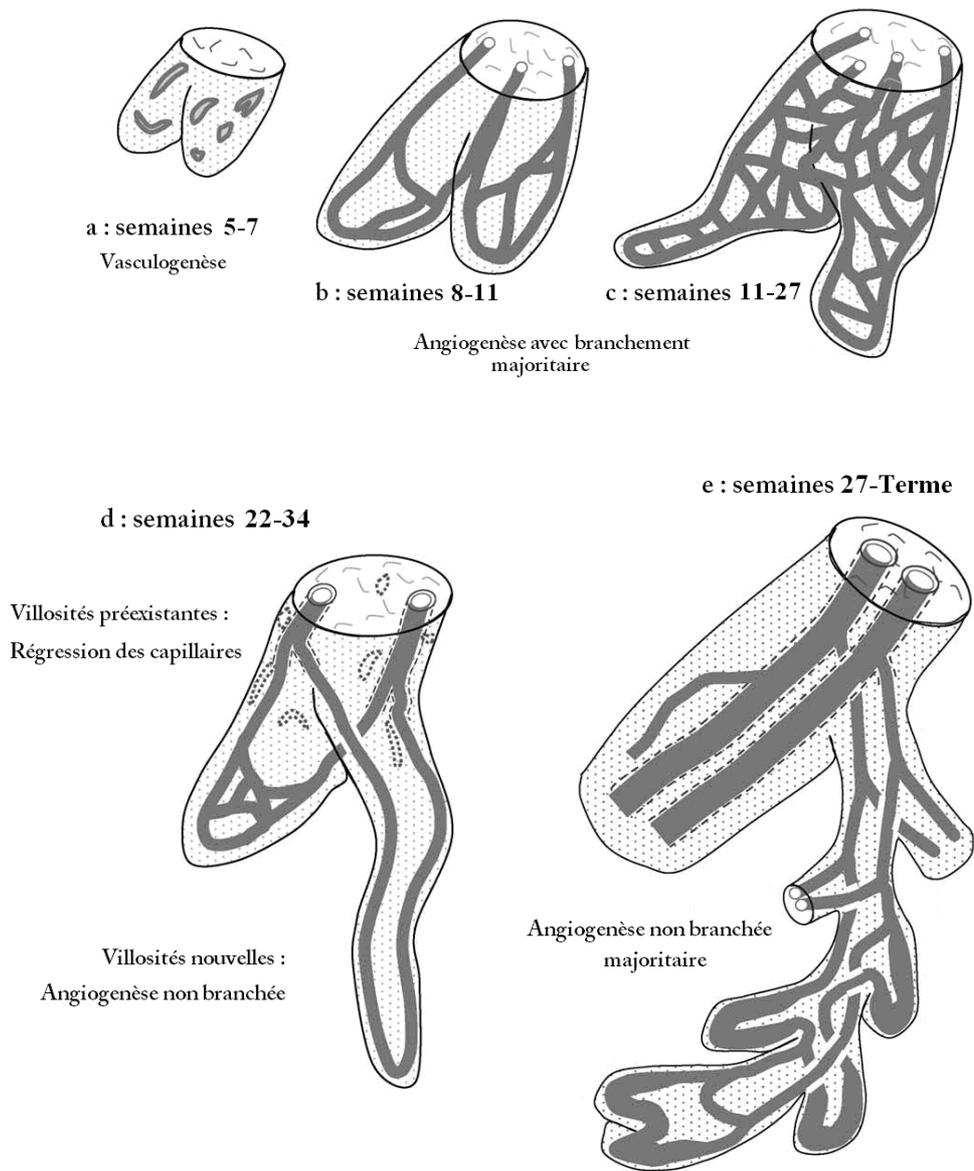


Figure 31 : Principales étapes de vasculogénèse et angiogénèse placentaire. L'âge gestationnel est exprimé en semaines d'aménorrhée. Schéma adapté (Kaufmann et al. 2004).

2.2 Développement vasculaire placentaire

Le placenta est un organe hautement vascularisé. A la fin de la grossesse, son réseau vasculaire mesure environ 550 km de long et 15m² de surface (Burton and Jauniaux 1995). Le placenta doit subvenir aux besoins métaboliques croissants du fœtus tout au long de la grossesse, ce qui implique un développement rapide de l'organe pour répondre aux changements constants, et une certaine plasticité vasculaire. La croissance placentaire est assurée non seulement par la prolifération et la différenciation trophoblastique, qui contribue à augmenter l'aire syncytiale au cours de la grossesse, mais surtout par le développement du réseau vasculaire qui est un acteur majeur du développement des villosités choriales. De ce fait, la vasculogénèse et l'angiogénèse sont deux processus qui ont une grande importance pour le développement placentaire et la croissance fœtale, qui dépendent non seulement des réseaux vasculaires fœtaux et maternels, mais aussi de l'augmentation du flux sanguin dans ces deux systèmes vasculaires à mesure que la gestation avance (voir figure 31).

A. Vasculogénèse placentaire

La vasculogénèse placentaire se déroule entre le 21^{ème} et le 32^{ème} JPF environ, correspondant à 5-7 SA, période pendant laquelle se déroule la formation de vaisseaux sanguins fœto-placentaires (Demir et al. 1989, Knoth 1968). Cette vascularisation placentaire est le résultat de la formation *de novo* de capillaires, plutôt que de l'avancée de vaisseaux embryonnaires dans le placenta. Au stade où la vasculogénèse commence, l'arbre villositaire n'est alors formé que de villosités primaires et de villosités secondaires. Avant la formation des premiers vaisseaux, les cellules de Hofbauer apparaissent dans le mésenchyme, et expriment des facteurs angiogènes, suggérant un rôle paracrine possible dans l'initiation de la vasculogénèse (Ahmed et al. 1995). Les cellules hémangioblastiques, précurseurs des cellules endothéliales contenus dans le mésenchyme, vont alors se différencier *in situ* et former de petits îlots, puis des cordons, juste en dessous de la couche trophoblastique. Ces cordons vont acquérir graduellement une lumière, probablement par un phénomène d'apoptose (Tertemiz et al. 2005), et s'unir pour former les premiers vaisseaux (Demir et al. 1989, Dempsey 1972). Des érythrocytes nucléés, provenant de la différenciation des hémangioblastes du centre des îlots sanguins, sont alors présents dans la lumière de ces vaisseaux (Burton et al. 2009). Ces nouvelles structures vasculaires vont progressivement s'allonger et se connecter au plexus vasculaire du sac vitellin, ainsi qu'aux vaisseaux fœtaux en développement, permettant

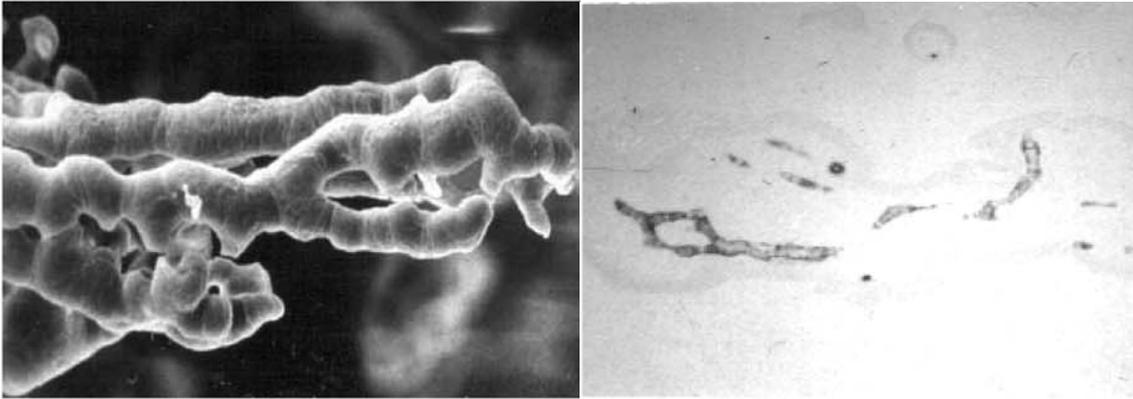


Figure 32 : Angiogenèse arborescente modérée à 8 SA (à gauche : x 500). Vascularisation placentaire par marquage anti-CD34 par immunohistochimie (à droite x180) (Kaufmann et al. 2004)

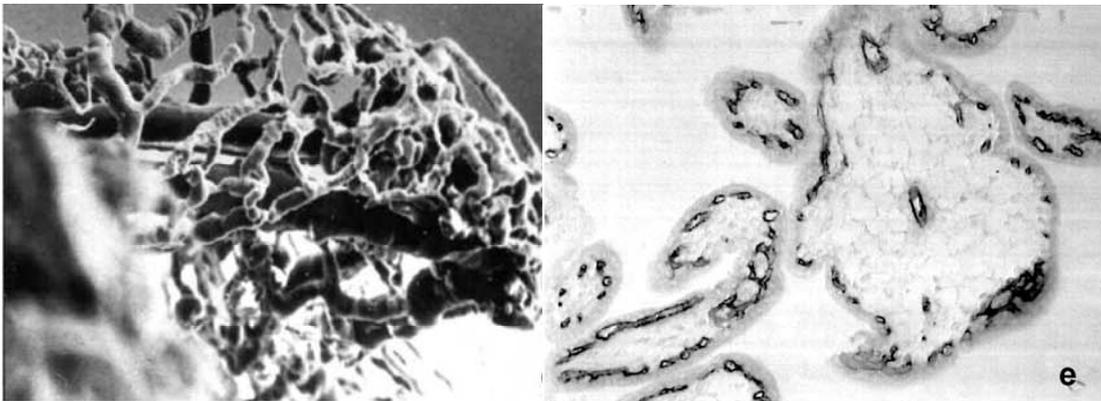


Figure 33 : Angiogenèse arborescente importante à 20 SA (à gauche x 400) avec formation de boucles de capillaires. Vascularisation placentaire par marquage anti-CD34 par immunohistochimie (à droite x500) (Kaufmann et al. 2004).

l'établissement de la circulation fœto-placentaire entre le 32^{ème} et 35^{ème} JPF. Le cœur du fœtus commence à battre aux alentours de la 5^{ème} SA, mais la circulation fœto-placentaire effective ne débute qu'aux alentours de la 7^{ème} SA, car les érythrocytes nucléés imposent une forte résistance à la circulation par leur manque de déformabilité (Jauniaux et al. 1991b). La proportion en érythrocytes nucléés chutera rapidement à la fin du 1^{er} trimestre, ce qui aura pour effet d'abaisser la résistance circulatoire (Burton et al. 2009).

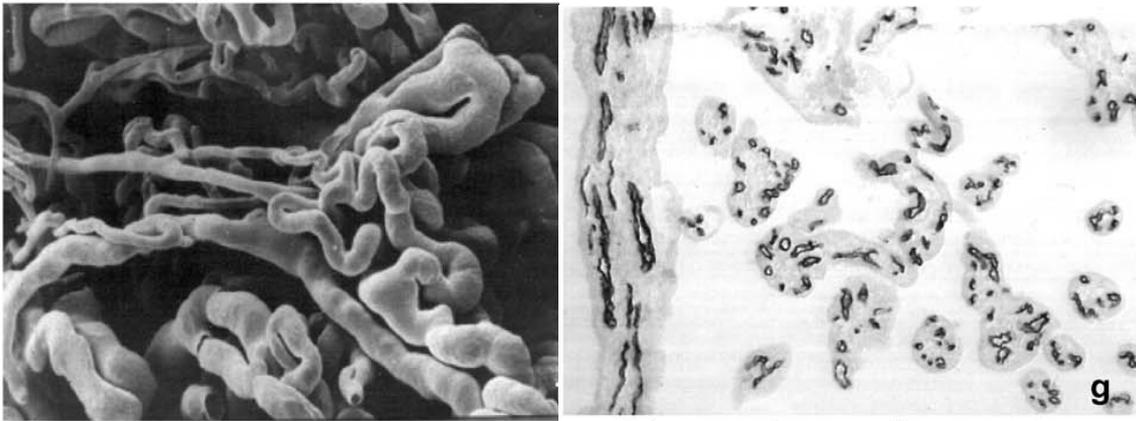
Les cellules endothéliales placentaires sont de type non fenêtré, et sont reliées aux autres cellules du vaisseau (principalement des cellules stromales et des péricytes) via des jonctions serrées et adhérentes alors immatures, suggérant une haute plasticité et perméabilité de ces vaisseaux sanguins (Heinrich et al. 1976, Jones and Fox 1991, Leach et al. 2002). A 6 SA, les capillaires placentaires se situent préférentiellement en périphérie de la villosité (à proximité de la couche de trophoblastes), avec quelques vaisseaux un peu plus gros au centre du mésenchyme (Burton et al. 2009).

B. L'angiogenèse placentaire

Le système vasculaire placentaire subit d'importants remodelages tout au long de la grossesse. Du 1^{er} au début du 2^{ème} trimestre, les capillaires placentaires augmentent progressivement en nombre, volume et surface (Jauniaux et al. 1991a, te Velde et al. 1997). L'allongement des capillaires augmente fortement aux alentours de la 27^{ème} SA, provoquant une augmentation exponentielle de la longueur totale des capillaires jusqu'au terme (Mayhew 2002). L'étape d'angiogenèse, qui se déroule à partir du 32^{ème} JPF jusqu'à la fin de la grossesse, est cruciale pour la survie embryonnaire par ses actions sur le développement vasculaire placentaire, et l'établissement de la circulation fœto-maternelle. Elle peut être divisée en trois étapes qui se superposent dans le temps.

a) Du 32^{ème} JPF à la 27^{ème} SA

La formation du réseau capillaire se fait principalement par angiogenèse arborescente (angiogenèse avec branchements) (voir figure 31 b-c). Jusqu'aux alentours de la 11^{ème} SA, la croissance vasculaire se fait davantage par élongation de vaisseaux préexistants (angiogenèse non arborescente) que par bourgeonnement (voir figure 31 b et figure 32), ce qui conduit à une vascularisation moyennement développée. Au fur et à mesure que la grossesse avance et que le diamètre de la villosité augmente, l'angiogenèse arborescente est stimulée, et le réseau



**Figure 34 : Angiogenèse sans branchement à terme avec allongement des capillaires (à gauche x 700).
Vascularisation placentaire par marquage anti-CD34 par immunohistochimie (à droite x180) (Kaufmann
et al. 2004).**

vasculaire se développe plus intensément (voir figure 31 c et figure 33), principalement sous la surface trophoblastique.

b) De la 17^{ème} à la 34^{ème} SA

Les villosités intermédiaires immatures centrales vont alors se transformer en tronc villositaire par la régression du réseau capillaire périphérique, la différenciation en artérioles et en veinules des capillaires centraux et la formation de vaisseaux souches centraux.

c) De la 27^{ème} SA au terme

Une fois la viabilité du fœtus atteinte aux environs de la 27^{ème} SA, un changement dans le développement des villosités placentaires apparaît. Par une angiogenèse non arborescente (angiogenèse sans branchement), les villosités mésenchymateuses se transforment enfin en villosités intermédiaires matures, où la croissance des capillaires excède la croissance des villosités elles-mêmes (voir figure 34). Ces boucles de capillaires, qui se développent latéralement, apportent le sang fœtal encore plus près de l'espace intervillositaire pour former les villosités terminales. Elles apparaissent exponentiellement pendant le troisième trimestre de la grossesse (Kingdom J. et al. 2000). Cette angiogenèse non arborescente se déroule dans un milieu normoxique.

Dans une certaine mesure, la morphologie des villosités reflète les processus d'angiogenèse. Au premier trimestre, les villosités intermédiaires immatures ont un calibre large, une couche épaisse de trophoblastes et un réseau complexe de capillaires qui entoure les vaisseaux centraux. Par contre, au troisième trimestre, les structures villositaires sont allongées avec une couche trophoblastique mince et un réseau étroit de boucles de capillaires. La couche trophoblastique est plastique, et s'adapte aux changements du réseau vasculaire tout au long de la grossesse.

2.3 Régulation de l'angiogenèse placentaire

La régulation moléculaire de la vasculogenèse et de l'angiogenèse placentaire dépend de nombreux facteurs aux repères spatio-temporels bien précis. Les principaux régulateurs de l'angiogenèse placentaire connus à ce jour sont le VEGF-A, les PIGFs, les angiopoïétines, l'hypoxie et l'hCG (Valdes and Corthorn 2011).

A. Les facteurs de croissance

Un certain nombre de facteurs de croissance angiogènes sont produits et localisés dans le placenta humain, avec entre autres les FGFs (Ferriani et al. 1994, Muhlhauser et al. 1996, Shams and Ahmed 1994), les PIGFs (Khaliq et al. 1996, Vuorela et al. 1997), et le VEGF-A, qui a été le facteur le mieux étudié jusqu'à aujourd'hui (Ahmed et al. 2000, Sharkey et al. 1993, Shore et al. 1997, Vuorela et al. 1997, Wheeler et al. 1995). Leurs récepteurs ont été également localisés dans le placenta humain.

▪ VEGF-A

Plusieurs études ont démontré que VEGF-A et les récepteurs VEGFR-1, VEGFR-2 étaient les facteurs de croissance angiogènes clefs dans les conditions physiologiques et pathologiques de la placentation (Ahmed et al. 1995, Ahmed et al. 2000, Clark et al. 1996, Muhlhauser et al. 1995, Shore et al. 1997). Ce facteur de croissance est exprimé fortement dans les trophoblastes pendant les premières semaines de grossesse. Il peut être détecté dans la circulation maternelle à partir de la 8^{ème} SA, augmentant vers un pic à la fin du 1^{er} trimestre (Evans P. W. et al. 1998). VEGF-A est considéré comme le facteur le plus important pour la différenciation des cellules mésenchymateuses en hémangioblastes (Burton et al. 2009). Les souris invalidées pour VEGF-A ou VEGFR-2 ne peuvent pas initier la vasculogenèse (Carmeliet et al. 1996, Ferrara et al. 1996, Shalaby et al. 1995). Une signalisation paracrine du VEGF-A pourrait de ce fait expliquer la proximité des îlots hémangioblastiques de la couche trophoblastique. Plus tard dans la grossesse, son expression est retrouvée dans les trophoblastes villosités et extravillosités, les cellules de muscle lisse, les cellules de Hofbauer, et les cellules endothéliales fœtales, suggérant une régulation autocrine de l'angiogenèse (Clark et al. 1998, Jackson et al. 1994, Vuorela et al. 1997). L'expression de VEGF par les trophoblastes semble diminuer à mesure que la grossesse avance (Cooper et al. 1996, Kingdom J. et al. 2000).

La transcription du VEGF est induite par l'hypoxie via le facteur HIF-1, facteur exprimé par le placenta humain et en particulier par les trophoblastes extravilloux (Caniggia et al. 2000). Des études *in vitro* ont montré que les trophoblastes augmentaient leur sécrétion de VEGF, alors qu'ils diminuaient leur sécrétion en PlGF sous condition hypoxique (Lash et al. 2002, Trollmann et al. 2003). Via son récepteur VEGFR-2, VEGF-A induit une prolifération de cellules endothéliales alors que via VEGFR-1, il stimule la formation de tubes endothéliaux (Breier 2000). De ces deux processus résulte l'angiogenèse arborescente (avec branchements). Il est considéré à ce jour comme le facteur le plus important contrôlant l'angiogenèse placentaire pendant le 1^{er} trimestre de grossesse (Torry et al. 2004). Dès la fin du 2^{ème} trimestre, il se produit une diminution de la sécrétion de VEGF et, parallèlement, une augmentation de la production de PlGF dans le trophoblaste villositaire et extravilloux (Khaliq et al. 1996).

▪ PIGF

Il est exprimé majoritairement par les trophoblastes villositaires et extravilloux (Clark et al. 1998), dans le mésenchyme (Khaliq et al. 1999) et est présent dans les cellules endothéliales fœtales, suggérant une régulation autocrine de l'angiogenèse (Vuorela et al. 1997). PlGF et VEGFR-1 augmentent jusqu'au 3^{ème} trimestre de grossesse (Kaufmann et al. 1985) alors que VEGF-A et VEGFR-2 sont présents principalement pendant les 2 premiers trimestres (Khaliq et al. 1999, Kingdom J. et al. 2000). Il existe également un pic de PlGF circulant détectable entre les 28-32^{èmes} SA (Chappell et al. 2002, Torry et al. 1998). La sécrétion de PlGF est stimulée par l'oxygène. Il se lie uniquement sur le VEGFR-1, ce qui suggère que ce facteur serait impliqué davantage dans l'angiogenèse que dans la vasculogenèse. Mais l'implication de PlGF et VEGFR-1 dans la mobilisation dans les précurseurs endothéliaux mésenchymateux (Li B. et al. 2006a) suggère qu'ils participeraient quand même à la vasculogenèse. Des données *in vivo* montrent que PlGF peut stimuler la formation de vaisseaux à des niveaux comparables à ceux de VEGF-A (Ziche et al. 1997). VEGFR-1/R-2 sont décrits comme impliqués dans l'angiogenèse arborescente alors que PlGF/VEGFR-1 seraient impliqués dans l'angiogenèse sans branchement (pour revue : (Ahmed et al. 2000)). Cette modification graduelle de la balance entre VEGF et PlGF pourrait expliquer le changement de l'angiogenèse arborescente à une angiogenèse non-arborescente, qui mène à la formation de villosités terminales et à l'inhibition de l'expansion globale de l'arbre capillaire (Kingdom J. et al. 2000, Kurz et al. 1998) (Cao et al. 1996). PlGF peut médier, au moins en partie, ses activités angiogènes par la formation d'hétérodimères avec VEGF (Cao et al. 1996).

Il est intéressant de noter que l'hypoxie augmente l'expression de VEGF, alors qu'elle inhibe celle du PlGF (0 ou 1% d'O₂ pour l'hypoxie en comparaison à 20 ou 40% d'O₂) (Ahmed et al. 2000, Khaliq et al. 1999).

▪ Les angiopoïétines

Ang-1 est exprimée par les trophoblastes et les cellules endothéliales fœtales, alors qu'Ang-2 est localisée fortement dans les syncytiotrophoblastes, et plus modérément dans les cytotrophoblastes, les cellules endothéliales fœtales et les cellules de Hofbauer (Geva et al. 2002, Seval et al. 2008). Ang-2 est considérée comme un marqueur de l'angiogenèse placentaire et a été récemment décrite comme étant significativement associée au développement anormal du placenta (Baschat et al. 2010). Il a été rapporté que l'hypoxie et le VEGF-A augmentaient l'expression en ARNm d'Ang-2, alors que l'hypoxie diminuait la stabilité de l'ARNm d'Ang-1 (Charnock-Jones 2002, Mandriota and Pepper 1998, Oh et al. 1999, Zhang et al. 2001), ce qui suggère que l'expression des angiopoïétines puisse être modulée au cours de la grossesse. Tie-1 est exprimé fortement dans la coque trophoblastique et les cellules endothéliales fœtales, et Tie-2 dans les cytotrophoblastes et les cellules endothéliales fœtales (Seval et al. 2008). La forte expression des angiopoïétines et de leurs récepteurs dans le placenta humain suggère une participation active de ces facteurs dans les processus d'angiogenèse placentaire. Des études plus poussées permettront de déterminer leurs fonctions précises dans ces processus physiologiques, et dans les pathologies de la grossesse.

B. L'hypoxie

De nombreux facteurs de croissance sont régulés par la concentration locale placentaire en oxygène, comme le VEGF-A ou le PlGF par exemple. Or, il est bien établi que la pression en oxygène change dans l'espace intervilloux au cours de la grossesse (Jauniaux et al. 2001, Rodesch et al. 1992, Soothill et al. 1986). En effet, la pO₂ de l'espace intervilloux d'une grossesse antérieure à 10 SA est inférieure à 20 mmHg, supérieure à 50 mmHg après 14 SA, de 60 mmHg environ à 18 SA, et baisse graduellement jusqu'au terme pour atteindre 45 mmHg. Ces modifications de la concentration en oxygène de l'espace intervilloux sont très importantes pour le remodelage des artères spiralées maternelles. En effet, il est établi que l'hypoxie augmente la prolifération trophoblastique, alors que la normoxie inhibe la prolifération, et induit la migration des trophoblastes (Genbacev et al. 1997). Concernant les mécanismes de l'angiogenèse placentaire, cette forte augmentation de la pO₂ à 14 semaines ne

correspond pas pour autant à une chute drastique des taux de facteurs angiogènes placentaires régulés par l'hypoxie, suggérant l'existence d'autres régulateurs de leur expression que l'oxygène et le stress oxydatif. Ces données suggèrent également que la notion d'hypoxie nécessiterait probablement une définition plus fine lorsqu'elle est appliquée au placenta. En effet, des tissus placentaires du premier et dernier trimestre répondent différemment *in vitro* aux altérations de la pO_2 (Zhang et al. 2001).

C. Les hormones

Un certain nombre d'hormones sont aussi nécessaires pour le déroulement de l'angiogenèse placentaire. Le syncytiotrophoblaste, qui est en contact direct avec la circulation maternelle dans l'espace intervilloux, sécrète de nombreuses hormones pendant la grossesse, comme l'hCG (human Chorionic Gonadotropin), l'hPL (human Placental Lactogen) ou l'hCS (human Chorionic Somatomammotropic hormone). En plus de leur rôle spécifique, certaines participent directement et indirectement à l'angiogenèse placentaire. En revanche, leurs mécanismes d'action sont loin d'être encore totalement élucidés.

▪ L'hCG

L'hCG est une hormone glycoprotéique produite au cours de la grossesse par le trophoblaste, et en particulier par la couche syncytiotrophoblastique (Pierce and Parsons 1981). Plusieurs données de la littérature s'accordent aujourd'hui pour attribuer à l'hCG un nouveau rôle angiogène dans la placentation. En effet, l'hCG stimule la prolifération, agit en synergie avec le VEGF-A dans son effet anti-apoptotique, et stimule le bourgeonnement *in vitro* des cellules endothéliales microvasculaires placentaires, les HPEC (Human Placental Endothelial Cell) (Herr et al. 2007). Elle a également été décrite comme facteur stimulant l'angiogenèse des cellules endothéliales microvasculaires utérines (Zygmunt et al. 2002) ou des cellules endothéliales macrovasculaires ombilicales, les HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) (Berndt et al. 2006). De plus, l'hCG agit également sur l'angiogenèse par son action sur le VEGF. En effet, elle augmente l'expression du VEGF dans le corps jaune de l'ovaire (Sugino et al. 2000) et serait impliquée dans l'angiogenèse lutéale (Kashida et al. 2001). L'hCG agit également sur l'angiogenèse placentaire par son action inductrice de la production de VEGF par les trophoblastes (Islami et al. 2003).

α -subunit, 92 amino acids

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
 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

β -subunit, 145 amino acids

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 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-
 91 O O O O
 ser-ser-ser-lys-ala-pro-pro-ser-leu-pro-ser-pro-ser-arg-leu-pro-gly-pro-ser-asp-thr-pro-ile-leu-pro-gln
 118 121 127 132 138 145

Figure 35 : Séquence en acides aminés des sous unités α et β de l'hCG (Cole 2009a)

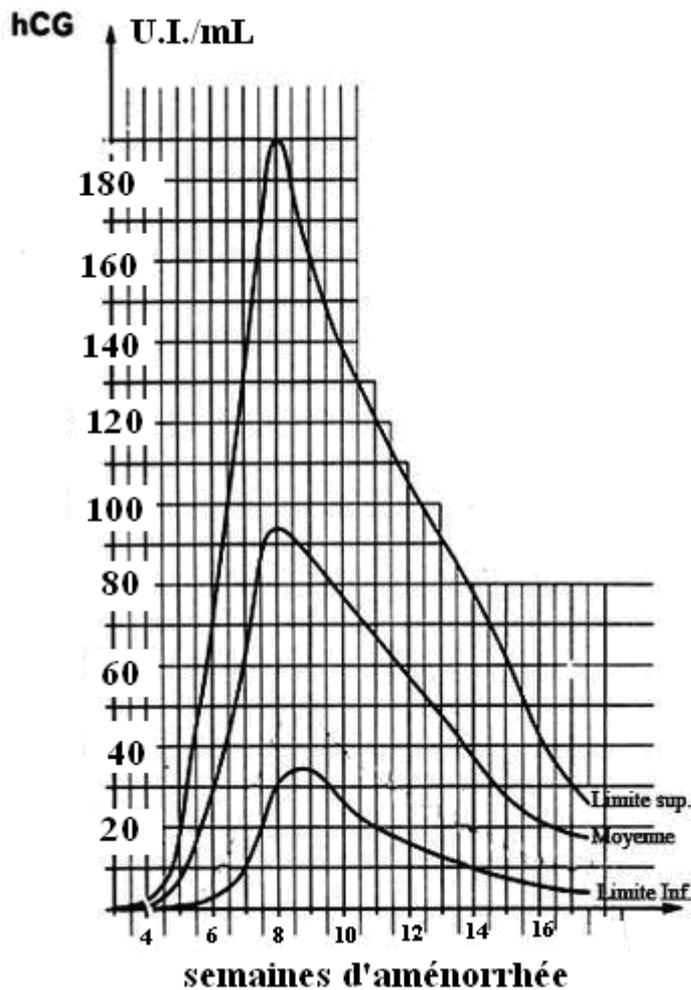


Figure 36 : Sécrétion plasmatique de l'hCG durant la grossesse normale. Schéma adapté de (Scholler and coll. 1980)

III. Hormone chorionique Gonadotrope humaine (hCG)

En plus de son effet sur l'angiogenèse placentaire, cette hormone tient un rôle majeur dans la grossesse humaine. Elle appartient à la famille des hormones glycoprotéiques qui inclut l'hormone lutéinisante (LH), l'hormone folliculo-stimulante (FSH), et l'hormone thyroïdienne (TSH). Ces hormones sont composées de deux sous-unités : une alpha (α) et une beta (β), unies par liaison non-covalente. L'unité α est commune à toutes les hormones glycoprotéiques, alors que la sous-unité β confère la spécificité hormonale (Pierce and Parsons 1981, Stockell Hartree and Renwick 1992).

3.1 Structure

L'hCG est un hétérodimère, avec une sous-unité α identique à celle de la LH, de la FSH, et de la TSH. Sa sous-unité β lui est propre et lui confère sa spécificité. Les deux sous-unités α -hCG et β -hCG, synthétisées séparément, sont unies par une liaison non-covalente (Laphorn et al. 1994).

A. Structure des gènes

Un seul gène sur le chromosome 6 code pour la sous-unité α (Fiddes and Goodman 1979), et six gènes codent pour la sous-unité β de l'hCG sur le chromosome 19, dont deux sont actifs et sont probablement nécessaires à la forte production de cette hormone durant la grossesse (Talmadge et al. 1983).

B. Structure de la protéine

L'hCG est composée de 237 acides aminés d'une masse moléculaire de 36 kDa. Elle comprend une sous-unité β de 145 acides aminés, et une sous-unité α de 92 acides aminés (voir figure 35). La demi-vie de dissociation des dimers en sous-unités α et β est de 700 ± 78 heures à 37°C (Cole et al. 1993). La demi-vie de l'hCG, qui est de 24 heures environ, est considérée comme plutôt longue (Cunningham FG et al. 1993).

3.2 Sécrétion

La sécrétion de l'hCG débute avant la nidation, et devient détectable entre le 7^{ème} et le 9^{ème} JPF (voir figure 36). Dès le retard des règles, sa concentration sanguine maternelle atteint 0,1 U.I./mL et son taux augmente jusqu'à la 8^{ème} SA environ, pour atteindre 100 U.I./mL, puis baisse jusqu'à la 18^{ème}-20^{ème} SA, pour se maintenir en plateau aux environs de 10-20 U.I./mL

jusqu'à l'accouchement. La concentration de l'hCG redevient non détectable environ 14 jours (de 3 à 30 jours) après l'accouchement (voir figure 36). Il existe une assez grande variabilité dans la concentration de l'hCG dans la circulation maternelle entre les différents sujets, ainsi que des variations circadiennes, bien qu'aucun rythme pulsatile circadien n'ait pu être mis en évidence à ce jour.

Le placenta est la première source d'hCG chez la femme enceinte (Hussa 1980). Après l'implantation, l'hCG est produite principalement par les trophoblastes (Handschuh et al. 2007a, Hoshina et al. 1985, Kliman et al. 1986, Muyan and Boime 1997) et majoritairement par le syncytiotrophoblaste. Des études plus poussées sur la sécrétion de l'hCG ont rapporté l'existence de protrusions de différentes tailles et formes à la surface de la couche syncytiale avec des granules contenant de l'hCG, particulièrement au sein de placentas de 7 SA environ (Yoshida 2005). Ces activités hypersécrétrices seraient entrecoupées de périodes de repos, pendant lesquelles la concentration en hCG est maintenue grâce à sa demi-vie considérée comme plutôt longue. L'hypersécrétion exacerbée des placentas de 6-7 SA participerait activement au pic d'hCG observé vers 8 SA, compensant ainsi la faible masse trophoblastique des placentas de ces âges gestationnels (Yoshida 2005). La baisse des niveaux de l'hCG dans la deuxième moitié de la grossesse reste encore à élucider. Cependant, la diminution de l'hCG a lieu au même moment de l'augmentation de la production de stéroïdes (progestérone et œstradiol) vers la 10^{ème} SA par le placenta (Islami et al. 2003). La production d'hCG est régulée par différentes molécules, dont la GnRH, les hormones stéroïdes (les œstrogènes stimulent la sécrétion de GnRH et la progestérone l'inhibe), les cytokines, la leptine (Islami et al. 2003), l'inhibine (via la suppression de GnRH) et d'autres facteurs de croissance comme l'EGF (epidermal growth factor) par exemple. A ce jour, le dosage de l'hCG reste l'indicateur majeur du bon déroulement de la grossesse. En effet, des taux anormaux peuvent indiquer une grossesse anormale (ectopique, multiple, tumeur trophoblastique, fœtus anormal, avortement spontané (fausse couche), mort *in utero* ...). Une concentration inférieure à la normale dans le sérum maternel peut être la conséquence d'un fœtus trisomique 18 (syndrome d'Edward), tandis qu'une concentration supérieure à la normale peut être le reflet d'une trisomie 21 (syndrome de Down) ou d'une môle hydatiforme. La clairance de l'hormone se fait par le rein majoritairement, d'où la présence de l'hormone dans l'urine, et par le foie. Seule 21,7% de l'hCG circulante est excrétée par l'urine (Nisula et al. 1989), le reste agit sur différents tissus ou est dégradé.

▪ hCG chez l'homme et la femme non enceinte

L'hCG est également sécrétée en faibles quantités par l'hypophyse chez l'homme et la femme non enceinte. Le dosage de l'hCG chez l'homme est inférieur à 8-10 mIU/mL, se situe entre 10 et 15 mIU/mL chez une femme non enceinte, et est inférieure à 15 mIU/mL chez une femme ménopausée. Il arrive à l'occasion que certaines tumeurs, notamment les carcinomes testiculaires, sécrètent des sous-unités β -libres ou des fragments immunoréactifs de la molécule, d'où l'intérêt du dosage de cette hormone chez les hommes en tant que marqueur tumoral. La concentration de l'hCG (souvent des sous-unités libres) corrèle alors avec le volume de la tumeur et le pronostic de la maladie. Le dosage de l'hCG est alors surtout utile dans le suivi du traitement, et de la progression de la maladie.

3.3 Fonctions

L'hCG joue un rôle capital dans le maintien de la grossesse. Le rôle de cette hormone serait de maintenir la production de progestérone par le corps jaune en début de grossesse jusqu'à ce que le placenta soit assez volumineux pour prendre le relais à partir de la 7^{ème} SA environ (Eta et al. 1994, Shi Q. J. et al. 1993, Toth et al. 1994). L'hormone stimulerait aussi le développement des gonades chez le fœtus, et la synthèse des androgènes par les testicules fœtaux (Huhtaniemi I. and Pelliniemi 1992, Huhtaniemi I. T. et al. 1977). En effet, l'hCG est présente dans la circulation fœtale, où son taux est maximal lors du pic plasmatique maternel (Huhtaniemi I. T. et al. 1977, Licht et al. 2001). Bien que les taux fœtaux et maternels aient des profils similaires, l'hCG fœtal atteint au plus 2,8 U.I./ml environ, soit 3% des taux d'hCG maternels (Clements et al. 1976). Cette différence s'explique par la présence de la barrière placentaire, qui empêche le sang fœtal et maternel d'être en contact direct. Un excès d'hCG est tératogène pour les gonades fœtales (Matzuk et al. 2003, Takasugi et al. 1985). Mais elle a aussi un effet anti-gonadotrope puisqu'elle inhibe la sécrétion de la LH et de la FSH. L'hCG est stéroïdogène, puisqu'elle favorise la sécrétion de progestérone du corps jaune, mais aussi parce qu'elle stimule la sécrétion des stéroïdes des gonades fœtales. Hormis la stéroïdogénèse, l'hCG joue un rôle dans l'augmentation de la fonction thyroïdienne du début de la grossesse, avec une diminution de la TSH, et dans la suppression partielle des réactions immunitaires. Sa principale fonction au sein du placenta serait l'induction de la différenciation des cytotrophoblastes en syncytiotrophoblastes (Cronier et al. 1994, Shi Q. J. et al. 1993). La régulation de la synthèse et de la sécrétion d'hCG est assurée par une GnRH trophoblastique.

| Gestation age (weeks since N last menses) | | Median Total hCG (mIU/ml) | HCG-H (% mole/mole) mean \pm SD |
|---|----------------|---------------------------|-----------------------------------|
| A. Serum samples | | | |
| 3-weeks-3-weeks 6-days | <i>n</i> = 12 | 12 | 90 \pm 11% |
| 4 weeks-4 weeks 6-days | <i>n</i> = 33 | 72 | 54 \pm 27% |
| 5 weeks-5-weeks 6-days | <i>n</i> = 25 | 521 | 42 \pm 27% |
| 6-weeks-6-weeks 6-days | <i>n</i> = 16 | 1879 | 29 \pm 38% |
| 7 weeks-7 weeks 6-days | <i>n</i> = 22 | 16,049 | 16 \pm 13% |
| 8 weeks-8 weeks 6-days | <i>n</i> = 33 | 47,641 | 7.0 \pm 5.4% |
| 9 weeks-9 weeks 6-days | <i>n</i> = 7 | 64,150 | 5.1 \pm 4.4% |
| 10 weeks-10 weeks 6-days | <i>n</i> = 8 | 102,750 | 4.3 \pm 3.1% |
| 11 weeks-13-weeks 6-days | <i>n</i> = 21 | 95,650 | 2.3 \pm 1.5% |
| 14 weeks-17 weeks 6-days | <i>n</i> = 57 | 32,275 | 1.3 \pm 0.61% |
| 18 weeks-26-weeks 6-days | <i>n</i> = 62 | 21,250 | 0.65 \pm 0.60% |
| 27 weeks-40 weeks 6-days | <i>n</i> = 49 | 21,025 | 0.36 \pm 0.16% |
| B. Urine samples | | | |
| 3-weeks-3-weeks 6-days | <i>n</i> = 80 | 13 (1.1X) | 83 \pm 92% |
| 4 weeks-4 weeks 6-days | <i>n</i> = 62 | 139 (1.9X) | 72 \pm 51% |
| 5 weeks-5-weeks 6-days | <i>n</i> = 62 | 902 (1.7X) | 38 \pm 46% |
| 6-weeks-6-weeks 6-days | <i>n</i> = 62 | 2730 (1.5X) | 22 \pm 25% |
| 7 weeks-7 weeks 6-days | <i>n</i> = 62 | 7500 (0.46X) | 15 \pm 13% |
| 8 weeks-8 weeks 6-days | <i>n</i> = 50 | 16,650 (0.34X) | 13 \pm 10% |
| 9 weeks-9 weeks 6-days | <i>n</i> = 47 | 50,458 (0.78X) | 8.2 \pm 8.5% |
| 10 weeks-10 weeks 6-days | <i>n</i> = 23 | 81,625 (0.79X) | 5.0 \pm 6.0% |
| 11 weeks-13-weeks 6-days | <i>n</i> = 128 | 19,130 (0.20X) | 4.2 \pm 3.8% |
| 14 weeks-17 weeks 6-days | <i>n</i> = 124 | 6367 (0.20X) | 3.0 \pm 3.8% |
| 18 weeks-26-weeks 6-days | <i>n</i> = 39 | 4337 (0.20X) | 1.4 \pm 1.3% |
| 27 weeks-40 weeks 6-days | <i>n</i> = 50 | 5224 (0.25X) | 1.6 \pm 2.3% |

Figure 37 : Production d'hCG-H au cours de la grossesse (sang et urine). D'après (Cole 2010).

3.4 hCG hyperglycosylée

Entre 1985 et 1997, une hCG différente de l'hCG normale a été rapportée. Cette hCG est produite dans les maladies trophoblastiques où l'invasion est dérégulée, comme dans le choriocarcinome (Cole et al. 1985, Cole 1987, Elliott et al. 1997). Il s'agit de l'hCG hyperglycosylée (hCG-H), où les sous-unités α et β sont toutes les deux hyperglycosylées. Il n'existe aucune différence entre l'hCG et l'hCG-H du point de vue de leur séquence peptidique. L'hCG hyperglycosylée est prédominante pendant la période d'implantation, où elle représente environ 85% de l'hCG urinaire dosée et 90% de l'hCG circulante, puis elle décroît rapidement dans les semaines qui suivent l'implantation, représentant moins de 2% au second et troisième trimestre de grossesse (voir figure 37) (Cole et al. 2003, Kovalevskaya et al. 2002a). Alors que la demi-vie de dissociation des dimères en sous-unités de l'hCG normale est de 700 ± 78 heures à 37°C (Cole et al. 1993), celle de l'hCG-H est plus courte, avec environ 140 heures à 37°C (Cole et al. 1991). Elle est synthétisée fortement par les trophoblastes extravilleux endovasculaires, et dans une moindre mesure par les cytotrophoblastes villeux et les trophoblastes extravilleux invasifs (Guibourdenche et al. 2010). L'hCG-H stimule l'implantation du blastocyste, induit la prolifération et l'invasion trophoblastique (Cole et al. 2003, Cole et al. 2006a, Cole et al. 2006b, Handschuh et al. 2007b, Sasaki et al. 2008). Les taux circulants d'hCG-H reflèteraient donc le succès de l'invasion trophoblastique du 1^{er} trimestre, et pourrait être de ce fait un bon marqueur de ce processus.

3.5 Récepteur LH/hCG (LH/CGR)

Le récepteur de l'hCG, qui est aussi celui de la LH, appartient à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G ou RCPG (McFarland et al. 1989). L'hCG aurait un effet plus « puissant » que la LH grâce à son affinité plus haute pour le récepteur, ainsi que par sa demi-vie plus longue (Rahman and Rao 2009, Rao C. V. 1979). Le gène qui code pour le LH/CGR, d'environ 70kb, est localisé sur le chromosome 2p21 et contient 10 introns et 11 exons (Koo et al. 1991, Rousseau-Merck et al. 1990). Les 10 premiers exons correspondent au domaine extracellulaire, alors que le 11^{ème} exon encode une petite partie du domaine extracellulaire, la région transmembranaire, et la partie C-terminale intracellulaire. L'épissage alternatif de ce gène produit au moins six ARNm différents, dû à différents sites d'initiation de la transcription contenus dans une région d'1 kb situé en amont

du 1^{er} exon (Atger et al. 1995). Ces différents ARNm codent pour des protéines tronquées capables de lier l'hormone, mais incapables de transmettre le signal (Banerjee et al. 2005, Bukovsky et al. 2003, Madhra et al. 2004, Nakamura et al. 2004, Pidoux et al. 2007a). Le LH/CGR est présent dans tout le système reproducteur féminin comme l'utérus (Zuo et al. 1994), le placenta (Reshef et al. 1990), le cordon ombilical (Rao C. V. et al. 1993), et l'ovaire (Minegishi et al. 1990). Dans les trophoblastes, l'hCG se lie à son récepteur, qui se lie alors à la protéine Gs, et de ce fait induit la stimulation de l'Adénylyl Cyclase (AC) et l'augmentation de l'AMP cyclique intracellulaire (Ascoli et al. 2002). Dans le placenta, le récepteur de l'hCG est exprimé principalement dans les syncytiotrophoblastes, et faiblement dans les cytotrophoblastes villosités (Jauniaux et al. 2000a, Shi Q. J. et al. 1993) ainsi que dans les cellules de Hofbauer (Jauniaux et al. 2000a) et les cellules endothéliales (Herr et al. 2007, Jauniaux et al. 2000a). D'autres données de la littérature rapportent une expression majeure du LH/CGR dans les cytotrophoblastes villosités, et mineure dans les syncytiotrophoblastes (Pidoux et al. 2007a, Pidoux et al. 2007b) (voir la Partie « Résultats-publication n°2 » pour plus de détails). Les LH/CGR sont également présents dans les trophoblastes extravilloux (Handschuh et al. 2007b, Tao et al. 1995). Récemment, des variants solubles de LH/CGR excrétés par certaines microvésicules placentaires ont été mis en évidence (Chambers et al. 2011), complexifiant encore davantage la compréhension des régulations entre l'hCG et le LH/CGR.

3.6 *Domaine de la reproduction et hCG*

Depuis de nombreuses années, les applications de la recherche sur l'hCG ont mené à l'élaboration et à l'amélioration des méthodes de détection de cette hormone par des tests urinaires ou sanguins. Les résultats de ces tests sont particulièrement difficiles à interpréter, car il existe une grande variabilité dans les taux inter-individuels circulants pour cette hormone, ainsi que dans la nature des formes détectées (Cole 2009a, Rahman and Rao 2009), ce qui conduit parfois à l'apparition de faux-positifs ou de faux-négatifs. Ces tests ont de multiples utilisations dans le domaine de la reproduction, avec entre autres, des applications pour la détection des grossesses intra-utérines, des grossesses ectopiques, ou encore des fausses couches (Davies et al. 2003). En plus de son rôle dans la détection des grossesses physiologiques et pathologiques, l'hCG a été testée depuis quelques années dans plusieurs études comme un traitement possible dans le domaine de la reproduction assistée. En effet, il a été montré que l'administration d'hCG chez des patientes engendrait une augmentation

significative dans les taux d'implantation après fécondation in vitro (FIV), probablement via une action de l'hormone sur la réceptivité endométriale et sur l'augmentation de la fenêtre implantatoire (Filicori et al. 2005, Fujimoto et al. 2002, Tesarik et al. 2003). De plus, l'hCG a également été rapportée pour son effet positif sur le maintien de la grossesse. En effet, une seule injection d'hCG a été décrite comme diminuant significativement l'incidence des fausses couches précoces spontanées et récurrentes (Toth et al. 2001). Ceci serait dû en partie à son action relaxante et vasodilatatrice sur les artères utérines, augmentant ainsi la perfusion utéro-placentaire (Toth et al. 2001). L'hCG possède également des effets positifs sur le maintien plus tardif de la grossesse, avec des propriétés inhibitrices sur les contractions utérines (Belmonte et al. 2005, Phillips et al. 2005, Slattery et al. 2001). Son action sur la prévention de la prématurité a été montrée chez la souris (Kurtzman et al. 1999, Kurtzman et al. 2001) et chez la femme (Than et al. 2003). L'ensemble de ces données laisse entrevoir des bénéfices thérapeutiques potentiels énormes pour cette hormone. L'utilisation de cohortes plus grandes permettra peut être prochainement de confirmer ces résultats et d'utiliser l'hCG comme un outil thérapeutique en routine dans le domaine de la procréation (Cole 2009a, Rahman and Rao 2009, Rao C. V. and Lei 2007).

IV. Les Prokinéticines

Les prokinéticines sont deux protéines, PROK1 et PROK2, récemment identifiées et possédant diverses fonctions dans l'organisme.

4.1 Les Prokinéticines et leurs récepteurs

A. Découverte des prokinéticines

Les prokinéticines sont une nouvelle famille de protéines sécrétées comportant deux membres : prokinéticine-1 (PROK1) et prokinéticine-2 (PROK2). En 1980, Joubert et Strydom décrivent une petite protéine non toxique dans le venin du serpent *Mamba noir* (*Dendroaspis polylepis*), appelée alors VPRA pour Venom Protein A (Joubert and Taljaard 1980). En 1999, l'étude fonctionnelle de cette protéine montre qu'elle stimule la contraction de l'iléon chez le cochon d'inde, et est alors nommée MIT-1 pour Mamba Intestinal Toxin 1 (Schweitz et al. 1990, Schweitz et al. 1999). La même année, une petite protéine riche en cystéines a été isolée des sécrétions de peau de la grenouille *Bombina variegata*, et nommée Bv8 pour son origine et son poids moléculaire de 8 kDa. L'effet de ce peptide sur l'appareil gastro-intestinal de rongeurs induit des contractions de l'iléon chez le cochon d'inde, le rat et la souris ; relaxe le colon chez le rat ; et induit une hyperalgésie¹³ chez les rats (Mollay et al. 1999). Bv8, qui est l'homologue de MIT1 chez la grenouille (Schweitz et al. 1999), présente une séquence protéique très proche et possède des propriétés contractiles similaires. Les séquences d'ADN codant pour MIT1 et Bv8 ont été utilisées comme sondes pour la recherche d'homologues dans la base de données du génome humain. En 2001, deux orthologues de MIT-1 et Bv8 chez l'homme ont été identifiés. Du fait de leur capacité à induire la contraction de l'iléon du cochon d'inde, ils ont été nommés respectivement prokineticine-1 (PROK1), et prokineticine-2 (PROK2) (Li M. et al. 2001, Wechselberger et al. 1999). En parallèle, l'équipe de Ferrara publia en 2001 l'identification d'un facteur de croissance spécifique des glandes endocrines, aux effets similaires à ceux du VEGF, et le nomma de ce fait EG-VEGF pour Endocrine Gland-derived Vascular Endothelial Growth Factor (*LeCouter et al. 2001*). Malgré des similarités d'action et de mécanismes de contrôle entre VEGF et EG-VEGF, ces deux facteurs n'ont aucune homologie de structure. L'alignement des séquences de PROK1 et d'EG-VEGF a permis de conclure qu'il s'agissait en réalité de la même protéine.

¹³ augmentation de la sensibilité à la douleur

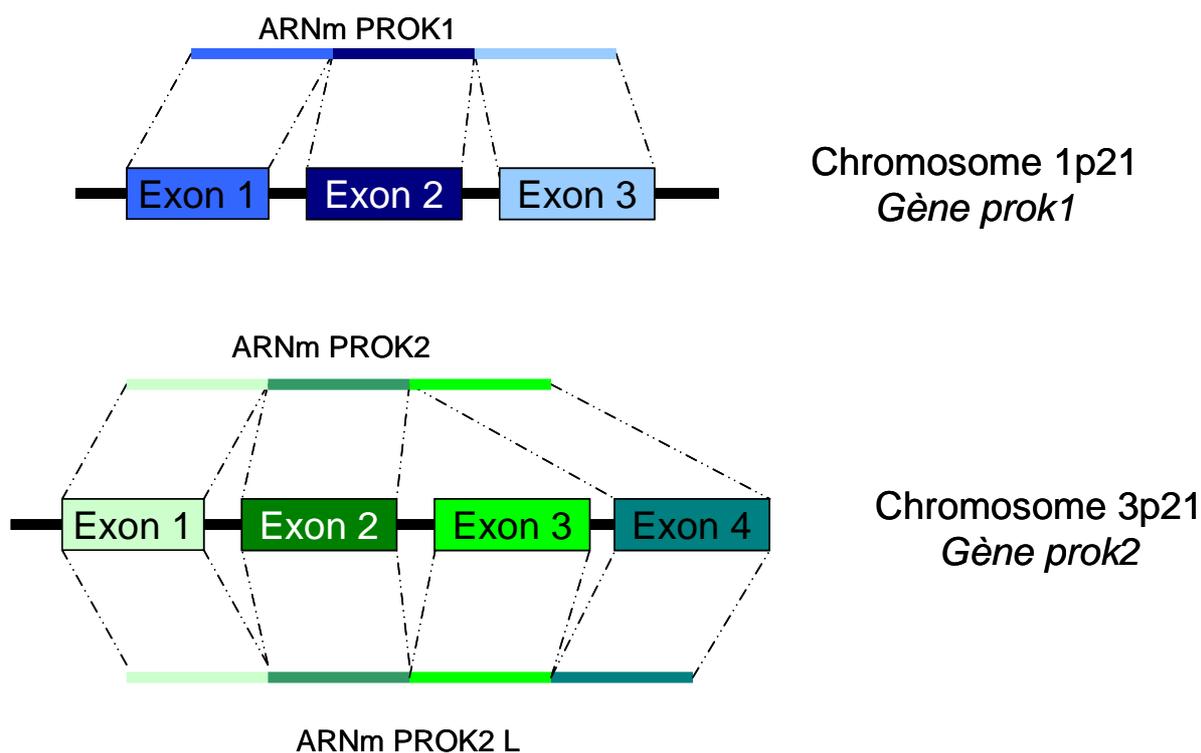


Figure 38 : Structure des gènes *prok1* et *prok2*

| | | | | |
|-----|-------------------------------------|------------------------------------|------------------------------|----|
| H1 | AVITGACERDVQCGAGTCCAISLWLRGLRMCTPL | GREGECHPGSHKVPFFR-KRKHHTCPCLPNLLC | SRFPDGRYRCSDMLKNINF | 86 |
| R1 | AVITGACERDVQCGAGTCCAISLWLRGLRLCTPL | GREGECHPGSHKIPFFR-KRQHHTCPCSPSLLC | SRFPDGRYRCSDLKNVNF | 86 |
| M1 | AVITGACERDIQCGAGTCCAISLWLRGLRLCTPL | GREGECHPGSHKIPFLR-KRQHHTCPCSPSLLC | SRFPDGRYRCFRDLKNANF | 86 |
| Mam | AVITGACERDLQCGKGTCCAIVSLWIKSVRVCTPV | GTSGEDCHPASHKIPFSGQRKMHHTCPCAPNLAC | VQTSPPKFKCLSK | 80 |
| Bom | AVITGACDKDVQCGSGTCCAASAWSRNIRFCIPL | GNSGEDCHPASHKVPYDG-KRLSSLCPCKSGLTC | SKSGE-KFKCS | 77 |
| F1 | AVITGACERDVQCGGLGCCAVSLWLRGLRMCAPR | GLEGDECHPFCHKVPYPG-KRQHHTCPCLPHLVC | TRDRDSKYRCTDDDFKNVDLYEVGQTLR | 94 |
| H2 | AVITGACDKDSQCGGMCCAIVSIWVKSIRICTPM | GKLGDSCHPLTRKVPFFG-RRMHHTCPCLPGLAC | LRTSFNRFICLAQK | 81 |
| M2 | AVITGACDKDSQCGGMCCAIVSIWVKSIRICTPM | GQVGDSCPLTRKVPFFG-RRMHHTCPCLPGLAC | LRTSFNRFICLARK | 81 |
| R2 | AVITGACDKDSQCGGMCCAIVSIWVKSIRICTPM | GQVGDSCPLTRKVPFFG-RRMHHTCPCLPGLAC | LRTSFNRFICLARK | 81 |
| B2 | AVITGACDRDPQCGGMCCAIVSLWVKSIRICTPM | GKVGDSCHPMTRKVPFLG-RRMHHTCPCLPGLAC | SRTSFNRYTCLAQK | 81 |
| F2 | AVITGACEKDSQCGGMCCAIVSIRSLRMCTPM | GREGDDCHPMSHTVPFFG-KRLHHTCPCLPNLSC | IPMDEGRAKCLSTYKYPDYYL | 88 |

Figure 39 : Séquence d'acides aminés des protéines matures de la famille AVIT dans différentes espèces. Le numéro fait référence au type 1 ou au type 2 des prokinétines. H : homme, R : rat, M : souris, Mam : serpent *mamba*, Bom : grenouille *Bombina varieta*, B : Taureau, F : Fugu. Les rectangles bleus montrent les acides aminés conservés. 86 indique le nombre d'acide aminé chez l'homme (Kaser et al. 2003).

Cette nouvelle famille de peptides est impliquée dans de nombreuses fonctions biologiques. Quelques années après, les homologues de Bv8 et MIT-1 ont été identifiés dans les sécrétions de peau d'autres amphibiens, de lézards, de poissons des espèces de Takifugu, de souris, de rats, de bovins, et de singes (Negri et al. 2007).

B. Les gènes des prokinéticines

Le gène *prok1* qui code pour la prokinéticine-1 (PROK1) chez l'homme est localisé sur le chromosome 1 en 1p21. Il est composé de trois exons, sans épissage alternatif connu. Le gène *prok2* qui code pour la prokineticine-2 (PROK2) se situe sur le chromosome 3 en 3p21.1, et est composé de quatre exons. Il donne deux protéines matures : PROK2 (exon 1,2, et 4), et une seconde forme PROK2L (exons 1, 2, 3, et 4) (voir figure 38). Les promoteurs de *prok2* humain et murin sont hautement conservés, suggérant une régulation transcriptionnelle similaire, alors que les promoteurs de *prok1* ont divergé, suggérant une spécificité dans la régulation transcriptionnelle de ces deux gènes (Bullock et al. 2004, LeCouter et al. 2003a, LeCouter et al. 2003b).

C. Les protéines des prokinéticines

PROK1 est constituée de 86 acides aminés, dont 10 cystéines, avec une masse moléculaire relative de 8,6 kDa. Son ADNc code pour une protéine de 105 acides aminées, dont 19 correspondent au peptide signal. PROK2 est composée de 81 acides aminés, et la seconde forme, PROK2L, de 102 acides aminés (voir figure 39). Les séquences protéiques de PROK1 et PROK2 présentent 44% d'identité environ (Maldonado-Perez et al. 2007). Toutes les protéines de cette famille possèdent une séquence hexa-peptidique identique en N-terminale : AVITGA. Elle est essentielle pour leurs activités biologiques et leurs liaisons aux récepteurs PROKR1 et PROKR2. Ces quatre premiers acides aminés N-terminaux (AVIT) ont été utilisés pour nommer cette famille de protéines (Kaser et al. 2003). Les prokinéticines possèdent également 10 cystéines constituant les 5 ponts disulfures (voir figure 39).

De façon intéressante, des protéines possédant de fortes homologies structurales avec les prokinéticines, et appartenant à la famille MIT-like atracotoxin (ACTX) ont été découvertes chez les invertébrés. Elles ont été trouvées entre autres dans le venin des araignées de genre

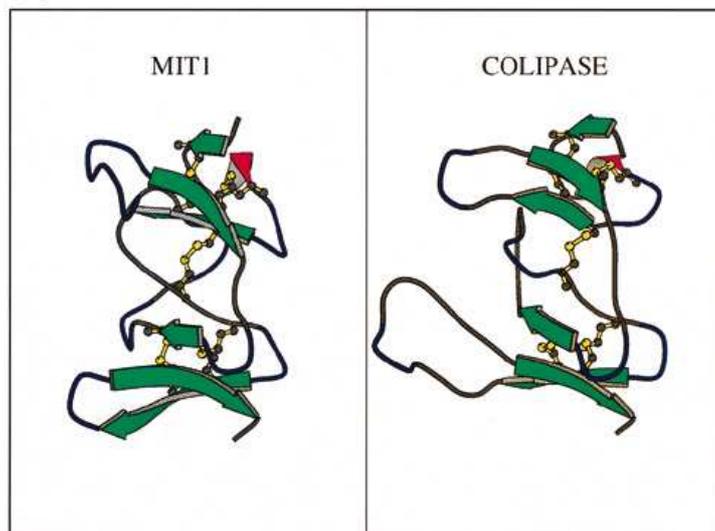


Figure 40 : Structure secondaire de MIT-1 et de la colipase (Boisbouvier et al. 1998).

Hadronyche (Szeto et al. 2000, Wen et al. 2005), le système des allomones¹⁴ chez les cnidaires (Sher et al. 2005) et dans les hémocytes¹⁵ de la crevette (Soderhall et al. 2005). Ces protéines ont perdu la séquence AVITGA en N-terminale, et sont incapables d'activer les récepteurs de mammifères des prokinéticines. Les similarités entre les prokinéticines de différentes espèces sont particulièrement importantes dans les régions N-terminales et centrales. Les différences majeures de ces protéines sont retrouvées dans les régions C-terminales (voir figure 39), où une conservation modérée de cette partie est tolérée pour le maintien de l'activité des prokinéticines (Bullock et al. 2004). En 1998, la structure tridimensionnelle de MIT-1 a été identifiée par résonance magnétique nucléaire (RMN) (Boisbouvier et al. 1998). Les dix cystéines sont particulièrement importantes pour la conformation des prokinéticines et leurs propriétés biochimiques. Les cinq ponts disulfures présents chez MIT-1 et PROK1 sont similaires à ceux retrouvés chez la colipase¹⁶ des mammifères (voir figure 40), mais cette homologie structurale ne se répercute pas au niveau fonctionnel puisque les prokinéticines ne stimulent pas l'activité de la lipase pancréatique (Boisbouvier et al. 1998, Kaser et al. 2003).

Ces ponts disulfures sont essentiels pour l'activité car un mauvais repliement de protéines recombinantes ou des mutations dans les cystéines donnent des protéines incapables d'activer les récepteurs des prokinéticines (Bullock et al. 2004). Les prokinéticines sont des protéines très basiques, avec un pI (point isoélectrique) calculé de 8,65 pour PROK1, 8,85 pour PROK2, et 10,68 pour PROK2L. De nombreuses protéines sécrétées comme les cytokines et les chémokines sont également très basiques, et interagissent avec la matrice extracellulaire. PROK1 se lie avec une grande affinité à l'héparine, d'où la possibilité que les prokinéticines puissent être régulées par séquestration dans le compartiment extracellulaire *in vivo* (LeCouter et al. 2001).

¹⁴ système de défense composé de neurotoxines chez les anémones de mer et les hydres

¹⁵ phagocytes des invertébrés

¹⁶ co-enzyme nécessaire à l'activité enzymatique optimale de la lipase pancréatique

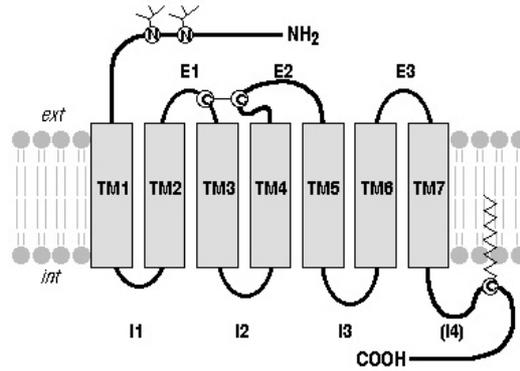


Figure 41 : Structure d'un RCPG avec les sept hélices alpha transmembranaires. L'extrémité amino-terminale (NH₂) de la protéine est extracellulaire. L'extrémité carboxy-terminale (COOH) est intracellulaire. On peut observer 3 boucles extracellulaires (nommées E1, E2 et E3) et 3 boucles intracellulaires (I1, I2 et I3). Ces protéines peuvent être sujettes à des modifications post-traductionnelles, de type N-glycosylation, acylation par des composés lipidiques (formant parfois une pseudo-quatrième boucle intracellulaire (I4), formation de ponts disulfures entre les chaînes latérales de 2 résidus de cystéines. Schéma de <http://rcpg.chez.com/images/structrcpg1.jpg>

| | | | | | | |
|------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|-----|
| PROKR1 | METIMGFMDD | NAINTSTSFLL | SVLNPHGAHA | TSFPFNFSYS | DYDMLDEDE | 50 |
| PROKR2 | MA----- | -ACNGNTSFT | PNFNPPQDHA | SSLSFNFSYG | DYDLMDEDE | 41 |
| TM1 | | | | | | |
| PROKR1 | DVTNSRTFFFA | AKIVIGMALV | GIMLVCGIGN | FIFIAALVRY | KKLRNLINLL | 100 |
| PROKR2 | DMTKTRTFFFA | AKIVIGIALA | GIMLVCGIGN | FVFI AALTRY | KKLRNLINLL | 91 |
| TM2 | | | | | | |
| PROKR1 | IANLAISDFL | VAIVCCPFEM | DYYVVRQLSW | EHGHVLCISV | NYLRTVSLYV | 150 |
| PROKR2 | IANLAISDFL | VAIICCPFEM | DYYVVRQLSW | EHGHVLCASV | NYLRTVSLYV | 141 |
| TM3 | | | | | | |
| PROKR1 | STNALLAIAI | DRYLAI VHPL | RPRMKCQTAT | GLIALVWTVS | ILIAIPSAFY | 200 |
| PROKR2 | STNALLAIAI | DRYLAI VHPL | KPRMNYQTAS | FLIALVWMVS | ILIAIPSAFY | 191 |
| TM4 | | | | | | |
| PROKR1 | TTETVLVIVK | SQEKIFCGQI | WPVDQQLYYK | SYFLFIFGIE | FVGPVVTMTL | 250 |
| PROKR2 | ATETVLVIVK | SQEKIFCGQI | WPVDQQLYYK | SYFLFIFGVE | FVGPVVVTMTL | 241 |
| TM5 | | | | | | |
| PROKR1 | CYARISRELW | FKAVPGFQTE | QIRKRLRCRR | KTVLVLMCIL | TAYVLCWAPF | 300 |
| PROKR2 | CYARISRELW | FKAVPGFQTE | QIRKRLRCRR | KTVLVLMCIL | TAYVLCWAPF | 291 |
| TM6 | | | | | | |
| PROKR1 | YGFTIVRDEF | PTVFVKEKHY | LTAFYIVECI | AMSNSMINTL | CFVTVKNDTV | 350 |
| PROKR2 | YGFTIVRDEF | PTVFVKEKHY | LTAFYVVECI | AMSNSMINTV | CFVTVKNNMT | 341 |
| TM7 | | | | | | |
| PROKR1 | KYFKKIMLLH | WKASYNGGKS | SADLDLKTIG | MPATEEVDCI | RLK | 393 |
| PROKR2 | KYFKKMMLLH | WRPSQRGSKS | SADLDLRTNG | VPTTEEVDCI | RLK | 384 |

Figure 42 : Alignement des séquences protéiques des récepteurs humains PROKR1 et PROKR2. Les rectangles gris indiquent les acides aminés identiques. La flèche montre la jonction des deux exons dans la séquence codante. Les séquences transmembranaires des récepteurs sont identifiées par des cadres noirs. 393 et 384 indique le nombre d'acides aminés chez l'homme. Schéma de (Soga et al. 2002).

D. Les récepteurs des prokinétines

Plusieurs équipes ont identifié simultanément les récepteurs des prokinétines chez les mammifères (Lin D. C. et al. 2002a, Masuda et al. 2002, Soga et al. 2002). Les prokinétines exercent leurs fonctions biologiques en se liant à deux RCPG, le récepteur 1 des prokinétines, PROKR1, et le récepteur 2 des prokinétines, PROKR2 (voir figure 41). PROKR1 et PROKR2 partagent environ 85% d'acides aminés identiques et montrent des différences majeures dans le domaine N-terminal (voir figure 42) (Lin D. C. et al. 2002a, Masuda et al. 2002). Leurs séquences sont presque identiques pour les domaines transmembranaires, suggérant une similitude dans leurs mécanismes d'activation (Maldonado-Perez et al. 2007). Les gènes correspondant à PROKR1 et PROKR2 sont localisés respectivement en 2q14 et 20p13 chez l'homme, indiquant que ces deux RCPG sont codés dans le génome humain par des gènes indépendants (Kaser et al. 2003, Lin D. C. et al. 2002a). Les deux gènes *prokr1* et *prokr2* sont composés de deux exons chacun, codant pour 393 acides aminés pour PROKR1, et pour 384 acides aminés pour PROKR2 (Soga et al. 2002).

4.2 Signalisation des prokinétines

A. Voies de signalisation

a) Activation des récepteurs couplés aux protéines G

Les RCPG constituent la plus importante famille de protéines membranaires impliquées dans la signalisation cellulaire. Chez les vertébrés, cette famille contient à ce jour entre 750 à 1000 membres, et représente ainsi la plus grande famille de gènes (>1% du génome humain). Chez l'homme, l'analyse du génome a permis de recenser environ 750 RCPG, dont la majorité correspond aux récepteurs olfactifs et gustatifs (Fredriksson and Schiöth 2005). Les RCPG sont caractérisés par la présence de sept hélices α transmembranaires séparées alternativement par des boucles intracellulaires et extracellulaires (Rosenbaum et al. 2009). Les récepteurs à sept domaines transmembranaires ont la particularité d'interagir avec les protéines G hétérotrimériques, d'où la terminologie de RCPG. Pour la majorité des RCPG, leur interaction avec les protéines G n'est pas encore démontrée, en particulier pour les gènes des récepteurs récemment séquencés.

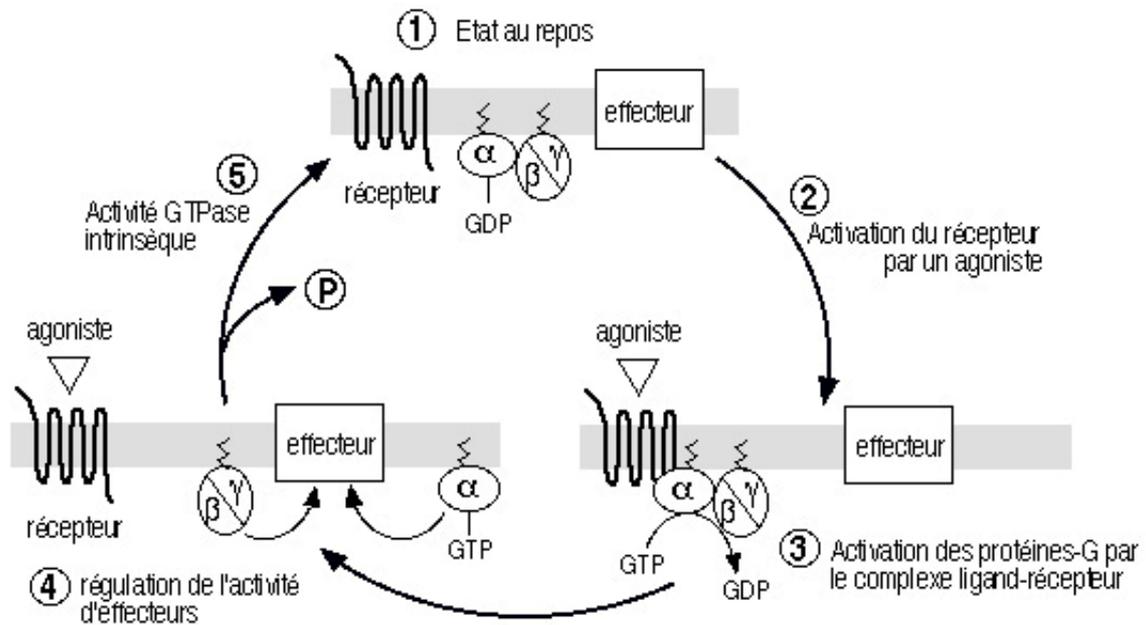


Figure 43 : Activation d'un RCPG. Un RCPG au repos (1) est activé par la liaison d'un agoniste spécifique (2). Le changement de conformation du complexe agoniste-récepteur, induit par cette liaison, permet l'activation de l'échange du GDP par du GTP et donc l'activation de la protéine-G hétérotrimérique (sous-unités $G\alpha$ et $G\beta/\gamma$) intracellulaires (3) qui vont aller réguler l'activité de divers effecteurs (4) membranaires ou cytosoliques. Le déclenchement de l'activité phosphatase, intrinsèque à la sous-unité $G\alpha$ entraîne la réassociation des sous-unités $G\alpha$ et $G\beta/\gamma$ (5) et le retour à l'état initial (1). Tant que le récepteur est activé par son ligand, et tant que le système ne subit pas une désensibilisation, le cycle d'échange du GDP par du GTP continue. Schéma de <http://rcpg.chez.com/images/GTPase.jpg>

Les protéines G sont constituées de trois polypeptides : la sous unité α , qui se lie et hydrolyse le GTP (guanosine tri-phosphate), et le dimère composé des sous unités β et γ (voir figure 43). La forme inactive de la protéine hétérotrimérique est composée de la sous unité α liée au GDP (guanosine di-phosphate), qui est associée au dimère $\beta\gamma$ (GDP- $\alpha\beta\gamma$). Le signal apporté par le stimulus extracellulaire est transduit à l'intérieur de la cellule, par l'intermédiaire du récepteur. Le récepteur transmet l'information aux protéines-G intracellulaires, qui activent ou inhibent alors des effecteurs intracellulaires. Le récepteur peut changer de conformation en présence de son ligand ou de manière constitutive (Smit et al. 2007). Ceci entraîne un changement de conformation de GDP- α , et la réduction de l'affinité du GDP. Le GTP se lie alors à la sous-unité α de la protéine hétérotrimérique. La forme active GTP- α provoque sa dissociation avec $\beta\gamma$, ainsi qu'avec le récepteur. La sous-unité α conserve sa forme active jusqu'à ce que le GTP soit hydrolysé en GDP grâce à l'activité intrinsèque GTPase.

Dès que le GTP est hydrolysé en GDP, la sous-unité α s'associe avec le dimère $\beta\gamma$ et le récepteur (Neer 1995). La fréquence et la durée d'activation des protéines G dépendent de la durée de vie de GTP- α . L'activité GTPase intrinsèque de la sous-unité α peut être accélérée en présence des protéines GAP (*GTPase-activating protein*). La sous-unité $\beta\gamma$ interagit également avec divers effecteurs tels que la phospholipase C (PLC), l'adénylyl cyclase (AC) ou la phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate kinase (PI3K) (Ford et al. 1998).

b) Régulation négative de la réponse induite par l'agoniste

Il existe des processus de contrôle de l'activité du récepteur suite à la liaison du RCPG avec son ligand (voir Figure 44). Il en résulte une régulation fine de la durée d'activation, ce qui a pour but de limiter dans le temps le signal, et d'éviter ainsi une « surcharge » stimulatrice. En effet, une stimulation prolongée du récepteur aurait des effets toxiques pour la cellule. Les grands mécanismes généraux de régulation du signal des RCPG sont la suppression de l'agoniste, la désensibilisation du RCPG, l'internalisation des RCPG et la régulation négative de l'expression du RCPG lui-même (pour revue voir (Luttrell 2008)).

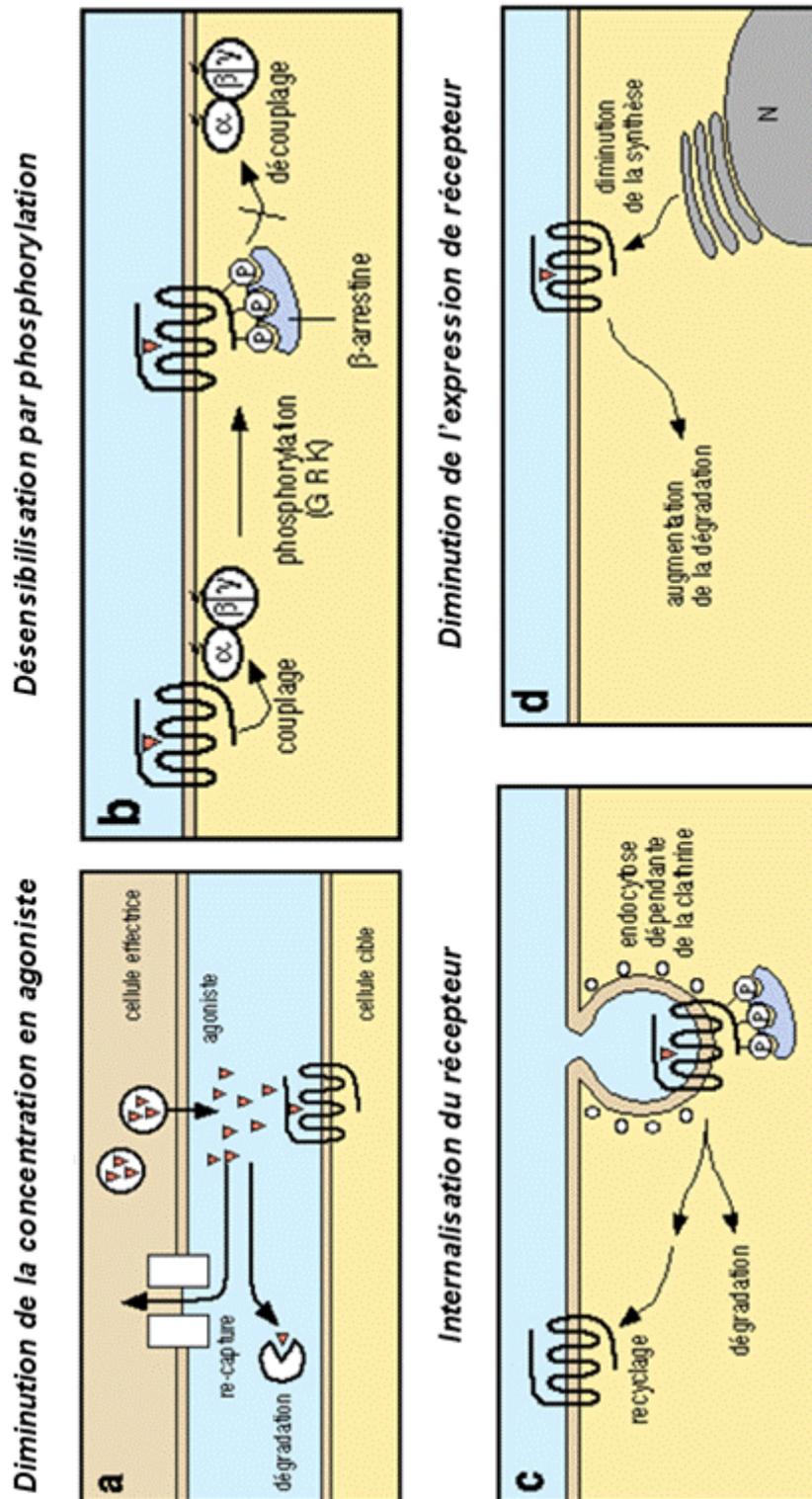


Figure 44 : Mécanismes de régulation de l'activité des RCPG. (A) Diminution de la concentration en agoniste. (B) Désensibilisation par phosphorylation de la queue C-terminale. (C) Internalisation du récepteur. (D) Diminution de l'expression du RCPG à la membrane. Image adaptée de <http://www.123bio.net/cours/liaison/images/desen4-3-2-1.jpg>

▪ Diminution de la concentration en agoniste

Il existe des contrôles locaux de la concentration du médiateur, qui peut se faire par recapture du ligand par la cellule effectrice, ou par sa dégradation par des enzymes spécifiques. De tels phénomènes sont bien décrits au niveau des fentes synaptiques par exemple.

▪ Désensibilisation des RCPG

Un découplage fonctionnel entre le RCPG et la protéine G se fait alors par la phosphorylation de résidus sérine/thréonine sur la queue C-terminale du récepteur. Il existe deux grands mécanismes de désensibilisation : la désensibilisation homologue et hétérologue.

- désensibilisation homologue : elle se fait par les protéines GRK et arrestine.

Ce mécanisme fait intervenir des kinases spécifiques des RCPG, que sont les GRK (G-protein coupled receptor kinases). La phosphorylation n'est possible que si le ligand est lié au récepteur. La cinétique de phosphorylation est extrêmement rapide (quelques secondes, voir moins). Le récepteur ainsi phosphorylé est alors reconnu par des protéines de type arrestine. La liaison de ces protéines sur les RCPG les rend incapable d'activer l'échange GDP-GTP au niveau des protéines G. De plus, cette liaison peut également favoriser dans certains cas l'endocytose des RCPG, qui est un mécanisme d'une durée plus longue.

- désensibilisation hétérologue : elle se fait par la PKA et PKC

La phosphorylation des RCPG se fait alors par des kinases activées par les seconds messagers, comme la PKA (proteïn kinase A) et la PKC (proteïn kinase C), qui ont été produits initialement en réponse à l'activation du récepteur par son ligand. La désensibilisation hétérologue peut également se faire par palmitoylation du récepteur. Il y a alors formation d'une 4^{ème} boucle intracytoplasmique (voir Figure 41).

▪ Régulation négative de l'expression du récepteur

Ce mécanisme de sous-expression intervient souvent après une action prolongée du ligand sur son récepteur. Il en résulte une diminution du nombre total de récepteur à la surface de la membrane plasmique. Cela peut se faire par une augmentation de la dégradation des récepteurs pré-existants dans les lysosomes ou par une diminution de la synthèse des récepteurs (régulation transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle).

▪ Internalisation des RCPG

L'inactivation du RCPG peut se faire également par un processus d'internalisation du récepteur par endocytose. Ce mécanisme, qui est un phénomène plus long, peut venir dans un second temps après la désensibilisation par phosphorylation, qui est un phénomène qui intervient rapidement après la liaison ligand-récepteur. L'endocytose participe non seulement au processus de régulation négative de l'expression du récepteur, via un phénomène de dégradation des RCPG dans les lysosomes, mais peut intervenir également dans des processus de resensibilisation, avec un recyclage d'une partie de ces récepteurs plus ou moins rapide.

c) Différentes protéines G

Il existe différentes sous-unités α constituant la protéine G. Quatre principales familles ont été définies : G_{as} , G_{oi} , $G_{\alpha q/11}$, et $G_{\alpha 12/13}$ qui diffèrent par leurs couplages intracellulaires. La voie de signalisation dépend de la famille de protéine G qui interagit avec le RCPG. Chacune des sous-unités α ou $\beta\gamma$ peut activer ou inhiber divers effecteurs tels que l'adénylyl cyclase (AC) et la guanylyl cyclase (GC), les phosphodiéstérases, la phospholipase A2 (PLA2), la phospholipase C (PLC), le phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate kinase (PI3K) et les canaux ioniques. La stimulation ou l'inhibition des différents effecteurs entraîne une modulation des seconds messagers, et induit diverses réponses biologiques.

Les RCPG contrôlent de nombreux processus physiologiques dont le système endocrine et le métabolisme cellulaire, les réponses inflammatoires et immunitaires, la neurotransmission, le système sensoriel, le développement embryonnaire, la prolifération, la différenciation cellulaire et la régulation du système cardiovasculaire (Wettschureck and Offermanns 2005).

d) Les voies de signalisation connues des PROKRs

Les PROKRs peuvent activer de multiples voies intracellulaires de signalisation en se couplant à différentes protéines G (voir figure 45). Les PROKRs peuvent se lier :

- à $G_{\alpha q}$ et ainsi augmenter la mobilisation calcique intracellulaire (Lin D. C. et al. 2002a, Soga et al. 2002),
- à G_{oi} (Lin R. et al. 2002b) et augmenter la signalisation via PKC (Protein Kinase C) MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) ou PI3K (Phosphoinositide 3 Kinase)-AKT,

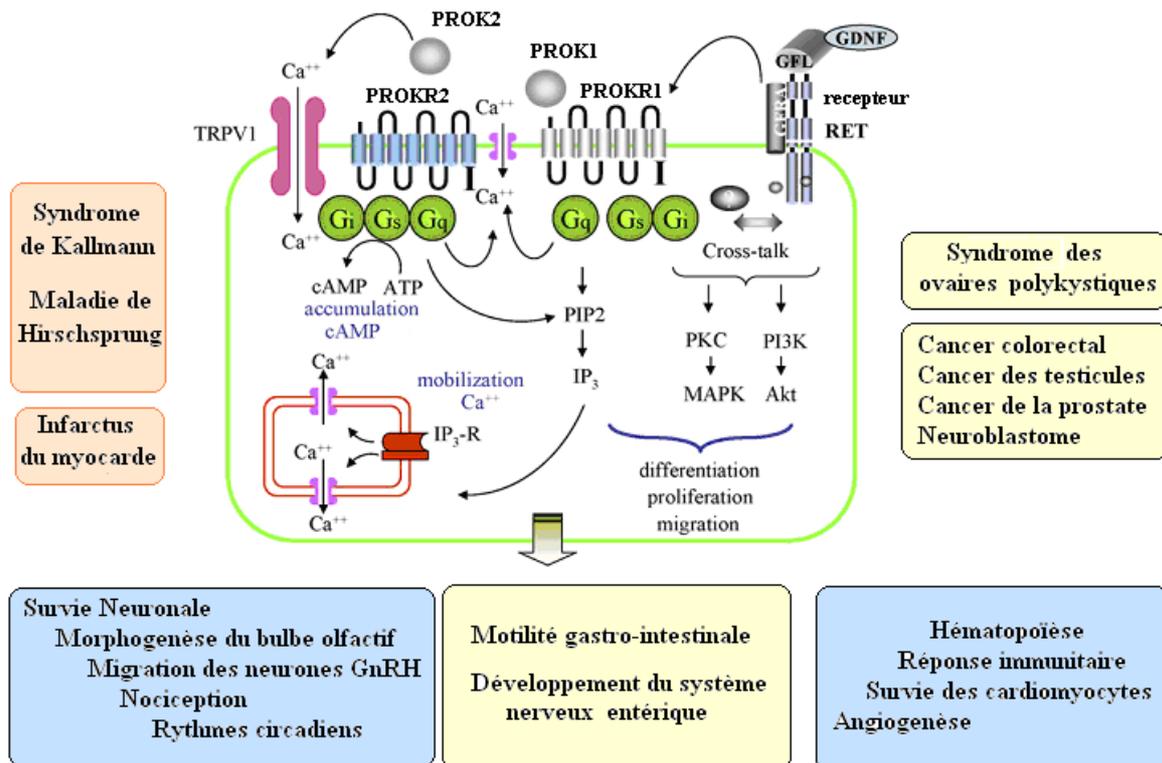


Figure 45 : L'activation des PROKRs peut impliquer de nombreuses voies intracellulaires de signalisation. Schéma adapté de (Ngan and Tam 2008).

| | PROKR1 | PROKR2 |
|--------|-------------|-------------|
| | <i>nM</i> | |
| PROK1 | 27.6 ± 8.2 | 52.2 ± 16.4 |
| PROK2 | 4.5 ± 0.8 | 6.4 ± 1.3 |
| PROK2β | 34.6 ± 13.5 | >1000 |

Figure 46 : Affinités de PROK1 et PROK2 pour leurs récepteurs. Ce tableau représente les valeurs des concentrations d'inhibition (IC 50) obtenues par tests de compétition sur les récepteurs PROKR1 et PROKR2 (Chen J. et al. 2005).

- à $G_{\alpha s}$ et augmenter l'accumulation d'AMPc (Cyclic Adenosine monophosphate) et stimule la protéine kinase PKA (Negri et al. 2007, Ngan and Tam 2008).

B. Affinités des prokinétines pour leurs récepteurs

PROK2 possède la plus forte affinité pour les PROKRs (IC₅₀ de $4,5 \pm 0,8$ pour PROKR1 et de $6,4 \pm 1,3$ pour PROKR2), tandis que PROK1 montre une affinité un peu plus modérée pour ces deux récepteurs (IC₅₀ de $27,6 \pm 8,2$ pour PROKR1 et de $52,2 \pm 16,4$ pour PROKR2) (voir figure 46). Lorsque l'on regarde l'affinité de PROK1 pour les PROKRs, on peut voir que l'ordre de grandeur de celle-ci est conservé pour ces deux récepteurs. Il en est de même pour PROK2, contrairement à PROK2 β (qui correspond à la forme protéique clivée de PROK2L) qui a une haute affinité pour PROKR1, mais une très faible pour PROKR2. Ces résultats soulèvent l'importance de la présence en plus ou moins grande quantité des PROKs et de leurs récepteurs dans le tissu cible, car ce sera cet élément qui influencera en grande partie la liaison de tel ligand sur tel récepteur. Les affinités, relativement peu différentes, interviendront quant à elles dans une moindre mesure dans les liaisons PROKs-PROKRs.

C. Rôles spécifiques des PROKRs

Récemment, des effets spécifiques de PROKR1 ou PROKR2 ont été rapportés. En effet, PROKR1 a été décrit comme spécifiquement impliqué dans des processus de prolifération, survie, migration et angiogenèse, alors que PROKR2 augmenterait la perméabilité, la fenêtration, et serait impliqué dans l'hypertrophie cellulaire (Guilini et al. 2009, Urayama et al. 2007, Urayama et al. 2008). Les mécanismes menant à ces effets différentiels ne sont pas encore clairement élucidés et restent à établir. Au vu des affinités similaires des PROKs pour les PROKRs, ces effets différentiels confirment l'importance de la distribution de ces protéines dans la cellule cible pour l'activation de voies de signalisation spécifiques, menant à des fonctions biologiques particulières. Différents patrons d'expression des prokinétines et de leurs récepteurs ont déjà été rapportés dans de nombreux tissus.

D. Dimérisation des récepteurs

Récemment, une dimérisation de PROKR2 a été rapportée dans les neutrophiles (Marsango et al. 2010). Il est connu que ces dimérisations peuvent affecter les affinités de liaison des ligands aux récepteurs, ainsi que la transmission du signal intracellulaire (Maggio et al. 1999, Maggio et al. 2007). L'homodimérisation rapportée de PROKR2, et la suggestion de

l'existence d'hétérodimères (Marsango et al. 2010) pourrait de ce fait participer à la modulation des réponses physiologiques déclenchées par la liaison des prokinétines sur leurs récepteurs. Il a été suggéré que le niveau même d'expression de chaque récepteur dans une cellule influait sur la nature des dimères formés, et que cela pourrait avoir des effets importants sur les signalisations intracellulaires déclenchées (Marsango et al. 2010). De nombreuses expériences complémentaires sont à envisager afin d'évaluer la présence de tels dimères dans le placenta, et leurs influences sur la réponse cellulaire.

4.3 Localisation des prokinétines et de leurs récepteurs

Les prokinétines et leurs récepteurs sont exprimés dans de nombreux tissus tels que les ovaires, les testicules, les glandes surrénales, le placenta, l'utérus, le cerveau, le système digestif et la moelle osseuse (voir tableau 1). A l'intérieur d'un même tissu, les prokinétines et leurs récepteurs peuvent être exprimés soit par les mêmes cellules, soit par des cellules différentes. De plus, ces expressions peuvent être dynamiques au cours d'un temps, dues à la présence de régulateurs. Le long du cycle menstruel et de la grossesse par exemple, PROK1 montre une expression temporelle dans l'ovaire, l'utérus et le placenta en réponse aux changements hormonaux (Maldonado-Perez et al. 2007, Ngan et al. 2006).

4.4 Régulation des prokinétines

Les mécanismes qui contrôlent l'expression spécifique tissulaire des prokinétines nécessitent d'être complètement élucidés. La caractérisation complète des promoteurs des prokinétines et de leurs récepteurs permettraient de connaître les régulateurs potentiels de ces systèmes. Néanmoins, certains régulateurs de PROK1 ont déjà été identifiés. Dans le système reproducteur de la femme, de nombreuses études ont montrés que les œstrogènes, la progestérone, l'hCG, et le HIF régulaient son expression (Battersby et al. 2004, Maldonado-Perez et al. 2007, Ngan et al. 2006). Les mécanismes de régulations de PROK1 par ces hormones restent cependant à être caractérisés.

A. Régulation par l'hypoxie

De façon cohérente avec leurs activités angiogènes, les promoteurs des gènes *prok1* et *prok2* ont des sites de liaison à HIF-1. L'expression de PROK1 et PROK2 est augmentée dans un environnement hypoxique. HIF-1 induit la transcription de l'ARNm, et secondairement la synthèse des prokinétines (LeCouter et al. 2001, LeCouter et al. 2003b).

Tableau 1 : Localisation des PROKs et des PROKRs.

| Tissus | PROK1 | PROK2 | PROKR1 | PROKR2 | Références |
|----------------------|---|---|--|--|---|
| Glandes surrénales | Cellules de la glomérulaire, cellules fasciculées | Cellules de la glomérulaire, fasciculées, et endothéliales | Cellules de la glomérulaire, fasciculées, et endothéliales | Cellules de la glomérulaire, et cellules fasciculées | (Keramidas et al. 2008) |
| Testicules | Cellules de Leydig | Spermatocytes | Cellules endothéliales du tissu intersticiel | Cellules endothéliales du tissu intersticiel | (LeCouter et al. 2003b, Maldonado-Perez et al. 2007, Samson et al. 2004, Wechselberger et al. 1999) |
| Ovaires | Stroma, région du hile ovarien, cellules de la granulosa, cellules lutéales de la thèque, follicule atrophique, corps jaune | Non détecté | Cellules endothéliales lutéales | Cellules endothéliales lutéales | (Ferrara et al. 2003, Ferrara et al. 2004, Fraser et al. 2005, LeCouter et al. 2001, Maldonado-Perez et al. 2007, Podlovni et al. 2006) |
| Utérus | Epithélium glandulaire, cellules stromales, endothéliales, cellules musculaires lisses | Epithélium glandulaire, cellules stromales, endothéliales, musculaires lisses | Epithélium glandulaire, cellules stromales, endothéliales, cellules musculaires lisses | Epithélium glandulaire, cellules stromales, endothéliales, cellules musculaires lisses | (Maldonado-Perez et al. 2007, Ngan et al. 2006) |
| Placenta | Syncytiotrophoblastes, cellules de Hofbauer, faible expression dans les cytotrophoblastes | Faiblement exprimé | Cytotrophoblastes, cellules endothéliales | Syncytiotrophoblastes, trophoblastes extravilleux, cellules endothéliales | (Brouillet et al., Hoffmann et al. 2006, LeCouter et al. 2001) |
| Cerveau | Faible expression | Cortex cérébral, bulbe olfactif, cellules de purkinje | Zone subventriculaire, courant de migration rostrale, bulbe olfactif, hippocampe | Zone subventriculaire, courant de migration rostrale, bulbe olfactif, hippocampe | (Cheng et al. 2002, Ng et al. 2005) |
| Cœur | Tissu cardiovasculaire, cellules cardiaques | Tissu cardiovasculaire, cellules cardiaques | Tissu cardiovasculaire, cellules cardiaques | Tissu cardiovasculaire, cellules cardiaques | (Urayama et al. 2007, Urayama et al. 2009) |
| Moelle osseuse, sang | Lymphocyte B et T, tissus inflammés | Cellules souches hématopoïétiques, monocytes, neutrophiles, cellules dendritiques | Cellules souches hématopoïétiques, cellules sanguines matures dont lymphocytes | Cellules souches hématopoïétiques, cellules sanguines matures dont lymphocytes | (Dorsch et al. 2005, LeCouter et al. 2004, Lin D. C. et al. 2002a) |
| Système intestinal | Plexus entérique, muqueuse de l'intestin embryonnaire | Plexus entérique | Plexus entérique, cellules de la crête neurale entérique | Plexus entérique | (Hoogerwerf 2006, Kaser et al. 2003, Ngan et al. 2007b, Ngan and Tam 2008) |

Par exemple, l'expression des prokinétines est augmentée par une faible tension en oxygène dans les SW13 et H295R (lignées tumorales de surrénales) et P19 (cellules murines de carcinome embryonnaire) (LeCouter et al. 2001, LeCouter et al. 2003a). En revanche, une étude *in vitro* sur une lignée de cellules humaines lutéales de la granulosa traitée avec deux agents inducteurs différents d'hypoxie chimique a montré que PROK1 était diminuée par l'hypoxie, alors que le VEGF était augmenté (Kisliouk et al. 2003). Ces résultats divergents suggèrent une réponse tissu-spécifique possible à l'hypoxie, ou une régulation plus complexe des prokinétines qui ne serait pas encore totalement comprise.

B. Régulation par les stéroïdes

Les glandes endocrines sécrètent beaucoup de stéroïdes. Le promoteur du gène *prok1* possède un site de liaison potentiel pour le facteur SF-1 (Steroidogenic factor-1), qui régule la transcription d'un grand nombre de gènes impliqués dans la stéroïdogénèse. De plus, il a été montré que les hormones stéroïdes, telles que les œstrogènes et la progestérone, régulent l'expression de PROK1 dans le système reproducteur (Battersby et al. 2004, Ngan et al. 2006).

C. Régulation par l'hCG

Il a été décrit que l'hCG augmentait l'ARNm de PROK1 *in vivo* chez le babouin, dans les cellules épithéliales endométriales humaines et dans la décidue du 1^{er} trimestre (Evans J. et al. 2009). Ces données établissent de nouvelles perspectives dans lesquelles l'hCG, qui joue un rôle important dans la réceptivité de l'endomètre et le maintien de la grossesse, pourrait agir via PROK1. En effet, PROK1 a été décrit récemment comme biomarqueur de la réceptivité de l'endomètre (Haouzi et al. 2009). Son expression en ARNm a également été rapportée comme augmentée *in vitro* dans les cellules de la granulosa du corps jaune de l'ovaire, suggérant un rôle de PROK1 possible dans la formation du corps jaune (Fraser et al. 2005).

4.5 Fonctions des prokinéticines

La grande distribution tissulaire, la diversité de répertoires de protéines G exprimés dans les types cellulaires, et la régulation différentielle des prokinéticines suggèrent une implication de ces facteurs dans une multitude de fonctions *in vivo*. En effet, les prokinéticines sont impliquées dans diverses fonctions biologiques telles que : la motilité gastro-intestinale (Li M. et al. 2001), la sensibilité à la douleur (Hu W. P. et al. 2006, Negri et al. 2002, Negri et al. 2006), l'angiogenèse (LeCouter et al. 2001, LeCouter et al. 2003b), le rythme circadien (Cheng et al. 2002, Li J. D. et al. 2006b, Prosser et al. 2007), l'activation du développement du bulbe olfactif (Matsumoto et al. 2006, Ng et al. 2005), l'hématopoïèse (LeCouter et al. 2004), la différenciation des monocytes (Dorsch et al. 2005), l'activation des macrophages (Martucci et al. 2006), la survie neuronale et la neurogenèse (Melchiorri et al. 2001), le cycle menstruel (Battersby et al. 2004, Ngan et al. 2006), la reproduction (Maldonado-Perez et al. 2007), l'angiogenèse (LeCouter et al. 2001, LeCouter et al. 2003b) et la placentation (Brouillet et al. 2010, Hoffmann et al. 2006, 2007, Hoffmann et al. 2009).

A. Le rythme circadien

Le rythme circadien est un type de rythme biologique d'une durée de 24 heures environ. Les rythmes biologiques jouent un rôle majeur dans le fonctionnement des organismes vivants (pulsations cardiaques, mouvements de paupières ou respiratoires, rythme repas/digestion, états alternés de veille et de sommeil, cycles de l'ovulation...). Le rythme circadien est contrôlé par des cellules localisées dans le noyau suprachiasmatique de l'hypothalamus (NSC), considéré comme l'horloge circadienne principale. L'alternance lumière/obscurité joue le rôle de synchroniseur prépondérant pour la plupart des espèces végétales et animales. Chez les mammifères, les signaux lumineux perçus par la rétine sont interprétés par le NSC et traduits en signaux moléculaires. Dans le NSC de rongeurs, il a été démontré que l'expression de l'ARNm de PROK2 oscille en fonction de la luminosité avec une expression maximale pendant le jour et minime la nuit, et qu'il avait un impact direct sur l'activité locomotrice des rongeurs, probablement via PROKR2, qui est fortement exprimé par le NSC (Cheng et al. 2002, Lambert et al. 2005, Negri et al. 2004, Zhou Q. Y. 2006). Le rôle de PROK2 comme médiateur des rythmes circadiens a été confirmé avec l'observation des souris invalidées pour PROK2, qui montrent des activités perturbées dans les rythmes locomoteurs, les cycles éveil/sommeil, la régulation de la température corporelle, la régulation de la glycémie et des

taux de glucocorticoïdes, ainsi que dans l'expression de gènes importants dans les rythmes circadiens (Li J. D. et al. 2006b). L'inactivation de PROKR2, qui est le récepteur prédominant des prokinétines dans le NSC, perturbe également de nombreux processus physiologiques contrôlés par l'horloge circadienne (Prosser et al. 2007). Pour conclure, PROK2/PROKR2 semblent à ce jour indispensables à la régulation adéquate du comportement et de la physiologie par le NSC.

- **Pathologies associées : sommeil altéré et dépression**

Une corrélation entre PROK2 et les cycles altérés de sommeil a été mise en évidence dans des souris transgéniques pour la maladie de Huntington (Morton et al. 2005). Il a également été montré que les souris invalidées pour PROK2 montraient une réduction de l'anxiété et des comportements dépressifs (Li J. D. et al. 2009).

B. Neurogenèse

La neurogenèse se déroule principalement pendant la vie embryonnaire et dans les étapes précoces post-natales. Chez les mammifères, elle continue chez l'adulte dans deux régions du cerveau : le bulbe olfactif (BO) et le gyrus dentelé de l'hippocampe. Il est bien décrit que PROK2/PROKR2 sont des régulateurs clés du développement neuronal du BO. PROK2, sécrété par le BO, agit comme un chémoattractant pour les progéniteurs neuronaux pendant le développement du BO chez le raton et le rat adulte (Cheng et al. 2002, Cheng et al. 2006). De plus, les souris invalidées pour PROK2 montrent un développement anormal du BO avec des défauts dans la migration et la différenciation des progéniteurs neuronaux, une hypoplasie et une architecture altérée du BO (Matsumoto et al. 2006, Ng et al. 2005). Ce phénotype a également été retrouvé chez les souris invalidées pour PROKR2 mais pas pour PROKR1, ce qui confirme l'importance de PROK2/PROKR2 pour la neurogenèse du bulbe olfactif. Par son action sur certains neurones, PROK2 inhibe la prise alimentaire et augmente la prise de boisson via PROKR2 (Negri et al. 2004, Negri et al. 2007).

- **Pathologie associée : le syndrome de Kallmann**

Le phénotype observé des souris invalidées pour PROKR2 ressemble en de nombreux points au phénotype de patients atteints du syndrome de Kallmann. Ce syndrome associe un hypogonadisme hypogonadotrope¹⁷, et une anosmie¹⁸ ou une hyposmie¹⁹, avec le plus souvent une atrophie du bulbe olfactif. Ce phénotype est retrouvé chez les souris invalidées pour PROKR2 (Matsumoto et al. 2006, Ng et al. 2005).

¹⁷ absence ou diminution de la fonction des gonades due à une absence d'hormones pituitaires.

¹⁸ perte de l'odorat.

¹⁹ diminution de l'odorat.

Ces observations ont été confirmées par des études génétiques sur des patients, où des mutations de PROK2 et PROKR2 ont été retrouvées chez 10% des patients environ (Dode et al. 2006, Pitteloud et al. 2007).

C. Le système gastro-intestinal

Les prokinéticines ont été décrites initialement comme protéines activatrices de la contraction de l'iléon isolé de cochon d'inde (Li M. et al. 2001, Mollay et al. 1999). Des études *in vivo* ont confirmées ces observations concernant la stimulation du transit gastro-intestinal par les prokinéticines (Zhou Q. Y. 2006). Un effet opposé des PROKs sur la relaxation via un mécanisme impliquant le NO sur le colon murin a aussi été rapporté (Hoogerwerf 2006). Par ailleurs, PROK2 ne semble pas stimuler la contraction du colon, ni celle de l'estomac chez la souris (Bassil et al. 2005). Ces données suggèrent l'importance de l'environnement extra et intracellulaire sur les différents effets observés.

D. Développement des cellules de la crête neurale

Pendant le développement fœtal, la formation des neurones et de la glie du système nerveux entérique²⁰ provient de cellules progénitrices multipotentes de la crête neurale entérique. Il a été rapporté que PROK1 et PROKR1 participent à la prolifération et différenciation des cellules de la crête neurale entérique via une activation des voies de signalisation Akt et MAPK. Il a été suggéré que PROK1 pourrait contribuer à la formation de neurones aux actions inhibitrices sur l'activité musculaire (Ngan et al. 2007a).

- Pathologie associée : le neuroblastome

Le neuroblastome est la tumeur solide extra-crânienne la plus fréquente chez le jeune enfant. C'est un cancer touchant des cellules embryonnaires de la crête neurale qui constitue le système nerveux autonome sympathique. Il a été établi que PROKR1 est corrélé à différents stades de neuroblastome et que l'expression en ARNm de PROKR2 est augmentée dans les stades avancés de neuroblastome. PROK1 induit la prolifération, la survie, la migration et l'invasion des cellules de neuroblastome via l'activation de la voie Akt. La stimulation de la prolifération par PROK1 nécessite les deux récepteurs, alors que seul PROKR2 semble nécessaire pour la stimulation de la survie, ce qui suggère une interaction potentielle entre les deux récepteurs pour certains processus physiologiques (Ngan et al. 2007b).

²⁰ partie du système nerveux autonome qui contrôle le système digestif.

E. L'hématopoïèse et régulation de la réponse immune

PROK2 est exprimée dans la moelle osseuse, les cellules sanguines, en particulier les monocytes, les neutrophiles, et les cellules dendritiques (LeCouter et al. 2004), alors que PROK1 est exprimée dans les lymphocytes B et T, ainsi que dans les tissus inflammés (Dorsch et al. 2005).

PROK2 est exprimée par les neutrophiles sur le site de l'inflammation, et peut stimuler la migration des monocytes (LeCouter et al. 2004). Les PROKRs sont exprimés dans les cellules souches hématopoïétiques et dans certaines cellules sanguines matures, telles que les lymphocytes (LeCouter et al. 2004). Par ailleurs, PROK1 et PROK2 augmentent le nombre de colonies de granulocytes et monocytes, formées lors de la culture des cellules souches hématopoïétiques humaines. De plus PROK1 et PROK2 peuvent favoriser la survie et la différenciation des granulocytes et des monocytes (Dorsch et al. 2005, LeCouter et al. 2004).

F. La nociception

Il est bien établi que les prokinétines jouent un rôle dans la nociception. La nociception est l'ensemble des phénomènes permettant l'intégration au niveau du système nerveux central d'un stimulus douloureux via l'activation des nocicepteurs²¹ cutanés, musculaires et articulaires. L'injection de PROK2 ou Bv8 chez le rongeur entraîne une hyperalgésie à un stimulus mécanique ou thermique, probablement via PROKR1 (Mollay et al. 1999, Negri et al. 2002). Ceci a été confirmé chez les souris invalidées pour PROKR1, qui présentent une réponse altérée à divers stimulants comme la chaleur, la capsaïcine²² ou des stimuli mécaniques (Negri et al. 2006). Les souris invalidées pour PROK2 ont également une réponse altérée à la nociception, ce qui suggère que le couple PROK2/PROKR1 jouerait un rôle principal dans ce processus biologique (Hu W. P. et al. 2006).

- *Pathologie associée : la douleur inflammatoire*

PROK2 est fortement exprimée dans les cellules sanguines comme les monocytes/macrophages, les neutrophiles, les cellules dendritiques et les tissus inflammés (Dorsch et al. 2005, Monnier and Samson 2008). PROK1 et PROK2 peuvent stimuler la libération de cytokines pro-inflammatoires, comme l'interleukine-1 (IL-1) et le TNF- α (Tumor Necrosis factor- α), connus pour intervenir dans la douleur chronique.

²¹ récepteurs à la douleur

²² composé actif du piment

PROK1 et PROKR1 ont été retrouvés augmentés dans un modèle expérimental de colite²³ (Kimball et al. 2007). Les PROKs, libérées par les tissus inflammés, pourraient agir alors comme médiateurs de la nociception, en stimulant la libération de cytokines pro-inflammatoires par les cellules immunes, et en activant les PROKRs des neurones, augmentant ainsi la réponse nociceptive (Negri et al. 2007).

G. L'angiogenèse

Si PROK1 ne présente pas d'homologies structurales avec le VEGF, elle semble partager les mêmes propriétés angiogènes. Même si il y a un consensus avéré sur l'activité angiogène de PROK1 et PROK2, le débat continue sur la spécificité tissulaire du potentiel angiogène des prokinétines. En effet, PROK1 (ou EG-VEGF) a été initialement identifiée comme le premier facteur angiogène spécifique de l'endothélium des glandes endocrines du fait de son expression majoritaire dans les tissus endocrines (les glandes surrénales, les ovaires, les testicules, le placenta), et de sa capacité à induire spécifiquement la prolifération, la survie, la migration, et la fenêtration des cellules endothéliales des capillaires dans ces tissus (LeCouter et al. 2001). Depuis cette première observation, de nombreux articles ont apporté une expression et des activités angiogènes au sein de tissus non endocrines, comme par exemple dans la choroïde, couche de la paroi du globe oculaire (Tanaka et al. 2006). De plus, PROK1 est exprimée dans les cellules de muscle lisse dans le corps jaune et l'aorte (Podlovni et al. 2006), suggérant un effet paracrine probable de PROK1 sur les cellules endothéliales.

a) Appareil reproducteur masculin : les testicules

Les PROKs sont fortement exprimées dans les testicules de mammifères. PROK1 est essentiellement exprimée par les cellules de Leydig (LeCouter et al. 2003b, Samson et al. 2004), sécrétant la testostérone, et PROK2 par les tubes séminifères dans les spermatocytes primaires (LeCouter et al. 2003b, Wechselberger et al. 1999). Les PROKRs sont exprimés par les cellules endothéliales du tissu interstitiel, et peuvent de ce fait réguler la prolifération et la fenêtration de la vasculature testiculaire, ainsi qu'agir sur le transport de la testostérone et d'autres facteurs (LeCouter et al. 2003b, Samson et al. 2004). Les souris invalidées pour PROKR2 montrent une atrophie sévère du système reproducteur, les testicules ne contenant alors que de petites cellules de Leydig, et pas de spermatides. De plus, l'injection *in vivo* de PROK1 ou PROK2 induit une forte réponse angiogénique dans le testicule (LeCouter et al. 2003b).

²³ maladie chronique digestive caractérisée par une inflammation du côlon

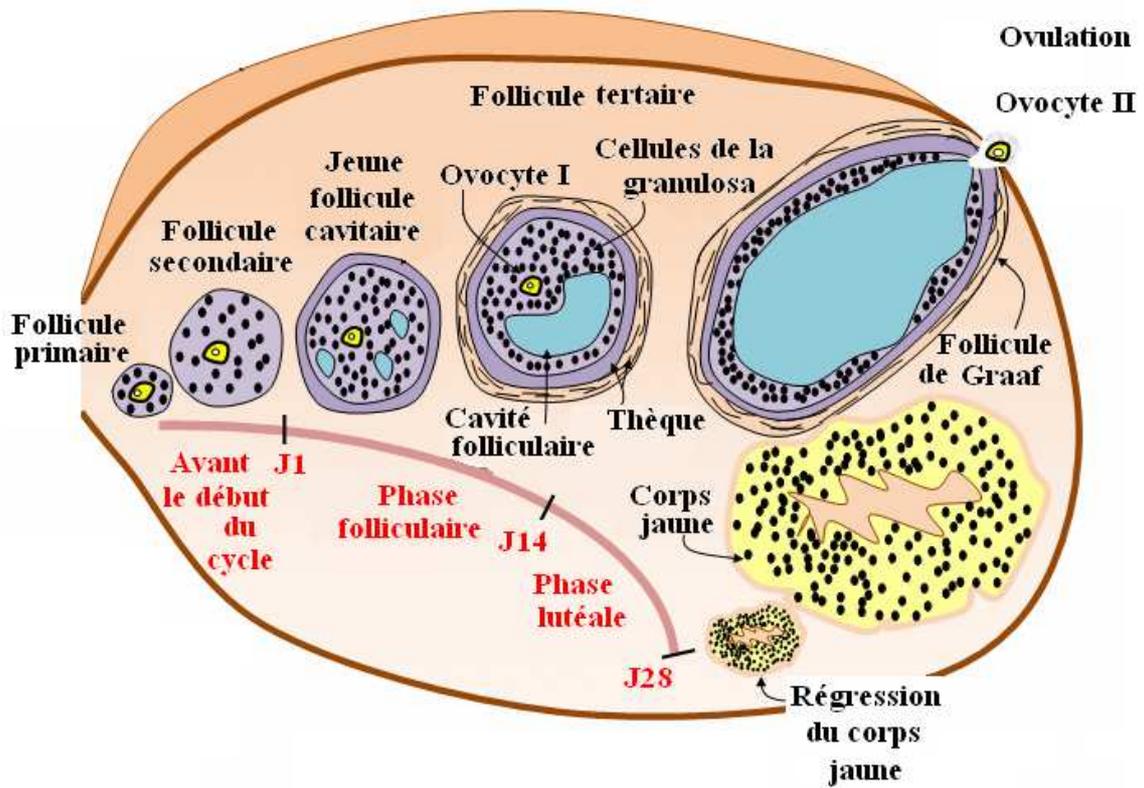


Figure 47 : Schéma des étapes du cycle ovarien. Schéma adapté de <http://svt.ac-dijon.fr/schemassvt/IMG/ovaire-545x404.jpg>

- **Pathologies associées : cancer des testicules et de la prostate**

PROK1, fortement exprimée par les cellules de Leydig, a été décrite comme augmentée dans les tumeurs de ces cellules. L'endothélium testiculaire exprimant les PROKRs, PROK1 pourrait être impliquée non seulement dans l'angiogenèse testiculaire physiologique, mais également dans ce cancer (Samson et al. 2004). PROK1 est augmentée dans le cancer de la prostate, et localisée dans l'épithélium glandulaire (Pasquali et al. 2006). De plus, PROK2 et les PROKRs sont exprimés dans les cultures primaires de cellules épithéliales prostatiques malignes. L'ensemble de ces résultats suggère une implication possible des PROKs dans le cancer prostatique (Pasquali et al. 2006).

b) Appareil reproducteur féminin

PROK2 est pratiquement indétectable dans les organes reproducteurs féminins (Ferrara et al. 2004, Fraser et al. 2005) et le placenta (Hoffmann et al. 2006). De ce fait, ces résultats placent PROK1 comme le régulateur majeur de ces organes pour les prokinétines.

▪ **Les ovaires**

PROK1 est fortement exprimée dans le stroma, en particulier dans les cellules de la région du hile ovarien²⁴, cellules qui produisent des stéroïdes (voir figure 47) (Ferrara et al. 2004). Son expression fluctue selon le cycle ovarien, avec une forte expression dans les cellules de la granulosa du follicule primordial et primaire. Son expression est intense dans les cellules lutéales de la thèque à partir de 8 jours post-ovulation environ, et ce jusqu'à la moitié (voir la fin) de la phase lutéale (voir figure 47) (Ferrara et al. 2003, Fraser et al. 2005). Son expression en ARNm est stimulée *in vitro* par l'hCG sur ces cellules mais pas par la progestérone, suggérant un rôle de PROK1 possible dans la formation du corps jaune (Fraser et al. 2005). Les PROKRs sont fortement exprimés dans les cellules endothéliales lutéales (LEC) dont la prolifération est augmentée par PROK1. L'injection de PROK1 dans l'ovaire induit de forts effets angiogènes chez le rat (LeCouter et al. 2001). Des études *in vitro* ont montré que PROK1 a des effets stimulants sur la prolifération et la survie des cellules endothéliales bovines du corps jaune (Kisliouk et al. 2005b). Dans les souris invalidées pour PROKR2, les follicules ovariens et le corps jaune ne se développent pas (Matsumoto et al. 2006).

²⁴ Zone où les vaisseaux et les nerfs entrent ou sortent de l'ovaire

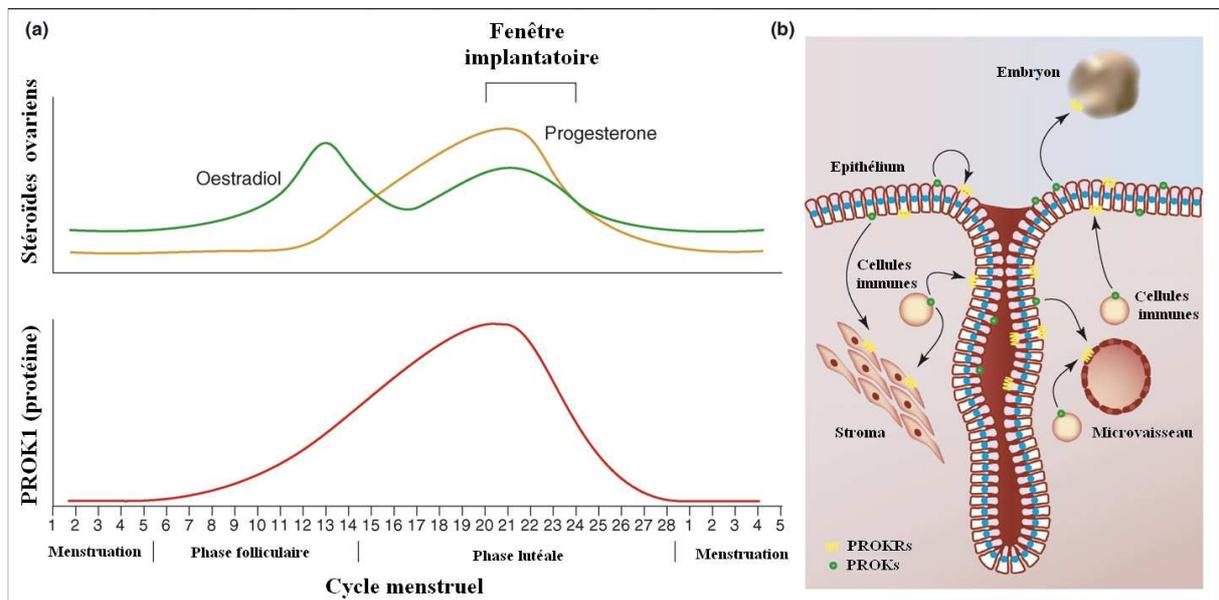


Figure 48 : Expression de PROK1 dans l'endomètre au cours du cycle ovarien. Schéma adapté de (Maldonado-Perez et al. 2007)

Pendant la maturation folliculaire, le profil d'expression de PROK1 est inverse à celui de VEGF, qui est absent dans le follicule primordial et primaire, alors que PROK1 est fortement exprimée dans les cellules de la granulosa de ces deux types folliculaires. Dans le follicule secondaire, l'expression forte de PROK1 est maintenue, alors que celle de VEGF est faible. Dans le follicule tertiaire, l'expression de PROK1 chute, alors que celle de VEGF augmente fortement, principalement dans les cellules de la granulosa, et modérément dans celles de la thèque. Dans le follicule atrophique²⁵, PROK1 est fortement exprimée alors que VEGF est faible (Maldonado-Perez et al. 2007). Après l'ovulation, l'expression de PROK1, qui est exprimée par les cellules de la granulosa, augmente dans le corps jaune, alors que l'expression de VEGF est déjà maximale dès le début de la phase lutéale (Fraser et al. 2005). Cette expression différentielle de PROK1 et VEGF suggère qu'ils pourraient avoir différents rôles à jouer dans le succès du processus ovulatoire avec une complémentarité d'action pour les processus angiogènes.

- **Pathologies associées : syndrome des ovaires polykystiques**

Le syndrome des ovaires polykystiques est caractérisé par une accumulation dans l'ovaire de follicules qui n'arrivent pas à maturité. PROK1 est exprimée fortement dans ces ovaires (Ferrara et al. 2003). Il a été montré que l'injection d'adénovirus pour les PROKs dans les ovaires augmentait la formation de kystes (Ferrara et al. 2003, LeCouter et al. 2001).

▪ **L'endomètre**

Les prokinétines PROK1 et PROK2 et leurs récepteurs sont exprimés dans l'endomètre humain, mais uniquement PROK1 semble varier au cours du cycle ovarien, avec une augmentation pendant la fenêtre implantatoire (voir figure 48). L'endomètre est un des tissus où l'angiogenèse est activement régulée dans les conditions physiologiques au cours du cycle menstruel. Les études de S. Battersby et E.S.W. Ngan suggèrent que PROK1 participe à la régulation de l'angiogenèse dans l'endomètre (Battersby et al. 2004, Maldonado-Perez et al. 2007, Ngan et al. 2006). Elle n'est plus exprimée dans l'endomètre après la ménopause, ce qui est cohérent avec le fait que PROK1 soit augmentée par les œstrogènes et la progestérone (Battersby et al. 2004, Maldonado-Perez et al. 2007, Ngan et al. 2006).

²⁵ follicule qui a commencé sa maturation mais qui n'ovule pas et dégénère

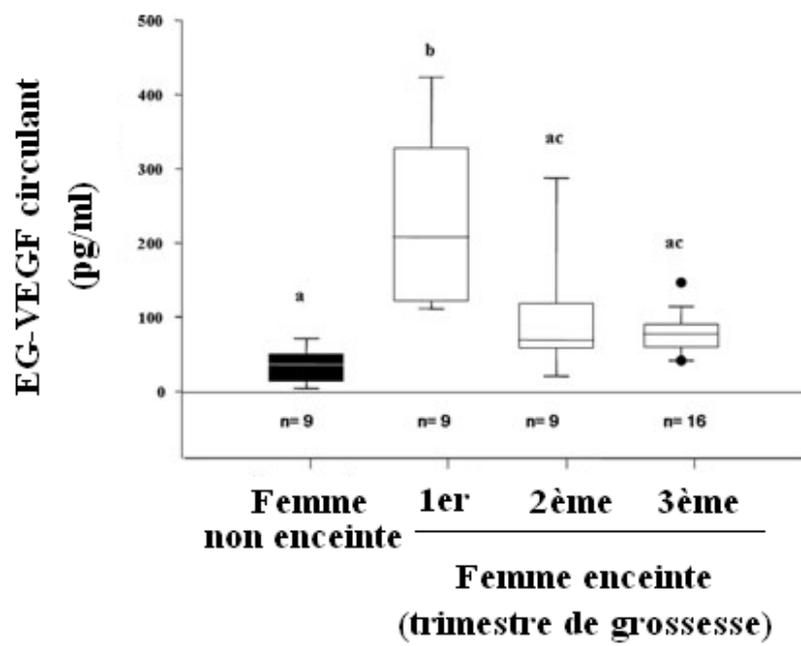


Figure 49 : Profil d'expression sérique d'EG-VEGF au cours de la grossesse. Figure adaptée de (Hoffmann et al. 2009)

c) Des effets angiogènes qui diffèrent selon l'origine vasculaire

Les cellules endothéliales sont multifonctionnelles (pour revue voir (Michiels 2003)) et leurs propriétés varient selon leur origine, reflétant ainsi l'hétérogénéité endothéliale (Aird 2003). L'expression, la régulation et les effets médiés par les PROKs et leurs récepteurs diffèrent dans les cellules endothéliales selon l'origine vasculaire de celles-ci. Par exemple, concernant leur expression, on peut noter que PROKR1 et PROKR2 sont exprimés dans les cellules endothéliales du corps jaune (LEC), alors que seul PROKR1 est exprimé dans les cellules endothéliales de l'aorte (BAEC) et des capillaires cérébraux (BCEC). Pour leurs régulations, TNF- α inhibe PROKR1 dans les BAEC, alors que la privation en sérum inhibe fortement PROKR1 dans les BAEC et les LEC. En ce qui concerne les effets différentiels des PROKs, PROK1 augmente la prolifération et la survie des LEC et BAEC, mais pas celui des BCEC. De même, PROK1 augmente la perméabilité cellulaire et le transport paracellulaire dans les LEC, et non ceux des BAEC et les BCEC. L'ensemble de ces résultats suggère que les prokinétines et leurs récepteurs possèdent différents rôles selon le type cellulaire étudié (Podlovni et al. 2006).

4.6 PROK1/EG-VEGF et placenta

L'expression de PROK1 a été brièvement rapportée dans le placenta par l'équipe de Ferrara en 2001, puis par d'autres équipes (Burton et al. 2003, Denison et al. 2008, Haouzi et al. 2009, LeCouter et al. 2001, Lee Y. L. et al. 2009). L'essentiel des données concernant son expression et sa régulation dans le placenta au cours de la grossesse ont été décrites par notre laboratoire. L'ensemble des données publiées dans le placenta utilise le terme EG-VEGF à la place de PROK1, c'est donc par EG-VEGF que je désignerai ce facteur dans la suite de ce manuscrit.

A. Expression sérique d'EG-VEGF au cours de la grossesse

Dans une récente publication (Hoffmann et al. 2009), le laboratoire a comparé le profil d'expression sérique d'EG-VEGF chez la femme au cours de la grossesse et chez la femme non enceinte (voir figure 49). Les taux circulants d'EG-VEGF étaient détectables dans tous les sera testés, et significativement plus élevés chez la femme enceinte pour l'ensemble des âges gestationnels. Les taux circulants d'EG-VEGF chez la femme non enceinte étaient de 30 pg/ml environ. Chez la femme enceinte, les taux circulants d'EG-VEGF étaient cinq fois plus

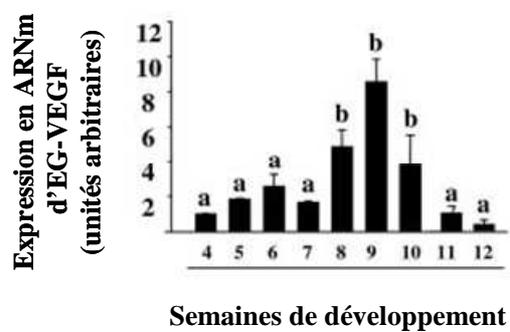
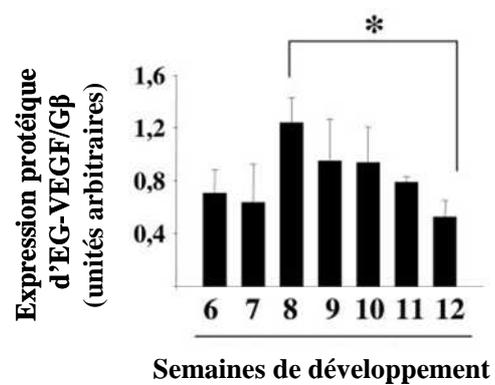
A**B**

Figure 50 : Expression d'EG-VEGF en ARNm et protéine au 1^{er} trimestre de grossesse (a et b sont significativement différents). Attention, les âges gestationnels sont en semaines de développement (il faut ajouter 2 semaines pour avoir les âges en semaines d'aménorrhée). Figures adaptées de (Hoffmann et al. 2006)

élevés au 1^{er} trimestre de la grossesse, avec 200 pg/ml environ, avant de baisser significativement au 2^{ème} et 3^{ème} trimestre à 70 pg/ml en moyenne. On peut penser que cette augmentation sérique d'EG-VEGF pourrait avoir de nombreuses conséquences sur les différents organes de la mère.

B. Expression placentaire des prokinétines et de leurs récepteurs au 1^{er} trimestre

a) Profil d'expression placentaire au 1^{er} trimestre de grossesse

EG-VEGF est abondant dans le placenta humain (LeCouter et al. 2001). Son expression placentaire est dynamique pendant la grossesse, avec une expression majoritaire pendant le 1^{er} trimestre, qui est également la période du pic d'expression sérique. Son profil d'expression dans le placenta au cours du premier trimestre de la grossesse a été établi par le laboratoire (Hoffmann et al. 2006). EG-VEGF montre un pic d'expression en ARNm et en protéines vers 8-9 semaines de développement, correspondant à 10 SA environ, période qui se situe peu avant l'établissement de la circulation fœto-maternelle (voir figure 50). De manière générale, PROK2 est non détectable dans le placenta humain avec une détection faible entre 8 et 10 SA en ARNm et protéines (Hoffmann et al. 2006). Cette différence d'expression entre EG-VEGF et PROK2 est similaire à celle retrouvée dans l'endomètre (Battersby et al. 2004) ou le corps jaune (Fraser et al. 2005). PROKR1 montre le même profil d'expression qu'EG-VEGF au cours du 1^{er} trimestre avec un pic d'expression entre 8-10 SA. Contrairement à PROKR1, PROKR2 présente quant à lui un profil d'expression plus stable au 1^{er} trimestre (Hoffmann et al. 2006).

b) Localisation et expression cellulaire au 1^{er} trimestre

EG-VEGF est exprimé majoritairement par les syncytiotrophoblastes et les cellules de Hofbauer avec une expression faible dans les cytotrophoblastes. L'ARNm d'EG-VEGF est 5 fois plus abondant dans les trophoblastes en cultures primaires que dans des extraits placentaires totaux au 1^{er} trimestre de grossesse. Les récepteurs PROKR1 et PROKR2 sont également exprimés dans le placenta humain. PROKR1 est principalement présent dans le cytotrophoblaste, alors que PROKR2 est majoritaire dans le syncytiotrophoblaste, les trophoblastes extravilleux et les cellules endothéliales microvasculaires placentaires (Hoffmann et al. 2006, Hoffmann et al. 2009).

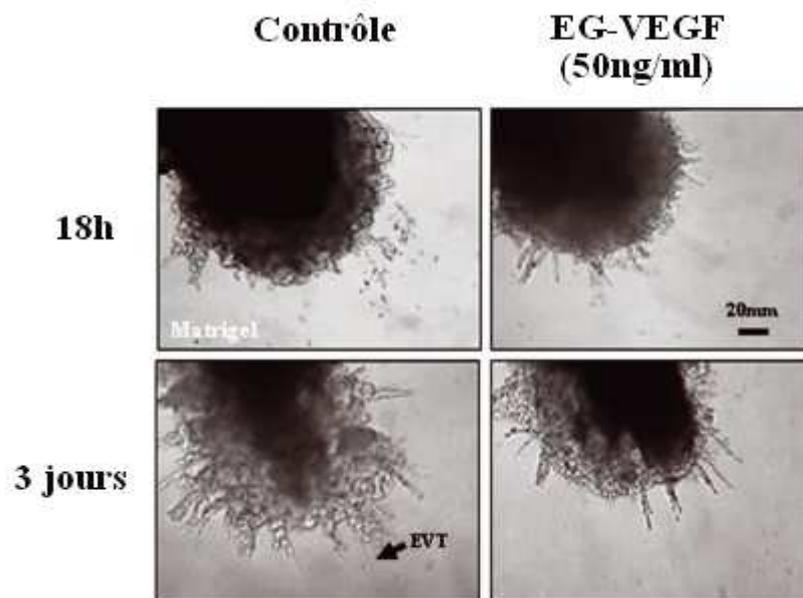


Figure 51 : Effet inhibiteur d'EG-VEGF sur l'invasion des TEV (noté EVT sur la figure) d'explants placentaires de 1^{er} trimestre de grossesse. Figure adaptée de (Hoffmann et al. 2009).

L'ARNm de PROKR1 est 80 fois plus abondant que celui de PROKR2 dans les trophoblastes en culture primaire. Cette différence d'expression des PROKRs au sein des différents types cellulaires suggère de possibles effets différentiels d'EG-VEGF sur ces cellules.

C. Expression d'EG-VEGF et de ses récepteurs au 3^{ème} trimestre

Etant donné la difficulté d'obtenir du tissu placentaire sain de 2^{ème} trimestre de grossesse, l'essentiel des données concernant les prokinétines et leurs récepteurs au delà du 1^{er} trimestre concerne des tissus de troisième trimestre de la grossesse, récupérés après césarienne. EG-VEGF, PROKR1, et PROKR2 se trouvent alors dans les syncytiotrophoblastes, les cytotrophoblastes, l'endothélium fœtal, et les macrophages (Brouillet et al. 2010, Denison et al. 2008). Dans de nombreuses expériences non publiées, une hausse de l'expression protéique des PROKRs a été observée dans des placentas à terme. Des expériences complémentaires sont à envisager afin de savoir si ces augmentations sont le reflet d'une augmentation continue au 2^{ème} et 3^{ème} trimestre, ou si cela est dû à une hausse tardive déclenchée par l'accouchement.

D. Régulation d'EG-VEGF et des PROKRs dans le placenta humain

Lorsque j'ai débuté ma thèse, l'unique régulation connue pour EG-VEGF et ses récepteurs dans le placenta humain concernait la régulation d'EG-VEGF et de PROKR1 par l'hypoxie. PROKR1 présente un pic d'expression vers 9-10 SA, comme EG-VEGF, pic qui se situe pendant la période d'hypoxie placentaire. Le laboratoire a mis en évidence la stimulation d'EG-VEGF et de PROKR1 par l'hypoxie dans des trophoblastes en culture primaire (Hoffmann et al. 2006). Néanmoins, les profils d'expression d'EG-VEGF et de PROKR1 ne sont pas totalement superposables à celui de l'hypoxie placentaire, qui couvre toute la période du 1^{er} trimestre de la grossesse. Ces différences suggèrent une régulation possible par d'autres facteurs.

E. Rôle d'EG-VEGF sur les trophoblastes extravilloux (TEV)

L'expression majoritaire de PROKR2 par les TEV suggérait une action possible d'EG-VEGF sur ces cellules. Il a été montré qu'EG-VEGF diminuait la migration, l'invasion et l'organisation en réseaux pseudo-vasculaires des TEV au 1^{er} trimestre de grossesse (voir figure 51) (Hoffmann et al. 2006, Hoffmann et al. 2009). L'effet inhibiteur d'EG-VEGF sur la migration et l'organisation était totalement aboli par l'utilisation d'ARN interférant PROKR2, indiquant que ce récepteur était indispensable pour ces effets.

Dans la physiologie placentaire, l'invasion trophoblastique s'accompagne *in vivo* d'un remodelage de la matrice extracellulaire par les métalloprotéinases (MMPs). Le rôle inhibiteur d'EG-VEGF sur l'invasion des TEV était complété par une diminution de la production de MMP2 et MMP9 par les trophoblastes extravilleux et les explants placentaires (Hoffmann et al. 2009), métalloprotéinases qui sont importantes pour le remodelage de la matrice extracellulaire (Bischof et al. 1998, Fisher et al. 1985). L'ensemble de ces résultats suggère qu'EG-VEGF est impliqué dans le contrôle de l'invasion trophoblastique en inhibant leur migration pendant le 1^{er} trimestre de grossesse, protégeant ainsi la villosité placentaire d'un remodelage anticipé des artères spiralées maternelles, et donc d'une oxygénation trop précoce, qui induirait un stress oxydatif important. Après 10 SA, la baisse physiologique d'EG-VEGF entraînerait la levée de cette inhibition, permettant alors aux TEV d'envahir la décidue. L'élargissement des artères spiralées permettrait alors l'oxygénation optimale de l'espace intervilloux, et le déroulement correct de la grossesse au 2^{ème} et 3^{ème} trimestre.

OBJECTIFS

La thématique de recherche du laboratoire dans lequel j'ai effectué ma thèse est centrée sur l'étude de l'angiogenèse physiologique et tumorale, en particulier dans les glandes endocrines (cortex surrénal et placenta). L'essentielle de l'activité de recherche porte sur l'étude de deux facteurs majeurs de l'angiogenèse, VEGF et EG-VEGF. Le laboratoire cherche à comprendre les mécanismes de contrôle de l'angiogenèse physiologique, afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour inhiber l'angiogenèse pathologique, et en particulier tumorale.

Au sein de ce laboratoire, l'équipe que j'ai intégrée étudie en particulier le rôle d'EG-VEGF dans la vascularisation placentaire, et dans les pathologies de la grossesse d'origine vasculaire (Toxémie Gravidique et Retard de Croissance Intra-Utérin). Cette équipe est née en 2003 lors de l'intégration dans l'unité du Dr. Nadia Alfaidy, qui a développé le modèle placenta et qui dirige ce projet. L'équipe a caractérisé dans un premier temps l'expression d'EG-VEGF et de ses récepteurs dans le placenta humain et murin. Dans un deuxième temps, l'étude des rôles de ce facteur sur les trophoblastes extravilleux, sa régulation par l'hypoxie ainsi que sa dérégulation dans la Toxémie Gravidique ont également été établies (Hoffmann et al. 2006, 2007, Hoffmann et al. 2009).

Depuis mon arrivée en 2007, mon travail a porté sur la compréhension des mécanismes du développement placentaire normal et pathologique au cours du 1^{er} trimestre de la grossesse, et sur l'étude des pathologies de la grossesse, comme le RCIU.

Suite aux résultats publiés par l'équipe depuis 2006, le premier objectif de travail de ma thèse a été de caractériser l'effet du facteur angiogène EG-VEGF sur les cellules endothéliales placentaires, les HPEC. Nous avons pour cela mis en place la culture primaire au sein du laboratoire. Le deuxième objectif de ma thèse a été d'étudier la régulation d'EG-VEGF et de ces récepteurs par l'hCG, hormone clé de la grossesse, au sein de la villosité chorale. Enfin, le troisième objectif a été de caractériser l'expression de ce facteur et de ces récepteurs dans les grossesses avec RCIU.

RÉSULTATS

RÉSULTATS
1^{ère} publication

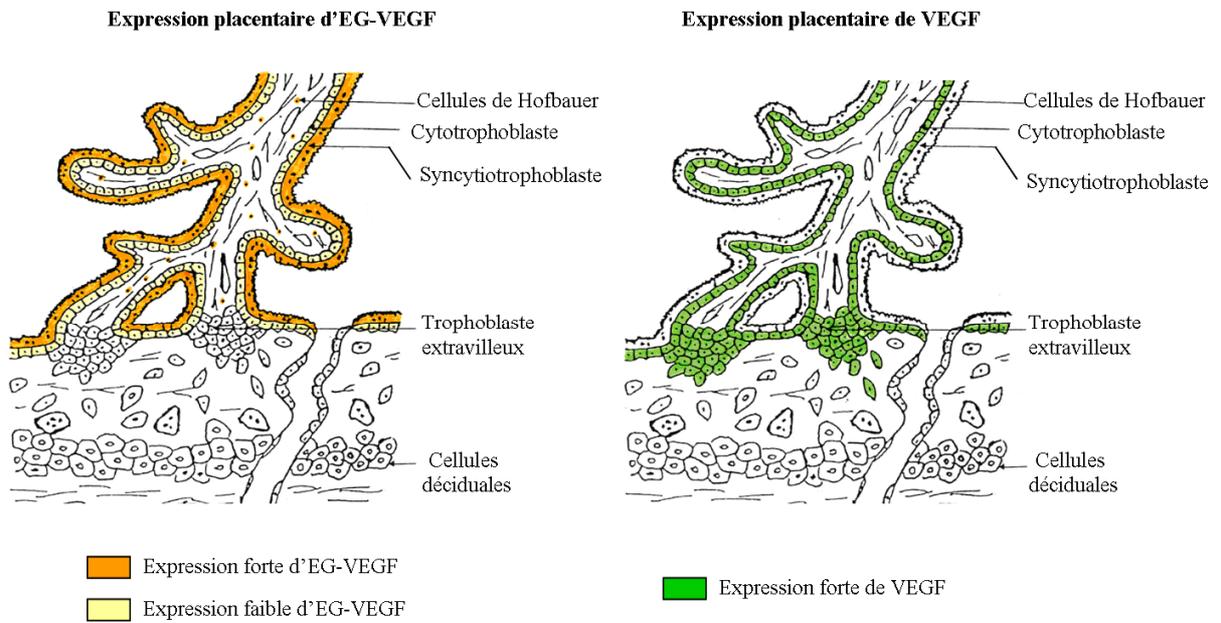


Figure 52 : Expression d'EG-VEGF et VEGF dans le placenta au 1^{er} trimestre de grossesse. Schémas adaptés de (Fournier et al. 2007).

I. Effet d'EG-VEGF sur l'angiogenèse placentaire (première publication)

1.1 Contexte de la première publication

Quand j'ai débuté mon travail de thèse, le rôle angiogène d'EG-VEGF était relativement bien établi dans différents organes dérivés des glandes endocrines, comme les testicules (LeCouter et al. 2003b, Samson et al. 2004), les ovaires (Kisliouk et al. 2005a, Kisliouk et al. 2005b, LeCouter et al. 2001), et les surrénales (LeCouter et al. 2001, Lin D. C. et al. 2002a). Le rôle angiogène d'EG-VEGF dans des tissus non endocrines, comme dans la choroïde par exemple, avait également été rapporté (Tanaka et al. 2006). En 2001, l'équipe de Ferrara rapportait qu'EG-VEGF n'activait pas la prolifération et la migration des HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells), cellules endothéliales dérivées de la veine ombilicale humaine (LeCouter et al. 2001), mais aucune donnée sur le potentiel angiogène d'EG-VEGF sur les cellules endothéliales placentaires, qui est un organe privilégié de l'expression de ce facteur, n'avait été publiée jusque là.

Devant ce constat, nous avons entrepris d'établir le rôle angiogène d'EG-VEGF sur les cellules endothéliales placentaires, les HPEC. De nombreuses données suggéraient une action potentielle d'EG-VEGF sur l'angiogenèse du placenta :

- EG-VEGF a un rôle angiogène dans de nombreux organes.
- Le placenta, organe fortement vascularisé, est un site d'expression privilégié de ce facteur angiogène et de ses récepteurs.
- L'expression sérique d'EG-VEGF est maximale au 1^{er} trimestre de grossesse (Hoffmann et al. 2009), période où l'angiogenèse placentaire est fortement activée.
- L'hypoxie augmente l'expression d'EG-VEGF et de son récepteur PROKR1 dans les trophoblastes (Hoffmann et al. 2006).
- EG-VEGF et VEGF sont exprimés dans des compartiments cellulaires adjacents dans le placenta, suggérant une complémentarité d'action de ces deux facteurs (voir figure 52).

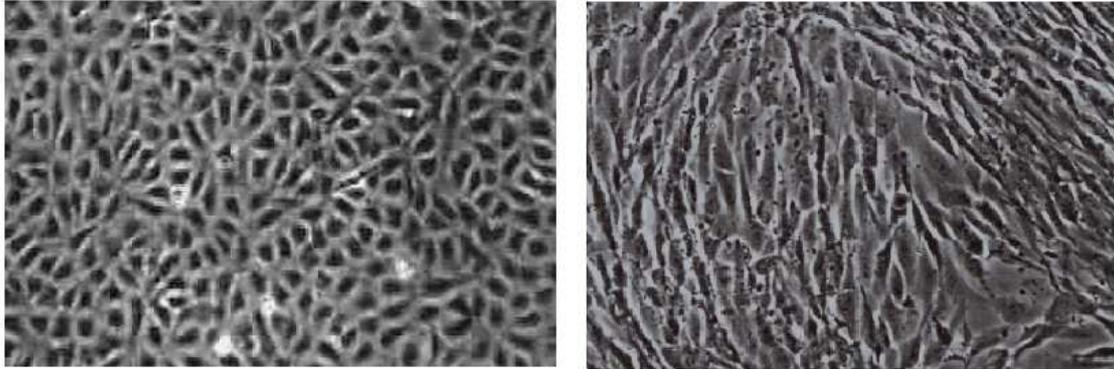


Figure 53 : Morphologie de cellules endothéliales HUVEC et HPEC. Les HUVEC (à gauche) sont polygonales alors que les HPEC (à droite) sont allongées, forme qu'elles conservent même à confluence.

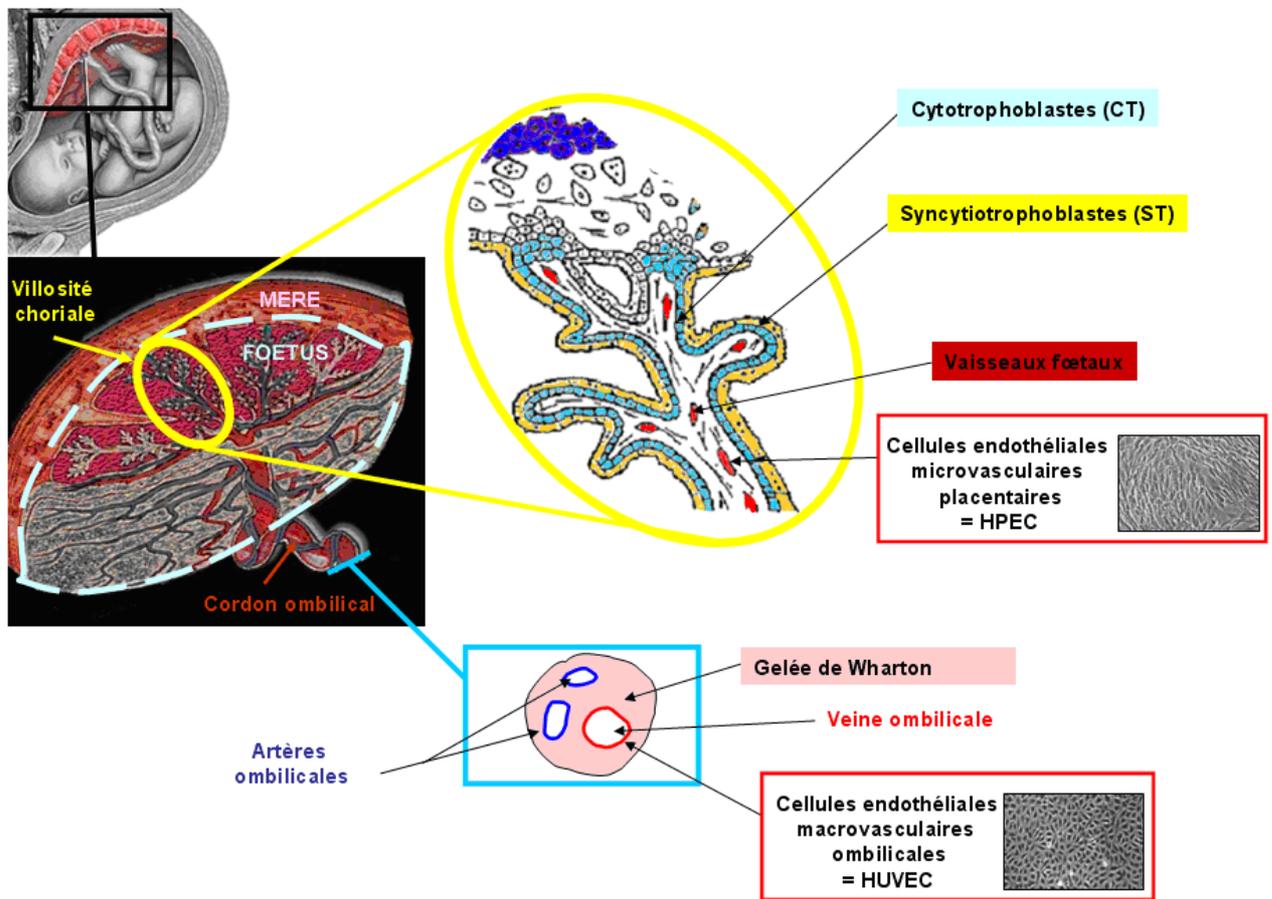


Figure 54 : Localisation des HPEC et des HUVEC. Schémas adaptés de <http://static.howstuffworks.com/gif/adam/images/en/anatomy-of-a-normal-placenta-picture.jpg>, <http://www.bioscience.org/atlas/fert/images/figures/matuplac.jpg> et (Fournier et al. 2007)

Des précautions particulières étaient nécessaires pour étudier l'effet angiogène d'EG-VEGF dans la villosité placentaire. En effet, l'hétérogénéité des cellules endothéliales macrovasculaires et microvasculaires est bien établie, tant au niveau de leur morphologie que de leur fonctionnalité (voir figure 53) (Bicknell 1993, Fajardo 1989, Garlanda and Dejana 1997, Zetter 1981).

De nombreuses caractéristiques discriminantes ont été rapportées pour les HUVEC et les HPEC concernant : leur morphologie (Jinga et al. 2000), leur expression génique (Murthi et al. 2007, Murthi et al. 2008), leur sécrétion de substances vasoactives (Lang et al. 2003), et leur réponse proliférative à des agents mitogènes comme le VEGF, PlGF ou FGF-2 (Khaliq et al. 1999, Lang et al. 2001, Lang et al. 2003, Migdal et al. 1998, Park et al. 1994). Cette hétérogénéité entre les cellules macrovasculaires et microvasculaires impose d'étudier spécifiquement les cellules endothéliales de l'organe concerné, et d'éviter au maximum les extrapolations d'organe à organe. Les HUVEC, largement utilisées pour l'étude des processus angiogènes, ne permettent donc pas de conclure sur les caractéristiques des cellules endothéliales dérivées d'organes différents (voir figure 54) (Lang et al. 2001). De ce fait, l'absence d'effets d'EG-VEGF sur la prolifération et la migration des HUVEC (LeCouter et al. 2001) n'excluait pas une possible action de cette cytokine sur les HPEC.

Pour étudier l'effet angiogène d'EG-VEGF sur le placenta, nous avons donc choisi d'utiliser les cellules endothéliales placentaires HPEC. Le placenta, qui possède à terme un réseau vasculaire estimé à 550 km environ (Burton and Jauniaux 1995, Jackson et al. 1992), est une excellente source pour les cellules endothéliales microvasculaires. Pour notre étude, l'isolement d'HPEC à partir de vaisseaux de placentas à terme a été réalisé selon la technique décrite par l'équipe de Simionescu (Jinga et al. 2000). Après 10-12 jours de culture, les HPEC arrivent à confluence et possèdent un phénotype allongé caractéristique. Après vérification du phénotype endothélial de nos cellules par différents marqueurs endothéliaux (CD-31, facteur de von Willebrand, UEA-lectine, ou internalisation de LDL acétylées), notre travail a consisté à établir l'action angiogène d'EG-VEGF sur les cellules endothéliales microvasculaires placentaires HPEC, et à la comparer à celle sur les cellules macrovasculaires ombilicales HUVEC.

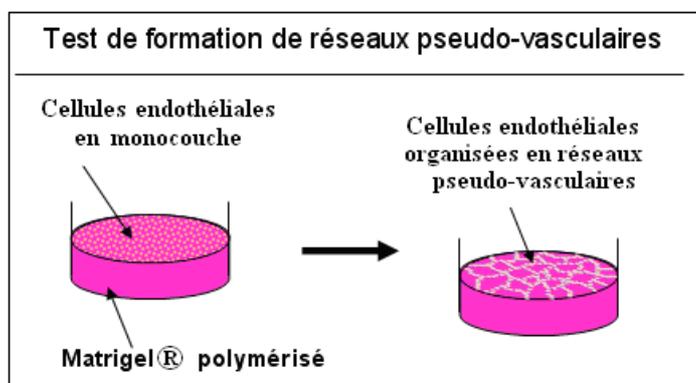


Figure 55 : Test de formation de réseaux pseudo-vasculaires. Les cellules endothéliales forment spontanément des réseaux pseudo-vasculaires lorsqu'elles sont cultivées sur Matrigel® (Murray 2003). La présence de certains facteurs dans le milieu de culture peut augmenter ou diminuer le nombre de réseaux à un moment donné.

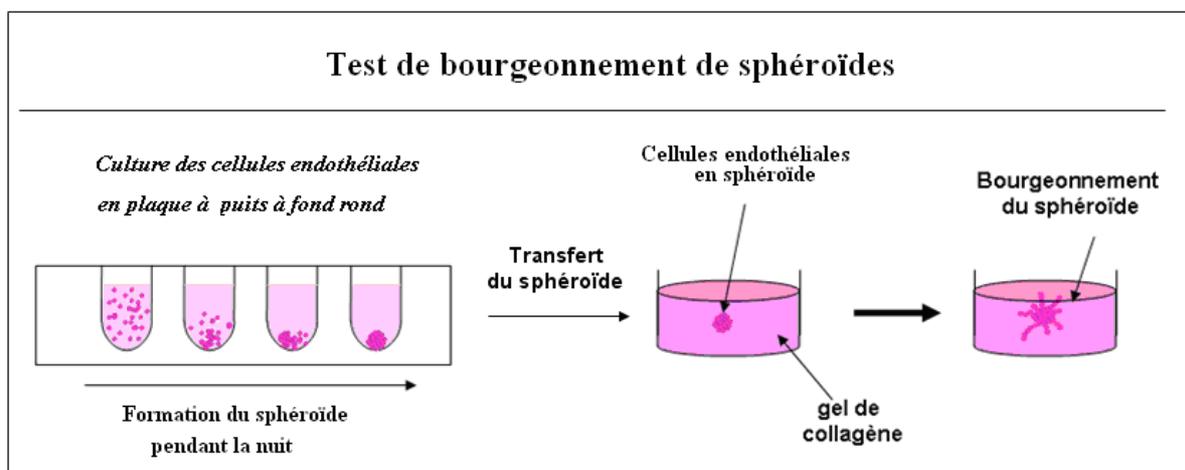


Figure 56 : Test de bourgeonnement de sphéroïdes. Les cellules endothéliales sont mises en culture dans des puits à fond rond sur la nuit, permettant ainsi la formation d'un sphéroïde par puits. Le lendemain, le sphéroïde est transféré avec précaution, et inclus dans un gel de collagène. Les premiers bourgeons apparaissent dès les premières heures d'inclusion.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'expression des récepteurs d'EG-VEGF, PROKR1 et PROKR2, dans les vaisseaux fœtaux placentaires et ombilicaux, puis nous avons vérifié le maintien de l'expression de ces récepteurs après l'isolement et la culture des HPEC et des HUVEC. Nous avons ensuite étudié l'effet d'EG-VEGF sur la prolifération, la migration et la survie des HPEC et des HUVEC.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'effet angiogène d'EG-VEGF par deux tests complémentaires : le test d'organisation en réseaux pseudo-vasculaires (voir figure 55) et le bourgeonnement de sphéroïdes d'HPEC et d'HUVEC (voir figure 56).

Dans le placenta, l'endothélium microvasculaire participe non seulement à l'angiogenèse, mais également aux échanges de nutriments et de solutés entre la mère et le fœtus. Il constitue donc une véritable barrière semi-perméable essentielle pour le succès de la grossesse. Dans une troisième partie, nous avons déterminé l'effet d'EG-VEGF sur la perméabilité endothéliale et le transport para-cellulaire d'une monocouche d'HPEC.

Grâce à une stratégie d'ARN interférents et d'anticorps bloquants, nous avons étudié l'implication différentielle des récepteurs PROKR1 et PROKR2 dans l'effet d'EG-VEGF sur l'angiogenèse et la perméabilité des HPEC.

Molecular Characterization of EG-VEGF-mediated Angiogenesis: Differential Effects on Microvascular and Macrovascular Endothelial Cells

Sophie Brouillet,^{*†‡} Pascale Hoffmann,^{*†‡§} Mohamed Benharouga,^{†‡||}
Aude Salomon,^{*†‡} Jean-Patrick Schaal,[§] Jean-Jacques Feige,^{*†‡}
and Nadia Alfaidy^{*†‡}

^{*}Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 878, Grenoble, France; [†]Commissariat à l’Energie Atomique, IRTSV, Grenoble, France; [‡]Université Joseph Fourier, Grenoble 1, France; [§]Centre Hospitalier Régional Universitaire de Grenoble, Département de Gynécologie, Obstétrique et Médecine de la Reproduction, Grenoble, France; and ^{||}Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 5249, Grenoble, France

Submitted January 26, 2010; Revised May 27, 2010; Accepted June 21, 2010
Monitoring Editor: Asma Nusrat

Endocrine gland derived vascular endothelial growth factor (EG-VEGF) also called prokineticin (PK1), has been identified and linked to several biological processes including angiogenesis. EG-VEGF is abundantly expressed in the highest vascularized organ, the human placenta. Here we characterized its angiogenic effect using different experimental procedures. Immunohistochemistry was used to localize EG-VEGF receptors (PROKR1 and PROKR2) in placental and umbilical cord tissue. Primary microvascular placental endothelial cell (HPEC) and umbilical vein-derived macrovascular EC (HUVEC) were used to assess its effects on proliferation, migration, cell survival, pseudovascular organization, spheroid sprouting, permeability and paracellular transport. siRNA and neutralizing antibody strategies were used to differentiate PROKR1- from PROKR2-mediated effects. Our results show that 1) HPEC and HUVEC express both types of receptors 2) EG-VEGF stimulates HPEC’s proliferation, migration and survival, but increases only survival in HUVECs. and 3) EG-VEGF was more potent than VEGF in stimulating HPEC sprout formation, pseudovascular organization, and it significantly increases HPEC permeability and paracellular transport. More importantly, we demonstrated that PROKR1 mediates EG-VEGF angiogenic effects, whereas PROKR2 mediates cellular permeability. Altogether, these data characterized angiogenic processes mediated by EG-VEGF, depicted a new angiogenic factor in the placenta, and suggest a novel view of the regulation of angiogenesis in placental pathologies.

INTRODUCTION

The human placenta is a highly vascularized organ. By the end of gestation, it has developed a capillary network that is ~550 km in length and 15 m² in surface (Burton and Jau-niaux, 1995). This network is essential for efficient materno-fetal exchange, but also plays a key mechanistic role in the elaboration of the placental villous tree. Vasculogenesis, and subsequent angiogenesis, are the pivotal processes for the enlargement of the placental vascular tree and placental development (Charnock-Jones and Burton, 2000; Leach *et al.*, 2002; Charnock-Jones *et al.*, 2004; Demir *et al.*, 2004, 2007). Failure in these processes can lead to preeclampsia (PE), early pregnancy loss, and intrauterine growth restriction (IUGR). It is now well established that a close relationship exists between embryonic development and the degree of vascu-

larization of the chorionic villi, and that normal chorionic villous vascularization is essential for undisturbed development of pregnancy (te Velde *et al.*, 1997).

Angiogenic growth factors are considered to be the main mediators of placental angiogenesis. Mouse models have demonstrated the importance of two families of ligands, namely vascular endothelial growth factors (VEGFs) and angiopoietins, and their respective tyrosine kinase receptors in fetal and placental angiogenesis (Risau, 1997; Neufeld *et al.*, 1999; Sibai *et al.*, 2005). Although VEGF-A and the angiopoietins are essentially selective for endothelial cells, they are widely expressed. Thus, it has been difficult to reconcile endothelial cell phenotypic diversity with the action of ubiquitous factors. Different studies have provided evidence for certain vascular bed-specific responses to VEGF (Palade *et al.*, 1979; Dellian *et al.*, 1996). In the placenta, VEGF acts differentially on the two types of endothelial cells that form this organ: the human placental microvascular endothelial cells (HPECs) that lie in the fetal capillaries of chorionic villi and the human umbilical vein macrovascular endothelial cells (HUVECs). Hence, it is likely that morphological and functional diversity among endothelia is achieved by several mechanisms, including vascular bed-specific response to ubiquitous mediators and the existence of unique mitogenic/differentiating factors with a tissue-restricted expression pattern.

This article was published online ahead of print in *MBoC in Press* (<http://www.molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbc.E10-01-0059>) on June 29, 2010.

Address correspondence to: Nadia Alfaidy (nadia.alfaidy-benharouga@cea.fr).

Abbreviations used: EG-VEGF, endocrine gland derived endothelial growth factor; PROK1, prokineticin 1; PROK2, prokineticin 2; PROKR1, prokineticin receptor 1; PROKR2, prokineticin receptor 2.

Table 1. Primers used in this study

| Gene | Forward primer | Reverse primer | T (°C) for qPCR |
|-----------|---------------------------------|-------------------------------|-----------------|
| PROKR1 | 5'-GTCCTCGTCATTGTCAAGAGCC-3' | 5'-AAACACGGTGGGGAAGAAGTCC-3' | 58 |
| PROKR2 | 5'-CATCCCATCGCCTTACTTTGC-3' | 5'-CTTTTCCTTACGAACACAGTGG-3' | 58 |
| GAPDH | 5'-ACCCAGAAGACTGTGGATGG-3' | 5'-TTCTAGACGGCAGGTCAGGT-3' | 60 |
| Galpha12 | 5'-ATGGTCTCCTCCAGCGAGTA-3' | 5'-CTTGATGCTCACGGTCTTCA-3' | 60 |
| Galpha13 | 5'-GGAGATCGACAAATGCCTGT-3 | 5'-CAACCAGCACCTCATACT-3 | 60 |
| Galpha 11 | 5'-TGAGCGATGAGGTGAAGGAGTC-3' | 5'-CGGTGAAGATGTTCTGGTAGACG-3' | 60 |
| Galpha i1 | 5'-CGGTGCTGGTGAATCTGGTAAAAAG-3' | 5'-ACCTCCCATAGCCCTAATGATAG-3' | 60 |
| Galpha i2 | 5'-TGTCTACAGCAACACCATCCAGTC-3' | 5'-CAATACGCTCCAGGTCGTTTCAG-3' | 60 |

qPCR, quantitative PCR.

The existence of organ-specific angiogenic factors has been postulated for many years (Stewart and Wiley, 1981; Roberts *et al.*, 1998), but only recently received confirmation when such a factor, named endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor (EG-VEGF), was characterized and sequenced (LeCouter *et al.*, 2001). This new factor was found to be expressed in testis, adrenal gland, ovary, and placenta (LeCouter *et al.*, 2001). More importantly, its angiogenic action appeared to be restricted to endothelial cells derived from endocrine tissues (LeCouter *et al.*, 2001). In endothelial cells isolated from steroidogenic tissues, EG-VEGF was shown to promote proliferation, survival, and chemotaxis (LeCouter *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2002b). More importantly, in vivo delivery of adenoviruses encoding EG-VEGF resulted in endocrine tissue-specific angiogenesis (LeCouter *et al.*, 2001). EG-VEGF, also known as prokineticin-1 is a member of a class of proteins that includes Bv8, a frog peptide purified from the skin secretion of the yellow-bellied toad *Bombina variegata*, also known as prokineticin-2 (PROK2) in mammals. Human EG-VEGF and Bv8 proteins present 83% identity and share the same G protein-coupled receptors, termed PROKR1 and PROKR2 (Lin *et al.*, 2002a).

EG-VEGF expression in the placenta was briefly described in the initial report by LeCouter *et al.* (2001). In three recent publications from our group, we have shown that EG-VEGF and its receptors, but not PROK2, are highly abundant in human placenta during the first trimester of pregnancy, with the highest expression of EG-VEGF found in the syncytiotrophoblast layer; that their expression is up-regulated by hypoxia; that EG-VEGF controls trophoblast invasion; and that its circulating levels were significantly higher in PE patients (Hoffmann *et al.*, 2006, 2007, 2009). The specificity and the magnitude of EG-VEGF expression in endocrine glands, its similarity of action with VEGF, its up-regulation by hypoxia and deregulation in PE, suggested to us that this new factor might play important role in placental angiogenesis. Here, we sought to characterize the angiogenic processes mediated by EG-VEGF in a highly vascularized organ, the human placenta and compare its effects to the well studied angiogenic factor, VEGF. Both microvascular (HPEC) and macrovascular (HUVEC) cells were studied.

MATERIALS AND METHODS

Tissues Collection

Collection and processing of human placentas were approved by the district and local hospital ethical committees, and collection was performed according to the Grenoble Hospital and University Joseph Fourier code of practice. Informed patient consent was obtained in all cases. Human term placentas were obtained from uncomplicated pregnancies after elective caesarean section delivery between 38 and 40 wk of gestation (wg) of gestation. For each

placenta both the placental disk and the attached umbilical cord were used for the isolation of HPEC and HUVEC cells, respectively.

Endothelial Cell Isolation

HPEC Cell Isolation. Primary HPECs were isolated from fetal vessels of human term placenta, as described elsewhere (Jinga *et al.*, 2000). Term trimester placentas were used for technical reasons, as the large size of the placenta at this gestational age allows the isolation of a sufficient number of endothelial cells. At this gestational age, EG-VEGF receptors are both expressed (Hoffmann *et al.*, 2007; Denison *et al.*, 2008). In brief, HPECs were isolated from term placental villi by enzymatic perfusion of the vasculature followed by separation of the resulting cells on a Percoll density gradient. The cells were further purified by a two-step selection procedure, based on differential trypsinization (Jinga *et al.*, 2000). HPECs were used in our experiments between passage 3 and 5. Cells were cultured at 37°C in 5% CO₂ in air (vol/vol) and relative humidity greater than 95%. HPECs were maintained in endothelial cell basal medium (MCDB131, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplemented with fetal bovine serum (FBS, 15%, Invitrogen, Cergy Pontoise, France), EGM 2MV endothelial med single quokit (Lonza, Basel, Switzerland), and antibiotics (1%) and were passaged upon reaching confluence, typically every 3–4 d.

HPEC Characterization. Isolated HPEC cells were tested for their expression of endothelial cell markers CD31 (PECAM) and von Willebrand factor, for binding of *Ulex europaeus* lectin (UEA-I) and for their DiI-Ac-LDL uptake, and for smooth muscle cell contamination was assessed by immunostaining of smooth muscle actin, according to the following methods. von Willebrand factor antigen, UEA-I lectin, and CD31. For the three antibodies the following protocol was used: HPECs were cultured on glass coverslips, rinsed three times with DMEM, fixed in cold acetone (20°C) for 5 min, and air-dried at room temperature (RT). Anti-human IgGs against von Willebrand factor antigen was used at 1/1000 dilution (rabbit IgG, Dako, France), UEA-I (Ulex lectin binding) was used at 1/10 (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France) and CD31 was used at 1/100 (mouse IgG, Dako). All antibodies were diluted in PBS. The glass coverslips with cultured cells (upside down) were exposed to antibodies in a moisture chamber, at 37°C, for 1 h. After extensive washing with PBS, the cells were incubated in the same conditions, with their specific secondary antibodies labeled with Cy2 (1/1000; Molecular Probes, Eugene, OR) for the vW^{***} or with FITC for CD31. Lectin UEA-1 was TRITC labeled. After 1 h, at 37°C, the coverslips were washed thoroughly with PBS (three times for 15 min), fixed in 2% paraformaldehyde for 10 min, and mounted in a drop of Vectashield (Dako), and placed under coverslips. Preparations were observed under a Leica confocal microscope (TCS-SP2; Deerfield, IL). Incubation in buffer without primary antibodies was used as negative control. The same protocol as for the staining for endothelial cell markers was also used to stain smooth muscle actin (1/70, mouse IgG, clone A14 from Dako).

Uptake of acetylated low-density lipoproteins (AcLDL). AcLDL coupled with fluorescent 1,1-dioctadecyl-3,3,3,3-tetramethyl-indocarbocyanide perchlorate (Molecular Probes, Eugene, OR; AcLDL-DiI) was prepared as described by Voyta *et al.* (1984). Confluent HPEC on glass coverslips were washed with PBS containing 1.2 mM CaCl₂ and 0.5 mM MgCl₂ (Sigma-Aldrich), incubated with AcLDL-DiI (10 µg/ml) for 1 h, and examined with the fluorescence microscope. Controls consisted of similarly processed cultures, except that AcLDL-DiI was omitted from the incubation medium.

HUVEC Isolation. HUVEC were isolated from human umbilical cord veins as described before (Hebert *et al.*, 1990). The isolated cells were cultured in EGM-2 endothelial medium bullet kit (Lonza) fetal calf serum at 37°C under 5% CO₂.

RNA Isolation and RT-PCR Analysis

Total RNA was extracted from HPECs and HUVEC as previously described using a rapid RNA isolation system (Qiagen RNeasy, Courtaboeuf, France).

Reverse transcription was performed on 1 μ g total RNA with Superscript II-RnaseH reverse transcriptase (Invitrogen).

Real-Time PCR Analysis

GAPDH, and G proteins (*Ga11*, *Ga12*, *Ga13*, *Gai1*, *Gai2*) mRNA expressions were quantified by real-time RT-PCR using a Light Cycler apparatus (Roche Diagnostics, Meylan, France). The PCR was performed using the primers shown in Table 1 and SYBR green PCR core reagents (Light Cycler-FastStart Master SYBR Green I, Roche Diagnostics, Meylan, France). For negative controls, we used a complete DNA amplification mix, where the target cDNA template was replaced by water. PCR conditions were as follows: step 1, 94°C for 10 min; and step 2, 45 cycles consisting of 95°C for 15 s, temperature indicated in Table 1 for 5 s and 72°C for 10 s. The results were normalized to GAPDH mRNA expression level.

RNA Interference

Expression of PROKR1 and PROKR2 mRNAs was inhibited by transfection of small interfering RNAs (siRNAs). Briefly, 1 d after plating, HPEC cells were transfected with or without 10–50 nM siRNA duplexes for PROKR1 or R2 genes, using RNA interference (RNAi) Max (Ambion, Austin, TX). siRNA duplexes (21-nucleotide) were purchased from Ambion. PROKR1 siRNA oligonucleotide templates were the following (5'-3'): antisense: GGCUCUUACAAUGGCG-

GUtt; sense: ACCGCCAUGUAAGAAGCCt, and PROKR2 siRNA oligonucleotide templates were the following (5'-3'): antisense: GUUAUGGUGAUUUAU-GACCUt; sense: AGGUCAUAAUCACCAUAACtg. Scrambled siRNA duplexes of these targeting sequences served as nonspecific control siRNA.

Immunohistochemistry

Placental tissues were collected from first trimester termination of pregnancy between 9 and 10 wg. Umbilical cords were collected at term from caesarean deliveries. Immunohistochemistry was processed as described previously (Hoffmann *et al.*, 2009).

Western Blotting Analysis

Western blotting was used to demonstrate the effect of EG-VEGF on mitogen-activated protein (MAP) kinase and AKT activation, to verify the loss of PROKR1 and PROKR2 mRNAs in HPECs treated with specific siRNAs to these proteins and to demonstrate the blocking effect of neutralizing antibodies to PROKR1 and PROKR2. Western blotting was processed as previously described (Hoffmann *et al.*, 2009). The rabbit antibodies against MAP kinase was (1/40,000, Sigma-Aldrich), phospho-MAP-kinase (1/5000, Promega, Madison, WI), Akt (1/1000, Cell Signaling, Beverly, MA), phospho-AKT (1/1000, Cell Signaling), PROKR1 (0.84 μ g/ml, in house antibody), and PROKR2 (0.84 μ g/ml, in house antibody). Mouse anti-human β -actin anti-

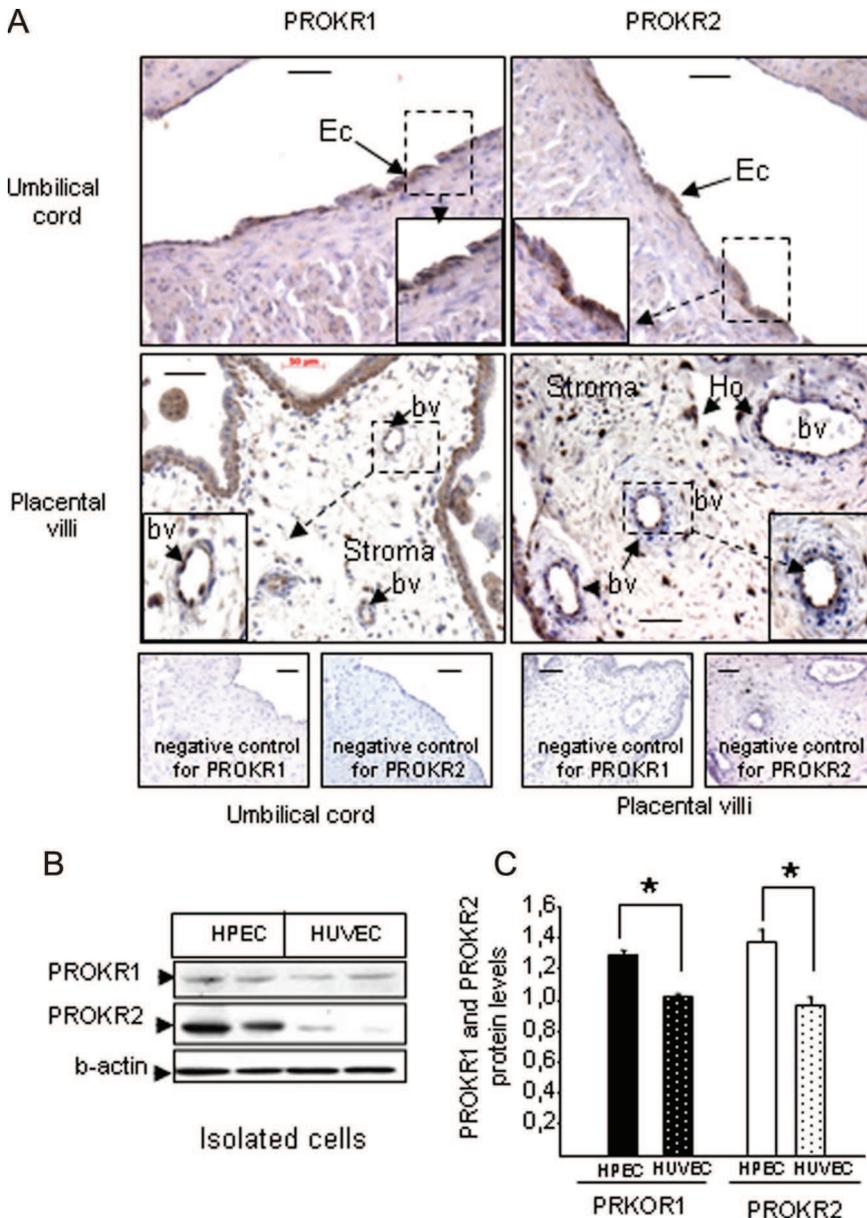


Figure 1. PROKR1 and PROKR2 protein expression in placental-tissue, umbilical cord and in isolated HPECs and HUVECs. (A) Chorionic villi and umbilical cord sections immunostained with anti-PROKR1 and anti-PROKR2 antibodies. The undersized photographs on the right show tissue sections incubated with the respective preimmune sera. Subset photographs in each panel represent higher magnifications for the staining in endothelial cells. CT, cytotrophoblast; Ho, Hofbauer cells; St, syncytiotrophoblast; Ec, endothelial cells; bv, blood vessels. Scale bar, 50 μ m. (B) A representative Western blot analysis of PROKR1 and PROKR2 expression in HPECs and HUVECs. (C) A quantification of levels PROKR1 and PROKR2 protein expression in HPEC and HUVEC cells. * $p < 0.05$.

body (1/8000, Sigma-Aldrich) was used as an internal control for protein loading.

Assessment of HPEC and HUVEC Proliferation

Both [³H]thymidine incorporation and Ki67 staining were used. The effect of EG-VEGF on cellular proliferation was examined using recombinant human EG-VEGF (Tebu, Le Perray-en-Yvelines, France). Cells were placed in 48-well plates (7×10^4 cell/well) and cultured overnight (37°C, 5% CO₂). The cells were serum-starved for 24 h and then incubated for 24 h in serum-free media containing 10–50 ng/ml EG-VEGF, which corresponds to 1–5 nM. The choice of these concentrations was based on the IC₅₀ of EG-VEGF for its receptors (2.7 nM; Lin *et al.*, 2002a; Maldonado-Perez *et al.*, 2007). For [³H]thymidine, cells were labeled with 0.5 μCi/ml [³H]thymidine (Amersham, Les Ulis, France). The cells were subsequently washed in HBSS and incubated in 2 ml ice-cold 5% trichloroacetic acid for 20 min at RT. After washing, 0.4 ml of 0.1 M NaOH and 0.1% SDS was added; the lysates were transferred to Eppendorf tubes and counted in a liquid scintillation counter (Beckman, Krefeld, Germany; LS 6500). For Ki67 staining the cells were incubated for 24 h in serum-free media containing 10–50 ng/ml EG-VEGF, fixed in paraformaldehyde for 20 min, and then stained for Ki67 antibody (Dako).

Assessment of HPEC and HUVEC Migration

Wound healing assay was performed to examine the effect of EG-VEGF on HPEC and HUVEC cell motility. Cells were seeded in equal number into six-well plates and processed as previously described (Hoffmann *et al.*, 2009). To further characterize the signaling pathway of EG-VEGF, inhibitors of MAP kinases and phosphatidylinositol 3'-kinase (PI3K) kinases (PD98059 and LY294002) have been used at 20 and 10 μM, respectively.

Apoptosis Detection

HPEC cells were serum-starved for 24 h and then incubated for an extra 24 h in the absence or presence of EG-VEGF at different concentrations (10, 25, 50 ng/ml). The percentage of apoptotic HPEC cells was determined using caspase 3 staining. After a challenge with EG-VEGF the cells were fixed for 5 min in cold acetone and stained with anti-human caspase 3 IgGs at 1/2500 dilution (rabbit IgG, Cell Signaling). The same protocol used for HPEC characterization was applied for the caspase staining. For each slide, three randomly selected microscopic fields were observed, and ≥ 200 cells/field were evaluated.

Pseudovascular Morphogenesis Assay

Approximately 150 μl of ice-cold Matrigel (BD Biosciences, Grenoble, France) was layered into each well of 24-well plates. The Matrigel was allowed to solidify completely at 37°C for 1 h. HPECs (10^5 cells per well) and HUVEC (10^5 cells per well) were added and incubated at 37°C in an atmosphere of humidified 95% air/5% CO₂ for 12 h. EG-VEGF treatment was applied at the same time as plating. Hourly observations were made under an inverted photomicroscope to document the developmental stages. Quantification of branching was performed after 10 h of culture by calculating the number of branching point formed in each well.

Generation of Endothelial Spheroids

Confluent monolayers of HPECs and HUVECs were trypsinized. Cells were suspended in a mixture of 1 volume of 1.2% (wt/wt) methylcellulose and 4 volumes of culture medium containing 15% FCS and antibiotics. In these experiments, 3000 cells were suspended in culture medium/methylcellulose and seeded in nonadherent round-bottom 96-well plates (Greiner, Frickenhausen, Germany). Under these conditions all suspended cells contribute to the formation of a single endothelial cell spheroid. The spheroids were harvested within 24 h and transferred into a collagen gel (3.54 mg/ml, BD Biosciences) and different concentrations of EG-VEGF were added. Sprout formation was measured and compared with those induced by fibroblast growth factor 2 (FGF-2; 20 ng/ml) or VEGF (100 ng/ml). Sprouting of spheroids starts as early as 1 h of culture. Quantification of the sprouting was done using ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) after 12 h of culture by image analysis of microphotographs. At least three replicates were included within each experiment, and three different preparations of HPEC and HUVEC were analyzed. To differentiate between PROKR1- and PROKR2-mediated effects in HPEC cells, we performed two different sets of experiments. In the first one, the follow-up of sprouting was assessed in spheroids that had been formed from HPEC invalidated for PROKR1 or PROKR2 using siRNAs as described in this section. In the second set, the follow-up of sprouting was performed in spheroids that had been preincubated with PROKR1- or PROKR2-blocking antibodies (Covalab, Lyon, France) at 0.5 μg/ml final concentration and then challenged with EG-VEGF. Control rabbit IgGs were also used in the set of experiment where blocking antibodies were used. See Figure S3 for siRNA and blocking peptide strategies.

Measurement of Endothelial Monolayer Permeability

Transendothelial Electrical Resistance. HPEC were seeded onto Vitrocoated Transwell polystyrene filters (Corning, Dutscher, France) and grown to confluence for 10–11 d. Growth medium was replaced every other day. Twenty-four hours before the experiment, confluent endothelial monolayers were serum-starved. Experiments were initiated by washing the upper and lower compartments with warmed (37°C) 20 mM Tris-buffered saline, pH 7.4, supplemented with 25 mM glucose and 0.1% BSA (150 μl/upper and 600 μl/lower compartments). The inserts were allowed to equilibrate for 30 min at 37°C before initiating the experiments. After equilibration, the buffer was removed from the inserts, and fresh buffer containing various treatments was added to the upper compartment (70 U/ml thrombin, 25 ng/ml EG-VEGF). EG-VEGF and thrombin-induced changes in the resistance of the endothelial monolayers were measured using MilliCell ERS (Millipore, Bedford, MA) at 0, 5, 10, 15, 20, 25, and 35 min after adding the treatments. In this set of experiment, thrombin was used as a positive control for endothelial cell permeability (Rabiet *et al.*, 1996). Assays were performed in triplicate, and changes in resistance were normalized to their respective controls. In a different set of experiments, electrical resistance was determined in HPECs that were invalidated for PROKR1 or PROKR2 using specific siRNAs and in HPEC cells that were treated with PROKR1- or PROKR2-blocking antibodies (Covalab) before the challenge with EG-VEGF.

[³H]Mannitol Transport (Papp). HPEC were grown and treated as described in the previous section. After the addition of the treatments, the tracer

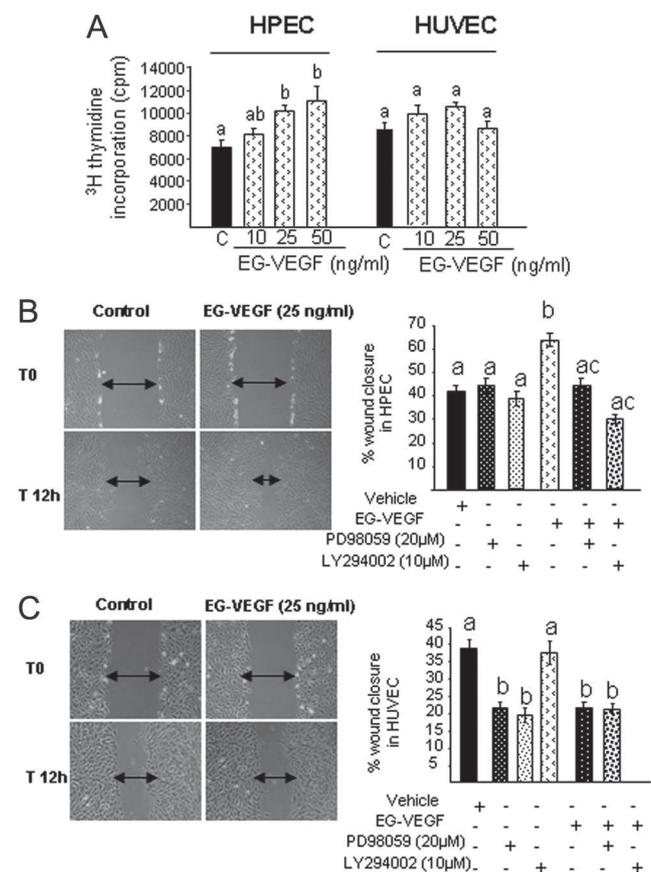


Figure 2. EG-VEGF increases HPEC but not HUVEC proliferation and migration. (A) [³H]Thymidine incorporation into HPEC and HUVEC cells, in the absence or presence of EG-VEGF. A significant increase of HPEC proliferation was observed with 25 and 50 ng/ml EG-VEGF (**p* < 0.05). No significant effect was observed on HUVEC cells. (B and C) Photographs of wounded HPEC and HUVEC monolayers, respectively, at 0 and 12 h after wounding. The plots show percentages of wound closure after 12 h of treatment with EG-VEGF in the absence or presence of PD98059 and the LY294002, the inhibitors of MAP kinases and PI3K, respectively. Bars with different letters are significantly different from each other (*p* < 0.05).

(^3H)mannitol, 125 nCi/well) was added. Samples (20 μl) of medium from the abluminal side were removed at 5, 10, 15, 20, 25 and 35 min and replaced with warm buffer. The assay was performed in triplicates. Radioactivity was measured using a scintillation counter. Papp (cm/s) was calculated using the following equation: $\text{Papp} = \text{dQ/dt} \times 1/\text{Ax Co}$, where dQ/dt is the slope of the linear curve describing the cumulative amount of tracer transported (i.e., detected in the abluminal side) versus time [sec], A, the surface area of the filter (cm 2), and Co (units/ml) the initial concentration in the donor compartment (luminal side).

Statistical Analysis

Statistical comparisons were made using one-way ANOVA analysis and tested for homogeneity of variance and normality ($p < 0.05$). Student's *t* test was also used when appropriate. Calculations were performed using SigmaStat (Jandel Scientific Software, San Rafael, CA).

RESULTS

Characterization of HPEC Cells

After seeding, HPECs reached confluence in 10–12 d and presented an epithelial-like morphology as described before (Jinga *et al.*, 2000). As shown in Figure S1 of supplementary data, all cultured HPECs were strongly labeled for vWf, UEA lectin, and CD31 and were able to internalize LDL-DiI. Immunofluorescence staining for anti-smooth muscle actin was 98% negative, indicating that the HPEC culture was not contaminated with myofibroblastic cells. The cultured cells were highly positive for endothelial cell markers, suggesting the presence of mainly HPEC cells. Cell viability, assessed by trypan staining, was 95% before and after treatments.

Expression of EG-VEGF Receptors, PROKR1 and PROKR2, in Micro- and Macrovascular Placental Cells

The first series of experiments were conducted to determine the types of prokineticin receptors expressed in HPEC and in HUVEC cells. PROKR expression was analyzed by immunohistochemistry on human placental tissue and human umbilical cord sections. Comparison of PROKR1 and PROKR2 expression levels was performed by Western blotting in isolated HPEC and HUVEC cells. As shown in Figure 1A, both PROKR1 and PROKR2 are expressed by endothelial cells within the placental villi. In the umbilical cord vein, both receptors were also detected in endothelial cells. Figure 1B illustrates a representative Western blot that shows differential expression of PROKR1 and PROKR2 in HPEC and HUVEC cells. Quantification of PROKR1 and PROKR2 protein levels in three independent experiments shows that both receptors are more abundant in HPEC than in HUVEC cells (Figure 1C).

EG-VEGF Effect on HPEC and HUVEC Proliferation

In a previous report from the group of Ferrara (LeCouter *et al.*, 2001), it has been shown that EG-VEGF does not affect the proliferation of HUVECs. However, no data are available on its effect on HPEC proliferation. Here, we investigated the effect of EG-VEGF on the proliferation of both cell types. Proliferation was assessed using two different techniques: [^3H]thymidine incorporation (Figure 2A) and Ki67 staining (Figure S2). Our results show that EG-VEGF significantly increased HPEC cell proliferation in a dose-dependen-

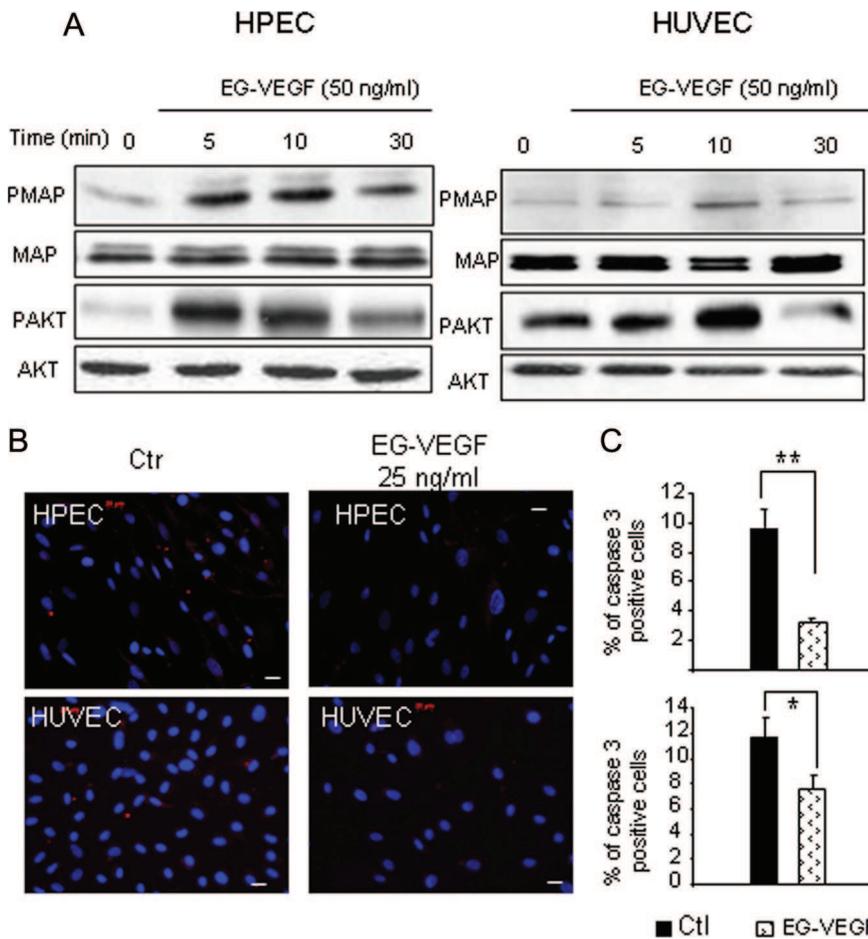


Figure 3. EG-VEGF is a survival factor for HPEC and HUVEC cells. (A) Representative Western blots of MAP kinase and AKT phosphorylations after treatment with EG-VEGF in HPEC and HUVEC cells. Standardization of the protein signals was done with antibodies against dephospho-MAP kinases and -AKT. (B) shows the effect of EG-VEGF on caspase 3 expression in HPEC and HUVEC cells after serum starvation and challenging with EG-VEGF (25 ng/ml). (C) The percentage of caspase 3-positive cells. Three randomly selected microscopic fields were observed, and ≥ 200 cells/field were evaluated. (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$). Bar, 20 μm .

dent manner. However, no effect was observed on HUVEC proliferation. These results were confirmed by the observed increase in Ki67 staining in HPECs but not in HUVECs.

EG-VEGF Effect on HPEC and HUVEC Migration

Because both HPEC and HUVEC cells expressed prokineticin receptors, we sought to investigate the effect of EG-VEGF on their migration using the monolayer wound assay. Figure 2, B and C, shows representative photographs of HPEC and HUVEC monolayers, at 0 and 6 h after their wounding with a pipette tip and subsequent incubation in the absence or presence of EG-VEGF. At 6 h of culture, the wound in HPEC was almost closed in the presence of EG-VEGF but not in the control condition. In HUVECs, EG-VEGF did not affect wound closure and therefore cell migration. Quantification of four independent experiments showed that treatment with EG-VEGF significantly increased the migration of HPECs. The closure of the wound reached 70% in the EG-VEGF condition versus only 40% in the control (Figure 2, D and E). These figures also show the effects of MAP kinases and PI3K inhibitors on the migratory process of HPECs and HUVECs in the absence or presence of EG-VEGF. Both inhibitors significantly decreased the response of HPEC to EG-VEGF without affecting their basal migration; however in HUVEC cells these inhibitors decreased the migratory process even at the basal state. These results suggest that HPEC and HUVEC respond differentially to promigratory stimuli, and this might in part explain their opposite response to EG-VEGF. To further investigate the differential response of HPECs and HUVECs to EG-VEGF, we compared the expression levels of the main G proteins reported to be associated to the activation of PROKR1 and PROKR2, i.e., $G\alpha11$, $G\alpha12$, $G\alpha13$, $G\beta1$, and $G\beta2$ (Chen *et al.*, 2005; Ngan *et al.*, 2008). Our data show that HPECs and HUVECs did not show any differences in their $G\alpha12$ and $G\alpha13$ levels; however, there was a slight difference in the expression level of $G\alpha11$, and threefold differences in those of $G\beta1$ and $G\beta2$ (Figure S4). $G\beta1$ was significantly more abundant in HUVEC compared with HPECs, and $G\beta2$ was significantly more abundant in HPECs than in HUVECs.

EG-VEGF Effect on HPEC and HUVEC Survival

It is well documented that mitogenic and survival effects of EG-VEGF on endothelial cells involve the induction of MAPK and PI3K phosphorylation (Kisliouk *et al.*, 2003). We examined whether EG-VEGF activated these signaling pathways in HPECs and HUVECs. Cells were serum-starved for 24 h and then examined for the phosphorylation of p42/44 MAPKs and AKT in response to EG-VEGF treatment. Figure 3A shows the Western blot analysis of phospho-MAPKs and phospho-AKT after EG-VEGF treatment. Strong phosphorylation of p44/42 MAPKs and AKT proteins in response to EG-VEGF were observed after only 5 min in HPECs. In HUVECs, there was a slight increase in MAPK and AKT phosphorylation. EG-VEGF effect on AKT phosphorylation suggested to us that this factor might be a survival factor for both types of cells. This was confirmed by the measurement of HPEC and HUVEC survival after 24 h of serum starvation and a 24-h challenge with EG-VEGF (10, 25, 50, and 100 ng/ml). Caspase 3 staining was used to detect apoptotic cells. Figure 3B shows that serum starvation of HPEC and HUVEC resulted in 9.6 ± 1.23 and $11.7 \pm 1.5\%$ of cells becoming apoptotic in both cells types, respectively, and that the presence of EG-VEGF significantly decreased this proportion to 3.25 ± 0.23 and $7.6 \pm 1.03\%$, respectively.

EG-VEGF Effect on Angiogenic Responses of HPEC and HUVEC Cells

Pseudovascular Organization. Endothelial cells are well known to self-organize as networks of vascular-like structures when grown on Matrigel (Murray, 2003). Here, we investigated the effect of EG-VEGF on pseudovascular organization of HPECs and HUVECs, with photographs taken every hour. Figure 4A shows representative photographs of HPEC and HUVEC cells at 0 and 10 h of culture on Matrigel and under different treatments. In the control condition, HPEC start to organize into tube-like structures by 3 h. By 10 h of culture only half of the plate was organized in a network of tubular structures. In the EG-VEGF treatment condition, this process was increased with an organization starting as early as after 1 h of culture, and the plate was completely organized by 10 h of culture. In contrast, EG-VEGF did not affect HUVEC organization. Quantification of four independent experiments shows that EG-VEGF significantly increased HPEC but not HUVEC organization as compared with the control condition, (Figure 4B).

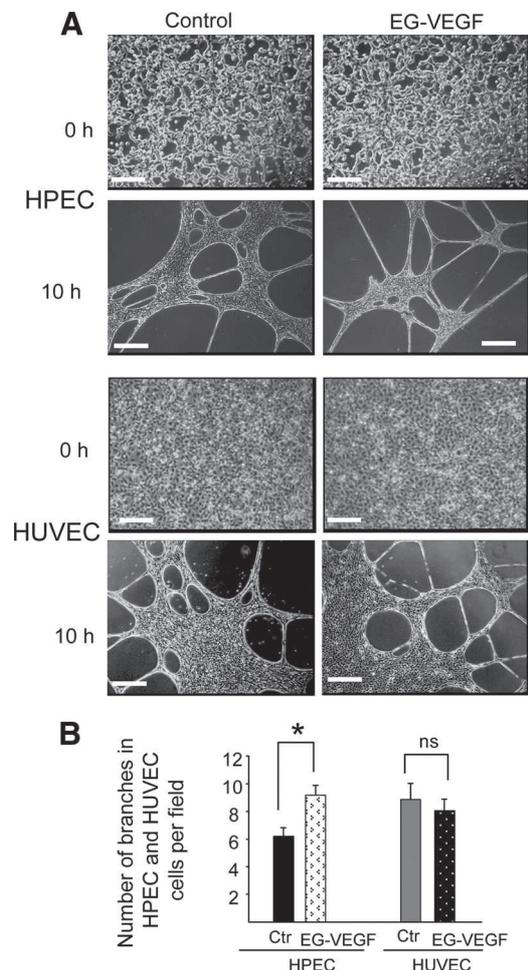


Figure 4. EG-VEGF increases HPEC but not HUVEC cord-like organization. (A) Photographs of HPEC and HUVEC cells cultured on Matrigel for 0 and 10 h in the absence or presence of EG-VEGF (25 ng/ml). Note that EG-VEGF increased HPEC but not HUVEC organization into cord-like structures compared with the control condition. (B) Measurements of the number of branches formed by the cells after 10 h of culture in the absence or presence of EG-VEGF. * $p < 0.05$.

Endothelial Cell Sprouting. A three-dimensional in vitro angiogenesis system was used to study the role of EG-VEGF on HPEC and HUVEC sprouting. A 12-h incubation of HPECs with EG-VEGF (25 ng/ml) resulted in a dose-dependent increase in sprout formation. No effect of EG-VEGF was observed on HUVEC sprouting. Figure 5, A and C, show representative photographs of HPEC and HUVEC spheroids at the time of their incubation with EG-VEGF and 12 h later. To control the response of the cells, we examined the effect of two potent angiogenic factors, FGF-2 and VEGF, on the sprouting. As expected, both FGF-2 and VEGF induced significant sprouting of the spheroids compared with the control conditions. Quantification of four independent experiments show that EG-VEGF treatment has a stronger effect than VEGF in HPEC cells. In HUVEC, no effect of EG-VEGF was observed (Figure 5, B and C).

In the aforementioned experiments, we have shown that HPEC express both type 1 and type 2 receptors for EG-VEGF (PROKR1 and PROKR2). To determine which type of receptor was involved in EG-VEGF effect on HPEC sprouting, we examined the effect of EG-VEGF on HPECs in which PROKR1 or PROKR2 mRNA expression was silenced by specific siRNAs, (see Figure S3 for siRNA strategy). In addition, the strategy of receptors blockade by specific neutralizing antibodies was also used (see Figure S3 for antibody strategy). Our results show that treatment with PROKR2 siRNA (Figure 6A) or antibody (Figure 6B) did not affect EG-VEGF stimulation of sprouting. However, PROKR1 siRNA or antibody reversed its effect. To measure the effect of EG-VEGF on HPEC sprouting, we quantified the number of sprouts formed under all conditions. The graphs in Figure 6, C and D, shows that EG-VEGF significantly increased the number of sprouts and that EG-VEGF effect was specifically

reversed by the PROKR1 siRNA treatment and by PROKR1 antibody blockade.

EG-VEGF Effect on HPEC Permeability

In the placenta, the microvascular endothelium is known to participate in angiogenesis and maintenance of blood fluidity (Rodgers, 1988; Murray, 2003) and is also a discriminating layer in materno-fetal transports of solutes and nutrients. Therefore, maintenance of a semipermeable barrier by the endothelium is critically important in endothelial cell function. Both permeability and paracellular transport of HPEC monolayers were assessed. HPEC permeability was measured in response to EG-VEGF and thrombin, an enhancer of electrolyte transport.

The endothelial barrier was evaluated by transendothelial electrical resistance (TEER). Figure 7A shows the percentage of increase in the permeability of a monolayer of HPEC in response to thrombin (70 U/ml), EG-VEGF (25 ng/ml), or VEGF (25 ng/ml). TEER was recorded every 5 min for 35 min. As expected, thrombin significantly increased HPEC permeability up to 35 min. Under EG-VEGF treatment, HPEC permeability increased as early as 5 min and was maintained for up to 20 min. VEGF showed a different profile from that of EG-VEGF with a significant increase at 5 min and a quick decline thereafter.

The effect of EG-VEGF on the paracellular transport was measured using [³H]mannitol. The data summarizing the permeability coefficients for [³H]mannitol transport (P_{app}) in response to thrombin and EG-VEGF are presented in Figure 7B. The basal permeability Coefficient (P_{app}) in HPEC was 1.7×10^{-5} cm/s (Figure 7C). Thrombin almost doubled [³H]mannitol transport through HPECs, and EG-

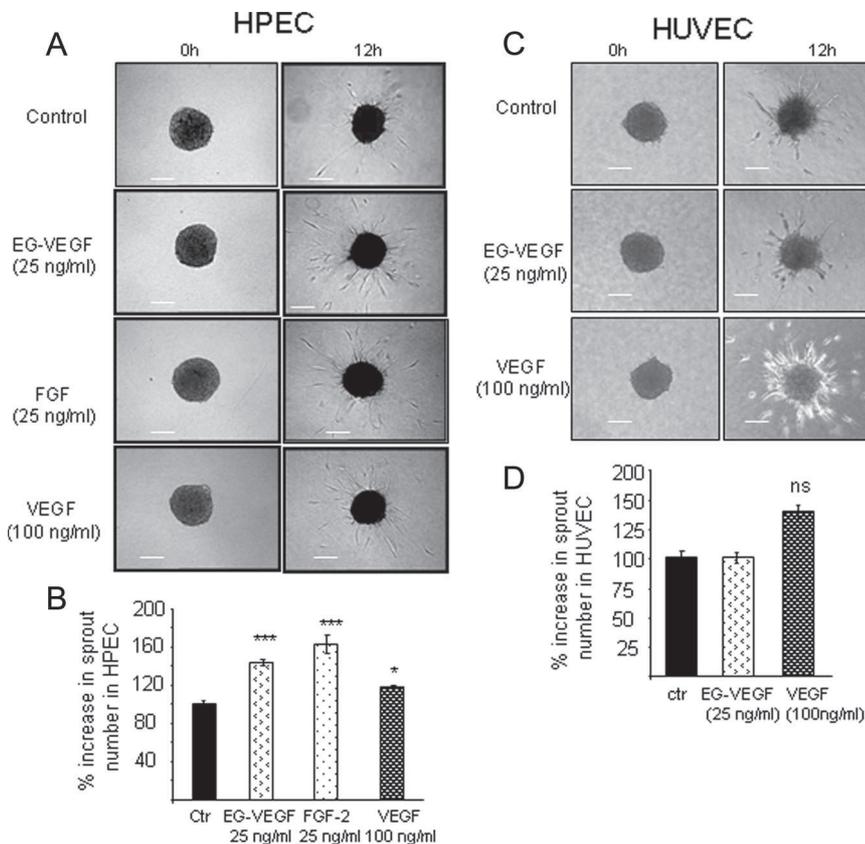


Figure 5. EG-VEGF, FGF, and VEGF effects on sprouting of HPEC spheroids. (A) Representative photographs of spheroids formed from HPEC cells and cultured in collagen gel for 0 or 12 h in the absence or presence of EG-VEGF (25 ng/ml), FGF-2 (25 ng/ml), and VEGF (100 ng/ml). Note that EG-VEGF increased HPEC spheroid sprouting compared with the control, FGF2, and VEGF conditions. (B) Quantification of the number of sprouts formed after 12 h in four independent experiments. (C) Representative photographs of spheroids formed from HUVEC cells and cultured in collagen gel for 0 and 12 h in the absence or the presence of EG-VEGF or VEGF (100 ng/ml). Note that EG-VEGF did not affect HUVEC spheroid sprouting compared with the control and VEGF conditions. Data represent the mean \pm SEM (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$). Bar, 150 μ m.

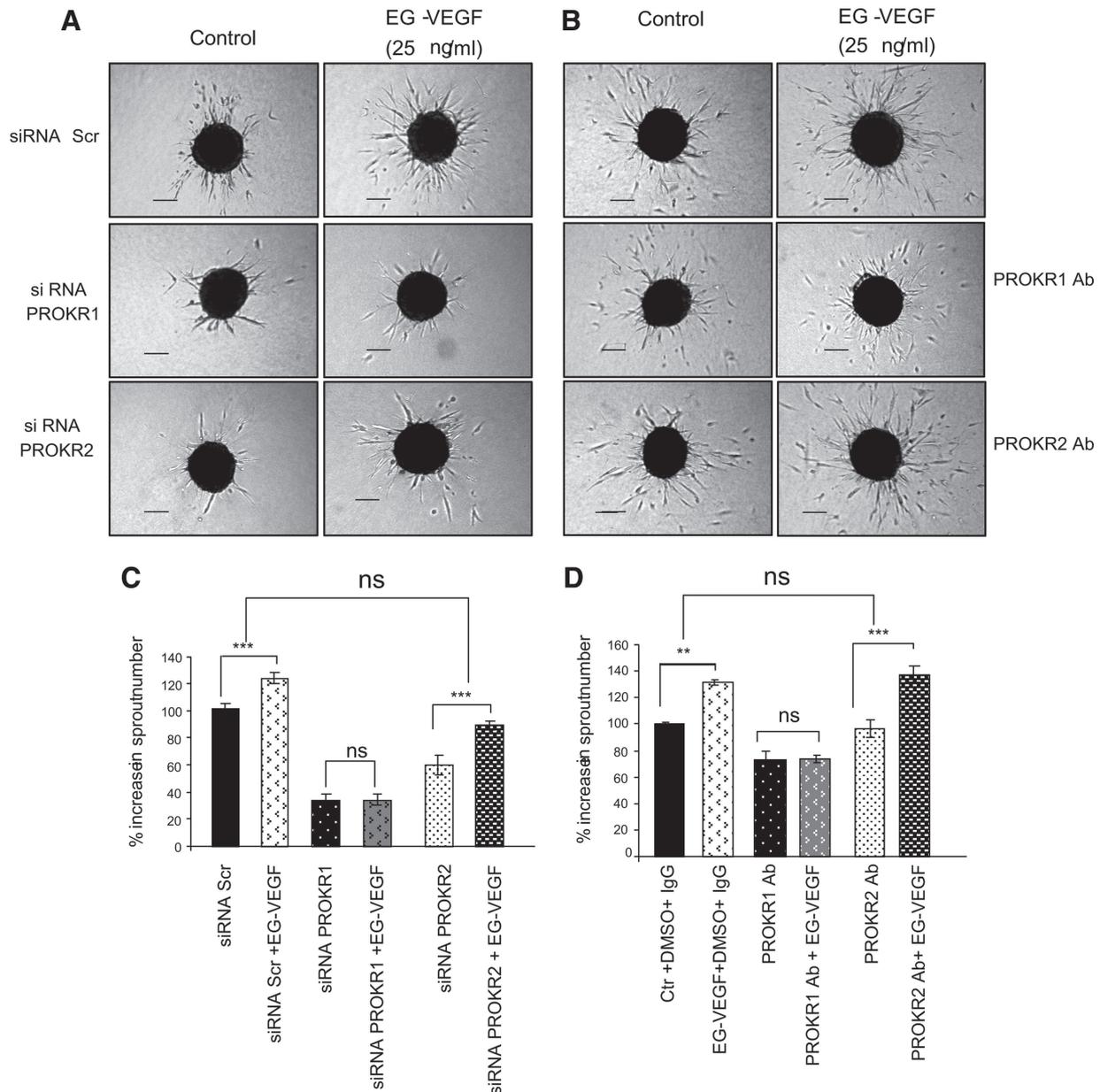


Figure 6. EG-VEGF angiogenic effects are mediated by PROKR1 and not PROKR2. (A and B) EG-VEGF (25 ng/ml) effect on spheroid sprouting of HPEC cells that had been silenced for PROKR1 and PROKR2 mRNA using siRNA (siRNA strategy), or treated with PROKR1 and R2 blocking antibodies (antibody strategy), respectively. (C and D) Quantifications of the number of sprouts in three independent experiments for both strategies. In the two sets of experiments, EG-VEGF significantly increased the number of sprouts. Both siRNA to PROKR1 and its blocking antibody inhibited EG-VEGF effect. However, nor siRNA to PROKR2, neither its blocking antibody did affect the spheroid sprouting. Data represent the mean \pm SEM (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns, not significant). Bar, 100 μ m.

VEGF increased this transport to almost the same levels achieved by thrombin.

As for the sprouting experiments, we also sought to determine the type of receptor that mediates EG-VEGF effects on permeability. Both, siRNA and antibody strategies were used to differentiate between the two receptor types. As expected, EG-VEGF significantly increased HPEC permeability in the absence of any other treatment. Scramble siRNA, siRNA PROKR1, or siRNA PROKR2 alone did not affect basal HPEC permeability. However, invalidation of PROKR2 significantly abolished the response to EG-VEGF. Under PROKR1 mRNA invalidation EG-VEGF effect was maintained (Figure 8A). These results were substantiated

with the antibody strategy, showing that only PROKR2 blockade affects EG-VEGF effects on HPEC permeability. Altogether these results demonstrate that EG-VEGF mediates its effect on the permeability via the activation of PROKR2 and not PROKR1 receptor (Figure 8B).

DISCUSSION

Using a multifaceted strategy that included molecular, immunochemical, and functional approaches, we have characterized the angiogenic processes mediated by the new factor, EG-VEGF, in a highly vascularized organ, the

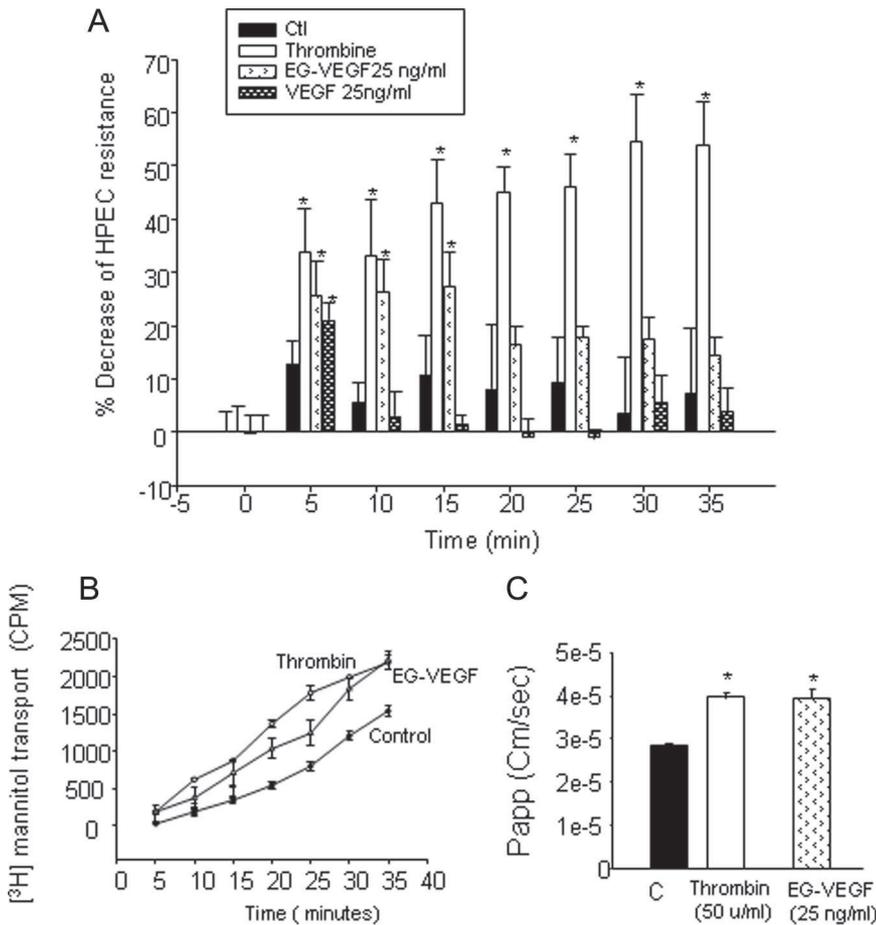


Figure 7. Effects of EG-VEGF, VEGF, and thrombin on the transendothelial electrical resistance (TEER) across HPEC monolayers. (A) The decrease in the TEER of HPEC cells after their incubation with EG-VEGF (25 ng/ml), VEGF (25 ng/ml), or thrombin (70 U/ml). Changes in resistance were measured at the time points 0, 5, 10, 15, 20, 25, and 35 min. Data represent the means \pm SEM from three independent experiments. The results were normalized to the respective control. (* $p < 0.05$). (B) Effects of EG-VEGF and thrombin on the paracellular transport of [3 H]mannitol in HPEC cells. The graph represents the plot of [3 H]mannitol accumulation in the abluminal chamber of HPECs. (C) The permeability coefficient of EG-VEGF and thrombin that was calculated as described in *Materials and Methods*. Data represent the mean \pm SEM from three independent experiments (* $p < 0.05$).

human placenta. We showed that EG-VEGF controls diverse angiogenic processes including proliferation, migration, tube organization, sprouting, endothelial permeability, and paracellular transport.

In previous reports, it has been shown that EG-VEGF induced phosphorylation of the mitogen-activated protein kinases, ERK1/2, and the Akt serine/threonine kinase of the PI3K cell survival pathway (Lin *et al.*, 2002b; Kisliouk *et al.*, 2003). Here, we showed that EG-VEGF activated both pathways in HPECs and HUVECs. These data suggest that EG-VEGF is a new mitogenic and prosurvival factor in the placenta.

In a previous report from the group of Ferrara, no effect of EG-VEGF was observed on HUVEC cell proliferation (LeCouter *et al.*, 2001). Here, we confirmed their findings by demonstrating that EG-VEGF has no effect on HUVEC proliferation and further showed its lack of effect on HUVEC migration, pseudovascular organization, and sprouting. Moreover, we observed that EG-VEGF is a potent angiogenic factor in the placenta by demonstrating its selective effect on HPEC, the microvascular cells that cover the fetal capillaries of chorionic villi and govern placental angiogenesis and growth.

Much of our knowledge on the control of placental angiogenesis comes from model systems, and particularly from HUVEC. These cells have been used as a model for endothelial cells in many studies describing the regulation of endothelial specific growth factors (Roberts *et al.*, 1998; Murthi *et al.*, 2007), and although they have proven to be a useful model, HUVECs are macrovascular endothelial cells

exposed to oxygenated blood and thereby atypical endothelial cells in their physiological context. Nowadays, growing literature in this field shows that the placental microvascular endothelial cells differ in phenotype, gene expression, and physiology from macrovascular endothelial cells (Lang *et al.*, 2001, 2003; Lang *et al.*, 2003). Therefore, our findings add a new differentiating parameter between micro- and macrovascular cells in the placenta, and support a differential angiogenic potential for EG-VEGF in the two endothelial environments. The differential response of HUVEC and HPEC to EG-VEGF might be explained by their differential levels of $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{i1}$, and $G\alpha_{i2}$ expression. In fact, HPEC cells express three times more $G\alpha_{i2}$ and three times less $G\alpha_{i1}$ compared with HUVECs. The higher levels of $G\alpha_{i1}$ over $G\alpha_{i2}$ has been previously reported at the protein levels in HUVEC cells (Masri *et al.*, 2006). Moreover, our results are completely in line with studies that showed that the degree of inhibition of adenylyl cyclase was higher in cells expressing $G\alpha_{i2}$ than in cells expressing $G\alpha_{i1}$ (Massotte *et al.*, 2002; Masri *et al.*, 2006). In HPEC cells we have also demonstrated (data not shown) that EG-VEGF effect was abolished in the presence of pertussis toxin, indicating the direct involvement of Gi proteins in the signaling pathway of EG-VEGF in these cells.

In previous reports from our lab, we showed that PROKR1 and PROKR2 are strongly expressed in the placenta during the first trimester of pregnancy (Hoffmann *et al.*, 2006, 2007, 2009). Here, we substantiate these results and further show that PROKRs are significantly more abundant in HPEC than in HUVEC cells. This difference in EG-VEGF

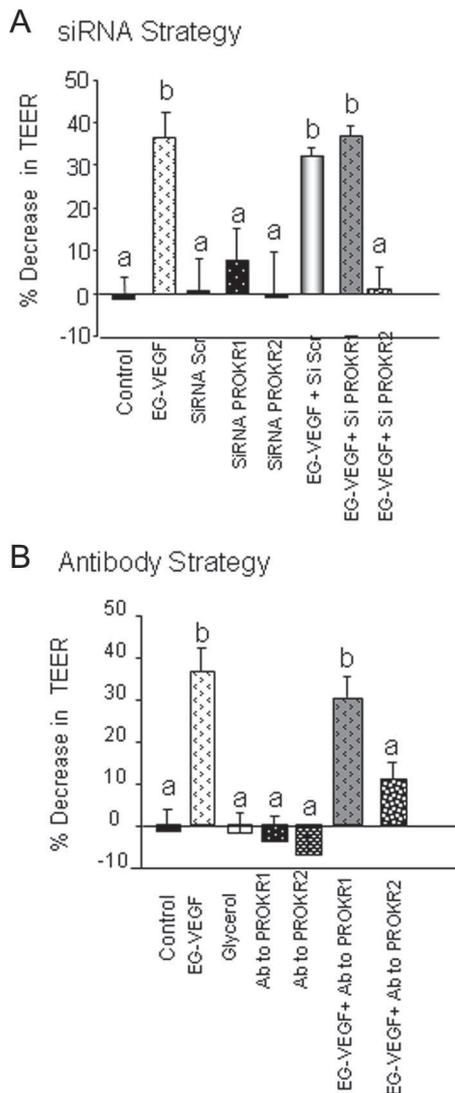


Figure 8. EG-VEGF effects on HPEC permeability are mediated by PROKR2 and not PROKR1: Panels (A) and (B) show EG-VEGF (25 ng/ml) effect on the permeability of HPEC cells that had been silenced for PROKR1 and PROKR2 mRNA using siRNA (siRNA strategy), or treated with PROKR1 and R2 blocking antibodies (antibody strategy), respectively. In the two sets of experiments, EG-VEGF significantly increased HPEC permeability. Both siRNA to PROKR2 and its blocking antibody inhibited EG-VEGF effect. However, nor siRNA to PROKR1, neither its blocking antibody did affect the permeability. Data represent the mean \pm SEM. Bars with different letters are significantly different from each other ($p < 0.05$).

receptor levels might also explain the differential response of these cells to EG-VEGF.

Using siRNA and blocking antibody strategies in HPEC, we could differentiate the effects mediated by PROKR1 from those mediated by PROKR2. We showed that PROKR1 is associated with EG-VEGF angiogenic effects, whereas PROKR2 is rather associated with its effects on cell permeability, results that are fully in line with those recently published by the group of Nebigil who showed that the same differential role exists for these receptors in cardiomyocytes (Guilini *et al.*, 2010; Urayama *et al.*, 2008, 2009) and that PROKR1 overexpression in cardiomyocytes was associated with an increase in their survival (Urayama *et al.*, 2008).

Therefore, one can speculate that EG-VEGF effects on HUVEC cell survival might well be mediated by PROKR1 and not PROKR2.

PROKR1 and PROKR2 receptors share 87% homology in their amino acid sequence, which may suppose similar activation mechanisms for the two receptors; however a difference in the final cellular response in a cell type that expresses both PROKR2, might also depend on the repertoires of G proteins present in each cell type. It is now well documented that the selectivity of coupling depends on the G-protein concentration in a given cell (Slessareva *et al.*, 2003). This suggests that in living cells the expression levels of specific G-protein subunits may regulate receptor-coupling preferences. In addition, we observed that HPEC and HUVEC cells express different $G_{\alpha i}$ proteins. This may allow these cells to perform different physiological functions in response to stimulation by the same ligand.

Transendothelial permeability is one of the specialized functions of the vascular endothelium. Here, we show that EG-VEGF increases the permeability and the paracellular transport of the placental microvascular endothelium, suggesting that this factor controls not only placental angiogenesis, but also some aspects of its physiological features such as, permeability and transport involved in the maternofetal exchanges. The endothelial cells of the human placenta are nonfenestrated, and adjacent cells are linked by junctional complexes comprising both tight and adherent junctions (Metz *et al.*, 1976; Palade *et al.*, 1979; Burton and Jauniaux, 1995). Recently, it has been shown that in hepatic sinusoidal cells (HHSECs), an endothelial cell that exclusively expresses PROKR2, which stimulates the internalization of ZO-1, the main protein involved in junctional complexes and cell-cell adhesion (Guilini *et al.*, 2010). These findings suggest that prokineticin effects on endothelial permeability may well involve a regulation of tight junction proteins. The mechanism by which EG-VEGF increases the permeability in HPEC, is, however, still to be investigated.

Various factors have been reported to stimulate placental angiogenesis and vasculogenesis in an autocrine or paracrine manner, as well as directly or indirectly by stimulating proliferation and differentiation of endothelial precursor cells (Gallery *et al.*, 1991). However, a specific factor for the placenta was still to be discovered. Here we show that EG-VEGF might be one of these tissue-specific factors that could control angiogenesis both during the first trimester and at term, as in term placentas, an increase in angiogenesis has been proposed to insure appropriate blood distribution for a successful delivery. One can therefore speculate that EG-VEGF might be involved in that process too.

The observation that EG-VEGF increases sprouting, vascular organization, and permeability of HPECs to an extent similar to those of VEGF and FGF-2, suggests that EG-VEGF is important in the development of the placental vascular bed. In the ovary, the angiogenic response induced by EG-VEGF is indistinguishable from that induced by VEGF (Lin *et al.*, 2002b), which indicates that EG-VEGF plays complementary or overlapping roles with VEGF in vascular development.

Recent data from our group have shown that EG-VEGF produced by the syncytiotrophoblast layer acts on the extravillous trophoblast cells outside the villi. However, an autocrine and/or paracrine effect of this cytokine is still to be investigated inside the villi. Here we bring evidence that EG-VEGF is a new factor that controls en-

dothelial growth within the placental villi and therefore participates to the development of the vascular tree, a process that drives the whole growth of the placenta.

In conclusion, our data characterized the molecular angiogenic processes mediated by EG-VEGF and suggest that this peptide should be ranked among the important regulators of human placental angiogenesis.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the following sources of funding: INSERM (U878), Commissariat à l'Énergie Atomique (DSV/iRTSV/LAPV), the Région Rhône Alpes (CIBLE-2008), and ARC Equipement 2009. S.B. was supported by a Doctoral Scholarship from the French Ministry of Education.

REFERENCES

- Burton, G. J., and Jauniaux, E. (1995). Sonographic, stereological and Doppler flow velocimetric assessments of placental maturity. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* *102*, 818–825.
- Charnock-Jones, D. S., and Burton, G. J. (2000). Placental vascular morphogenesis. *Baillieres Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* *14*, 953–968.
- Charnock-Jones, D. S., Kaufmann, P., and Mayhew, T. M. (2004). Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. I. Molecular regulation. *Placenta* *25*, 103–113.
- Chen, J., Kuei, C., Sutton, S., Wilson, S., Yu, J., Kamme, F., Mazur, C., Lovenberg, T., and Liu, C. (2005). Identification and pharmacological characterization of prokineticin 2 beta as a selective ligand for prokineticin receptor 1. *Mol. Pharmacol.* *67*, 2070–2076.
- Dellian, M., Witwer, B. P., Salehi, H. A., Yuan, F., and Jain, R. K. (1996). Quantitation and physiological characterization of angiogenic vessels in mice: effect of basic fibroblast growth factor, vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor, and host microenvironment. *Am. J. Pathol.* *149*, 59–71.
- Demir, R., Kayisli, U. A., Seval, Y., Celik-Ozenci, C., Korgun, E. T., Demir-Weusten, A. Y., and Huppertz, B. (2004). Sequential expression of VEGF and its receptors in human placental villi during very early pregnancy: differences between placental vasculogenesis and angiogenesis. *Placenta* *25*, 560–572.
- Demir, R., Seval, Y., and Huppertz, B. (2007). Vasculogenesis and angiogenesis in the early human placenta. *Acta Histochem.* *109*, 257–265.
- Denison, F. C., Battersby, S., King, A. E., Szuber, M., and Jabbour, H. N. (2008). Prokineticin-1, a novel mediator of the inflammatory response in third-trimester human placenta. *Endocrinology* *149*, 3470–3477.
- Gallery, E. D., Rowe, J., Schriber, L., and Jackson, C. J. (1991). Isolation and purification of microvascular endothelium from human decidua tissue in the late phase of pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* *165*, 191–196.
- Guilini, C., Urayama, K., Turkeri, G., Dedeoglu, D. B., Kurose, H., Messaddeq, N., and Nebigil, C. G. (2010). Divergent roles of prokineticin receptors in the endothelial cells: angiogenesis and fenestration. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *298*, H844–H852.
- Hebert, C. A., Lusinskas, F. W., Kiely, J. M., Luis, E. A., Darbonne, W. C., Bennett, G. L., Liu, C. C., Obin, M. S., Gimbrone, M. A., Jr., and Baker, J. B. (1990). Endothelial and leukocyte forms of IL-8. Conversion by thrombin and interactions with neutrophils. *J. Immunol.* *145*, 3033–3040.
- Hoffmann, P., Feige, J. J., and 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*, 1675–1684.
- Hoffmann, P., Feige, J. J., and Alfaidy, N. (2007). Placental expression of EG-VEGF and its receptors PKR1 (prokineticin receptor-1) and PKR2 throughout mouse gestation. *Placenta* *28*, 1049–1058.
- Hoffmann, P., Saoudi, Y., Benharouga, M., Graham, C. H., Schaal, J. P., Mazouni, C., Feige, J. J., and Alfaidy, N. (2009). Role of EG-VEGF in human placenta: physiological and pathological implications. *J. Cell Mol. Med.* *13*, 2224–2235.
- Jinga, V. V., Gafencu, A., Antohe, F., Constantinescu, E., Heltianu, C., Raicu, M., Manolescu, I., Hunziker, W., and Simionescu, M. (2000). Establishment of a pure vascular endothelial cell line from human placenta. *Placenta* *21*, 325–336.
- Kisliouk, T., Levy, N., Hurwitz, A., and Meidan, R. (2003). Presence and regulation of endocrine gland vascular endothelial growth factor/prokineticin-1 and its receptors in ovarian cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *88*, 3700–3707.
- Lang, I., Hoffmann, C., Olip, H., Pabst, M. A., Hahn, T., Dohr, G., and Desoye, G. (2001). Differential mitogenic responses of human macrovascular and microvascular endothelial cells to cytokines underline their phenotypic heterogeneity. *Cell Prolif.* *34*, 143–155.
- Lang, I., Pabst, M. A., Hiden, U., Blaschitz, A., Dohr, G., Hahn, T., and Desoye, G. (2003). Heterogeneity of microvascular endothelial cells isolated from human term placenta and macrovascular umbilical vein endothelial cells. *Eur. J. Cell Biol.* *82*, 163–173.
- Leach, L., Babawale, M. O., Anderson, M., and Lammiman, M. (2002). Vasculogenesis, angiogenesis and the molecular organisation of endothelial junctions in the early human placenta. *J. Vasc. Res.* *39*, 246–259.
- LeCouter, J., *et al.* (2001). Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium. *Nature* *412*, 877–884.
- Lin, D. C., Bullock, C. M., Ehlert, F. J., Chen, J. L., Tian, H., and Zhou, Q. Y. (2002a). Identification and molecular characterization of two closely related G protein-coupled receptors activated by prokineticins/endocrine gland vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.* *277*, 19276–19280.
- Lin, R., LeCouter, J., Kowalski, J., and Ferrara, N. (2002b). Characterization of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor signaling in adrenal cortex capillary endothelial cells. *J. Biol. Chem.* *277*, 8724–8729.
- Maldonado-Perez, D., Evans, J., Denison, F., Millar, R. P., and Jabbour, H. N. (2007). Potential roles of the prokineticins in reproduction. *Trends Endocrinol. Metab.* *18*, 66–72.
- Masri, B., Morin, N., Pedebnarde, L., Knibiehler, B., and Audigier, Y. (2006). The apelin receptor is coupled to Gi1 or Gi2 protein and is differentially desensitized by apelin fragments. *J. Biol. Chem.* *281*, 18317–18326.
- Massotte, D., Brillet, K., Kieffer, B., and Milligan, G. (2002). Agonists activate Gi1 alpha or Gi2 alpha fused to the human mu opioid receptor differently. *J. Neurochem.* *81*, 1372–1382.
- Metz, J., Heinrich, D., and Forssmann, W. G. (1976). Gap junctions in hemochorial and hemotrichorial placentae. *Cell Tissue Res.* *171*, 305–315.
- Murray, J. D. (2003). On the mechanochemical theory of biological pattern formation with application to vasculogenesis. *CR Biol.* *326*, 239–252.
- Murthi, P., So, M., Gude, N. M., Doherty, V. L., Brennecke, S. P., and Kalionis, B. (2007). Homeobox genes are differentially expressed in macrovascular human umbilical vein endothelial cells and microvascular placental endothelial cells. *Placenta* *28*, 219–223.
- Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S., and Poltorak, Z. (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J.* *13*, 9–22.
- Ngan, E. S., Shum, C. K., Poon, H. C., Sham, M. H., Garcia-Barcelo, M. M., Lui, V. C., and Tam, P. K. (2008). Prokineticin-1 (Prok-1) works coordinately with glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) to mediate proliferation and differentiation of enteric neural crest cells. *Biochim. Biophys. Acta* *1783*, 467–478.
- Palade, G. E., Simionescu, M., and Simionescu, N. (1979). Structural aspects of the permeability of the microvascular endothelium. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* *463*, 11–32.
- Rabiet, M. J., Plantier, J. L., Rival, Y., Genoux, Y., Lampugnani, M. G., and Dejana, E. (1996). Thrombin-induced increase in endothelial permeability is associated with changes in cell-to-cell junction organization. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *16*, 488–496.
- Risau, W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature* *386*, 671–674.
- Roberts, W. G., Delaat, J., Nagane, M., Huang, S., Cavenee, W. K., and Palade, G. E. (1998). Host microvasculature influence on tumor vascular morphology and endothelial gene expression. *Am. J. Pathol.* *153*, 1239–1248.
- Rodgers, G. M. (1988). Hemostatic properties of normal and perturbed vascular cells. *FASEB J.* *2*, 116–123.
- Sibai, B., Dekker, G., and Kupferminc, M. (2005). Pre-eclampsia. *Lancet* *365*, 785–799.
- Slessareva, J. E., Ma, H., Depree, K. M., Flood, L. A., Bae, H., Cabrera-Vera, T. M., Hamm, H. E., and Graber, S. G. (2003). Closely related G-protein-coupled receptors use multiple and distinct domains on G-protein alpha-subunits for selective coupling. *J. Biol. Chem.* *278*, 50530–50536.
- Stewart, P. A., and Wiley, M. J. (1981). Developing nervous tissue induces formation of blood-brain barrier characteristics in invading endothelial cells: a study using quail-chick transplantation chimeras. *Dev. Biol.* *84*, 183–192.

te Velde, E. A., Exalto, N., Hesselink, P., and van der Linden, H. C. (1997). First trimester development of human chorionic villous vascularization studied with CD34 immunohistochemistry. *Hum. Reprod.* *12*, 1577–1581.

Urayama, K., Dedeoglu, D. B., Guilini, C., Frantz, S., Ertl, G., Messaddeq, N., and Nebigil, C. G. (2009). Transgenic myocardial overexpression of prokineticin receptor-2 (GPR73b) induces hypertrophy and capillary vessel leakage. *Cardiovasc. Res.* *81*, 28–37.

Urayama, K., Guilini, C., Turkeri, G., Takir, S., Kurose, H., Messaddeq, N., Dierich, A., and Nebigil, C. G. (2008). Prokineticin receptor-1 induces neovascularization and epicardial-derived progenitor cell differentiation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *28*, 841–849.

Voyta, J. C., Via, D. P., Butterfield, C. E., and Zetter, B. R. (1984). Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated-low density lipoprotein. *J. Cell Biol.* *99*, 2034–2040.

Supplemental Figures

Figure. S1

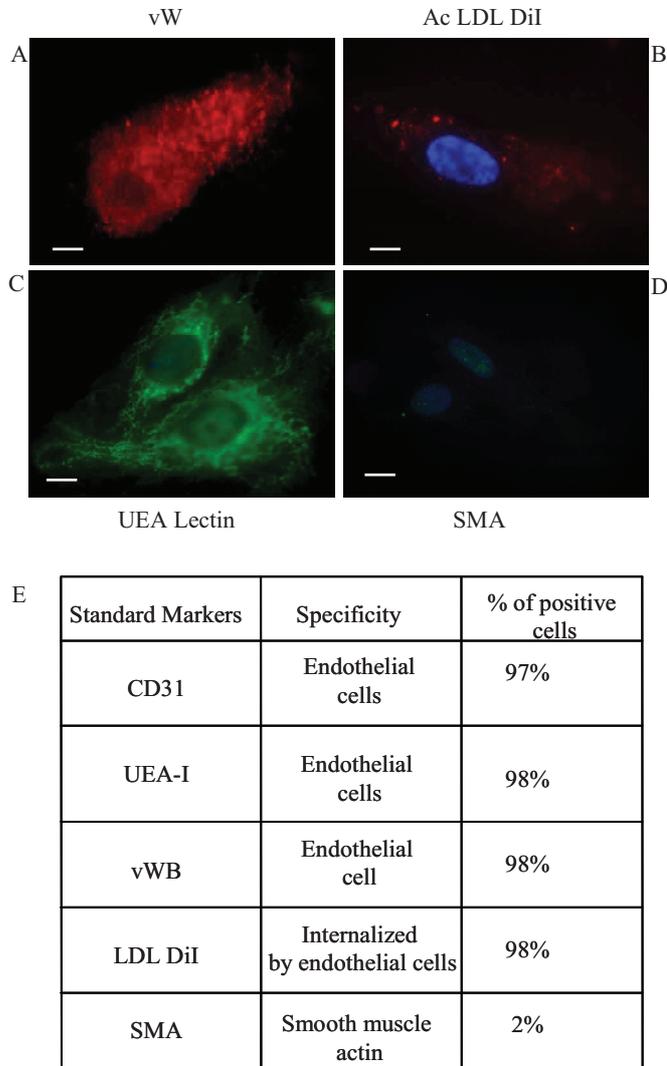


Figure S1: Characterisation of isolated HPEC cells: A Confocal photomicrograph of HPEC cell stained with vWf (Von Wilbrand factor) is shown in (A). (B) shows HPEC incorporation of LDL-DiI. (C) shows UEA-C staining of HPEC. (D) shows a negative staining of HPEC with SMA (smooth muscle actin). Cells were counterstained with DAPI. Bar, 10 μ m. The table in (E) shows the percentage of positive cells to the common markers of endothelial cells, and to the marker of fibroblastic cells, SMA.

Figure S2

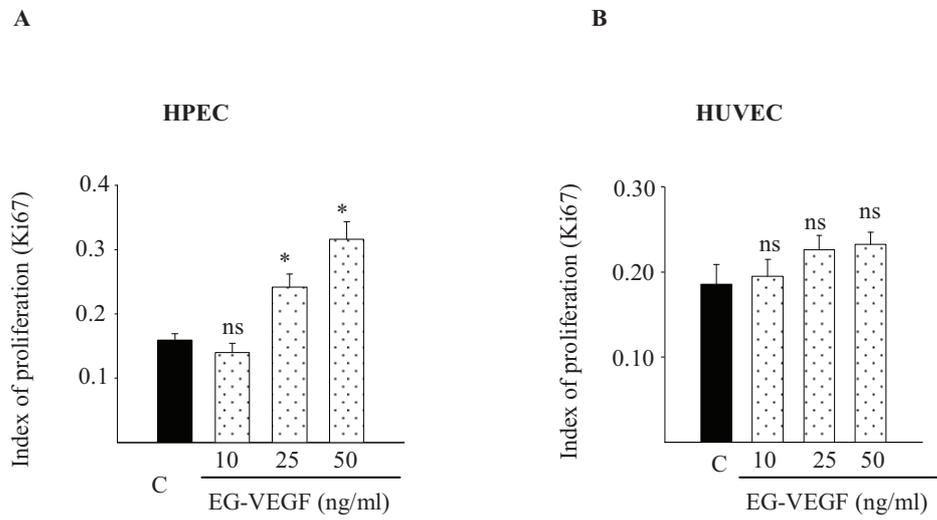
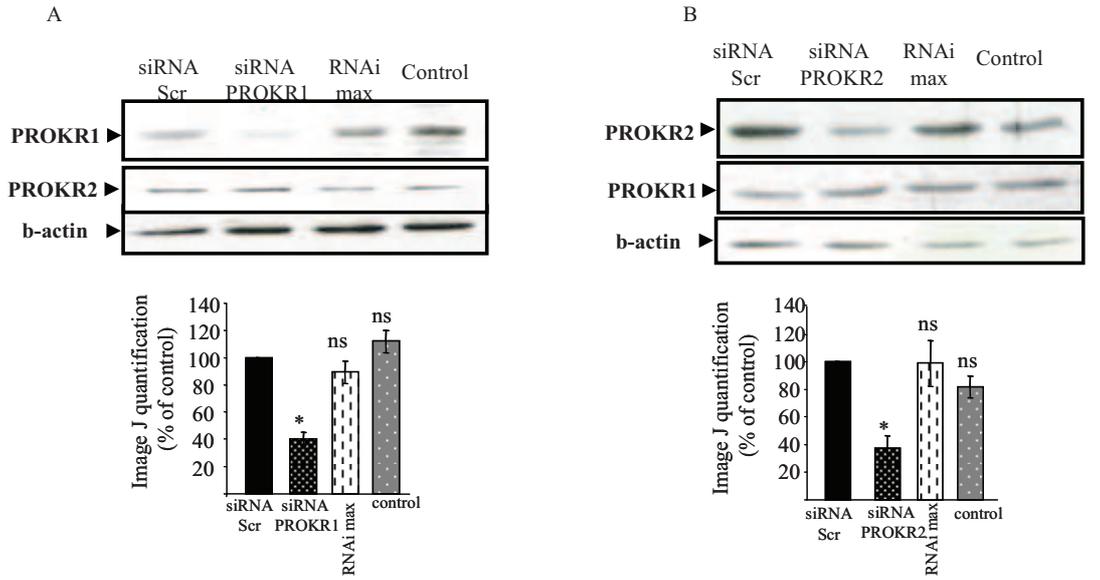


Figure S2: Index of proliferation of HPEC and HUVEC under EG-VEF treatment. Proliferation was assessed by Ki67 staining after 24h of treatment with indicated doses of EG-VEGF. (* $P < 0.05$, ns: not significant).

Figure S3

siRNA Strategy



Antibody Strategy

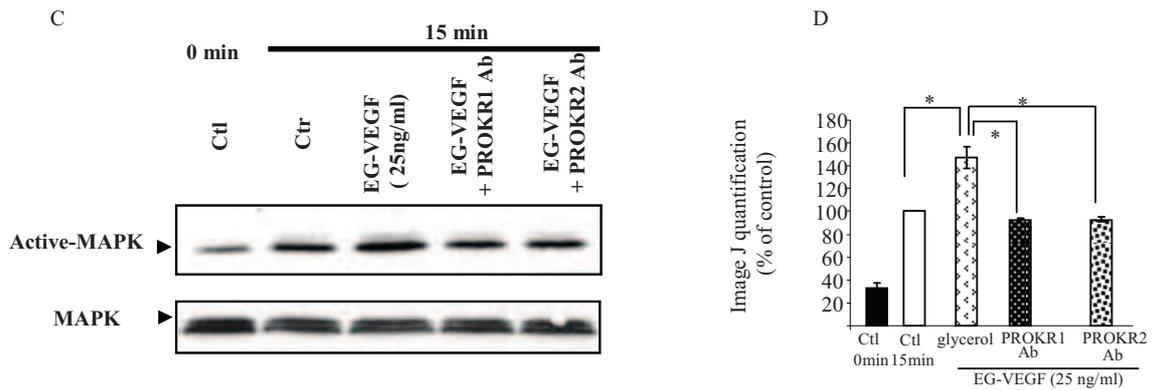


Figure S3: Control for the efficacy of siRNA and blocking antibodies in HPEC cells: (A) and (B) show representative western blots, and quantifications of the loss of PROKR1 and PROKR2 proteins after the use of specific siRNAs. Cells were analysed for the loss of PKR2 protein expression 72 h after transfection. Scrambled siRNA (Scr) served as non-specific control siRNAs. RNAimax is the transfecting agent. (C) shows a representative blot of the inhibitory effect of PROKR1 and PROKR2 blocking antibodies on EG-VEGF mediating activation of MAP-kinases P42 and P44. A quantification of protein signals from three independent experiments is shown in (D). Data represent the mean \pm SEM (***) $P < 0.001$).

1.2 Discussion de la première publication

Dans cet article, nous avons caractérisé les effets angiogènes d'EG-VEGF sur les cellules endothéliales microvasculaires placentaires, les HPEC. Nous les avons également comparés aux effets obtenus sur les cellules endothéliales macrovasculaires ombilicales, les HUVEC.

A. Bref résumé des résultats

a) Expression des PROKRs dans les HPEC et les HUVEC

Dans notre étude, nous avons constaté que les HPEC et les HUVEC exprimaient les deux PROKRs *in situ* dans le placenta, et que cette expression était maintenue après l'isolement et la culture de ces deux types cellulaires. En plus, nous avons montré qu'il existe une expression différentielle des PROKRs, les HPEC en culture exprimant davantage de récepteurs d'EG-VEGF que les HUVEC.

b) Effet d'EG-VEGF sur la prolifération, la migration et la survie des HPEC et les HUVEC

Aucune donnée sur l'effet d'EG-VEGF dans les cellules endothéliales placentaires n'était disponible jusqu'alors. Dans notre étude, nous avons démontré qu'EG-VEGF stimulait la prolifération, la migration, et la survie des HPEC. Nous avons confirmé en parallèle les résultats rapportés par Ferrara en 2001 sur l'absence d'effet d'EG-VEGF sur la prolifération et la migration des HUVEC (LeCouter et al. 2001). En revanche, nous avons démontré qu'EG-VEGF avait un effet stimulant sur la survie des HUVEC, suggérant des voies de signalisation différentes entre la migration-prolifération et la survie.

c) Effets angiogènes d'EG-VEGF sur les HPEC et les HUVEC

Dans la deuxième partie de la publication, nous avons étudié les effets angiogènes d'EG-VEGF sur les HPEC par deux tests complémentaires : la formation de réseaux pseudo-vasculaires sur Matrigel®, et le bourgeonnement de sphéroïdes dans un gel de collagène, système d'angiogenèse en 3D. Nous avons montré qu'EG-VEGF augmentait la formation de réseaux pseudo-vasculaires par les HPEC, mais n'avait pas d'effet significatif sur les HUVEC. Pour le deuxième test, nous avons observé une augmentation de bourgeonnement pour les sphéroïdes d'HPEC sous EG-VEGF, à un niveau presque comparable à celui de FGF-2, facteur pro-angiogène connu. VEGF augmente également le nombre de bourgeons

mais à un niveau plus modéré. Pour les HUVEC, aucune induction n'a été observée sous EG-VEGF, alors que le VEGF, facteur pro-angiogène connu, stimule bien leur bourgeonnement.

d) Effet d'EG-VEGF sur la perméabilité des HPEC

Dans le placenta, l'endothélium microvasculaire est connu pour participer non seulement à l'angiogenèse, mais également au transport de solutés et nutriments par le maintien d'une barrière endothéliale semi-perméable. L'étude de la perméabilité par la mesure de la résistance électrique trans-endothéliale à travers une monocouche d'HPEC a montré qu'EG-VEGF augmentait la perméabilité après 5 minutes (min), et ce jusqu'à 20 min de traitement. L'induction de la perméabilité sous EG-VEGF atteint un niveau comparable à celui obtenu avec la thrombine, notre contrôle positif, qui induit une augmentation de la perméabilité de 5 à 35 min de traitement. Dans ce test, VEGF augmente aussi la perméabilité des HPEC, mais de façon très transitoire avec un pic à 5 min. Pour l'étude du transport para-cellulaire, EG-VEGF et la thrombine augmentent le transport à un niveau similaire. L'ensemble de ces résultats montre qu'EG-VEGF est un facteur important pour la perméabilité de l'endothélium placentaire.

e) Implication des PROKRs dans l'angiogenèse et la perméabilité des HPEC

Concernant l'implication des PROKRs dans ces processus physiologiques, seule l'inactivation de PROKR1 affecte l'augmentation de bourgeonnement des sphéroïdes d'HPEC sous EG-VEGF, suggérant que les effets angiogènes passeraient par ce récepteur. Pour la perméabilité au contraire, c'est PROKR2 qui semble impliqué dans l'augmentation sous EG-VEGF.

f) Conclusion

L'ensemble de ces données montre qu'EG-VEGF est un nouveau facteur angiogène du placenta qui agit sélectivement sur les HPEC, cellules endothéliales des capillaires fœtaux de la villosité chorale.

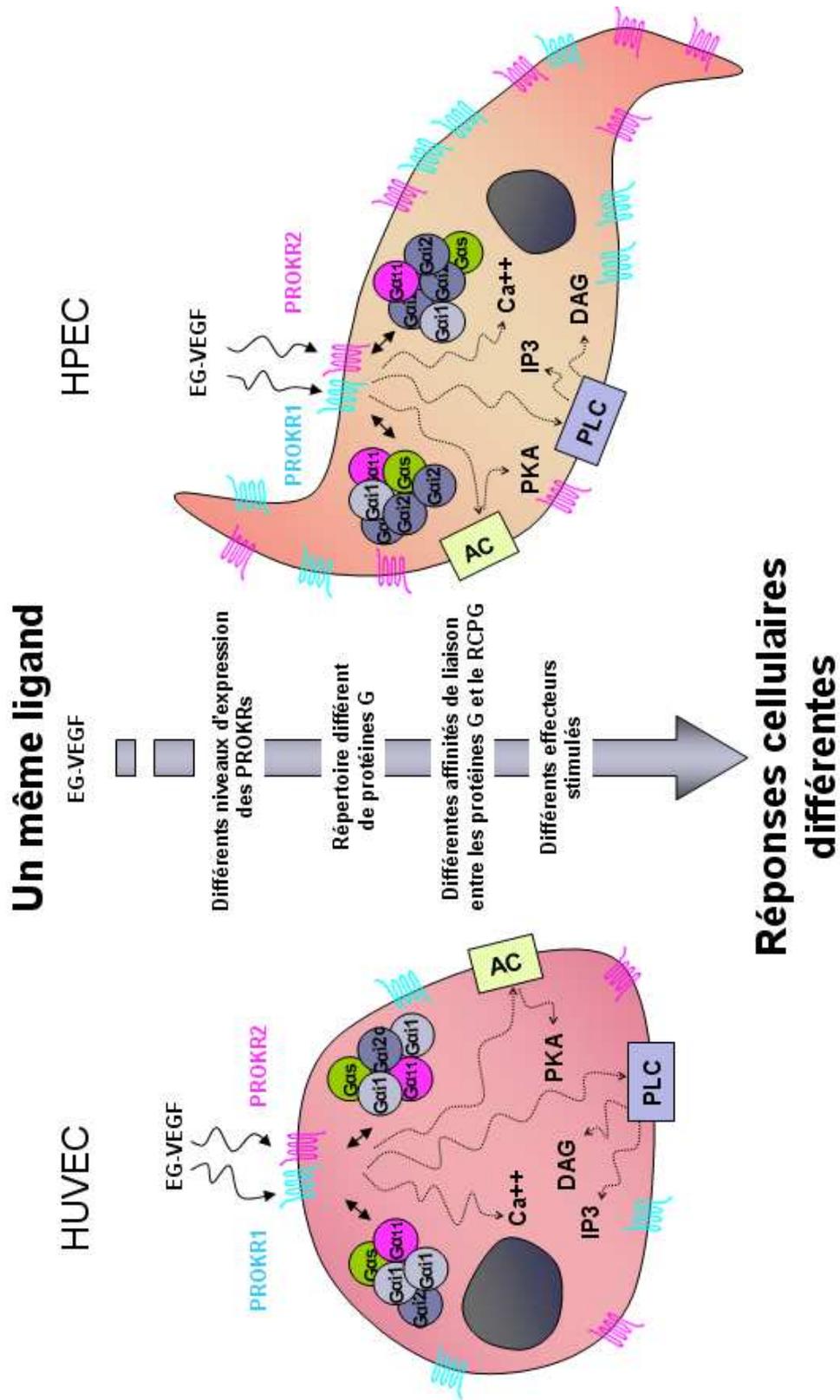


Figure 57 : EG-VEGF n'induit pas les mêmes effets sur les HPEC et les HUVEC. Ceci peut être en partie expliqué par le niveau d'expression des PROKR2 à la membrane, les protéines G exprimées dans les deux types cellulaires, et les effecteurs intracellulaires. AC : Adénylate Cyclase, PLC : Phospholipase C, IP3 : Inositol trisphosphate, DAG : Diacylglycerol

B. Discussion des résultats

Pour déterminer l'effet angiogène d'EG-VEGF sur le placenta, nous avons étudié son effet sur la prolifération, la migration, la survie, l'angiogenèse et la perméabilité des HPEC en culture, tout en comparant ces résultats avec ceux obtenus sur les HUVEC.

a) EG-VEGF a des effets différents sur les HPEC et les HUVEC

Tout au long de nos expériences, nous avons été confrontés à l'effet différentiel d'EG-VEGF sur les HPEC et les HUVEC, confirmant ainsi les premières données de Ferrara sur l'absence d'effets prolifératif et migratoire d'EG-VEGF sur ces cellules macrovasculaires ombilicales (LeCouter et al. 2001). On peut supposer que cette sélectivité d'action d'EG-VEGF puisse être due en partie aux différences suivantes : le niveau d'expression des récepteurs dans les deux types cellulaires, les répertoires de protéines G et les effecteurs intracellulaires par exemple (voir figure 57).

▪ les HPEC expriment plus fortement les PROKRs

L'expression plus importante en culture des récepteurs PROKR1 et PROKR2 dans les HPEC ne peut expliquer à elle seule l'effet différentiel entre les HPEC et les HUVEC. En effet, des concentrations beaucoup plus importantes d'EG-VEGF (jusqu'à 500 ng/ml) ont été testées lors de tests de migration et de bourgeonnement de sphéroïdes d'HUVEC (données non publiées), et cela sans effet significatif. Ceci suggère que l'absence de réponse des HUVEC à EG-VEGF doit être due à une autre caractéristique spécifique de ces cellules.

▪ Différents répertoires de protéines G

Dans des données supplémentaires de la publication, nous avons montré que les HPEC exprimaient davantage l'ARNm de $G_{\alpha 2}$, alors que les HUVEC possédaient plus de transcrits $G_{\alpha 1}$ et $G_{\alpha 11}$. Ces données, qui suggèrent une différence dans le répertoire des protéines G dans les HPEC et les HUVEC, constituent une piste intéressante dans l'explication des effets différentiels d'EG-VEGF sur les HPEC et les HUVEC. Ces données sont, dans un premier temps, à confirmer au niveau protéique. Dans un deuxième temps, il serait très intéressant de déterminer avec précision l'identité des protéines G qui interagissent spécifiquement avec les PROKRs dans chacun des processus biologiques que nous avons étudiés. En effet, la connaissance précise des voies de signalisation engagées par EG-VEGF dans ces différentes

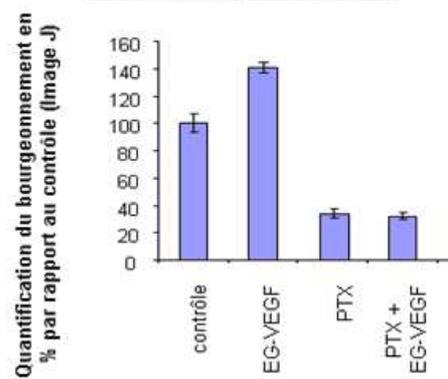
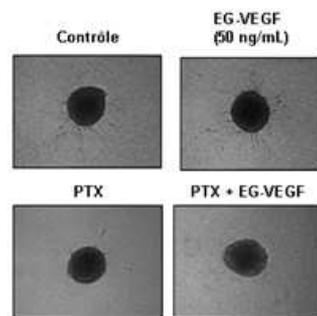
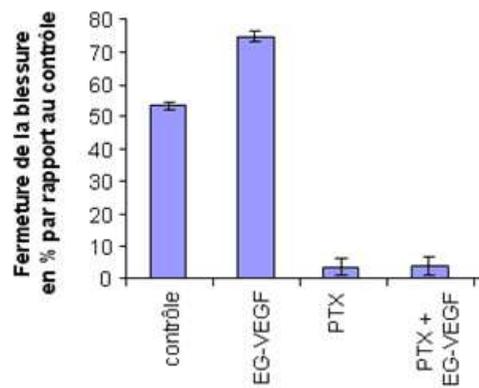
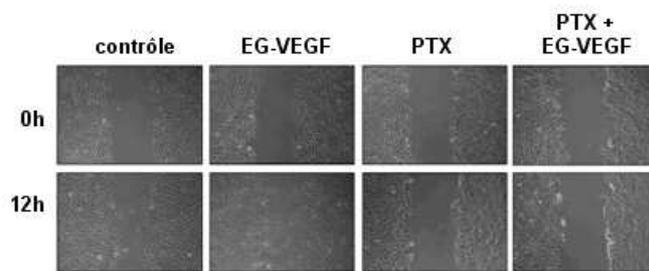


Figure 58 : Effet de la toxine pertussique (PTX) sur les HPEC. PTX bloque la migration et le bourgeonnement des sphéroïdes des HPEC au niveau basal et sous EG-VEGF.

actions biologiques contribuerait à l'élucidation des effets différentiels de ce facteur sur les HPEC et les HUVEC. Dans des données non publiées, nous avons observé que la toxine pertussique (PTX), qui est un inhibiteur de l'activité des protéines G_i , affectait la migration et le bourgeonnement des sphéroïdes d'HPEC au niveau basal et sous stimulation EG-VEGF (voir figure 58).

L'effet drastique de la toxine pertussique dans la réponse cellulaire des HPEC indique l'importance des protéines G_i , protéines inhibitrices de l'adénylyl cyclase, dans ces deux processus physiologiques. De façon intéressante, il a été montré que le degré d'inhibition de l'Adénylyl Cyclase était plus important dans les cellules exprimant $G_{\alpha i2}$ que $G_{\alpha i1}$ (Massotte et al. 2002). Ces données suggèrent que les HPEC, qui expriment d'avantage de transcrits de $G_{\alpha i2}$ que de $G_{\alpha i1}$, répondraient à priori plus fortement aux stimuli pro-migratoire et pro-bourgeonnement que les HUVEC, qui expriment davantage $G_{\alpha i1}$ que $G_{\alpha i2}$. Des expériences complémentaires sont à envisager afin d'infirmer ou de confirmer cette hypothèse, et pour disséquer plus finement l'ensemble de ces régulations.

Il est intéressant de garder à l'esprit que les sous-unités $G_{\beta\gamma}$ sont également capables d'activer ou d'inhiber des effecteurs intracellulaires ; et que les RCPG, dont font partie les PROKRs, ont également été décrits pour se lier à d'autres protéines que les protéines G. L'avancée des connaissances dans ce domaine nous permettra d'élucider plus précisément les voies de signalisation engagées par EG-VEGF dans ces cellules. L'ensemble de ces données ouvre de grandes perspectives dans la régulation des prokinétines. En effet, une multitude de sous-unités G_α sont présentes dans une même cellule, et de nombreuses études ont montré que les RCPG se couplaient avec différentes affinités aux sous-unités α intracellulaires, et cela même lorsqu'elles appartenait à la même famille. En aval de cette liaison, chacune de ces G_α est également capable d'activer différents effecteurs, ce qui multiplie d'autant plus les possibilités de cascades de transduction (Allouche et al. 1999, Chan et al. 1995, Laugwitz et al. 1993, Prather et al. 1994). Ainsi, une investigation plus profonde des affinités de liaison des sous-unités G_α /PROKRs permettrait une meilleure compréhension de la mécanistique, et apporterait potentiellement des pistes dans l'explication des effets cellulaires différentiels des prokinétines sur les HPEC et les HUVEC.

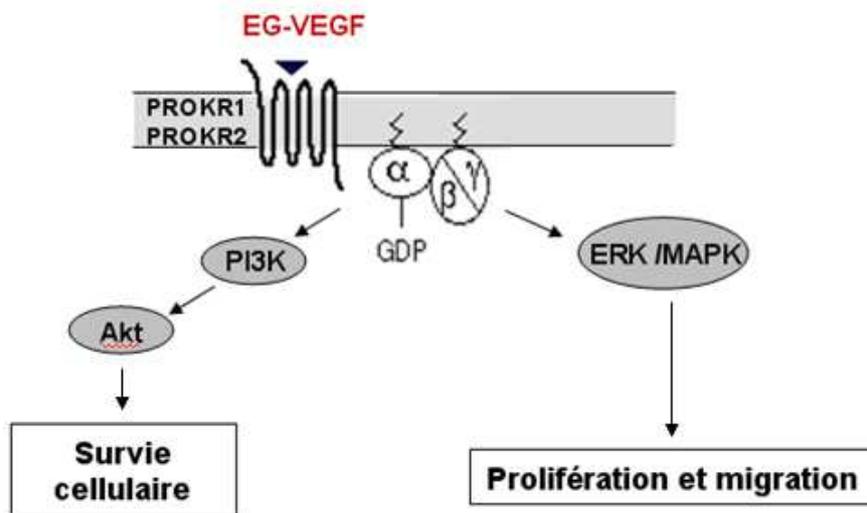


Figure 59 : Voies de signalisation d'EG-VEGF. EG-VEGF augmente la survie cellulaire via PI3K et AKT alors que l'induction de la prolifération et de la migration passe par les MAPK.

▪ Une induction plus importante des P-MAP et P-AKT chez les HPEC

Concernant les spécificités des effecteurs intracellulaires dans les HPEC et les HUVEC, nous avons analysé leur régulation après une stimulation sous EG-VEGF. Il est bien établi que les effets d'EG-VEGF sur la prolifération-migration et la survie des cellules endothéliales impliquent l'induction de la phosphorylation des MAPK (P-MAP) et AKT (P-AKT) respectivement (voir figure 59) (Kisliouk et al. 2003, Lin R. et al. 2002b).

Dans notre étude, nous avons démontré une forte induction de la phosphorylation de MAPK et AKT sous EG-VEGF dans les HPEC, alors qu'une légère augmentation de la phosphorylation est observée dans les HUVEC pour ces deux protéines. On peut supposer alors que ces différences d'induction entre les deux types cellulaires pourraient participer aux effets différentiels d'EG-VEGF sur la prolifération-migration et la survie dans les HPEC et HUVEC. En effet, ces résultats suggèrent qu'une forte induction des P-MAPK conduirait à un effet significatif sur la prolifération cellulaire, expliquant ainsi l'induction forte de la prolifération dans les HPEC, et l'absence d'effet d'EG-VEGF sur les HUVEC. En revanche, l'induction des P-AKT serait directement proportionnelle à l'augmentation de la survie dans les deux types cellulaires, conduisant ainsi à un effet significatif sur la survie des HPEC et des HUVEC. Des éléments en faveur de ces hypothèses ont été trouvés dans nos résultats concernant l'utilisation d'inhibiteurs des MAPK et PI3K sur la migration de ces deux types cellulaires. En effet, nous avons montré que ces inhibiteurs affectaient différemment ces cellules, avec une forte diminution de la migration basale pour les HUVEC, mais pas pour les HPEC. Ces données suggèrent que ces voies de signalisation tiennent une place différente dans le processus migratoire de ces deux types cellulaires, ce qui impliquerait des réponses différentes aux stimuli pro-migratoires.

▪ Dimérisation des récepteurs

Il a été récemment rapporté que PROKR2 dimérise en homo-dimère dans les neutrophiles (Marsango et al. 2010). Cette même équipe suggère également une possible hétéro-dimérisation avec PROKR1. Il est établi que ces dimérisations peuvent affecter les affinités de liaison des ligands aux récepteurs, ainsi que la transmission du signal intracellulaire (Maggio et al. 1999, Maggio et al. 2007), ce qui peut être à l'origine de réponses physiologiques différentes. De plus, il a également été suggéré que le niveau d'expression de chaque

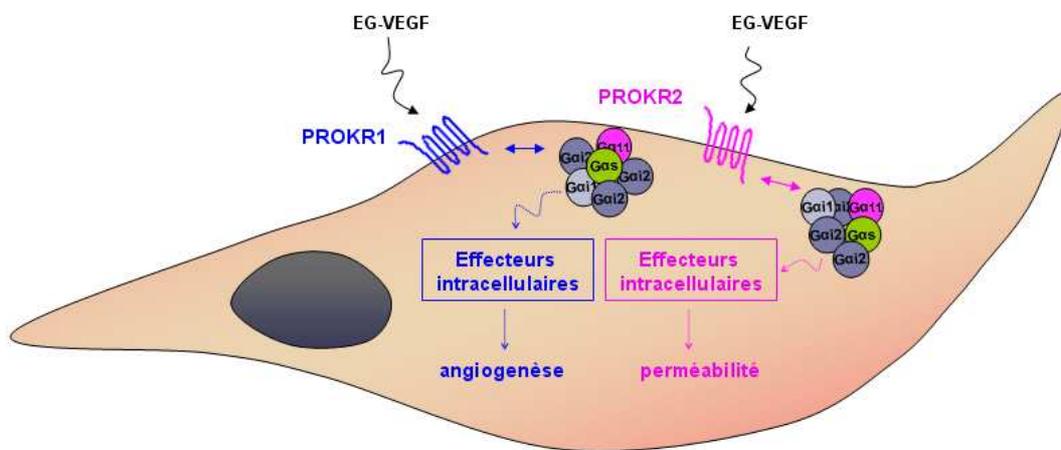


Figure 60 : Effet différentiel d'EG-VEGF dans les HPEC. EG-VEGF induit l'angiogenèse via PROKR1 et la perméabilité par PROKR2 dans les HPEC

récepteur dans une cellule pouvait influencer directement sur la nature des dimères formés, et avoir ainsi un effet important sur les signalisations intracellulaires déclenchées (Marsango et al. 2010). Nous avons établi que le niveau d'expression des PROKRs dans les HPEC et les HUVEC était différent, ce qui suggère que la nature des dimères, ainsi que les voies de signalisations intracellulaires déclenchées, puissent être différentes pour ces deux types cellulaires. De nombreuses expériences complémentaires sont à envisager prochainement afin d'évaluer la présence de tels dimères dans le placenta, ainsi que leurs diverses influences sur la réponse cellulaire.

b) Les PROKRs induisent des processus physiologiques différents

L'existence de deux récepteurs capables de lier EG-VEGF soulève la question de leur capacité à induire des réponses cellulaires différentes. L'expression majoritaire d'un des deux récepteurs au sein d'un type cellulaire donné pourrait alors avoir un impact important sur les réponses physiologiques engendrées au sein de ces cellules. Dans notre étude, nous avons utilisés la technique d'ARN interférents et d'anticorps bloquants pour investiguer l'implication des PROKRs dans les processus de bourgeonnement de sphéroïdes, et de perméabilité. Grâce à ces deux techniques différentes, nous avons montré que PROKR1 était associé aux effets angiogènes d'EG-VEGF, alors que PROKR2 était responsable de ses effets sur la perméabilité (voir figure 60). L'ensemble de ces données est en accord avec les travaux récemment publiés par l'équipe de Nebigil, où le même rôle différentiel des PROKRs a été établi dans les cardiomyocytes (Guilini et al. 2009, Urayama et al. 2007, Urayama et al. 2009).

c) Faible effet de VEGF sur les HPEC

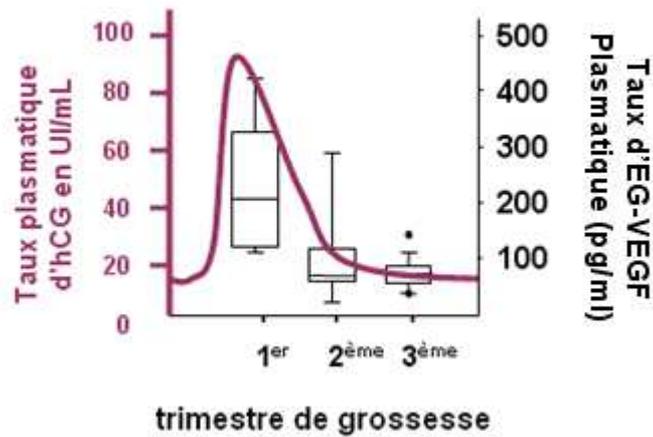
Dans nos expériences, nous avons observé une augmentation très modérée du bourgeonnement de sphéroïdes et de la perméabilité des HPEC sous VEGF-A. D'autres données de la littérature rapportaient un effet modeste de VEGF sur les HPEC par rapport aux HUVEC avec, par exemple, une augmentation de la prolifération deux fois plus importante chez les HUVEC que les HPEC sous VEGF-121 (Lang et al. 2003). De plus, l'expression endogène de VEGF par les HPEC (Vuorela et al. 1997) pourrait venir amoindrir les effets du VEGF exogène. L'étude de l'expression des récepteurs et du niveau de sécrétion de VEGF dans les HPEC est envisageable prochainement, et pourrait potentiellement expliquer les effets modérés de ce facteur sur les HPEC.

C. Conclusion des résultats

L'ensemble de ces résultats ouvre des perspectives très intéressantes pour la compréhension des mécanismes d'action d'EG-VEGF sur l'angiogenèse placentaire. Ce processus biologique est impliqué dans la croissance du réseau vasculaire, agissant ainsi directement dans les échanges de nutriments et d'oxygène entre la mère et le fœtus. De plus, le rôle direct bien établi de l'angiogenèse sur la croissance et l'architecture de la villosité chorale place EG-VEGF au centre du développement placentaire. L'ensemble de ces données sera replacé dans le contexte physiologique de la placentation dans la partie « Discussion », permettant ainsi une vision globale d'EG-VEGF sur la villosité placentaire.

RÉSULTATS
2^{ème} publication

A



B

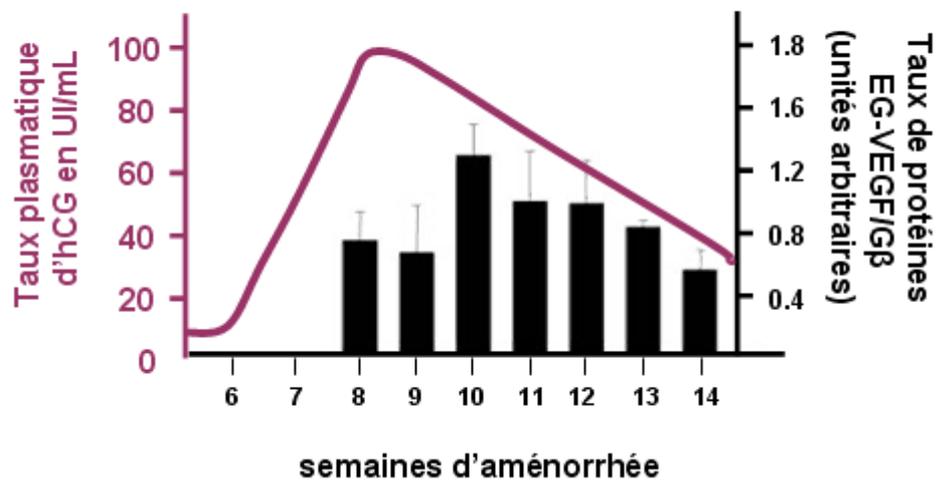


Figure 61 : Expression de l'hCG et d'EG-VEGF au cours de la grossesse humaine. A- Taux plasmatiques de l'hCG et d'EG-VEGF au cours de la grossesse. On peut noter la similitude des profils et la concentration maximale au 1^{er} trimestre de la grossesse pour les deux facteurs. B- Expression placentaire d'EG-VEGF par rapport à la concentration plasmatique de l'hCG au cours du 1^{er} trimestre de la grossesse. Le pic plasmatique de l'hCG, vers 8-9 SA, devance le pic d'expression placentaire d'EG-VEGF vers 10SA. L'ensemble de ces données suggère une régulation possible d'EG-VEGF par l'hCG dans le placenta humain.

II. Effet de l'hCG sur EG-VEGF et ses récepteurs **(deuxième publication)**

2.1 Contexte de la deuxième publication

Le développement placentaire se déroule en milieu hypoxique pendant le 1^{er} trimestre de la grossesse. Aux alentours de 12 SA, le sang oxygéné pénètre progressivement dans l'espace intervilloux, grâce au remodelage des artères spiralées maternelles par les trophoblastes extravilloux. Ceci conduit au déroulement de la grossesse en milieu normoxique du 2^{ème} trimestre jusqu'au terme.

Quand j'ai débuté mon travail de thèse, le laboratoire avait déjà publié de nombreuses données sur EG-VEGF dans le placenta. L'étude des variations d'expression dans des extraits totaux de placentas du 1^{er} trimestre montrait un pic protéique vers 10 SA, peu avant l'établissement de la circulation fœto-maternelle (voir figure 61) (Hoffmann et al. 2006). Le laboratoire avait établi que la cytokine, principalement exprimée par les syncytiotrophoblastes, était également augmentée par l'hypoxie dans les trophoblastes (Hoffmann et al. 2006). Or, le fait que l'expression d'EG-VEGF ne soit pas maximale pendant toute la période hypoxique placentaire suggère une régulation éventuelle par d'autres facteurs. Au vu des profils plasmatiques similaires de l'hCG et d'EG-VEGF au cours de la grossesse, et du pic d'expression de l'hCG situé peu avant celui d'EG-VEGF, une régulation de la prokinéticine par cette hormone semblait possible.

Afin d'étudier cette hypothèse, nous avons déterminé l'effet de l'hCG sur l'expression d'EG-VEGF et de ses récepteurs PROKR1 et PROKR2 dans des placentas du 1^{er} trimestre de grossesse. Les placentas humains de 6 à 11 SA ont été obtenus après Interruption Volontaire de Grossesse (IVG) dans le service de Gynécologie et d'Obstétrique du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Grenoble. Certains de ces placentas ont été dissociés enzymatiquement pour préparer les cultures primaires de trophoblastes, d'autres ont été disséqués finement pour les cultures organotypiques.

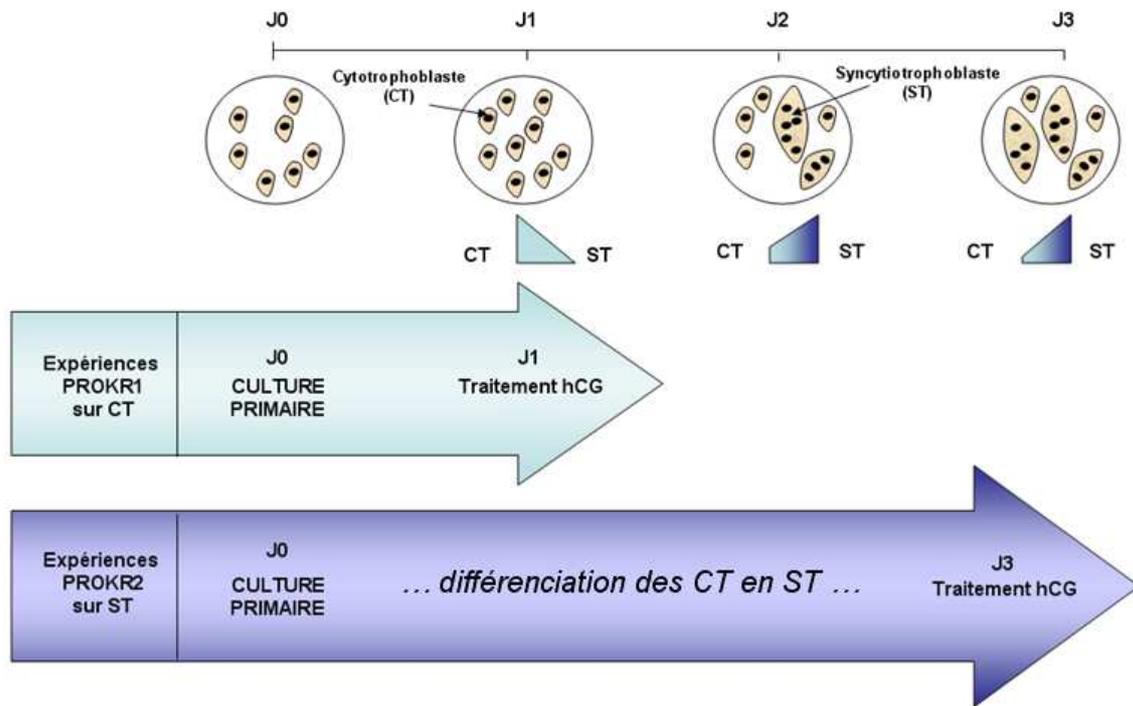


Figure 62 : Cinétique de traitement par l'hCG sur des cultures de cytotrophoblastes (CT) et syncytiotrophoblastes (ST).

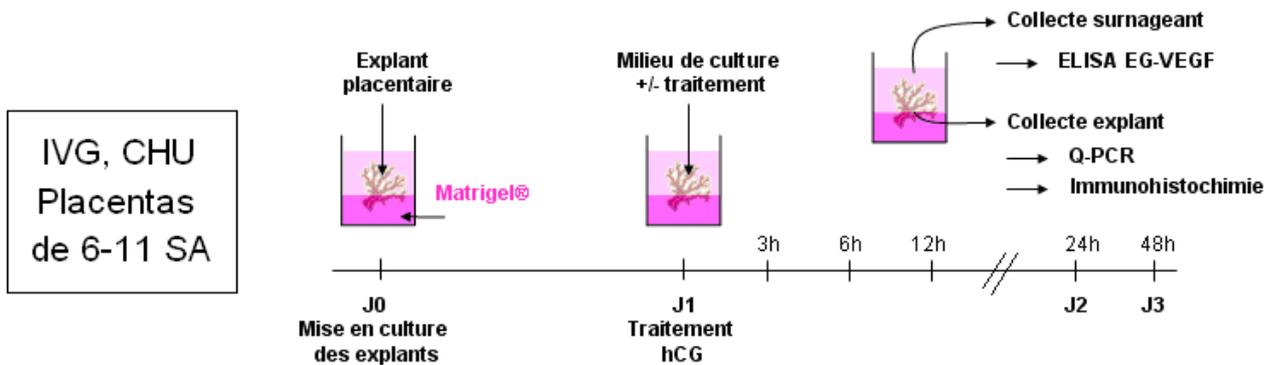


Figure 63 : Culture des explants placentaires. Après 18h d'attachement, les explants sont traités ou non par l'hCG (10 U.I./ml à 100 U.I./ml). Les surnageants et les explants sont collectés selon une cinétique de 0 à 48h de traitement et conservés à -20°C.

A. Cultures primaires de trophoblastes = cultures in vitro

La technique d'isolement des trophoblastes a été réalisée comme décrit précédemment (Hoffmann et al. 2006). Une fois en culture, les CT perdent rapidement leur capacité à proliférer (Morrish et al. 1997), et se différencient spontanément en ST en 48h-72h environ (Kliman et al. 1986).

- Pour les études sur la régulation de PROKR1, des cultures de CT ont été utilisées, car ce récepteur est majoritairement exprimé par ce type cellulaire. Les cultures ont été traitées le lendemain de leur isolement, ce qui permet de conserver des cultures de CT non différenciés jusqu'à la fin du traitement (voir figure 62).
- Pour les études sur la régulation d'EG-VEGF et PROKR2, des cultures de ST ont été utilisées pour leur expression majoritaire dans ce type cellulaire. Les cultures ont été traitées 3 jours après l'isolement afin d'avoir une majorité de ST dans la culture, et ce jusqu'à la fin du traitement (voir figure 62).

B. Cultures organotypiques placentaires = cultures ex vivo

Une partie des expériences a été menée sur des explants placentaires, modèle qui conserve la structure de la villosité et l'ensemble des types cellulaires placentaires. Ce modèle est considéré de ce fait plus physiologique que celui des cultures cellulaires primaires, et est qualifié d'*ex vivo* dans la littérature. Plusieurs groupes de villosités chorales sont disséqués à partir d'un même placenta, et mis en culture sur Matrigel®. Les explants bénéficient de 18h d'attachement, puis ils sont traités par de l'hCG (de 0 U.I./ml à 100 U.I./ml) pendant 0 à 48h. A chaque temps de prélèvement, les milieux de culture et les explants sont collectés et conservés à -20°C. EG-VEGF est dosé dans les surnageants par Test ELISA. Pour les explants, une partie est incluse en paraffine pour localiser certaines protéines en Immunohistochimie, alors que l'ARN d'une autre partie des explants est extrait pour étudier l'expression de différents gènes par RT-Q-PCR (voir figure 63).

Dans un premier temps, nous avons vérifié l'expression du récepteur à l'hCG, le LH/CGR, dans la villosité chorale. Puis nous avons étudié l'effet de l'hormone sur l'expression de l'ARNm et la sécrétion d'EG-VEGF. Dans un deuxième temps, nous avons recherché les mécanismes qui régissent l'action de l'hCG sur EG-VEGF. La régulation des PROKRs par l'hCG a également été établie au niveau ARNm et protéine.

Revisiting the role of hCG: new regulation of the angiogenic factor EG-VEGF and of its receptors.

Brouillet S.^{1,2,3}, Hoffmann P.^{1,2,4}, Chauvet S.^{2,3,5}, Salomon A.^{1,2,3}, Chamboredon S.^{1,2}, Sergent F.^{1,2,4}, Benharouga M.^{2,3,5}, Feige JJ.^{1,2,3}, Alfaidy N.^{1,2,3,4}.

¹ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 1036, Laboratoire Biologie du Cancer et de l'Infection, Grenoble, France; ² Commissariat à l'Energie Atomique, iRTSV, Grenoble, France; ³ Université Joseph Fourier, Grenoble 1, France; ⁴ Centre Hospitalier Régional Universitaire de Grenoble, Département de Gynécologie, Obstétrique et Médecine de la Reproduction, Grenoble, France; and ⁵ Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 5249, Grenoble, France.

Informative title: New role for hCG in human pregnancy

Correspondance: Dr. Nadia ALFAIDY

INSERM U1036

iRTSV/BCI, CEA-G

17, rue des Martyrs. 38054 Grenoble, Cedex 9, France

Tel: (33) 438 78 35 01

Fax: (33) 438 78 50 58

e-mail: nadia.alfaidy-benharouga@cea.fr

Abstract

EG-VEGF is an angiogenic factor reported to be specific for endocrine tissues, including the placenta. Its biological activity is mediated via two G protein-coupled receptors, prokineticin receptor 1 (PROKR1) and prokineticin receptor 2 (PROKR2). We have recently shown that **i**) EG-VEGF expression peaks between the 10th and 11th week of gestation **ii**) its mRNA and protein levels are up-regulated by hypoxia **iii**) EG-VEGF is a negative regulator of trophoblast invasion and **iv**) its circulating levels are increased in preeclampsia (PE), the most threatening pathology of pregnancy. Here, we investigated the regulation of the expression of EG-VEGF and its receptors by hCG, a key hormone of pregnancy that is also deregulated in PE. During the first trimester of pregnancy, hCG and EG-VEGF exhibit the same pattern of expression suggesting a potential regulation of EG-VEGF by hCG. Both placental explants (PEX) and primary cultures of trophoblasts from the first trimester of pregnancy were used to investigate this hypothesis. Our results show that **i**) LH/CGR, the hCG receptor, is expressed both in cyto- and syncytiotrophoblasts **ii**) hCG increases EG-VEGF, PROKR1 and PROKR2 mRNA and protein expression in a dose and time-dependent manners **iii**) hCG increases the release of EG-VEGF from PEX conditioned media **iv**) hCG effects are transcriptional and post-transcriptional and **v**) the hCG effects are mediated by cAMP via cAMP response elements present in the EG-VEGF promoter region. Altogether, these results demonstrate a new role for hCG in the regulation of an emerging regulatory system of placental development, EG-VEGF and its receptors.

Key words: hCG, prokineticins, EG-VEGF, human pregnancy, angiogenesis, preeclampsia

Introduction

The process of embryo implantation and trophoblast invasion is the most limiting factor for successful pregnancy. Molecular interactions at the embryo-maternal interface during the time of adhesion and subsequent invasion are crucial for implantation (1). Failure of these interactions can lead to preeclampsia (PE), early pregnancy loss, or intrauterine growth retardation (IUGR). There is evidence suggesting that cytokines produced by the developing placenta play an important role in these processes (1). We have recently determined the role of a new actor of these processes (2, 3), namely endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor (EG-VEGF), also named prokineticin 1 (PROK1).

EG-VEGF is a growth factor that was found to be specifically expressed in endocrine tissues including testis, adrenal gland, ovary and placenta (4). It was shown to promote tissue-specific angiogenesis in endocrine organs (5-9). EG-VEGF acts via two G protein-coupled receptors, termed prokineticin receptor 1 (PROKR1) and prokineticin receptor 2 (PROKR2) (10). Recent data from our group reported the expression of EG-VEGF and its receptors in human and mouse placenta and its role during the first trimester of pregnancy (3, 11, 12). We have shown that EG-VEGF is localized to the syncytial layer of the human placenta; that both its expression and that of its receptors are high in this tissue, with the strongest expression peaking between the 10th and 11th weeks of gestation (wg); that EG-VEGF controls trophoblast invasion, and that its circulating levels are significantly elevated in PE (3, 11). More recently, we have also shown that EG-VEGF is a potent angiogenic factor in the placenta, and established its angiogenic role during pregnancy (2). Altogether these findings suggest that EG-VEGF is directly involved in normal placental development and that its expression should be finely regulated. We and others have shown that expression of EG-VEGF and its receptors is up-regulated by hypoxia (4, 11). During placental development, the hypoxic environment lasts from the beginning of implantation to the end of the first trimester. However, the strongest expression of EG-VEGF is between the 8th and 11th wg, suggesting that other factors than hypoxia might regulate the EG-VEGF/ PROKR1/PROKR2 system. To date, little is known about the regulation of EG-VEGF and its receptors, and there is no enlightenment for the peak of expression of EG-VEGF by the end of the first trimester of pregnancy. During the first trimester of pregnancy, one dominant hormone, hCG (human chorionic gonadotropin) exhibits the same pattern of expression to that of EG-VEGF and displays similar effects on placental development (13-15). One of the earliest endocrine roles of hCG is to stimulate the corpus luteum to produce enough progesterone in order to establish pregnancy at the outset. In the placenta, hCG is well known to facilitate trophoblastic differentiation (14, 15), and was reported to

induce the expression of specific genes such as vascular endothelial growth factor, leukemia inhibitory factor, and metalloproteinase-9, all central to the establishment of the feto-maternal interface (16, 17). In human placenta, hCG is primarily produced by the syncytiotrophoblast and to a certain extent by the cytotrophoblasts (18, 19). In normal pregnancies, detectable levels of hCG begin to appear in the maternal circulation about 2–3 weeks after conception and the peak is observed at ~8–9 wg before declining significantly in the later stages of pregnancy. High serum hCG levels at mid-late pregnancy have been associated with PE, IUGR and Down's syndrome (DS) (20).

The hCG hormone transduces signals by binding to its specific LH/hCG receptor (LHCGR). Binding of hCG to its receptor generates signal transduction through the activation of the associated heterotrimeric G-proteins and a consequent activation of protein kinase A (PKA) through cAMP mobilization, as well as an increase in intracellular calcium through inositol triphosphate/ phospholipase C pathway (21, 22). LHCGR expression in human placenta has been reported by many groups (23, 24), however, the precise sites of its expression and the type of receptors expressed throughout pregnancy are still under debate (24-28). This discrepancy is probably due to the multiple forms described for this receptor. It has also been reported that in early pregnancy, the LHCGR are truncated and probably non-functional until 9 wg (25, 26, 29).

Because hCG has long been associated with the initiation and maintenance of pregnancy, and since our recent findings propose EG-VEGF as a new factor directly involved in human placentation, we hypothesized that hCG might be involved in the regulation of EG-VEGF and of its receptors. In the present study, we determined, for the first time, the effect of hCG on EG-VEGF secretion; established its effect on EG-VEGF expression both at the mRNA and protein levels; and determined its effect on the expression of PROKR1 and PROKR2. More importantly, we characterized the molecular mechanism by which hCG regulates this new factor and its receptors.

Material and Methods

Tissue collection

A total of 48 first-trimester human placentas of 6–11 weeks of gestation (wg) were obtained from elective terminations of pregnancies. Shortly after collection, tissue was fixed in paraformaldehyde at room temperature (for Immunohistochemistry); snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C to be used for RNA and protein extraction, or placed in ice-cold Hanks' balanced salt solution (Ca^{2+} , Mg^{2+} HBSS) and transported to the laboratory for *in vitro* and *ex vivo* primary cultures. A total of 29 placentas from 6–11 wg were used for primary cultures. Collection and processing of human placentas was approved by the University Hospital Ethics Committee, and informed consent was obtained from each patient.

Human villous explants cultures

Villous explant cultures were established from first trimester human placentas (6–11 wg). Small fragments of placental villi (15–20 mg wet weight) were placed into 48-well plates precoated with 150 μL per well of diluted Matrigel (matrigel/DMEM-F12) (Becton-Dickinson, le Pont de claux, France) and polymerized at 37°C for 30 min. Explants were cultured in DMEM-Ham's F-12 (DMEM/F12; Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplemented with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin, 100 U/mL penicillin, pH 7.4. After 24h of culture, the medium was changed and explants were incubated in the absence or presence of hCG (10–100 IU/ml) (Sigma Aldrich, France) or forskolin (10 μM , Sigma Aldrich) for 0 to 48h. Villous explants were kept in culture for 72h. Explants (from a single placenta) were used in triplicate for each time point. For statistical analysis, the (n) value represents the number of placentas (not explants). In some experiments, trophoblast explants were treated by 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of 5, 6-dichloro-1- β -d-ribofuranosylbenzimidazole (DRB), a potent RNA polymerase inhibitor, or 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cycloheximide (CHX), a translation inhibitor.

Immunohistochemistry

Placental tissues collected at 6–11 wg were fixed for 24 h at 4°C in 4% (vol/vol) paraformaldehyde, embedded in paraffin, and cut into 5 μm sections as described previously (11). Adjacent sections were stained using specific antibodies and the avidin-biotin immunoperoxidase detection method. Endogenous peroxidase activity was quenched by pretreatment with 3% (vol/vol) hydrogen peroxide in methanol for 30 min. Rabbit polyclonal antibodies developed in our laboratory were used to detect EG-VEGF, PROKR1 and PROKR2 (Covalab, Lyon, France). hCG receptor was detected using the human LHCGR antibody "peptide 28-77" (Santa Cruz Biotechnology). For immunohistochemical detection, antibodies were incubated with the tissue sections for 18 h at 4°C and used at final concentrations of 0.33 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for anti-EG-VEGF, 0.84 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for anti-PROKR1, 0.84 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for anti-PROKR2, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for anti-LHCGR. The tissue sections were subsequently washed three times with PBS and incubated with biotinylated goat anti-rabbit IgG (1:250 dilution in blocking solution; Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) for 1 h at 4°C . After three PBS washes, the slides were incubated with an avidin biotin complex (Vectastain ABC kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA) for 1 h. After a final PBS wash, the immunoreactive proteins were visualized after the addition of 3,3-diaminobenzidine (Dako, Trappes,

France) for 2 min and then counterstained with hematoxylin. Control sections were treated with antibodies that had been preabsorbed overnight at 4°C with the appropriate antigen peptides or without primary antibodies.

Western blotting analysis

Frozen placental samples and cultured trophoblast cells were homogenized in RIPA lysis buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 1% Triton X-100, 1 mM PMSF, 5 µg/ml leupeptin, 5 µg/ml aprotinin] and processed as previously described (3). Protein extracts were electrophoretically separated on 0.1% sodium dodecyl sulfate-12 % polyacrylamide gels and electrically transferred onto 0.45 µm nitrocellulose membranes. The membranes were blotted with antibodies against PROKR1, PROKR2 and LHCGR. PROKR1 and PROKR2 antibodies were both used at a final concentration of 0.84 µg/ml, LHCGR antibody was used at 0.75µg/ml. The intensities of immunoreactive bands were measured by scanning the photographic film and analyzing the images on a desktop computer using Scion Image software (version 4.0.2; Scion Corp., Frederick, MD). The mean pixel density for each band was analyzed to obtain relative OD units for PROKR1 and PROKR2 proteins. To standardize for sample loading, the blots were subsequently stripped using a commercially available kit, following the manufacturer's instructions (Re-blot; Millipore) and reprobbed with an anti-βactin antibody (Sigma Aldrich, France) as an internal control for protein loading.

EG-VEGF ELISA

EG-VEGF was measured by ELISA (PeproTech, France) in conditioned media from placental explants treated or not with hCG (10-100 IU/ml). Two separated standard curves were constructed to allow accurate readings of samples at upper and lower ranges of the assay. All samples were in the linear range of the standard curves. The detection limit of the assay was 16 pg/mL.

Isolation and treatment of trophoblasts

Placental cytotrophoblasts were isolated from first-trimester human placentas (9–11 wk of gestation, n= 14) and cultured as previously described (30). Briefly, the tissue was thoroughly washed in 50 ml cold sterile HBSS until the supernatant was nearly free of blood. Areas rich in chorionic villi were selected and were minced into small pieces between scalpels. Tissue was incubated in HBSS containing trypsin (0.25%) and DNase (0.2 mg/ml) for 30 min digestions. The dispersed placental cells were filtered through 100 µm nylon gauze and loaded onto a discontinuous Percoll gradient (5–70% in 5% steps of 3 ml each) and then centrifuged at 1200 x g for 20 min at room temperature to separate the different cell types. Cytotrophoblast cells that sedimented between the density markers of 1.049 and 1.062 g/ml were collected and washed with DMEM. Isolated cells were then incubated with anti-CD9 antibodies and subjected to negative immunomagnetic separation using MiniMacs columns (Miltenyi Biotech, Paris, France). The dispersed trophoblasts were cultured for 24 h at 37°C in 5% CO₂ - 95% air to allow attachment. The cells were then divided into two groups: a half was treated one day after the plating to insure the cytotrophoblast phenotype and half was allowed to differentiate into a syncytiotrophoblast phenotype and treated 48h later. Both cultures were treated by hCG (10-100 IU/ml) for 12h (mRNA analysis) or 48h (protein analysis). In some experiments, trophoblast cells were treated by DRB (50 µg/ml), or CHX (10 µg/ml). Cell viability, assessed by Trypan blue exclusion, was more than 95% before and after incubation.

RNA isolation and RT-qPCR analysis

Total RNA was extracted from placental tissue using the Trizol reagent (Invitrogen, USA) according to the manufacturer's instructions. To remove any genomic DNA contamination, total RNA was treated with RNase-free DNase I treatment (Qiagen). Total RNA concentration was determined using Nanodrop. Reverse transcription was performed on 0.5 µg total RNA with Superscript II-RNaseH reverse transcriptase (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) under conditions recommended by the manufacturer. EG-VEGF, PROKR1, PROKR2 mRNA and 18S rRNA expression was quantified by real-time RT-PCR using a Light Cycler apparatus (Roche Diagnostics, Meylan, France). The PCR was performed using the primers shown in Table 1 and SYBR green PCR core reagents (LightCycler-FastStart Master SYBR Green I, Roche Diagnostics) according to the manufacturer's instructions. In addition, several control reactions were routinely run in parallel; this includes RT-PCR run in the absence of reverse transcriptase to confirm the absence of genomic DNA contamination, and reverse transcription reactions without RNA to check for reagent contamination. PCR conditions were: step 1, 94°C for 10 min; step 2, 45 cycles consisting of 95°C for 15 sec, temperature indicated in Table 1 for 5 sec, and 72°C for 10 sec. The results were normalized to 18S rRNA expression levels. To assess linearity and efficiency of PCR amplification, standard curves for all transcripts were generated by using serial dilutions of trophoblast cDNA. A melt curve analysis was carried out on the products of amplification reaction to ascertain the melting temperature of the product.

TABLE 1. Primers used for real-time (RT) PCR

| Gene | Forward primer (5'–3') | Reverse primer (5'–3') | (°C) |
|---------|------------------------|-------------------------|------|
| EG-VEGF | AGGTCCCCTTCTTCAGGAAACG | TCCAGGCTGTGCTCAGGAAAAG | 56 |
| PROKR1 | GTCCTCGTCATTGTCAAGAGCC | AAACACGGTGGGGAAGAAGTCG | 58 |
| PROKR2 | CATCCCATCGCCTTACTTTGC | CTTTTCCTTCACGAACACAGTGG | 58 |
| 18S | TTGTTGGTTTTTCGGAAGTGGG | GGCAAATGCTTTTCGCTCTGGTC | 60 |

DNA transfection and dual luciferase activity assay

Cos7 cells (100,000 cells/12-well plates) were transfected in Opti-MEM (Invitrogen) using lipofectamine-2000 (Invitrogen) with 0.285 µg pGL3b-luc, 0.500 µg of pGL3-pEG-luc. The PGL3b plasmid was purchased from Promega (Madison, WI, USA) (31). Twenty-four hours after transfection, cells were treated with or without 8-bromo-cAMP (Sigma Aldrich, France) for 4 or 6h. Firefly luciferase activities were measured sequentially with the Dual-Luciferase reporter assay (Promega). Results are expressed as ratios of firefly luciferase activity per µg of proteins.

Mutagenesis and functional analysis

The cAMP binding sites were individually mutated using site-directed mutagenesis. Complementary primers were designed for each mutation. Mutant constructs were generated by PFU turbo (Promega, Madison, WI) PCR using 60 ng of each primer, 20 ng of the pGL3-pEG-luc as template, 250 µM dNTP, 2 U PFU turbo polymerase, 1x PFU buffer in a total volume of 50 µl. The recommended cycling conditions were adapted as follows to permit amplification of the full plasmid containing the desired mutation: denaturation 95 °C for 60 s; 18 cycles of 95 °C for 60 s, 55 °C for 60 s, 68 °C for 10 min; final extension 72°C for 10 min. A *DpnI* digestion was

performed prior to bacterial transformation of the plasmid DNA to eliminate the parent promoter plasmid. All oligonucleotides used for these procedures are given in Table 2 (mutations highlighted).

For functional analysis, Cos-7 cells were plated in a 24-well plate the day before transfection in order to achieve a density of 70-80% confluency at the day of the transfection. The cells were transiently transfected with 500 ng pGL3b-pEG-luc expression plasmid or empty pGL3 using lipofectamine-2000 (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. After 48 h, the transfection media was removed and was replaced with fresh media containing or not 500 μ M 8-bromo-cAMP and 200 μ M IBMX. After 6 hours incubation, the cells were lysed using Passive Lysis Buffer (Promega, Madison, WI) as per the manufacturer's instructions. The Dual Luciferase Assay System (Promega, Madison, WI) was used to assess the luciferase activity in the cell lysates using a Tecan Infinite M200 microplate reader (Tecan, France). The fold stimulation of the promoter activity was calculated after normalizing the reporter firefly luciferase values to the μ g of proteins.

Table 2

| | CRE1 | CRE2 |
|------------------|--|---|
| Wild type | AGGCTGGTCTCGAACTCCTGACCTCAAGTGATCCGCCTGCCTC | GTGCAGGGAAGCATAAATGGTGATGTTGCAAATCCCTTAATTCAT |
| Mut1 | AGGCTGGTCTCGAACTCCT CTCCAG AAGTGATCCGCCTGCCTC | GTGCAGGGAAGCATAAATGGTGATGTTGCAAATCCCTTAATTCAT |
| Mut2 | AGGCTGGTCTCGAACTCCTGACCTCAAGTGATCCGCCTGCCTC | GTGCAGGGAAGCATAAATGGT CTTGAAAC CAAATCCCTTAATTCAT |
| Mut1+2 | AGGCTGGTCTCGAACTCCT CTCCAG AAGTGATCCGCCTGCCTC | GTGCAGGGAAGCATAAATGGT CTTGAAAC CAAATCCCTTAATTCAT |

Statistical analysis

All data are expressed as mean +/- SE. Statistical comparisons were made using nonparametric test and Mann Whitney test. Calculations were performed using SigmaStat (Jandel Scientific Software, San Rafael, CA).

Results

Expression of LHCGR in human placenta

The first series of experiments were conducted to determine the sites and the levels of expression of hCG receptors in human placenta during the first and third trimester of pregnancy. Fig. 1A, shows representative photographs of LHCGR immunolocalization within the placental villi of human placenta at 8 wg (a) and 10 wg (b). Immunostainings show that LHCGR is highly expressed by cyto - and syncytiotrophoblast cells. A strong expression could also be observed in Hofbauer cells. Negative controls are shown in (c) and (d). Fig. 1B, shows a representative western blot that illustrates the protein levels of LHCGR in human first trimester placenta compared to term placenta. Two major bands with molecular masses of 55 and 70 kDa are observed. The 55 kDa form is known as the precursor form and the 70 kDa as the mature form. A slight decrease in the intensity of the bands is observed towards the end of first trimester. The strongest expression is however observed in term placenta.

hCG effect on EG-VEGF protein expression and secretion

In previous reports from our group (11), we have shown that EG-VEGF is highly expressed by the syncytiotrophoblast layer in the human placenta during the first trimester of pregnancy and that this cytokine is secreted and can be measured in human serum. We therefore investigated the effect of hCG on EG-VEGF expression and secretion in the conditioned media of explant cultures (6 to 11 wg) treated or not with hCG. It was particularly relevant to study hCG effects on EG-VEGF expression in an organotypic system in which villous tissue architecture is maintained. Placental villous explants in culture preserve the topology of intact villi and mimic physiological responses.

hCG effect on EG-VEGF protein expression

Analysis of the hCG effect on EG-VEGF protein expression in placentas from 6 to 11 wg showed differential responses in respect to the gestational age of the placentas examined. The placentas collected from 6-8 wg were less sensitive to hCG treatments compare to those collected from 9-11 wg. Fig 2 shows representative photographs of control and treated placental explants (10 and 100 IU/ml of hCG) at 8 and 10 wg. Whereas the concentration of 10 IU/ml was sufficient to show a significant increase in EG-VEGF protein expression at 10 wg (i), ten times this concentration was needed to see a significant effect at 8 wg (c). Photographs in (e, f, g) and (k, l, m) show negative stainings in placental sections of 8 and 10 wg, respectively.

hCG effect on EG-VEGF protein secretion

Similar effects to those observed on EG-VEGF expression were also observed on EG-VEGF secretion. Fig. 3A and 3B show temporal and dose response regulations of EG-VEGF secretion by hCG in explants from placentas of 6-8 wg and 9-11 wg, respectively. In the 6-8 wg placentas, hCG increased EG-VEGF secretion in a dose dependent manner with the significant effects observed at 50 and 100 IU/ml. In the 9-11 wg placentas, hCG exhibited an opposite dose response effect with the lowest concentration of hCG being the most effective. This phenomenon was previously reported for hCG effects in other systems and is probably due to transient loss of second-messenger production (desensitization), to receptor internalization, and/or loss of cell surface receptors

(down-regulation) in response to high physiological doses of the ligand (32, 33). The discrepancy in the response between 6-8 wg and 9-11 wg might well be due to the lack of functionality of LHCGR in early gestational age as this was previously reported by (25, 29) and suggested by (26).

Effects of hCG on EG-VEGF secretion were confirmed using forskolin, an activator of protein kinase A (PKA), the main active pathway upon LHCGR stimulation by hCG. Fig. 3C shows a time course effect of forskolin effect on EG-VEGF secretion.

hCG effect on EG-VEGF mRNA expression

To investigate the effect of hCG on EG-VEGF mRNA expression, both primary human placental explants and primary trophoblast cells isolated from first trimester placentas were used. Because both hCG and EG-VEGF profiles of expression show the highest levels between 9 and 11 wg, we used placentas at this period of gestation for all mechanistic experiments. Fig. 4A, 4B and 4C show temporal and dose response regulation of EG-VEGF by hCG in explants and syncytiotrophoblasts, respectively. In placental explants, 10 IU/ml of hCG significantly increased EG-VEGF expression with a peak at 12 h. In trophoblasts, the highest effect was observed with 10 IU/ml with a decrease in the response to hCG at higher concentrations. The temporal and dose response experiments both demonstrate the positive effect of hCG on EG-VEGF mRNA expression, but also divulge the existence of a phenomenon of desensitization, receptor internalization, and/or loss of cell surface receptors in the placenta in response to hCG when longer time of exposure or stronger concentrations of the hormone were applied. To further characterize the mechanism by which hCG regulates EG-VEGF expression, we examined the effects of transcription and translation inhibitors on the hCG regulation of EG-VEGF expression in syncytiotrophoblasts. Both the RNA polymerase inhibitor, DRB (50 µg/ml), and the translation inhibitor, CHX (10µg/ml) abolished hCG induction of EG-VEGF, Fig.4D These data suggest that hCG regulates EG-VEGF gene expression at the transcriptional level and that this effect requires protein neosynthesis.

Mechanism by which hCG upregulates EG-VEGF expression

It is well established that physiological concentrations of hCG elevates cAMP level and induces the activation of the protein kinase A signalling pathway (34, 35). Therefore, we evaluated whether the up-regulation of EG-VEGF gene expression by hCG in placental cells was mediated by this pathway. To investigate the involvement of cAMP in hCG effect, we cloned the promoter region of EG-VEGF gene (-3000 bp) which contains two canonical cAMP response elements: CRE1 (cyclic AMP responsive element 1), located at -1282pb, and CRE2, located at -2636pb (Fig. 5A). We then performed gene reporter assays with Cos 7 cells transiently expressing the luciferase gene under the control of EG-VEGF promoter. 24 hours after transfection, cells were treated with or without 8-bromo-cAMP for 4 or 6h. Fig. 5A shows that cAMP treatment significantly increased EG-VEGF promoter activity both at 4 and 6 hours compared to the promoterless condition. These results indicate that cAMP enhances EG-VEGF promoter activity and regulates EG-VEGF promoter expression at the transcriptional level. To determine whether CRE1 or CRE2, or both are involved in EG-VEGF activation in response to cAMP, we mutated CRE1, CRE2 or both. Mutation of CRE1 slightly affected cAMP effect on EG-VEGF promoter; however the mutation of CRE2 completely abolished this effect. This was also observed when both CRE1 and CRE2 were mutated (Fig. 5C). Altogether these results demonstrate that the increase in EG-VEGF mRNA production in response to hCG is largely mediated through an activation of CRE2.

hCG effects on the expression of PROKR1 receptors

Because of the significant effect of hCG on EG-VEGF expression in placental cells, we wondered whether this key hormone also regulates the expression of EG-VEGF receptors, PROKR1 and PROKR2. Fig. 6 shows hCG effect on PROKR1 expression in cytotrophoblasts and in placental explants collected at 9-11 wg. Fig. 6A shows hCG effect on PROKR1 mRNA expression in cytotrophoblast cells (12h). hCG significantly increased PROKR1 mRNA levels; this effect was however only observed at 100 IU/ml, but not at lower concentrations. This effect was substantiated at the protein level, both by immunohistochemistry in placental explants that have been incubated in the absence or presence of hCG 10 and 100 IU/ml (48h) (Fig. 6B), and by western blot on protein extracted from cytotrophoblasts that have been incubated in the absence or presence of hCG 100 IU/ml (48h) (Fig. 6C).

hCG effects on the expression of PROKR2 receptors

hCG effect on PROKR2 expression was also investigated in placental explants and in syncytiotrophoblast cells that highly express PROKR2. Fig. 7 shows hCG effect on PROKR2 expression in syncytiotrophoblast, and in placental explants collected at 9-11 wg. Fig. 7A shows hCG effect on PROKR2 mRNA expression (12h). In contrast to hCG effects on PROKR1, PROKR2 mRNA levels were significantly increased in response to ten times lower concentrations. This effect was substantiated at the protein levels, both by immunohistochemistry in placental explants that have been incubated in the absence or presence of hCG 10 and 100 IU/ml (48h) (Fig. 7B); and by western blot on proteins extracted from syncytiotrophoblasts that have been incubated in the absence or presence of 10 IU/ml hCG (48h) (Fig. 7C). Altogether these findings suggest that PROKR1 and PROKR2 are finely regulated by hCG.

Discussion

During the last decade, several reports have shed light on the role of the new angiogenic factor, EG-VEGF in reproductive organs. It is now well established that EG-VEGF plays a role in physiological and pathological ovarian activities (36, 37), in testicular angiogenesis (9), and is involved in the success of endometrial implantation (5, 38, 39). In the placenta, we (2, 3, 11, 12) and others (40, 41) have demonstrated its role during early and late pregnancy, respectively. In four recent publications from our group, we have shown that EG-VEGF and its receptors are highly abundant in the human placenta during the first trimester of pregnancy, with the highest levels of expression found in the syncytiotrophoblast layer (3, 11). We have also reported its control of trophoblast invasion, and its angiogenic effects in microvascular endothelial cells (2, 3). Furthermore, we reported the deregulation of its circulating levels in Preeclampsia (3). The regulation of expression of both EG-VEGF and its receptors was however still unknown. We and others have shown that the EG-VEGF gene is actively transcribed under hypoxia via mechanisms that are common to other hypoxia-inducible genes (11, 42). Nevertheless, a fine regulation of EG-VEGF and that of its receptors by an important pregnancy signal was predictable but not investigated.

Here, we demonstrate that the key hormone of placentation, hCG, significantly increases the expression of EG-VEGF and that of its receptors during the first trimester of pregnancy. hCG effect was assessed in two physiological systems, the placental explants and the primary trophoblast cultures. The present finding demonstrates a new physiological regulation between an endocrine hormone released by the syncytiotrophoblast layer and acts, in an autocrine manner, on the same cell type to increase the expression of the new factor EG-VEGF, and its receptor PROKR2 abundantly expressed by this differentiated cell type. hCG also acts in a paracrine manner on the undifferentiated cell type of the placenta, the cytotrophoblast where it stimulates the expression of PROKR1. Altogether these results reveal a new role for hCG in human placentation through its activation of the EG-VEGF/ PROKR1/ PROKR2 system and might explain the peak of expression of this ligand and its receptors (8 to 11 weeks of gestation) during the first trimester of pregnancy. Consistent with these suggestions is the demonstration that placentas collected at 6-8 wg and treated with physiological concentrations of hCG (80-100 IU/ml) increased 5 times the EG-VEGF secretion which explains the exponential increase in EG-VEGF secretion reported earlier at this gestational period (11). At 9-11wg the same concentration of hCG increased EG-VEGF secretion by 1.5 fold only which might explain the gradual decline also reported at this period of gestation (11). One can therefore speculate that the recent described effects of hCG on placental villi development, including its effect on placental angiogenesis (17, 43, 44) require a prior activation of EG-VEGF production. Consistent with this data, the group of Jabbour has recently shown that EG-VEGF stimulation of LIF (Leukemia Inhibitory Factor) expression during endometrial implantation in the baboon was under the control of embryonic hCG (38).

More importantly, we demonstrated that hCG effect is transcriptional and post-transcriptional and determined the mechanism by which this hormone up regulates EG-VEGF production. *In silico* analysis of EG-VEGF promoter revealed consensus response elements for different transcription factors including CREB. Mutation of these sites showed that hCG effect on EG-VEGF expression is mediated via the activation of CRE2 located at -2636 bp on the EG-VEGF promoter region and not CRE1 located at -1282 bp. Hence these data bring evidence of a direct regulation of EG-VEGF transcription upon hCG stimulation of the trophoblast cells.

In earlier work from our group, we have shown that EG-VEGF could be measured in circulating serum with the highest levels found during the first trimester of pregnancy (3). These data demonstrate that the placenta during this period of gestation is an important source of EG-VEGF, and that its local production should be finely controlled. Here we show for the first time, in an *ex vivo* model, the placental explant, that EG-VEGF is secreted and can be measured in the explant conditioned medium. Moreover we show that hCG significantly increases this secretion.

In the present paper we also demonstrate that EG-VEGF, PROKR1 and PROKR2 are differentially regulated by hCG. We found that hCG stimulates EG-VEGF and PROKR2 expression at lower concentrations (10 IU/ml), whereas PROKR1 stimulation was only observed at higher concentrations (100 IU/ml). Given the preferential expression of EG-VEGF and PROKR2 in the syncytiotrophoblast and that of PROKR1 in the cytotrophoblast cells, these results might be explained by differential levels, and/or type of LHCG receptors expressed in the undifferentiated trophoblast, the cytotrophoblast, and the differentiated trophoblast, the syncytiotrophoblast. These speculations are consistent with previous reports showing that LHCGR might exist under multiple splicing forms in a given tissue (45-47), and from data showing differential expression levels of LHCGR in cyto- and syncytiotrophoblast cells (18, 19, 28). The *LHCGR* gene has 11 exons and codes for multiple alternatively spliced species mRNA (at least 6). These different mRNA transcripts are initiated at multiple sites spanning a region more than a kilobase upstream of the first exon (48, 49). The discrepancy in the responses of PROKR1 and PROKR2 to the same concentrations of hCG might well be explained by the differential composition of their promoter region. *In silico* analysis showed that the PROKR2 promoter region exhibits additional potential response elements to cAMP (CRE and Sp1) as compared to the PROKR1 promoter. This might explain the higher hCG concentration required to activate PROKR1 expression.

When the effect of hCG was analyzed on EG-VEGF expression and secretion in placental explants, a significant up-regulation was observed and this effect was dose and time-dependent. Nevertheless, we observed that higher doses of hCG (100 IU/ml) stimulates EG-VEGF expression to a lower degree than 10 IU/ml of hCG. This phenomenon is probably due to a transient loss of second-messenger production (desensitization), internalization, and/or loss of cell surface receptors (down-regulation) in response to pharmacological doses of the ligand (50, 51). In our experiments the decrease in LHCGR response was only observed when explant tissues or isolated syncytiotrophoblasts were used, but not when cytotrophoblast cells were used. This observation supports the hypothesis that cyto- and syncytiotrophoblast cells might not express the same type of LHCGR receptor isoforms, and/or do not activate the same second messengers upon hCG activation. The decrease in the response to hCG in both ST and tissue explants might also be explained by the release by the ST layer of soluble LHCGRs, a recent phenomenon described in placenta (52). We can speculate that high hCG concentration increase soluble LHCGR receptors secretion that might trap the hCG in the conditioned media and thereby lower its biological effect. To date, it is well established that deregulations in hCG production are tightly associated with the development of major pathological pregnancies such as preeclampsia (53-55). Interestingly, we have shown that EG-VEGF levels are also deregulated in PE (3), suggesting that the new loop of regulation between hCG and EG-VEGF might contribute to mechanisms underlying the development of placental pathologies during early human pregnancy. In the present work, we provide evidence that hCG up-regulates EG-VEGF gene and its receptors PROKR1 and PROKR2 in human placenta, and that the hCG regulatory effect on EG-VEGF expression involves the cAMP signal transduction pathway. In summary, our results further support the

importance of EG-VEGF in pregnancy and reveal a new loop of physiological regulation between two key factors within the placental villi.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the staff of the Department of Gynecology/Obstetrics (Pr. J.P. Schaal) at the University Hospital of Grenoble for giving us access to human placentas. We acknowledge the following sources of funding: INSERM (U1036), University Joseph Fourier, Commissariat à l'Energie Atomique (DSV/iRTSV/BCI), the Région Rhône-Alpes (CIBLE-2008). S.B. was supported by doctoral scholarships from the French Ministry of Education and Research and from the Fondation pour la Recherche Médicale.

Figures Legend

Figure 1: LHCGR protein expression in placental-tissue at 8 and 10 weeks of gestation. Fig. 1A shows LHCGR expression in human placental section. The photographs on (a) and (b) show chorionic villi sections immunostained with anti-LHCGR antibody at 8 wg and 10 wg, respectively. The photographs on (c) and (d) show tissue sections incubated with pre-immune sera at 8 and 10 wg, respectively. Cytotrophoblast (Ct); Hofbauer cells (Ho); syncytiotrophoblast (St). Scale bar = 50 μ m. Fig. 1B shows a representative Western blot analysis of LHCGR expression in human placental extracts collected from 7 wg to term. Two major bands with molecular masses of 55 (LHCGR precursor) and 70 kDa (mature LHCGR) were observed in placental extracts.

Figure 2: hCG effect on EG-VEGF expression. The photographs in this figure show EG-VEGF staining in sections of placental explants that have been cultured in the absence or presence of hCG (10 and 100 IU/ml) at 8 and 10 wg. Undersized photographs show tissue sections incubated with pre-immune serum. Cytotrophoblast (Ct); Hofbauer cells (Ho); Syncytiotrophoblast (St). Scale bar = 50 μ m.

Figure 3: hCG effect on EG-VEGF secretion. Fig. 3A and 3B show temporal (0 to 48 h) and dose dependence analysis of hCG effect on EG-VEGF secretion in placental conditioned media collected from placental explants at 6-8 wg and 9-11 wg, respectively. Fig. 3C shows a time course (0h- 48h) effect of Forskolin on EG-VEGF secretion. Data represent the mean \pm SEM from three independent experiments. (* P<0.05).

Figure 4: hCG effect of EG-VEGF mRNA expression in placental explants and in syncytiotrophoblasts. The graph in panel A shows a temporal effect of hCG (10 IU/ml) on EG-VEGF mRNA expression, measured by Q-RT-PCR, in placental explants. Data represent the means \pm SEM from 3 independent experiments (*P<0.05). Panel B shows a representative analysis of hCG (10, 50 and 100 IU/ml) effect on EG-VEGF mRNA expression in syncytiotrophoblast cultures (12h). Panel C shows a dose response effect of hCG (10, 50 and 100 IU/ml) on EG-VEGF mRNA expression in syncytiotrophoblast cultures (12h). Panel D shows DRB (50 μ g/ml) and CHX (10 μ g/ml) effects on basal and hCG-induced EG-VEGF mRNA expression in primary trophoblast cells. Data represent the mean \pm SEM from three independent experiments. (*P<0.05).

Figure 5: Mechanism by which hCG up-regulates EG-VEGF expression. (A) shows 8-bromo-cAMP effect on EG-VEGF promoter activation in Cos7 cells transfected with pGL3b pEG-VEGF or pGL3b, used as control. Luciferase activity was measured after 4 h and 6 h of cAMP stimulation. Data represent the mean \pm SEM from three independent experiments. (*P<0.05). Panel B shows 8-bromo-cAMP effect on EG-VEGF promoter activation in Cos7 cells transfected with pGL3b, pGL3b pEG-VEGF, pGL3b pEG-VEGF mutated at the CRE1 site, pGL3b pEG-VEGF mutated at the CRE2 site, and pGL3b pEG-VEGF mutated at CRE1 and CRE2 sites. Luciferase activity was measured after 6 h of cAMP stimulation. Data represent the mean \pm SEM from three independent experiments.

Figure 6: hCG effect on PROKR1 mRNA and protein expression. The graph in panel A shows a dose response of hCG (10-100 IU/ml, 12h) on PROKR1 mRNA expression, measured by Q-RT-PCR, in cytotrophoblast cells. Data represent the means \pm SEM from 3 independent experiments (*P<0.05). The photographs in Panel B show PROKR1 staining in sections of placental explants that have been cultured in the absence or presence of hCG (10 and 100 IU/ml) at 10 wg (48h). Undersized photographs (e, f, g) show tissue sections incubated with pre-immune serum. Cytotrophoblast (Ct); Hofbauer cells (Ho); Syncytiotrophoblast (St). Scale bar = 50 μ m. Fig. 6C shows a representative Western blot analysis of PROKR1 expression in cytotrophoblasts incubated in the absence or presence of hCG (100 IU/ml, 48h). Fig. 6C shows histograms of the mean relative OD of PROKR1 protein signals normalized to beta actin protein. Data are mean \pm SEM.

Figure 6: hCG effect on PROKR2 mRNA and protein expression. The graph in panel A shows a dose response of hCG (10-100 IU/ml, 12h) on PROKR2 mRNA expression, measured by Q-RT-PCR, in syncytiotrophoblast cells. Data represent the means \pm SEM from 3 independent experiments (*P<0.05). The photographs in Panel B show PROKR2 staining in sections of placental explants that have been cultured in the absence or presence of hCG (10 and 100 IU/ml) at 10 wg (48h). Undersized photographs (e, f, g) show tissue sections incubated with pre-immune serum. Cytotrophoblast (Ct); Hofbauer cells (Ho); Syncytiotrophoblast (St). Scale bar = 50 μ m. Fig. 6C shows a representative Western blot analysis of PROKR2 expression in cytotrophoblasts incubated in the absence or presence of hCG (10 IU/ml, 48h). Fig. 6C shows histograms of the mean relative OD of PROKR2 protein signals normalized to beta actin protein. Data are mean \pm SEM.

Figure 7: Proposed model of hCG stimulation of the EG-VEGF/PROKR1 and PROKR2 system in human placenta during the first trimester of pregnancy. (A) Shows a cartoon of placental villi with the new physiological regulation of EG-VEGF by hCG. hCG released from the syncytiotrophoblast layer will activate, in autocrine manner, EG-VEGF and PROKR2 expression in the ST layer and, in a paracrine manner, the PROKR1 in the cytotrophoblast layer. (B) Summarizes the proposed model, according to which PROKR1, expressed by cytotrophoblasts, is only increased with high hCG levels. In contrast, EG-VEGF and PROKR2, mainly expressed by differentiated syncytiotrophoblasts, are increased by low hCG levels.

Figure 1

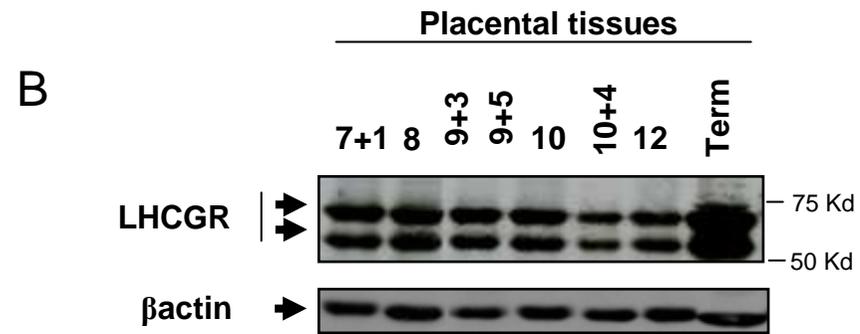
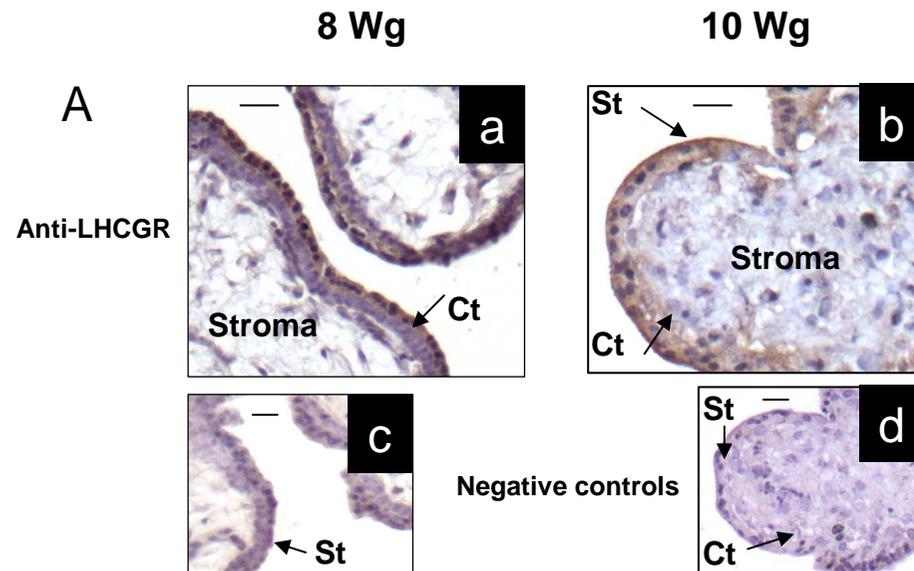


Figure 2

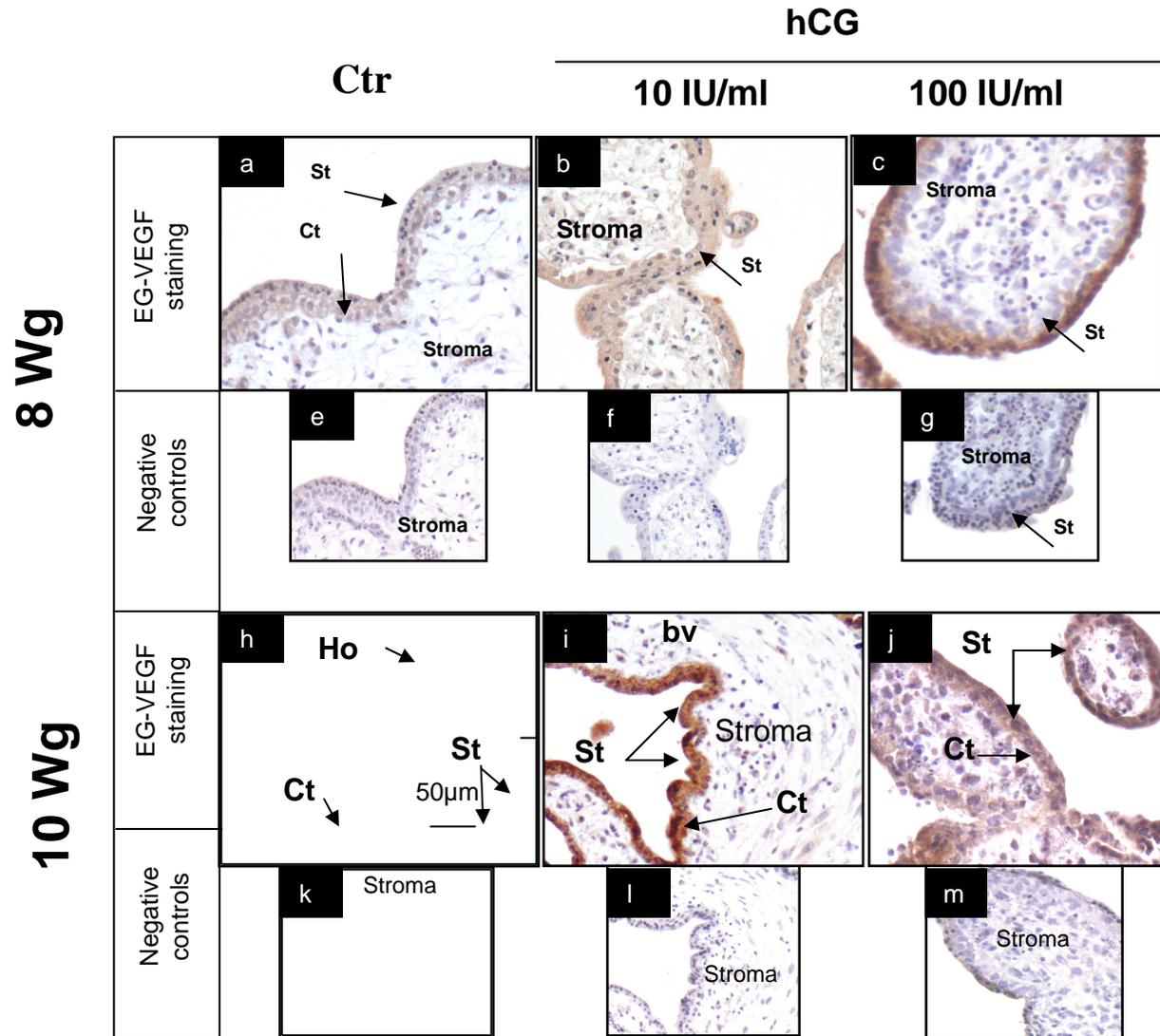


Figure 3

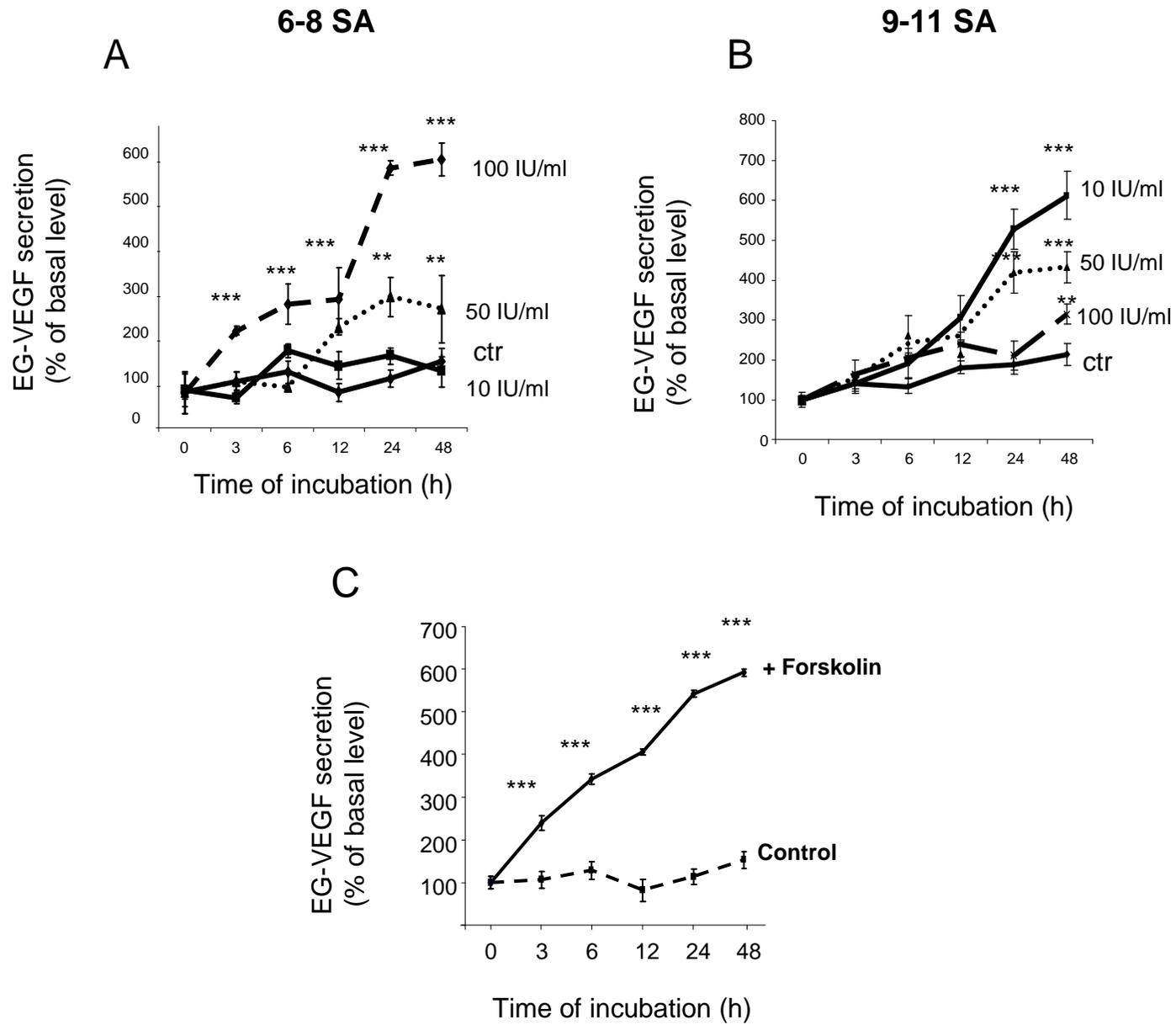


Figure 4

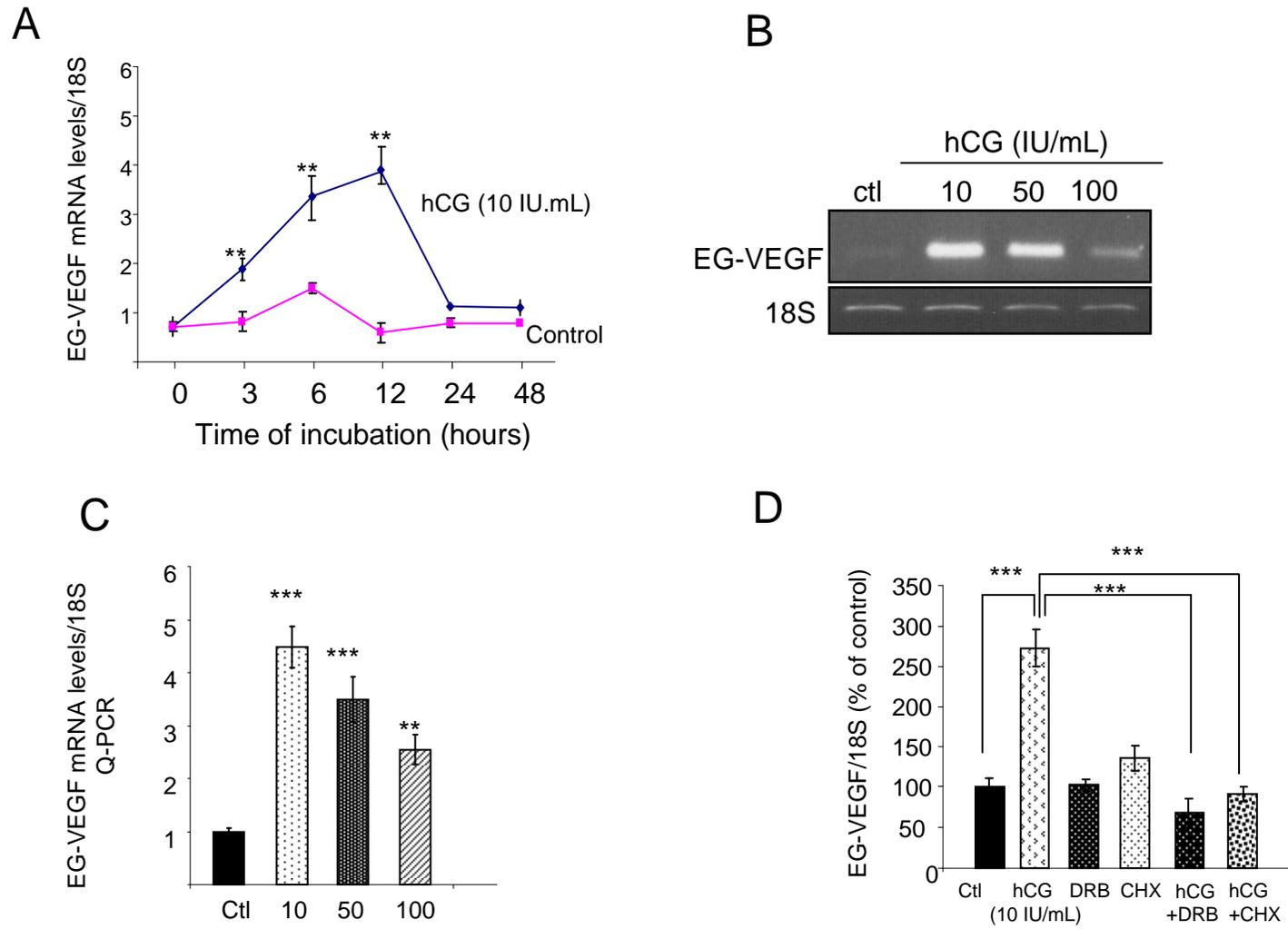
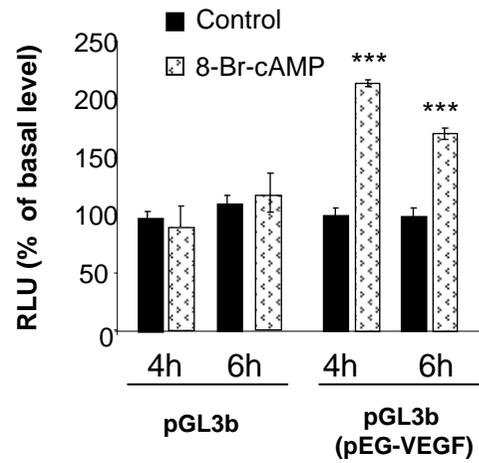


Figure 5

A

| | CRE1 | CRE2 |
|------------------|---|--|
| Wild type | AGGCTGGTCTCGAACTCCTGACCTCAAGTGATCCGCCTGCCTC | GTGCAGGGAAGCATAAATGGTGATGTTGCAAATCCCTTAATTCAT |
| Mut1 | AGGCTGGTCTCGAACTCCTC CTCCAG AAGTGATCCGCCTGCCTC | GTGCAGGGAAGCATAAATGGTGATGTTGCAAATCCCTTAATTCAT |
| Mut2 | AGGCTGGTCTCGAACTCCTGACCTCAAGTGATCCGCCTGCCTC | GTGCAGGGAAGCATAAATGGT CTTGAAC CAAATCCCTTAATTCAT |
| Mut1+2 | AGGCTGGTCTCGAACTCCTC CTCCAG AAGTGATCCGCCTGCCTC | GTGCAGGGAAGCATAAATGGT CTTGAAC CAAATCCCTTAATTCAT |

B



C

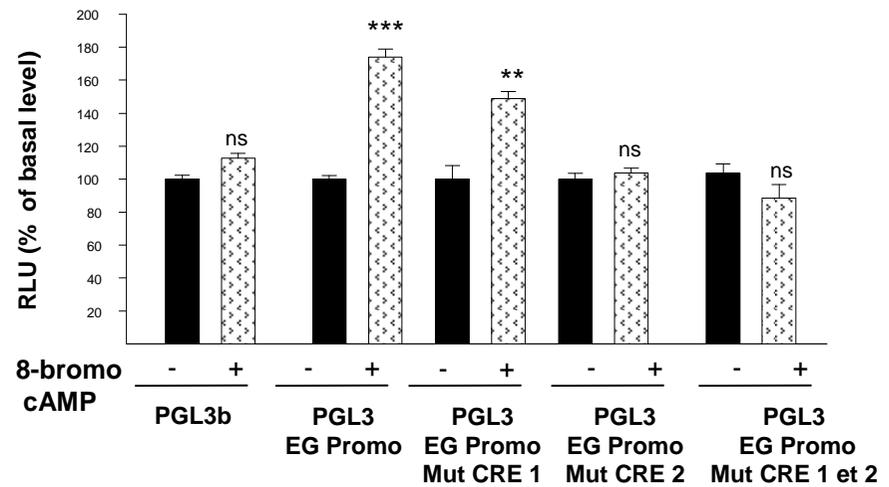


Figure 6

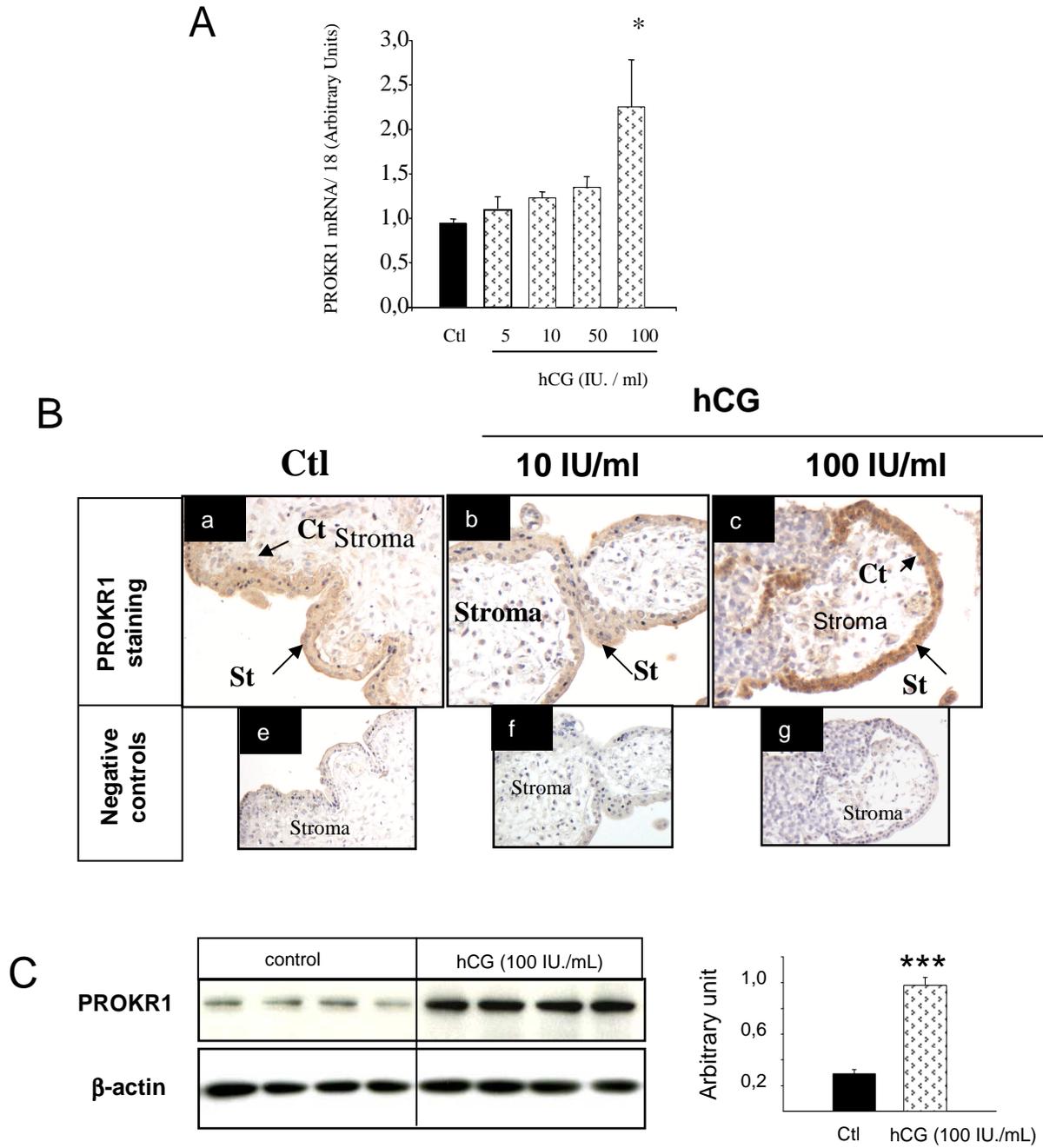


Figure 7

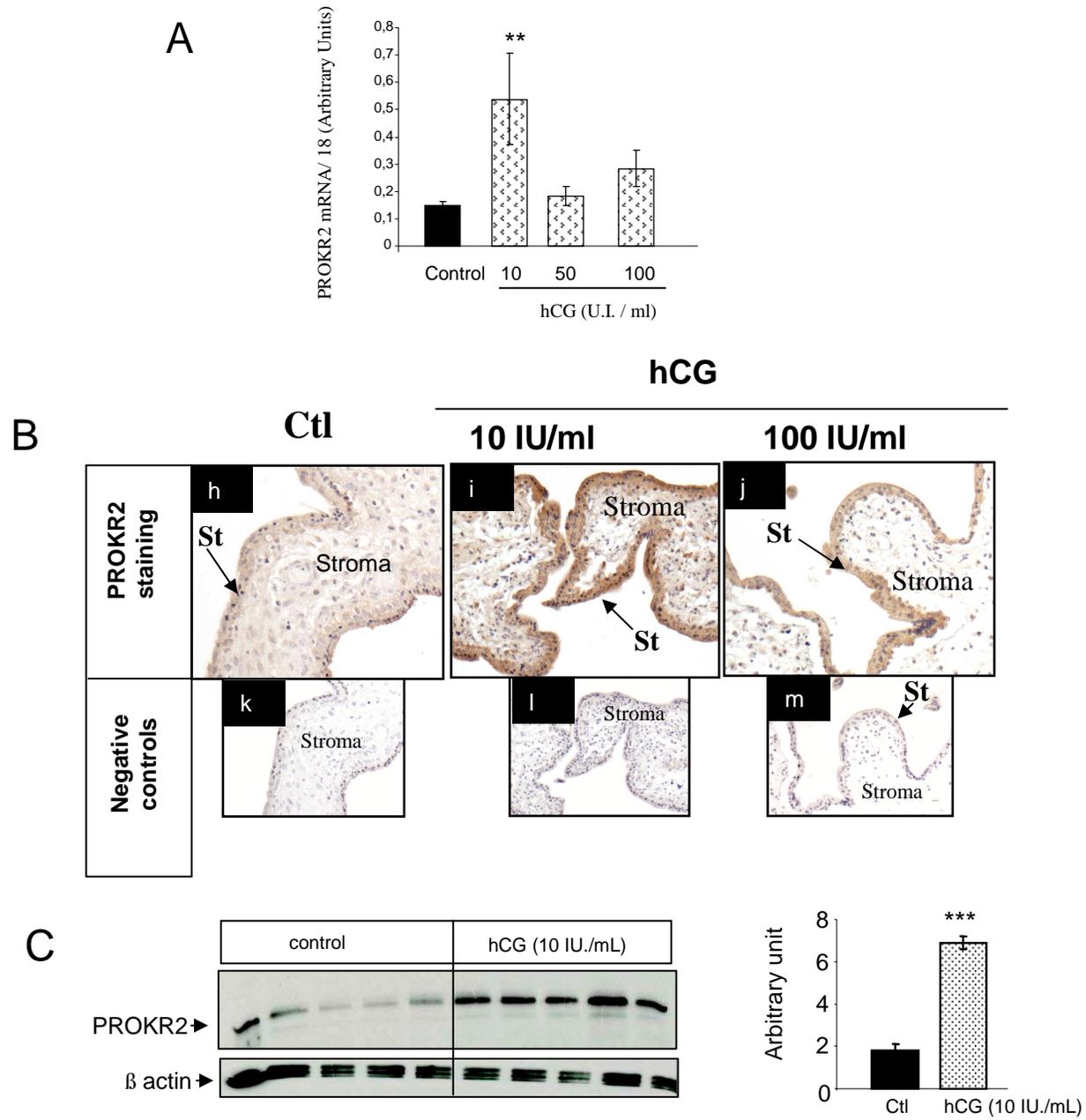
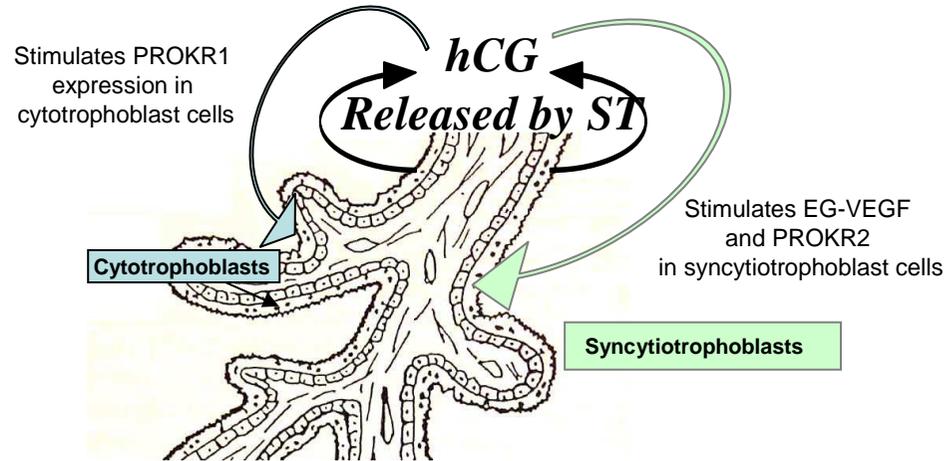


Figure 8

A



B

| | | 10-12 weeks |
|--------------------------|----------------|------------------|
| LHCGR (expression level) | | Function |
| Response to hCG | EG-VEGF | 10 100 IU/ml |
| | PROKR1 | 10 100 IU/ml |
| | PROKR2 | 10 100 IU/ml |

References

1. **Fitzgerald JS, Busch S, Wengenmayer T, Foerster K, de la Motte T, Poehlmann TG, Markert UR** 2005 Signal transduction in trophoblast invasion. *Chem Immunol Allergy* 88:181-199
2. **Brouillet S, Hoffmann P, Benharouga M, Salomon A, Schaal JP, Feige JJ, Alfaidy N** 2010 Molecular characterization of EG-VEGF-mediated angiogenesis: differential effects on microvascular and macrovascular endothelial cells. *Mol Biol Cell* 21:2832-2843
3. **Hoffmann P, Saoudi Y, Benharouga M, Graham CH, Schaal JP, Mazouni C, Feige JJ, Alfaidy N** 2009 Role of EG-VEGF in human placentation: Physiological and pathological implications. *J Cell Mol Med* 13:2224-2235
4. **LeCouter J, Kowalski J, Foster J, Hass P, Zhang Z, Dillard-Telm L, Frantz G, Rangell L, DeGuzman L, Keller GA, Peale F, Gurney A, Hillan KJ, Ferrara N** 2001 Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium. *Nature* 412:877-884
5. **Battersby S, Critchley HO, Morgan K, Millar RP, Jabbour HN** 2004 Expression and regulation of the prokineticins (endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor and Bv8) and their receptors in the human endometrium across the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 89:2463-2469
6. **Ferrara N, Frantz G, LeCouter J, Dillard-Telm L, Pham T, Draksharapu A, Giordano T, Peale F** 2003 Differential expression of the angiogenic factor genes vascular endothelial growth factor (VEGF) and endocrine gland-derived VEGF in normal and polycystic human ovaries. *Am J Pathol* 162:1881-1893
7. **Lecouter J, Lin R, Ferrara N** 2004 EG-VEGF: a novel mediator of endocrine-specific angiogenesis, endothelial phenotype, and function. *Ann N Y Acad Sci* 1014:50-57
8. **Podlovni H, Ovadia O, Kisliouk T, Klipper E, Zhou QY, Friedman A, Alfaidy N, Meidan R** 2006 Differential expression of prokineticin receptors by endothelial cells derived from different vascular beds: a physiological basis for distinct endothelial function. *Cell Physiol Biochem* 18:315-326
9. **Samson M, Peale FV, Jr., Frantz G, Rioux-Leclercq N, Rajpert-De Meyts E, Ferrara N** 2004 Human endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor: expression early in development and in Leydig cell tumors suggests roles in normal and pathological testis angiogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 89:4078-4088
10. **Lin DC, Bullock CM, Ehlert FJ, Chen JL, Tian H, Zhou QY** 2002 Identification and molecular characterization of two closely related G protein-coupled receptors activated by prokineticins/endocrine gland vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 277:19276-19280
11. **Hoffmann P, Feige JJ, 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* 147:1675-1684
12. **Hoffmann P, Feige JJ, Alfaidy N** 2007 Placental expression of EG-VEGF and its receptors PKR1 (prokineticin receptor-1) and PKR2 throughout mouse gestation. *Placenta* 28:1049-1058
13. **Herr F, Baal N, Reisinger K, Lorenz A, McKinnon T, Preissner KT, Zygmunt M** 2007 HCG in the regulation of placental angiogenesis. Results of an in vitro study. *Placenta* 28 Suppl A:S85-93

14. **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* 19:37-47
15. **Malassine A, Cronier L** 2002 Hormones and human trophoblast differentiation: a review. *Endocrine* 19:3-11
16. **Licht P, Fluhr H, Neuwinger J, Wallwiener D, Wildt L** 2007 Is human chorionic gonadotropin directly involved in the regulation of human implantation? *Mol Cell Endocrinol* 269:85-92
17. **Zygmunt M, Herr F, Keller-Schoenwetter S, Kunzi-Rapp K, Munstedt K, Rao CV, Lang U, Preissner KT** 2002 Characterization of human chorionic gonadotropin as a novel angiogenic factor. *J Clin Endocrinol Metab* 87:5290-5296
18. **Rao CV, Lei ZM** 2007 The past, present and future of nongonadal LH/hCG actions in reproductive biology and medicine. *Mol Cell Endocrinol* 269:2-8
19. **Shi QJ, Lei ZM, Rao CV, Lin J** 1993 Novel role of human chorionic gonadotropin in differentiation of human cytotrophoblasts. *Endocrinology* 132:1387-1395
20. **Frendo JL, Vidaud M, Guibourdenche J, Luton D, Muller F, Bellet D, Giovagranti Y, Tarrade A, Porquet D, Blot P, Evain-Brion D** 2000 Defect of villous cytotrophoblast differentiation into syncytiotrophoblast in Down's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 85:3700-3707
21. **Boelhaue M, Sinowatz F, Wolf E, Paula-Lopes FF** 2005 Maturation of bovine oocytes in the presence of leptin improves development and reduces apoptosis of in vitro-produced blastocysts. *Biol Reprod* 73:737-744
22. **Ryu KS, Gilchrist RL, Koo YB, Ji I, Ji TH** 1998 Gene, interaction, signal generation, signal divergence and signal transduction of the LH/CG receptor. *Int J Gynaecol Obstet* 60 Suppl 1:S9-20
23. **Alsaf E, Cedard L** 1974 [Demonstration of a specific fixation of radio-iodinated human chorionic gonadotropin (HCG I-125) in fragments of human placentas]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 278:2665-2668
24. **Reshef E, Lei ZM, Rao CV, Pridham DD, Chegini N, Luborsky JL** 1990 The presence of gonadotropin receptors in nonpregnant human uterus, human placenta, fetal membranes, and decidua. *J Clin Endocrinol Metab* 70:421-430
25. **Jauniaux E, Bao S, Eblen A, Li X, Lei ZM, Meuris S, Rao CV** 2000 HCG concentration and receptor gene expression in placental tissue from trisomy 18 and 21. *Mol Hum Reprod* 6:5-10
26. **Licht P, Cao H, Lei ZM, Rao CV, Merz WE** 1993 Novel self-regulation of human chorionic gonadotropin biosynthesis in term pregnancy human placenta. *Endocrinology* 133:3014-3025
27. **Pidoux G, Gerbaud P, Marpeau O, Guibourdenche J, Ferreira F, Badet J, Evain-Brion D, Frendo JL** 2007 Human placental development is impaired by abnormal human chorionic gonadotropin signaling in trisomy 21 pregnancies. *Endocrinology* 148:5403-5413
28. **Pidoux G, Gerbaud P, Tsatsaris V, Marpeau O, Ferreira F, Meduri G, Guibourdenche J, Badet J, Evain-Brion D, Frendo JL** 2007 Biochemical characterization and modulation of LH/CG-receptor during human trophoblast differentiation. *J Cell Physiol* 212:26-35
29. **Rao CV** 1996 The beginning of a new era in reproductive biology and medicine : Expression of low functional luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptors in nongonadal tissues. *J Physiol Pharmacol* 47:41-53

30. **Alfaidy N, Gupta S, DeMarco C, Caniggia I, Challis JR** 2002 Oxygen regulation of placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2: physiological and pathological implications. *J Clin Endocrinol Metab* 87:4797-4805
31. **Logeart-Avramoglou D, Bourguignon M, Oudina K, Ten Dijke P, Petite H** 2006 An assay for the determination of biologically active bone morphogenetic proteins using cells transfected with an inhibitor of differentiation promoter-luciferase construct. *Anal Biochem* 349:78-86
32. **Kolena J, Scsukova S, Jezova M, Vranova J, Tatara M** 1996 Ligand-induced rapid desensitization causes structural alteration of rat ovarian LH/hCG receptor. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 104:459-463
33. **Shinozaki H, Butnev V, Tao YX, Ang KL, Conti M, Segaloff DL** 2003 Desensitization of Gs-coupled receptor signaling by constitutively active mutants of the human lutropin/choriogonadotropin receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 88:1194-1204
34. **Conti M, Richter W, Mehats C, Livera G, Park JY, Jin C** 2003 Cyclic AMP-specific PDE4 phosphodiesterases as critical components of cyclic AMP signaling. *J Biol Chem* 278:5493-5496
35. **Menon KM, Munshi UM, Clouser CL, Nair AK** 2004 Regulation of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor expression: a perspective. *Biol Reprod* 70:861-866
36. **Kisliouk T, Friedman A, Klipper E, Zhou QY, Schams D, Alfaidy N, Meidan R** 2007 Expression pattern of prokineticin 1 and its receptors in bovine ovaries during the estrous cycle: involvement in corpus luteum regression and follicular atresia. *Biol Reprod* 76:749-758
37. **Kisliouk T, Levy N, Hurwitz A, Meidan R** 2003 Presence and regulation of endocrine gland vascular endothelial growth factor/prokineticin-1 and its receptors in ovarian cells. *J Clin Endocrinol Metab* 88:3700-3707
38. **Evans J, Catalano RD, Brown P, Sherwin R, Critchley HO, Fazleabas AT, Jabbour HN** 2009 Prokineticin 1 mediates fetal-maternal dialogue regulating endometrial leukemia inhibitory factor. *FASEB J* 23:2165-2175
39. **Evans J, Catalano RD, Morgan K, Critchley HO, Millar RP, Jabbour HN** 2008 Prokineticin 1 signaling and gene regulation in early human pregnancy. *Endocrinology* 149:2877-2887
40. **Catalano RD, Lannagan TR, Gorowiec M, Denison FC, Norman JE, Jabbour HN** Prokineticins: novel mediators of inflammatory and contractile pathways at parturition? *Mol Hum Reprod* 16:311-319
41. **Denison FC, Battersby S, King AE, Szuber M, Jabbour HN** 2008 Prokineticin-1: a novel mediator of the inflammatory response in third-trimester human placenta. *Endocrinology* 149:3470-3477
42. **Ambrosini G, Nath AK, Sierra-Honigmann MR, Flores-Riveros J** 2002 Transcriptional activation of the human leptin gene in response to hypoxia. Involvement of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 277:34601-34609
43. **Berndt S, Perrier d'Hauterive S, Blacher S, Pequeux C, Lorquet S, Munaut C, Applanat M, Herve MA, Lamande N, Corvol P, van den Brule F, Frankenne F, Poutanen M, Huhtaniemi I, Geenen V, Noel A, Foidart JM** 2006 Angiogenic activity of human chorionic gonadotropin through LH receptor activation on endothelial and epithelial cells of the endometrium. *FASEB J* 20:2630-2632
44. **Islami D, Bischof P, Chardonnens D** 2003 Modulation of placental vascular endothelial growth factor by leptin and hCG. *Mol Hum Reprod* 9:395-398

45. **Hai MV, De Roux N, Ghinea N, Beau I, Loosfelt H, Vannier B, Meduri G, Misrahi M, Milgrom E** 1999 Gonadotropin receptors. *Ann Endocrinol (Paris)* 60:89-92
46. **Misrahi M, Beau I, Ghinea N, Vannier B, Loosfelt H, Meduri G, Vu Hai MT, Milgrom E** 1996 The LH/CG and FSH receptors: different molecular forms and intracellular traffic. *Mol Cell Endocrinol* 125:161-167
47. **Robert C, Gagne D, Lussier JG, Bousquet D, Barnes FL, Sirard MA** 2003 Presence of LH receptor mRNA in granulosa cells as a potential marker of oocyte developmental competence and characterization of the bovine splicing isoforms. *Reproduction* 125:437-446
48. **Bacich DJ, Rohan RM, Norman RJ, Rodgers RJ** 1994 Characterization and relative abundance of alternatively spliced luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid in the ovine ovary. *Endocrinology* 135:735-744
49. **Mamluk R, Wolfenson D, Meidan R** 1998 LH receptor mRNA and cytochrome P450 side-chain cleavage expression in bovine theca and granulosa cells luteinized by LH or forskolin. *Domest Anim Endocrinol* 15:103-114
50. **Conti M, Harwood JP, Hsueh AJ, Dufau ML, Catt KJ** 1976 Gonadotropin-induced loss of hormone receptors and desensitization of adenylate cyclase in the ovary. *J Biol Chem* 251:7729-7731
51. **Maymo JL, Perez Perez A, Sanchez-Margalet V, Duenas JL, Calvo JC, Varone CL** 2009 Up-regulation of placental leptin by human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 150:304-313
52. **Chambers AE, Stanley PF, Randeve H, Banerjee S** 2011 Microvesicle-mediated release of soluble LH/hCG receptor (LHCGR) from transfected cells and placenta explants. *Reprod Biol Endocrinol* 9:64
53. **Gaspard U, Foidart JM, Lambotte R, Reuter AM, Franchimont P** 1984 [Human chorionic gonadotropin and its subunits in normal and pathologic pregnancies]. *Ann Endocrinol (Paris)* 45:269-280
54. **Goldstein DP, Berkowitz RS** 1994 Current management of complete and partial molar pregnancy. *J Reprod Med* 39:139-146
55. **Myatt L, Miodovnik M** 1999 Prediction of preeclampsia. *Semin Perinatol* 23:45-57

2.2 Discussion de la deuxième publication

Dans cet article, nous avons caractérisé la régulation d'EG-VEGF et de ses récepteurs par l'hCG dans le placenta de 1^{er} trimestre. L'étude des mécanismes de régulation suggère que l'hCG augmente EG-VEGF via la voie AMPc, qui agirait probablement via les deux sites CRE de son promoteur, avec une implication majeure du site CRE-2.

A. Bref résumé des résultats

Les expériences présentées dans cet article ont été réalisées sur des placentas de 6-11 SA. Il faut garder à l'esprit que les concentrations physiologiques circulantes de l'hCG chez les femmes enceintes entre 6 et 11 SA se situent entre 50 U.I./mL et 100 U.I./ml environ.

a) Expression du récepteur LH/CG dans les trophoblastes

Dans notre étude, nous avons montré que le placenta du 1^{er} trimestre de grossesse exprimait le récepteur LH/CG, principalement au niveau des trophoblastes. Cette expression placentaire suggère une action éventuelle de l'hCG sur ces cellules. La présence de deux formes du LH/CGR dans les extraits protéiques placentaires correspond à la forme précurseur du récepteur, qui est une glycoprotéine immature intracellulaire (pour la bande du bas), et à la forme mature présente à la membrane (pour la bande du haut), comme décrit dans la littérature (pour revue voir (Ascoli et al. 2002)). On note une expression plus importante du récepteur LH/CG dans le placenta à terme, par rapport à son expression au 1^{er} trimestre de grossesse. Ces différences d'expression seront discutées dans la partie « discussion des résultats ».

b) Régulation de l'expression protéique et de la sécrétion d'EG-VEGF par l'hCG

A travers nos expériences, nous avons montré que l'hCG augmentait la sécrétion d'EG-VEGF par les explants placentaires du 1^{er} trimestre de grossesse, et ce quelque soit le terme utilisé (entre 6 et 11 SA). Toutefois, les doses réponses étaient spécifiques de l'âge gestationnel des placentas.

▪ Profil de sécrétion pour des placentas de 6-8 SA

L'hCG augmente la sécrétion d'EG-VEGF par les explants placentaires pour des doses d'hCG de 50 U.I./mL et 100 U.I./mL. On peut noter que cette augmentation est proportionnelle à la

concentration d'hCG utilisée. Par contre, 10 U.I./mL d'hCG n'a aucun effet significatif sur la sécrétion d'EG-VEGF, et cela jusqu'à 48h de traitement. Le marquage d'EG-VEGF sur des coupes placentaires d'explants traités par hCG pendant 48h confirme ces données, présentant une intensité de marquage maximale pour 100 U.I./mL.

▪ **Profil de sécrétion pour des placentas de 9-11 SA**

On observe une augmentation significative de la sécrétion placentaire d'EG-VEGF par hCG dès 10 U.I./ml, contrairement aux placentas de 6-8 SA. Cette augmentation est significative pour toutes les concentrations d'hCG testées (10-50-100 U.I./mL). Néanmoins, on peut noter que l'augmentation de la sécrétion d'EG-VEGF est inversement proportionnelle aux doses d'hCG utilisées. Cet effet a été confirmé sur des coupes d'explants placentaires traités par les mêmes doses d'hCG, où nous avons observé une intensité de marquage maximal d'EG-VEGF au sein des ST des villosités traités avec 10 U.I./mL d'hCG. L'intensité de marquage était également inversement proportionnelle aux doses de traitement d'hCG utilisées. Cette augmentation inversement proportionnelle retrouvée dans chaque expérience pour les placentas de 9-11 SA soulève l'existence d'un rétrocontrôle dans la signalisation hCG/EG-VEGF. Ces régulations fines sont bien décrites pour les RCPG, dont fait partie le LH/CGR. Elles seront abordées dans la partie « discussion des résultats ».

c) Etude des mécanismes de régulation de l'hCG sur EG-VEGF

Nous avons ensuite voulu déterminer les mécanismes d'action de l'effet de l'hCG sur l'expression d'EG-VEGF. Pour cela, nous avons choisi d'utiliser des placentas de 9-11 SA, car ils sont décrits dans la littérature comme exprimant des LH/CGR pleinement fonctionnels, ce qui n'est pas le cas des placentas de 6-8 SA. Cette notion est abordée plus en détail dans la partie « discussion des résultats ».

▪ **Effet de l'hCG sur l'expression en ARNm d'EG-VEGF**

Une augmentation de l'expression en ARNm d'EG-VEGF est observée pour toutes les concentrations d'hCG, avec une induction maximale sous 10 U.I./mL. L'ensemble de ces résultats est en accord avec les données obtenues pour la sécrétion d'EG-VEGF. Concernant la cinétique d'expression de l'ARNm d'EG-VEGF sous 10 U.I./mL d'hCG, une augmentation significative est observée jusqu'à 12h de traitement.

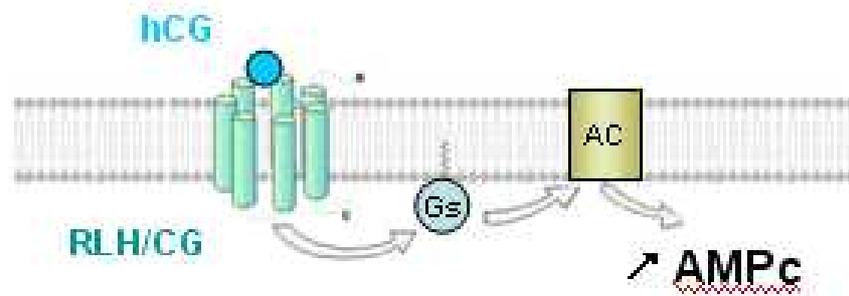


Figure 64 : Voie de signalisation de l'hCG dans le trophoblaste. La liaison de l'hCG sur son récepteur entraîne son association avec la protéine G_s , la stimulation de l'adenylyl cyclase (AC), et l'augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc (Ascoli et al. 2002).

▪ Voie de signalisation de l'hCG dans l'augmentation d'EG-VEGF

Il est bien établi dans la littérature que la liaison de l'hCG sur son récepteur engendre au sein du trophoblaste la stimulation de l'adenylyl cyclase (AC), qui entraîne à son tour une augmentation intracellulaire d'AMPc (voir figure 64) (Ascoli et al. 2002, Menon and Jaffe 1973, Shi Q. J. et al. 1993). Dans nos expériences, nous avons utilisé un activateur de l'AC, la Forskolin (FSK), et montré une augmentation de la sécrétion d'EG-VEGF sous FSK dès 3h, et ce jusqu'à 48h de traitement. Dans des expériences complémentaires, nous avons également observé une augmentation de l'activité promotrice d'EG-VEGF sous AMPc, confirmant ainsi l'effet stimulant de cette voie sur l'expression d'EG-VEGF. Le promoteur d'EG-VEGF possède 2 sites CRE (cAMP response element), qui sont des sites de réponse à l'AMPc. Nos expériences de mutations sur ces CRE ont montré l'implication de ces 2 sites sur l'activation du promoteur par l'AMPc, avec un rôle majeur du site CRE-2. L'ensemble de ces données suggère une régulation de l'expression de l'ARNm d'EG-VEGF par la fixation de facteurs régulateurs en réponse à l'AMPc sur ces deux séquences CRE présentes dans le promoteur d'EG-VEGF.

d) Régulation de l'expression des PROKRs par l'hCG

Au vu de la régulation d'EG-VEGF par l'hCG, nous avons caractérisé les effets de cette hormone sur les récepteurs PROKR1 et PROKR2. Ces deux récepteurs sont exprimés différemment dans la villosité chorale, avec PROKR1 exprimé majoritairement dans les CT et PROKR2 dans les ST (Hoffmann et al. 2006, Hoffmann et al. 2009).

▪ Régulation de l'expression de PROKR1 par l'hCG

Pour l'étude de la régulation de PROKR1 par l'hCG, des cultures primaires de CT du 1^{er} trimestre ont été utilisées et traitées avant leur différenciation en ST (voir figure 62). Nous avons observé une augmentation de l'expression de l'ARNm de PROKR1 uniquement dans des CT traités par 100 U.I./ml d'hCG. Ce même résultat a été confirmé au niveau protéique où l'augmentation de l'expression de PROKR1 n'a été obtenue que pour les CT traités par 100 U.I./ml d'hCG. Des résultats similaires ont été observés sur des coupes d'explants placentaires traités par différentes doses d'hCG pendant 48h. On peut noter une augmentation de l'intensité du marquage dans les trophoblastes uniquement dans les explants traités par 100 U.I./ml d'hCG.

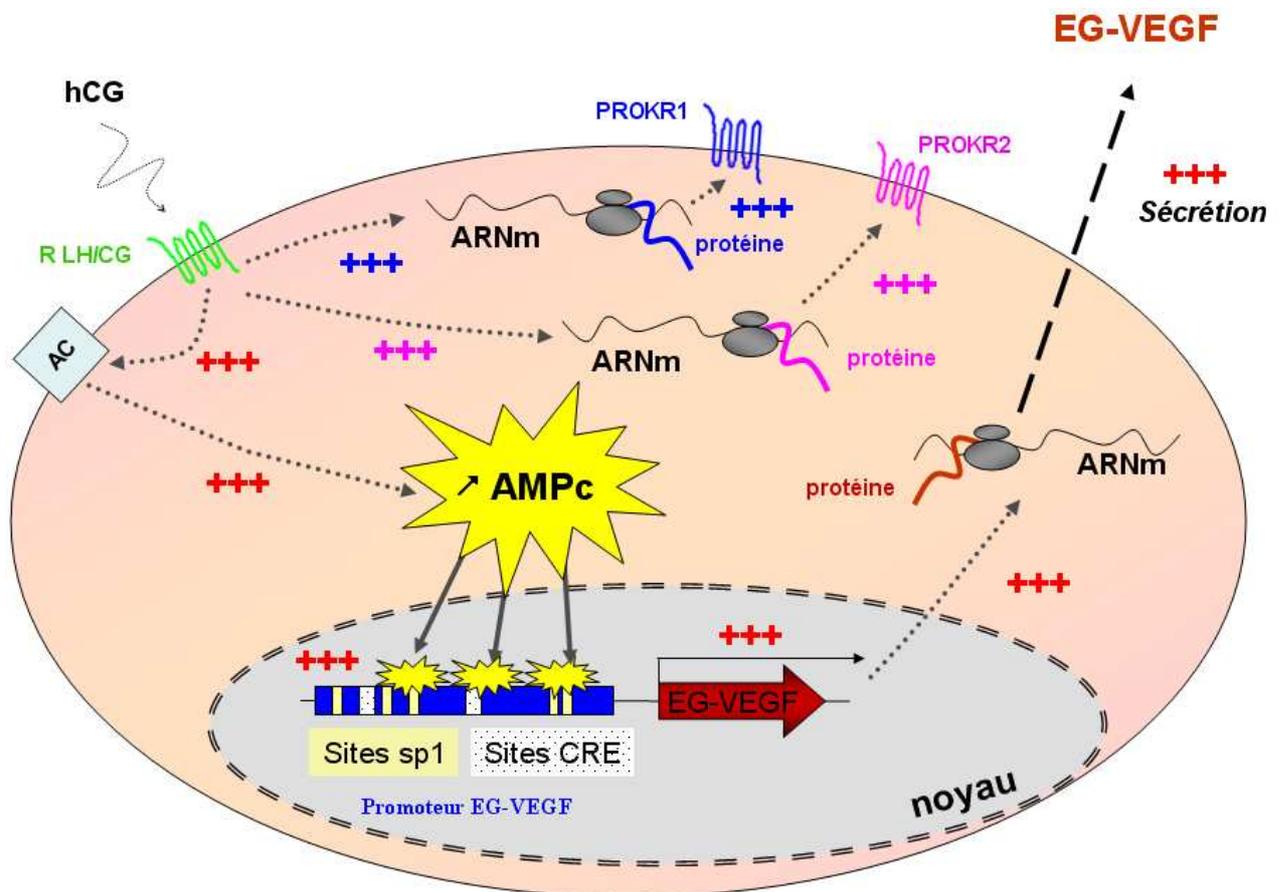


Figure 65 : Schéma récapitulatif de la publication n°2. Dans le trophoblaste, la liaison de l'hCG à son récepteur engendrerait la stimulation de l'adénylyl cyclase. L'AMPc intracellulaire ainsi augmenté va activer des facteurs de transcription, et induire leur fixation sur les séquences régulatrices CRE du promoteur d'EG-VEGF. Cette fixation va avoir pour conséquence l'augmentation de la transcription d'EG-VEGF, et une augmentation de l'expression de l'ARNm. La traduction de ces transcrits ainsi augmentés conduira à une augmentation de la protéine EG-VEGF, et une hausse de sa sécrétion. EG-VEGF ainsi augmenté dans le milieu extracellulaire peut alors stimuler à son tour l'ensemble des cellules de la villosité chorionale. L'hCG augmente également l'expression en ARNm de PROKR1 et PROKR2, ainsi que leur expression protéique. De multiples mécanismes de régulation de l'hCG sur EG-VEGF et les PROKRs sont à envisager, et à caractériser prochainement.

▪ **Régulation de l'expression de PROKR2 par l'hCG**

Pour l'étude de la régulation de PROKR2 par l'hCG, des cultures primaires de ST du 1^{er} trimestre ont été utilisées (voir figure 62). Nous avons observé une augmentation de l'expression protéique de PROKR2 dans les ST traités par 10 U.I./ml d'hCG. L'augmentation de l'intensité du marquage pour PROKR2 dans les trophoblastes des explants traités par 10 U.I./ml d'hCG est en accord avec les résultats précédents. Ces données ont été confirmées au niveau de l'expression en ARNm, avec une induction significative pour 10 U.I./mL.

e) Conclusion : Schéma de synthèse des principales données

La figure 65 fait la synthèse de l'ensemble des données obtenues sur l'effet de l'hCG sur l'expression des transcrits, de la protéine et de la sécrétion d'EG-VEGF dans le trophoblaste. De nombreuses expériences complémentaires sont nécessaires pour connaître avec précision l'enchaînement de ces étapes, ainsi que les mécanismes de régulation et/ou compensation qui se mettent possiblement en place au long de la cascade intracellulaire.

B. Discussion des résultats

a) Récepteur LH/CG dans le placenta humain

L'expression du récepteur LH/CG dans le placenta humain a été rapporté pour la première fois par Alsat (Alsat and Cedard 1974), puis confirmé par d'autres équipes (Reshef et al. 1990). Néanmoins, la caractérisation et la régulation des LH/CGR dans le placenta sont encore très peu documentées. Les sites de son expression et les types de récepteurs exprimés restent toujours controversés. Certaines équipes décrivent le syncytiotrophoblaste comme type cellulaire privilégié pour son expression (Jauniaux et al. 2000a, Licht et al. 1993, Reshef et al. 1990), alors qu'il s'agit du cytotrophoblaste villositaire pour d'autres équipes (Handschuh et al. 2007b, Pidoux et al. 2007a, Pidoux et al. 2007b). Dans l'ensemble de nos expériences, nous avons trouvé le marquage *in vivo* dans la couche de syncytiotrophoblastes dans les villosités chorales placentaires entre 6 et 11 SA.

▪ Régulation de l'expression du récepteur LH/CG par l'hCG

D'après nos données, on note que le LH/CGR semble plus abondant dans les placentas à terme par rapport aux placentas du 1^{er} trimestre. Cela est cohérent avec les données de la littérature qui montrent un rétrocontrôle négatif de l'expression du récepteur LH/CG par l'hCG elle-même, au niveau de l'expression en ARNm et protéine (Licht et al. 1993). Ainsi, on peut penser que la concentration plus basse en hCG à la fin de la grossesse (autour de 10-20 U.I./mL) diminuerait le rétrocontrôle négatif de l'hCG sur son récepteur, et aurait pour conséquence une augmentation de l'expression du LH/CGR.

▪ Fonctionnalité des récepteurs LH/CG au cours du 1^{er} trimestre : une explication possible pour l'existence des deux profils 6-8 SA et 9-11 SA.

Il est établi que l'âge gestationnel des placentas est très important, car il confère des propriétés singulières dans les régulations et la sécrétion d'hormones (Kato and Braunstein 1990, Licht et al. 1993). Des données de la littérature ont décrit que les récepteurs LH/CG étaient tronqués et probablement moins fonctionnels avant 9 SA (Jauniaux et al. 2000a, Licht et al. 1993, Rao Ch V. 1996). La nature exacte des récepteurs tronqués, ainsi que la caractérisation de leur manque de fonctionnalité (données non publiées à ce jour de l'équipe de Rao) restent encore à définir précisément. Toutefois, l'absence de rétrocontrôle de l'hCG

sur sa propre expression et celle de son récepteur dans les placentas de 8-9 SA (Licht et al. 1993), alors qu'il est établi dans le placenta pour d'autres âges gestationnels, apporte un élément favorable supplémentaire à cette hypothèse de fonctionnalité altérée dans les placentas jusqu'à 9 SA. L'implication de cette caractéristique du LH/CGR dans nos résultats concernant l'effet différentiel de l'hCG sur la sécrétion d'EG-VEGF dans des placentas de 6-8 SA et 9-11 SA sera discutée plus bas.

- **Régulation de l'activité des récepteurs LH/CG : une explication possible pour l'augmentation inversement proportionnelle d'EG-VEGF sous hCG à 9-11 SA.**

La signalisation hCG-LH/CGR possède de nombreux niveaux de régulation. Une partie de ces phénomènes touchent le LH/CGR et incluent la désensibilisation (Pidoux et al. 2007b, Segaloff et al. 1990), l'internalisation et/ou la baisse du nombre de récepteurs LH/CG à la membrane par des doses fortes ou prolongées d'hCG (Hoffman et al. 1991, Hu Z. Z. et al. 1990, LaPolit et al. 1990, Licht et al. 1993, Peegel et al. 1994, Pidoux et al. 2007b, Segaloff et al. 1990). Cette régulation négative a été décrite pour être accompagnée également d'une baisse de l'expression en ARNm du LH/CGR, et cela via une augmentation de sa dégradation, phénomène qui semble étroitement lié à la baisse de l'activité de liaison du ligand par le récepteur (pour revue (Menon et al. 2010)). Ces phénomènes, non exclusifs, peuvent possiblement tous intervenir dans la diminution de la signalisation hCG-LH/CGR à mesure que la concentration en hCG augmente, et donc dans l'augmentation inversement proportionnelle de la réponse EG-VEGF sous hCG par les placentas de 9-11 SA. Ces données seront discutées plus précisément plus bas.

b) Sécrétion de l'hCG par le placenta

- **Justification des doses d'hCG utilisées dans les expériences**

Les traitements en hCG utilisés pour nos expériences ont été choisis par rapport aux doses physiologiques de l'hCG au cours de la grossesse. En effet, les concentrations plasmatiques à partir de 6 SA jusqu'au terme sont comprises entre 10 et 100 U.I./mL, ce qui correspond à l'ensemble des doses utilisées dans notre étude. En ce qui concerne les concentrations effectives d'hCG dans nos milieux de cultures, la demi-vie longue de l'hormone (entre 24h et 48h) permettait de stimuler une seule fois les cellules/explants pour la caractérisation des effets de l'hCG sur EG-VEGF et ses récepteurs.

▪ **Sécrétion endogène d'hCG par les trophoblastes en culture**

La production endogène d'hCG par le placenta a été prise en compte dans nos expériences. En nous appuyant sur de nombreuses données (Handsuh et al. 2007a, Pidoux et al. 2007a, Pidoux et al. 2007b), nous avons estimé la sécrétion des trophoblastes nettement inférieure à 1 U.I./mL d'hCG en 48h, et celles des explants placentaires inférieure à 2 U.I./mL d'hCG en 48h. Les doses de traitements des milieux conditionnés reflètent donc bien les concentrations effectives d'hCG dans nos expériences, puisqu'elles sont largement supérieures aux sécrétions trophoblastiques endogènes.

c) Effet de l'hCG sur l'expression d'EG-VEGF au 1^{er} trimestre de grossesse : deux profils différents selon l'âge gestationnel des placentas

Nous avons observé une augmentation de l'expression d'EG-VEGF à des doses différentes d'hCG entre les placentas de 6-8 SA et de 9-11 SA.

▪ **Les placentas de 9-11 SA répondent à des doses plus faibles d'hCG (dès 10 U.I./mL)**

Comme décrit plus haut, des données de la littérature semblent indiquer que les LH/CGR seraient moins fonctionnels jusqu'à 9SA en raison de la présence d'un nombre non négligeable de récepteurs tronqués (Jauniaux et al. 2000a, Licht et al. 1993, Rao Ch V. 1996). Ces récepteurs deviendraient alors fonctionnels après 9 SA. Cette caractéristique des LH/CGR peut expliquer le fait que seule une forte dose d'hCG (de 50 et 100 U.I./mL) activerait ces récepteurs LH/CGR peu fonctionnels dans les placentas de 6-8 SA, menant ainsi à l'augmentation d'EG-VEGF. En revanche, de plus faibles doses d'hCG (à partir de 10 U.I./mL) pourraient activer les récepteurs fonctionnels de l'hCG dans des placentas de 9-11 SA, engendrant ainsi les cascades intracellulaires nécessaires à l'augmentation significative d'EG-VEGF dès 10 U.I./mL d'hCG. La nature exacte des récepteurs tronqués n'est pas encore publiée à ce jour (données non publiées de l'équipe de Rao). Il en est de même pour leur baisse de fonctionnalité, qui peut faire intervenir, entre autres, l'affinité de liaison de l'hCG, les changements conformationnels du récepteur suite à son activation, le couplage LH/CGR avec certaines protéines G, des glycosylations différentielles, l'adressage à la membrane etc. La caractérisation précise de ces récepteurs est une perspective majeure et

indispensable à la compréhension de la signalisation hCG-LH/CGR dans les placentas 6-8 SA.

▪ **L'augmentation d'EG-VEGF est inversement proportionnelle aux doses d'hCG utilisées pour les placentas de 9-11 SA**

Dans nos expériences sur les placentas de 9-11 SA, qui possèdent des récepteurs LH/CG fonctionnels, nous avons été confronté à une baisse de l'augmentation de la sécrétion d'EG-VEGF au delà de 10 U.I./mL d'hCG. Cette inhibition de l'effet de l'hCG sur la sécrétion d'EG-VEGF semble directement proportionnelle aux concentrations d'hCG utilisées

Plusieurs explications non exclusives sont possibles :

- **Désensibilisation, internalisation et régulation négative de l'expression du LH/CGR**

Comme décrit plus haut, le LH/CGR, qui est un RCPG, est soumis à de nombreux processus de régulation de son activation. Ces mécanismes incluent la désensibilisation, l'internalisation et la baisse du nombre de récepteurs à la membrane (par augmentation de leur dégradation et diminution de l'expression des transcrits LH/CGR).

Le phénomène de désensibilisation des récepteurs LH/CG est bien connu dans la littérature pour des fortes concentrations hormonales (Kash and Menon 1998, Menon et al. 2004). Dans l'ovaire, le pic de LH est connu pour causer une désensibilisation de la réponse à l'hormone (ainsi qu'une baisse de l'expression des récepteurs). En effet, la stimulation du récepteur LH/CG engendre une incapacité temporaire à coupler la sous-unité $G_{\alpha s}$, inhibant ainsi l'augmentation de la production d'AMPc (Hunzicker-Dunn and Birnbaumer 1976, Marsh et al. 1973, Segaloff et al. 1990). Ceci provoque une perte de réponse transitoire à la stimulation hormonale, et protège ainsi la cellule des stimulations répétées. La désensibilisation de la réponse à l'hCG est également décrite comme proportionnelle aux concentrations hormonales utilisées (Conti et al. 1976, Herr et al. 2007, Licht et al. 1993, Shi Q. J. et al. 1993), ce qui semble être en adéquation avec nos résultats.

La baisse d'expression à la membrane des récepteurs permet également de protéger la cellule d'une sur-stimulation, via des phénomènes d'internalisation ou de régulation négative de leur expression (augmentation de la dégradation ou baisse de la synthèse). Ces phénomènes

impliquent l'endocytose et l'adressage aux lysosomes des LH/CGR (Ascoli et al. 2002), mais également la baisse d'expression transitoire des transcrits de LH/CGR par une augmentation de leur dégradation (Hoffman et al. 1991, LaPolt et al. 1990, Licht et al. 1993, Lu et al. 1993, Peegel et al. 1994, Segaloff et al. 1990).

L'ensemble de ces phénomènes peut participer à la baisse de l'augmentation d'EG-VEGF sous les doses croissantes d'hCG, observée dans nos résultats sur les placentas de 9-11 SA. Des expériences complémentaires sont à envisager pour définir clairement l'implication de chacun de ces processus dans la baisse de la signalisation hCG-LH/CGR sur EG-VEGF.

Nous pouvons également rapprocher ces données de la littérature de nos résultats obtenus sur l'expression plus importante du LH/CGR dans le placenta à terme. En effet, la concentration physiologique plasmatique en hCG à la fin du 3^{ème} trimestre est aux alentours de 10-20 U.I./ml, concentration bien plus faible que dans le placenta de 1^{er} trimestre, où la concentration en hCG avoisinent les 100 U.I./ml. La concentration modérée en hCG au terme de la grossesse favoriserait donc la diminution des rétrocontrôles négatifs sur le LH/CGR provoqués par les concentrations fortes en hCG, concentrations qui sont retrouvées au 1^{er} trimestre de la grossesse. Ces données sont en adéquation avec nos résultats et appuient l'hypothèse selon laquelle des concentrations supérieures à 10-20 U.I./ml d'hCG entraîneraient une baisse d'expression des récepteurs LH/CG matures, comme ce que nous avons pu observer dans nos expériences. Il est intéressant de garder à l'esprit qu'avant 9 SA, la présence majoritaire de récepteurs LH/CG peu fonctionnels empêcherait l'hCG d'exercer ce rétrocontrôle négatif aux fortes concentrations, que ce soit sur sa propre expression ou sur celle de son récepteur. Il a été suggéré que cela participerait fortement à l'augmentation physiologique de l'hCG jusqu'à son pic aux alentours de 8-9 SA (Licht et al. 1993). Ces données sont en faveur de nos résultats, où nous avons trouvé une augmentation proportionnelle d'EG-VEGF aux doses d'hCG dans les placentas de 6-8 SA, suggérant également un manque de rétrocontrôle dans la signalisation hCG-LH/CGR. Afin de valider cette hypothèse, des études sur la régulation de l'expression du LH/CGR dans les explants placentaires de 6-8SA et 9-11 SA traités par 10 et 100 U.I./ml d'hCG sont prévues prochainement.

9-11 SA

6-8 SA

| | | |
|--|--|--|
| <p>Chez la femme enceinte</p> | <p>Taux de protéines EG-VEGF/Gβ dans le placenta (Unités Arbitraires)</p> <p>Taux plasmatique d'hCG en U.I./ml</p> <p>semaine d'aménorrhée</p> | <p>9-11 SA</p> <p>autour de 70-100 U.I./ml d'hCG</p> |
| <p>Taux plasmatique d'hCG</p> | <p>6-8 SA</p> <p>croissants jusqu'à 100 U.I./ml d'hCG</p> | <p>augmentation modérée d'EG-VEGF (de x1.5 à x2 <i>in vitro</i>)</p> |
| <p>Effet de cette concentration sur la sécrétion placentaire d'EG-VEGF</p> | <p>augmentation très forte d'EG-VEGF (jusqu'à x5 <i>in vitro</i>)</p> | <p>Sécrétion modérée d'EG-VEGF</p> <p>Baisse graduelle à partir de 11 SA de l'expression placentaire</p> |
| <p>Hypothèse</p> | <p>Sécrétion forte d'EG-VEGF</p> <p>Pic d'hCG à 10 SA de l'expression placentaire d'EG-VEGF</p> | <p>Sécrétion modérée d'EG-VEGF</p> <p>hCG à 70-100 U.I./ml</p> |

Figure 66 : Extrapolation de nos résultats dans la physiologie placentaire.

- **L'hCG induit différentes voies de signalisation**

Les concentrations modérées d'hCG sont décrites pour solliciter la voie AMPc (Menon and Jaffe 1973, Menon and Gunaga 1974). Aux fortes concentrations d'hCG, considérés comme « supra-physiologiques » dans la littérature, l'implication probable de la voie PLC est suggérée. Elle conduirait alors à l'augmentation de la production d'IP₃ (Inositol triPhosphate) et de DAG (DiAcylGlycerol) (Davis J. S. et al. 1984, Gudermann et al. 1992). IP₃ est décrit pour augmenter la mobilisation calcique (Berridge and Irvine 1984), et DAG comme un stimulateur de la protéine kinase C (PKC) (Nishizuka 1984). Si le rôle physiologique de l'hCG comme stimulant la production de l'AMPc est relativement bien décrit, son rôle dans l'activation de la voie PLC est bien moins compris (Ascoli et al. 2002). En particulier, le seuil précis au-delà duquel la voie PLC serait déclenchée est encore débattu. Néanmoins, ces données suggèrent la possibilité que l'hCG à 10 U.I./ml et à 100 U.I./ml n'activerait pas les mêmes voies de signalisation, et de ce fait engendrerait des réponses différentes dans la sécrétion d'EG-VEGF par les explants placentaires de 9-11 SA. Cette hypothèse n'est pas particulièrement appuyée par nos résultats, où la diminution graduelle de la sécrétion et de l'expression en ARNm en réponse aux doses croissantes de l'hCG dans les placentas de 9-11 SA, suggère davantage un rétrocontrôle négatif de plus en plus important, plutôt qu'une autre voie de signalisation. Des expériences complémentaires sont à réaliser afin d'infirmier ou de confirmer cette hypothèse. De manière générale, ces mécanismes régulateurs de la signalisation hCG-LH/CGR apportent de nombreuses perspectives expérimentales à tester, afin de définir précisément leur implication dans la signalisation hCG-EG-VEGF.

d) Implication de ces résultats dans l'expression placentaire d'EG-VEGF dans la physiologie humaine au cours du 1^{er} trimestre de grossesse

Les profils différents de sécrétion d'EG-VEGF par des placentas de 6-8 SA et 9-11 SA traités par l'hCG suggèrent une régulation dynamique d'EG-VEGF au cours du 1^{er} trimestre de la grossesse. En effet, les résultats que nous avons obtenus dans nos expériences *ex vivo* peuvent être transposés dans la placentation physiologique. Dans nos expériences sur les placentas de 6-8 SA, nous avons observé une forte augmentation de la sécrétion d'EG-VEGF, de plus de 5 fois la sécrétion basale, pour des traitements de 100 U.I./ml d'hCG pendant 48h. En extrapolant l'impact de ces données dans la physiologie de la femme enceinte, l'ensemble de nos résultats suggère alors que la concentration physiologique en hCG chez la femme

enceinte, qui se situe aux alentours de 100 U.I./mL à 8 SA, provoquerait une sécrétion accrue d'EG-VEGF par les trophoblastes, contribuant ainsi à l'augmentation physiologique d'EG-VEGF au sein du placenta et dans la circulation sanguine aux alentours de 10 SA (voir figure 66, 6-8 SA). En revanche, dans nos expériences sur les placentas de 9-11 SA, nous avons observé une augmentation plus modérée dans la sécrétion d'EG-VEGF sous 100 U.I./ml d'hCG, qui n'est alors plus que de 1.5-2 fois la sécrétion basale environ. Ce changement dans l'augmentation de la sécrétion d'EG-VEGF engendrerait alors une stimulation moindre d'EG-VEGF dans la physiologie, et par conséquent une baisse progressive de l'expression placentaire et de la concentration plasmatique en EG-VEGF (voir figure 66, 9-11 SA).

e) Sécrétion endogène d'EG-VEGF par les explants placentaires

Nous avons observé une différence significative dans la sécrétion basale d'EG-VEGF par les villosités chorales de 6-8 SA et de 9-11 SA. Pour les placentas de 6-8 SA, elle est de 200 pg/ml environ pour 48h, tandis que pour 9-11 SA, elle est de 50 pg/ml environ à 48h (données non publiées). Ces résultats suggèrent qu'au moins une partie des mécanismes physiologiques de régulation de l'expression d'EG-VEGF sont conservés après leur mise en culture, et cela au moins jusqu'à 72h après récupération du placenta. Cette diminution de la sécrétion basale d'EG-VEGF pour les explants de plus de 9 SA corrèle avec nos résultats *in vitro* concernant l'effet de l'hCG sur la sécrétion d'EG-VEGF. En effet, la concentration circulante physiologique d'hCG autour de 6-8 SA atteint au maximum 100 U.I./mL environ, ce qui d'après nos résultats induit une forte augmentation d'EG-VEGF. Or la sécrétion basale de ces placentas en culture est haute, et atteint 200 pg/mL d'EG-VEGF. En revanche, la concentration circulante physiologique d'hCG aux alentours de 9-11 SA atteint 70-100 U.I./mL d'hCG, concentration que nous avons démontrée comme augmentant très modérément EG-VEGF. Nous observons en parallèle que la sécrétion basale des placentas de 9-11 SA n'est que de 50 pg/mL, suggérant ainsi un certain maintien en culture des régulations *in vivo* d'EG-VEGF dans le placenta humain.

f) Effet de l'hCG sur les PROKRs

L'augmentation observée de la sécrétion d'EG-VEGF et de l'expression des PROKRs par l'hCG dans les placentas de 9-11 SA dans nos expériences soulève l'implication possible d'EG-VEGF dans la régulation de ses propres récepteurs. Dans des données non publiées, nous avons observé une régulation différentielle de PROKR1 et PROKR2 par EG-VEGF selon la durée du traitement et la dose d'EG-VEGF utilisée. De façon très intéressante, le

traitement d'explants placentaires pendant 48h par des fortes doses d'EG-VEGF engendre une augmentation de PROKR2, et non de PROKR1.

Cette condition est à rapprocher du traitement à 10 U.I./mL d'hCG, qui provoquait une forte augmentation de la sécrétion d'EG-VEGF, ainsi qu'une forte induction de l'expression de PROKR2, mais pas de PROKR1. Inversement, le traitement d'explants placentaires par des doses modérées d'EG-VEGF (données non publiées) conduisait à une augmentation importante de PROKR1, mais pas de PROKR2. Cette condition, quant à elle, est à rapprocher du traitement à 100 U.I./mL d'hCG, qui induisait une augmentation plus modérée d'EG-VEGF, avec une forte induction de l'expression de PROKR1, mais pas de PROKR2 à 48h de traitement. L'ensemble de ces données suggère que l'effet de l'hCG sur les PROKRs pourrait être dû, au moins en partie, à l'effet d'EG-VEGF sur ces propres récepteurs, sans exclure la participation d'un effet direct de l'hCG via les nombreux éléments de réponse à l'AMPc contenus dans les promoteurs des PROKRs. Des études *in silico* ont montré que le promoteur de PROKR2 contenait davantage d'éléments de réponse à l'AMPc (sites CRE et Sp1) que le promoteur de PROKR1, ce qui pourrait participer également aux effets différentiels de l'hCG sur l'expression de ces deux récepteurs. Des expériences complémentaires sont nécessaires pour caractériser l'implication de ces deux mécanismes dans l'augmentation des PROKRs sous hCG.

C. Conclusion des résultats

L'ensemble de nos résultats montre que l'hCG est un nouveau régulateur d'EG-VEGF et de ses récepteurs. L'importance de la voie AMPc dans la sécrétion et l'activation du promoteur d'EG-VEGF soulève de nombreuses questions quant aux mécanismes précis et aux partenaires recrutés dans les voies de signalisation qui mènent à l'augmentation finale de la sécrétion d'EG-VEGF par le placenta. De nombreuses expériences sont nécessaires pour caractériser avec plus de précision les mécanismes impliqués dans la signalisation hCG-EG-VEGF.

RÉSULTATS
3^{ème} publication

III. EG-VEGF et ses récepteurs dans les pathologies de la grossesse : cas du Retard de Croissance Intra-Utérin (troisième publication)

3.1 Contexte de la troisième publication

Quand j'ai débuté mon travail de thèse, l'expression d'EG-VEGF et de ses récepteurs dans les pathologies de la grossesse d'origine vasculaire, qui représente une partie importante de l'activité de recherche du laboratoire, avait déjà été déterminée et publiée pour la Toxémie Gravidique (Hoffmann et al. 2009). En revanche, aucune donnée n'était disponible pour le Retard de Croissance Intra-Utérin (RCIU), autre pathologie où le placenta joue un rôle clé (Krebs et al. 1996, Regnault et al. 2002, Sibley et al. 2005).

Le développement correct du placenta pendant la grossesse dépend majoritairement de deux types cellulaires : les trophoblastes et les cellules endothéliales fœtales. La croissance placentaire, dont dépend directement la croissance fœtale, requiert de ce fait un contrôle fin dans la prolifération, la survie, et la fonctionnalité de ces deux types cellulaires. L'effet d'EG-VEGF sur les cellules endothéliales fœtales, les HPEC, avait déjà été caractérisé pendant la première partie de ma thèse (voir la partie « Résultats – 1^{ère} publication »). En revanche, peu de données concernant l'effet d'EG-VEGF sur les trophoblastes avaient été publiées jusqu'à présent. Seul l'effet inhibiteur d'EG-VEGF sur la migration, l'invasion et la formation de réseaux pseudo-vasculaires par les trophoblastes extravilleux avait été rapporté (Hoffmann et al. 2009), mais aucune donnée n'était disponible concernant son effet sur les trophoblastes villeux, cellules qui représentent majoritairement les trophoblastes dans la villosité chorale. Les trophoblastes villeux sont constitués d'une couche proliférative de cytotrophoblastes, qui entoure directement le mésenchyme, et d'une couche continue de syncytiotrophoblastes différenciés, qui se trouve en contact direct avec le sang maternel. Il est primordial que cette couche de syncytiotrophoblastes augmente en volume pendant la grossesse, notamment par l'incorporation continue de cytotrophoblastes, afin de répondre à la croissance rapide des villosités placentaires, ainsi qu'à la desquamation physiologique de la couche de syncytiotrophoblastes apoptotiques dans la circulation maternelle (Huppertz et al. 2006). L'expansion de cette couche syncytiale dépend donc du maintien d'une population de

cytotrophoblastes prolifératifs, et capables de fusionner avec la couche préexistante de syncytiotrophoblastes (Huppertz et al. 2006). Il nous semblait de ce fait primordial d'étudier l'effet d'EG-VEGF sur la prolifération, la survie, et la différenciation des trophoblastes vilieux.

Les placentas issus de grossesses RCIU sont le siège de nombreuses altérations pathologiques touchant la prolifération trophoblastique, l'angiogenèse ou l'invasion des artères spiralées maternelles, contribuant ainsi au maintien d'une hypoxie utéro-placentaire anormale (voir la partie « introduction » pour plus de détails) (Allaire et al. 2000, Arroyo and Winn 2008, Chen C. P. et al. 2002, DiFederico et al. 1999, Ishihara et al. 2002, Jackson et al. 1995, Khong et al. 1986, Levy and Nelson 2000, Mayhew et al. 2003, Smith et al. 1997, Torry et al. 2004). De plus, de nombreux facteurs de croissances induits par l'hypoxie ont été rapportés comme dérégulés dans les grossesses RCIU (Arroyo and Winn 2008, Jarvenpaa et al. 2007, McCarthy et al. 2007, Roh et al. 2005). L'ensemble de ces résultats suggérait qu'EG-VEGF, facteur placentaire angiogène régulé par l'hypoxie, pouvait présenter une expression anormale dans cette pathologie de la grossesse.

Dans ce troisième article, nous avons étudié dans un premier temps l'effet physiologique d'EG-VEGF sur les trophoblastes vilieux afin de compléter nos données sur les rôles de ce facteur dans la placentation physiologique. Pour cela, nous avons caractérisé l'effet d'EG-VEGF sur la prolifération des trophoblastes à travers 2 tests complémentaires : l'incorporation de thymidine tritiée par des cytotrophoblastes en culture primaire, et un marquage ki-67 sur des explants placentaires. Nous avons également étudié l'effet d'EG-VEGF sur la survie trophoblastique, ainsi que sur la différenciation des cytotrophoblastes en syncytiotrophoblastes, étape finement régulée et essentielle au développement placentaire. Dans un deuxième temps, nous avons caractérisé l'expression d'EG-VEGF et de ses récepteurs dans des grossesses RCIU au 3^{ème} trimestre de grossesse.

Role of EG-VEGF in normal and pathological pregnancies: Case of IntraUterine Growth Restriction (IUGR).

S. Brouillet^{1,2,3}, P. Hoffmann^{1,2,3,4}, A. Salomon^{1,2,3}, M. Dakouane-Giudicelli⁶, P. De Mazancourt, MN. Dieudonné⁶, S. Barraux⁵, D. Vaiman⁵, P. Rozenberg⁶, M. Benharouga^{2,3,7}, JJ. Fejge^{1,2,3} and N. Alfaidy^{1,2,3}.

¹ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1036, Grenoble, France. ² Commissariat à l'Énergie Atomique, IRTSV, LBBSI, Grenoble, France. ³ Université Joseph Fourier, Grenoble, France. ⁴ Centre Hospitalier Régional Universitaire de Grenoble, Département de Gynécologie, Obstétrique et Médecine de la Reproduction, Grenoble, France. ⁵ Département Génétique et Développement, Institut Cochin, 24 rue du Faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris, France. ⁶ Université de Versailles-St Quentin, Service de Biochimie et Biologie Moléculaire, 78303 Poissy Cedex, France. ⁷ Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 5249, Grenoble, France.

Correspondance: Dr. Nadia ALFAIDY
INSERM U878
iRTSV/LAPV, CEA
17, rue des Martyrs. 38054 Grenoble, Cedex 9, France
Tel: (33) 438 78 35 01
Fax: (33) 438 78 50 58
e-mail: nadia.alfaidy-benharouga@cea.fr

Abstract

Growth of the placental villi is a key event in placental development during the first trimester of human pregnancy. A failure in this process is believed to contribute to the development of placental pathologies such as intrauterine growth retardation (IUGR). Our recent reports unmasked the roles of a new placental growth factor, endocrine gland derived-VEGF (EG-VEGF) and its receptors, prokineticin receptor 1 and prokineticin receptor 2 (PROKR1 and PROKR2) in placental villi development. We have shown that i) EG-VEGF, PROKR1 and PROKR2 are abundantly expressed in first trimester human placenta, ii) EG-VEGF controls extravillous trophoblast invasion and promotes placental angiogenesis iii) EG-VEGF and PROKR1 expression is up regulated by hypoxia and iii) EG-VEGF circulating levels are the highest during the first trimester of pregnancy. In the present study, we investigated EG-VEGF effects on i) trophoblast proliferation, both in primary cytotrophoblast (CT) and in placental explant culture, and trophoblast survival, ii) cytotrophoblast syncytialisation (measurement of syncytin 1 and 2 and β hCG mRNA expression). To further investigate the role of EG-VEGF and its receptors in placental development, we determined their levels of expression both at the mRNA and protein levels, in normal and IUGR placentas. We also determined the circulating levels of EG-VEGF in sera collected from normal and IUGR pregnant women. Our results showed that i) EG-VEGF increased CT proliferation both in primary and explant cultures; ii) EG-VEGF did not affect syncytin 1, syncytin 2 and β hCG mRNA expression iii) EG-VEGF, PROKR1 and PROKR2 mRNA and proteins levels were significantly increased in IUGR placentas, and iv) EG-VEGF circulating levels were significantly higher in IUGR patients. Altogether, our results identify a new trophoblastic growth factor, and provide evidence for its dysregulation in IUGR placentas. Changes in EG-VEGF, PROKR1 and PROKR2 in IUGR placentas are likely to represent a compensatory mechanism for this pathological condition.

INTRODUCTION

It is well established that placental development depends on controlled growth, invasion and differentiation of the trophoblast cells and on adequate vascular development. A failure in these processes leads to the development of placental pathologies such as preeclampsia (PE) or IUGR (intrauterine growth restriction). Therefore a fine control of placental development during the first trimester of pregnancy is critical for the success of pregnancy.

IUGR is the leading cause of perinatal mortality and morbidity and an important antecedent to childhood and adult diseases (Barker 1992, Bernstein et al. 2000, Henriksen 1999). It occurs when the full growth potential of the fetus, depending on genetic potential modulated by nutritional and endocrine environments, is not achieved. IUGR affects approximately 8% of all pregnancies (Baschat 2004, Cetin et al. 2004, Pollack and Divon 1992) and its occurrence is highly related to abnormal placental development (Krebs et al. 1996, Regnault et al. 2002, Sibley et al. 2005). In normal pregnancies, an adequate and efficient supply of nutrients and oxygen is vital for proper development of the fetus. The placenta has a key role in this process via its actions on the transport of nutrients and gases through the placental barrier, composed of syncytiotrophoblast and cytotrophoblast layers (CT), connective tissue and fetal vascular endothelium. Placentas of IUGR pregnancies are characterized by a number of pathological defects, such as increased placental apoptosis (Allaire et al. 2000, DiFederico et al. 1999, Ishihara et al. 2002, Levy and Nelson 2000, Smith et al. 1997), higher thickness of the placental barrier (Mayhew et al. 2003), poor invasion of maternal vessels (Arroyo and Winn 2008, Khong et al. 1986), reduced syncytiotrophoblast area (Mayhew et al. 2003), and aberrant angiogenesis (Chen et al. 2002, Torry et al. 2004).

To date, the causes of IUGR development are not fully understood. However several indications converge to incriminate dysregulations of growth and angiogenic factors during placental development. Various growth factors and cytokines, such as epidermal growth factor (EGF) and transforming growth factor (TGF)- β have been reported to be involved in the coordination of these processes and were reported to be dysregulated in IUGR (Cartwright et al. 1999, Irving and Lala 1995, Lysiak et al. 1993). Also, alterations in the expression of antiangiogenic and angiogenic growth factors, and of hypoxia-regulated genes have been described in IUGR (Arroyo and Winn 2008, Jarvenpaa et al. 2007, McCarthy et al. 2007, Roh et al. 2005). These results suggest that abnormal levels of angiogenic and antiangiogenic growth factors could be in part responsible for the pathophysiology of IUGR. Oxygen

regulation is another factor associated with the occurrence of IUGR. Tapanainen and coworkers demonstrated an association between hypoxia, decreased placental size, and the development of IUGR (Tapanainen et al. 1994). Placental hypoxia is however thought to be a consequence of the primary defect in vascular remodelling of the maternal decidua rather than a cause of the process that leads to IUGR development. Failure in vascular remodelling and in the establishment of the fetomaternal interface is most likely caused by defects in growth and angiogenic factor expression.

During the last decade, we and others have been interested in the study of new angiogenic factor, named EG-VEGF for endocrine gland derived vascular endothelial growth factor, that was initially characterized and sequenced by the group of N. Ferrara (LeCouter et al. 2001). EG-VEGF was shown to be expressed in testis, adrenal gland, ovary, and placenta (LeCouter et al. 2001). EG-VEGF is a member of a class of proteins that also includes Bv8, a peptide purified from the skin secretion of the yellow-bellied toad, *Bombina variegata* (LeCouter et al. 2001), also known as prokineticin (PROK)-2. Human EG-VEGF and Bv8 proteins present 83% identity and share the same G protein coupled receptors (PROKRs), termed PROKR1 and PROKR2 (Lin et al. 2002). EG-VEGF expression in the placenta was briefly described in the initial report by LeCouter *et al.* (LeCouter et al. 2001). In recent publications from our group, we have shown that EG-VEGF/PROK1 and its receptors, but not PROK2, are highly abundant in human placenta during the first trimester of pregnancy, with the highest expression of EG-VEGF found in the syncytiotrophoblast layer. We observed that their expression is up-regulated by hypoxia, that EG-VEGF controls trophoblast invasion and placental angiogenesis, and that its circulating levels are significantly higher in PE patients (Brouillet et al. 2010, Hoffmann et al. 2006, 2007, Hoffmann et al. 2009).

The specificity and the magnitude of EG-VEGF expression in the placenta, its similarity of action with VEGF, its action on placental angiogenesis, its up-regulation by hypoxia and dysregulation in PE, suggested to us that this new factor might play an important role in placental development during the first trimester of pregnancy and that its expression might also be dysregulated in IUGR pregnancies. Here we determined the direct role of EG-VEGF on placental development during the first trimester of pregnancy by demonstrating its effect on trophoblast proliferation, survival, differentiation, and vascular development. Furthermore, we investigated its circulating levels in IUGR and age-matched control pregnant women and compared its levels of expression and those of its receptors PROKR1 and PROKR2 in normal and IUGR placentas.

Materials and Methods

Tissue collection

Collection and processing of human placentas were approved by the local university hospital ethical committee, and collection was performed according to the Grenoble Hospital and University Joseph Fourier code of practice. Informed patient consent was obtained in all cases. First trimester human placentas from 7 to 10 weeks of gestation were obtained from elective terminations of pregnancies. Human term placentas were obtained from uncomplicated or IUGR pregnancies after elective caesarean section delivery between 30 and 36 wk of gestation. Shortly after collection, the tissue was snap-frozen in dry ice and stored at -80°C (for protein and RNA extraction), or placed in ice-cold Hanks' balanced salt solution (Ca^{2+} , Mg^{2+} HBSS) and transported to the laboratory for *in vitro* primary cultures. A total of 15 placentas from 7 to 10 wk of gestation were used for primary culture, and a total of 24 placentas were used for protein and mRNA analysis.

Blood sample collection

Analysis of circulating EG-VEGF levels in IUGR versus age-matched control pregnant women was performed using a bank of sera that has been collected at Hospital Poissy-Saint Germain. All patients received informed consent and the study was approved by the local ethics committee. From this study, we were able to collect 11 sera samples of IUGR patients and 11 sera samples from healthy pregnant women.

EG-VEGF ELISA

EG-VEGF was measured by ELISA (PeproTech, France) in conditioned media from IUGR or normal patients. Two separated standard curves were constructed to allow accurate readings of samples at upper and lower ranges of the assay. All samples were in the linear range of the standard curves. The detection limit of the assay was 16 pg/mL.

Cell culture

Isolation and treatment of trophoblasts

Placental cytotrophoblasts were isolated from first-trimester human placentas (7–10 wk of gestation, $n = 8$) and cultured as previously described (Hoffmann et al. 2006). Trophoblasts were seeded at a density of 10^6 cells/ml in DMEM supplemented with 2 mM glutamine, 10% fetal bovine serum, 25 mM HEPES, 100 IU penicillin, and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin.

Approximately $4\text{--}5 \times 10^6$ cells were obtained per gram of chorionic villi. The dispersed trophoblasts were cultured for 24 h at 37°C in 5% CO_2 -95% air to allow attachment. Purity of the cell preparation was assessed at the end of the experiment by immunofluorescent staining for cytokeratin, an epithelial cell lineage marker (Dako), or vimentin, a mesenchymal cell lineage marker (Dako). After 48 h of culture, both mononucleated cytotrophoblasts and aggregates of placental trophoblasts forming syncytial clumps were observed. $95 \pm 5\%$ of the cultured cells were cytokeratin positive and vimentin negative, suggesting the presence of a majority of cytotrophoblasts and a minority of fibroblasts or decidual cells. Cell viability, assessed by Trypan blue exclusion, was more than 95% before and after incubation.

Human villous explant cultures and EG-VEGF treatment

Villous explants cultures were established from first trimester human placentas (7-10 wk of gestation, $n=7$). Small fragments of placental villi (15-20 mg wet weight) were dissected under a binocular microscope and placed into 48-well plates precoated with 150 μL diluted Matrigel (matrigel/DMEM-F12) (Becton-Dickinson, le Pont de Claix, France) per well that was allowed to polymerize at 37°C for 30 min. Explants were cultured in DMEM-Ham's F-12 (DMEM/F12 1/1; Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplemented with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin, 100 U/mL penicillin, and 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ascorbic acid, pH 7.4. After 24h of culture, the medium was changed and explants were incubated in the absence or presence of 25–100 ng/ml (2.5–10 nM) recombinant human EG-VEGF (Tebu, Le Perray-en-Yvelines, France).. Villous explants were kept in culture for 24h. Explants from a single placenta were used in triplicate for each time point of treatment. For statistical analysis, the (n) value represents the number of placentas (not explants).

Assessment of EG-VEGF effect on trophoblast proliferation

The effect of EG-VEGF was assessed on primary cytotrophoblasts and on placental explants using [^3H] thymidine incorporation and Ki67 staining, respectively. Recombinant human EG-VEGF (Tebu, Le Perray-en-Yvelines, France) was used at 25–100 ng/ml. The choice of these concentrations was based on the IC_{50} of EG-VEGF for its receptors (Lin et al. 2002, Maldonado-Perez et al. 2007). Cells were placed in 48-well plates (7×10^4 cell/well) and cultured overnight (37°C , 5% CO_2). The cells were serum-starved for 24 h and then incubated for 24 h in serum-free media containing 25–100 ng/ml EG-VEGF and 0.5 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ [^3H]thymidine (Amersham, Les Ulis, France). At the end of the incubation, cells were washed with HBSS and treated with 2 ml/well ice-cold 10% trichloroacetic acid for 20 min at RT. After washing, 0.4 ml of 0.1 M NaOH and 0.1% SDS was added; the lysates were transferred into vials containing scintillation liquid and counted in a β counter. For Ki67

staining the placental explant were incubated for 24 h in serum-free media containing 10–100 ng/ml EG-VEGF, fixed in paraformaldehyde for 20 min, and then stained for Ki67 antibody (Dako).

siRNA silencing of PROKR1 protein in primary cytotrophoblast cells

Primary cytotrophoblast cells were transfected with siRNA (50 nM final concentration) targeting human PROKR1 sequence using Siport as transfecting agent (Ambion, France). A non relevant siRNA was used in order to control the specificity of siRNA effect. Proteins and RNAs were extracted 48 h hours after siRNA transfection. All siRNAs were purchased from Ambion (France).

Assessment of EG-VEGF effect on trophoblast survival

Apoptosis was detected on paraffin sections by ApopTag labeling of fragmented DNA (KIT QIA33, Calbiochem, France), according to the manufacturer's instructions. In short, paraffin-embedded sections were deparaffinized, pretreated with proteinase K, rinsed and quenched in 1% H₂O₂. Samples were then incubated with terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT), in the presence of nucleotides. (TdT catalyzes a template-independent addition of nucleotide triphosphates to the 3'-OH ends of double- or single-stranded DNA, and forms an oligomer composed of digoxigenin. The slides were then incubated with stop-wash buffer, incubated with anti-dioxigenin peroxidase complex, rinsed and stained with chromogen. Sections were counterstained with Mayers hematoxylin. A dark brown signal indicates positive staining while blue-green to greenish colour signifies a nonreactive cell.

Immunohistochemistry

Placental tissues of 30-36 wg (n=12) IUGR and age-matched controls (n=12) were collected and fixed for 24 hrs at 4°C in 4% (v/v) PFA, embedded in paraffin and processed as previously described (Hoffmann et al. 2006). Immunoreactive PROKR1 and PROKR2 were detected using in house rabbit polyclonal antibodies, CD31 and Ki67 staining were detected using commercial antibodies (Dako, France). For immunohistochemical detection, anti-PROKR1 and anti-PROKR2 antibodies were incubated with the tissue sections for 18 hrs at 4°C and used at final concentrations of 0.56 µg/ml and 0.72 µg/ml, respectively. Control sections were treated with anti-PROKR1 and anti-PROKR2 antibodies that had been pre-absorbed overnight at 4°C with the appropriate pre-immune serum.

Western blotting analysis

Frozen placental samples from IUGR (30-36 wg ; n=11), from age-matched controls (n=11), and from cytotrophoblast cells were homogenized in RIPA lysis buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 1% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulphate, 1% Triton X-

100, 1 mM PMSF, 5 µg/ml leupeptin and 5 µg/ml aprotinin) and processed as previously described (Hoffmann et al. 2006). Protein extracts were electrophoretically separated on 0.1% sodium dodecyl sulphate–12% polyacrylamide gels and electrically transferred onto 0.45 µm nitrocellulose membranes. The membranes corresponding to tissue samples were blotted with rabbit antibodies against PROKR1, PROKR2, both used at a final concentration of 0.84 µg/ml, and with anti-CD31 antibodies. Membranes corresponding to cell extracts were blotted with anti-AKT and anti-phospho-AKT antibodies (Cell Signalling, France). To standardize for sample loading, the blots were stripped and re-probed with an anti-Gβ antibody (Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA).

RNA isolation

Total RNA was extracted from IUGR and normal placental tissue using the Trizol reagent (Invitrogen, USA) according to the manufacturer's instructions. To remove any genomic DNA contamination, total RNA was treated with RNase-free DNase I treatment (Qiagen). Total RNA concentration was carefully determined by measuring A260 in a total volume of 2 µL using Nanodrop. A260/A280 was also determined for each sample, and the values ranged between 1.80 and 1.90. Reverse transcription was performed on 1 µg total RNA with Superscript II-RNase H reverse transcriptase (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) under conditions recommended by the manufacturer. Real-time PCR was performed using specific primers listed in supplemental table 1.

Real-time PCR analysis

PROKR1, PROKR2, βhCG, ST1, ST2 and GAPDH mRNA expression was quantified by real-time RT-PCR using a Biorad CFX96 apparatus and GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, Charbonnières Les Bains, France). The PCR was performed using the primers shown in Table 1. For negative controls, we used a complete DNA amplification mix in which the target cDNA template was replaced by water. PCR conditions were: step 1, 94 C for 10 min; step 2, 45 cycles consisting of 95 C for 15 sec, temperature indicated in Table 1 for 5 sec, and 72 C for 10 sec. The results were normalized to GAPDH mRNA expression levels. To assess linearity and efficiency of PCR amplification, standard curves for all transcripts were generated by using serial dilutions of cDNAs. For standard-curve generation, we used cDNAs from human placenta or untreated trophoblast cells. A melt curve analysis was carried out on the products of amplification reaction to ascertain the melting temperature of the product.

TABLE 1. Primers used for real-time (RT) PCR

| Gene | Forward primer (5'–3') | Reverse primer (5'–3') | Temperature (C) |
|--------|-------------------------|--------------------------|-----------------|
| PROKR1 | GTCTCGTCATTGTCAAGAGCC | AAACACGGTGGGGAAGAAGTCG | 60 |
| PROKR2 | CATCCCATCGCCTTACTTTGC | CTTTTCCTTCACGAACACAGTGG | 60 |
| βhCG | TACTGCCCCACCATGACC | GGACTCGAAGCGCACATC | 60 |
| ST1 | CGGACATCCAAAGTGATACATCT | TGATGTATCCAAGACTCCACTCCA | 60 |
| ST2 | GCCTGCAAATAGTCTTCTTT | ATAGGGGCTATTCCCATTAG | 60 |
| GAPDH | ACCCAGAAGACTGTGGATGG | TTCTAGACGGCAGGTCAGGT | 60 |

Desmoplakin Immunofluorescence

To detect desmoplakin, cultured trophoblast cells were rinsed with PBS, fixed and permeabilized in methanol at -20°C for 25 minutes. A monoclonal anti-desmoplakin antibody (Abcam, France) was then applied, followed by fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-mouse immunoglobulin (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Wet Grove, PA), as previously described (Alsat et al., 1996; Frenco et al., 2000b). After washing, samples were mounted in medium with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) for nuclear staining (Vector laboratories, France).

Statistical analysis

All data are expressed as mean \pm SE. Statistical comparisons were made using one-way ANOVA test and Student's t test. Calculations were performed using SigmaStat (Jandel Scientific Software, San Rafael, CA).

TABLE 2.

| | Normal pregnancies (n = 22) | IUGR pregnancies (n = 24) | P |
|-------------------------------------|-----------------------------|---------------------------|-------------|
| Age (years) | 31 \pm 4,5 (25-36) | 30 \pm 3,3 (25-35) | ns |
| Gestational age at sampling (weeks) | 35 \pm 2,4 (30-35,5) | 34 \pm 2,4 (30-36,3) | ns |
| fœtal weight (gr) | 3135 \pm 258 (2810-3380) | 1485 \pm 550 (670-2550) | ** P<0.0001 |

Results

EG-VEGF effect on Cytotrophoblast Proliferation

In a previous report from our group (Brouillet et al. 2010), we have shown that EG-VEGF increases the proliferation of human placental microvascular endothelial cells (HPECs). Here, we investigated the effect of EG-VEGF on the proliferation of cytotrophoblast (CT) cells using both primary isolated trophoblast cells and placental explants. Fig. 1A shows the effect of EG-VEGF on the proliferation of CT using [³H] thymidine incorporation in cytotrophoblast cells. EG-VEGF significantly increased CT proliferation in a dose-dependent manner. As CT cells are known to preferentially express the PROKR1 receptor, we asked whether PROKR1 mediates these proliferative effects of EG-VEGF using the siRNA strategy to silence its expression. Fig. 1B shows that PROKR1 siRNA suppressed the EG-VEGF effect, thereby confirming its direct involvement. It is well documented that the mitogenic effects of EG-VEGF involve the induction of p42/44MAPK phosphorylation (Kisliouk et al. 2003). We examined whether EG-VEGF activates this signaling pathway in primary cytotrophoblast cells. Fig. 1C shows a representative Western blot analysis of phospho-MAPKs upon EG-VEGF treatment. Strong phosphorylation of p42/44 MAPKs protein was observed in response to EG-VEGF after only 10 min of incubation.

To confirm the effect of EG-VEGF on CT proliferation, we used the organotypic model of placental explants. It was particularly relevant to study EG-VEGF effects on trophoblast proliferation in an organotypic system in which villous tissue architecture is maintained. This is the case for ex vivo cultures of placental villous explants on Matrigel gels. We determined the proliferative effects of EG-VEGF by Ki67 immunostaining in explants collected at 10wg. Fig. 2A shows representative sections of placental explants that have been incubated in the absence or the presence of EG-VEGF (50 ng/ml) for 24h and immunostained for Ki67. There was a significant increase in the number of Ki67positive cytotrophoblasts both in chorionic villi (B) and in placental columns (D). The quantification of three independent experiments determined a 2- to 4-fold increase in the proliferation index in each site under EG-VEGF treatment (fig. 2B). Altogether these data suggest that EG-VEGF behaves as a new trophoblastic growth factor in the placental villi during the first trimester of pregnancy.

EG-VEGF controls the survival of placental villi

To get more insight into the role of EG-VEGF in placental villi growth, we investigated its potential effect on cell survival upon 48h-long serum starvation of the organotypic cultures. First, we performed TUNEL staining of placental villi that have been incubated in the absence or presence of EG-VEGF (10- 50 ng/ml) for 24h. TUNEL staining was used to detect apoptotic cells. Under control conditions, serum starvation increased TUNEL staining (brown staining) suggesting increased apoptosis in the placental villi under these conditions. The treatment of the explants with EG-VEGF reversed this phenomenon (Fig. 3A). These results suggest that EG-VEGF may act as a survival factor for the placental villi during first trimester of pregnancy. As the pro-survival effects of EG-VEGF on other cell types imply the activation of the PI3K/AKT pathway (Kisliouk et al. 2003), we examined whether EG-VEGF did so in primary placental explants. Fig. 3B shows a representative Western blot analysis of AKT phosphorylation upon EG-VEGF treatment. Strong phosphorylation of AKT protein in response to EG-VEGF was observed within 2 min. Quantification of three independent western blotting experiments is shown in Fig. 3C.

EG-VEGF effect on trophoblast syncytialisation

Placental trophoblast differentiation is an important phenomenon for normal placental development. Under physiological conditions, cytotrophoblasts differentiate and fuse to form the multinucleated epithelium known as the syncytiotrophoblast, site of numerous placental functions. The fusogenic membrane glycoproteins: syncytin-1 and syncytin-2 (respectively encoded by the retroviral envelop genes HERV-W and FRD) are critical to this process (Blaise et al. 2003, Frendo et al. 2003, Potgens et al. 2002). Trophoblast differentiation also enhances the secretion of two hormones, human chorionic gonadotrophin (hCG) and placental lactogen (Kliman et al. 1986, Morrish et al. 1998, Shi et al. 1993). Production of hCG by the syncytiotrophoblast is a biological marker of trophoblast differentiation (Shi et al. 1993). Here, we assessed the effect of EG-VEGF on cytotrophoblast syncytialisation by measuring syncytin-1, syncytin-2 and β -hCG mRNA expressions in trophoblastic cells after 24h exposure to 50 ng/mL of EG-VEGF (Fig. 4A). No significant effect of EG-VEGF was observed on the expression of these mRNAs. A range of EG-VEGF concentration (10-100 ng/mL) and time exposure (24h; 48h;72h and 120h) were tested but no condition showed any effect of EG-VEGF on trophoblast differentiation (data not shown). However, the same cells responded positively to forskolin (50 μ M) for trophoblast syncytialization after 24h (Fig. 4B), 48h and 72 h (data not shown). Syncytialization can also be followed morphologically using

intercellular junctions markers such as desmoplakin to identify mononuclear and multinuclear cell boundaries and morphology (Douglas and King 1990). Quantification of nuclei within desmoplakin boundaries following 24h treatment with EG-VEGF did not show any effect on syncytialization (Fig. 4C), confirming the absence of EG-VEGF effects on cytotrophoblast differentiation towards syncytium formation. Fig. 4D is a quantification of the number of syncytia formed in the absence or presence of EG-VEGF as determined in 40 fields per condition.

EG-VEGF increases placental vascularization

Because the vascular system within the placental villi drives its growth and development during the first trimester of pregnancy, we wondered whether EG-VEGF also affected this aspect of placental growth. Fig. 5A shows placental explants that have been incubated in the absence or presence of 50 ng/ml EG-VEGF and stained for CD31, a marker of endothelial cells. EG-VEGF treatment significantly increased CD31 staining, suggesting an increase in the number of blood vessel formed. Fig. 5B confirmed this increase in a Western blot analysis showing a dose-dependent increase in CD31 expression under EG-VEGF treatment. Fig. 5C shows a quantification of three independent Western blot analyses.

Levels of carbonic anhydrase, an endogenous hypoxia marker, in normal and IUGR pregnancies

We then hypothesized that EG-VEGF might be dysregulated in placental pathologies associated with growth and vascularization defects, such as IUGR. Hence, we investigated its expression and that of its receptors PROKR1 and PROKR2 in a bank of sera and placental tissues collected from normal and IUGR patients during the third trimester of pregnancy.

Hypoxia has been demonstrated to contribute to the development of IUGR (Tapanainen et al. 1994) (Tanaka et al. 1994). In the bank of tissues collected for this study, we first wanted to confirm that IUGR placentas were hypoxic. Fig. 6A shows two representative control and two representative IUGR sections collected at 30 and 35 wg and stained for carbonic anhydrase IX (CA IX), a sensitive marker of hypoxic tissues. As expected, the level of CA IX protein was up-regulated in IUGR chorionic villi as compared to the control. Quantification of Western blot analyses of 7 controls and 7 IUGR matched for their gestational age showed a significant increase in the expression of CA IX in IUGR tissues (Fig. 6B and Fig. 6C).

EG-VEGF circulating levels and placental expression are increased in IUGR pregnancies

The combination of our previous data showing that EG-VEGF is abundantly expressed in human placenta during the first trimester of pregnancy (Hoffmann et al. 2006), that EG-VEGF decreases EVT invasion (Hoffmann et al. 2009) and that its expression is up-regulated by hypoxia (Hoffmann et al. 2006) suggested to us that EG-VEGF and PROKRs expression might be altered in IUGR pregnancies. We therefore compared EG-VEGF circulating levels in normal and IUGR patients during the third trimester of pregnancy. Fig. 7A shows that EG-VEGF levels were significantly higher in the IUGR group as compared to the control group ($P < 0.05$). This value increased almost two-fold in IUGR patients. Fig. 7B shows two representative controls and two representative IUGR sections collected at 30 and 35 wg and stained for EG-VEGF. EG-VEGF protein expression was significantly increased in IUGR placentas and was mostly localised to the syncytiotrophoblast layer, its site of production.

PROKR1 and PROKR2 in normal and IUGR pregnancies

As EG-VEGF acts via its two receptors PROKR1 and PROKR2, we wondered whether these receptors were also dysregulated in IUGR placentas. Both mRNA and protein assessments were performed using placental tissues collected between 30 and 35 wg; Fig. 8A shows placental tissue mRNA expression of PROKR1 and PROKR2 using quantitative Real-time PCR analysis. Both PROKR1 and PROKR2 mRNA levels were significantly increased in the IUGR placentas ($P < 0.001$). Fig. 9A shows representative photographs of PROKR1 and PROKR2 protein expression in control and IUGR placentas. For both receptors an increase in the intensity of the staining was observed. These results were confirmed by Western blotting analysis, when a larger number of placentas were analysed in each group (Fig. 9B and 9C).

Discussion

The present work demonstrated the direct involvement of EG-VEGF in the growth of the placental villi during the first trimester of pregnancy and brought evidences of its dysregulation and in that of its receptors in the major placental pathology, IUGR. Hence, we propose that EG-VEGF is a new placental growth factor that should be ranked among the well described placental actors of these processes. These statements are based on three main observations. First, is the demonstration that EG-VEGF increased the proliferation of villi and anchoring cytotrophoblast cells, without affecting their differentiation toward the formation of syncytium. These results are of great interest in term of physiological perspective as this specific effect on cytotrophoblast cells is mandatory for the continuous growth of the villi in a hypoxic environment during the first trimester of pregnancy. By increasing the proliferation of anchoring cytotrophoblast cells, EG-VEGF participates to the formation of trophoblast plugs that are well described to protect the growing villi, and therefore the embryo from harmful high oxygen levels for which he is not equipped at that gestational age. The absence of effect of EG-VEGF on syncytium formation is also an important aspect that support a differential effect of the EG-VEGF on the growth but not the differentiation of cytotrophoblast cells, a process that is well described during this period of gestation. Second, is the demonstration that EG-VEGF is a survival factor for the placental villi under stressful conditions. This result was observed upon serum starvation of explants villi *in vitro*, but clearly reflects what could happen when the placenta is subjected to diverse stressors such as those found in IUGR environment. The increase in EG-VEGF and its receptors levels we demonstrated in IUGR patients is a confirmation of this speculation and suggest that the EG-VEGF/ PROKR1 and PROKR2 might well be a compensatory system for placental development under stressful conditions. Third, is the demonstration that EG-VEGF increased the vascularisation of the placental villi, that was reflected by an increase in CD31 expression. This result further supports an involvement of this factor in the development of the villi during the first trimester of pregnancy, a process that is major for the establishment of the fetomaternal exchanges. The effect of EG-VEGF on CD31 expression is consistent with our previous finding showing EG-VEGF effects on microvascular angiogenesis in human placenta (Brouillet et al. 2010). In the context of the IUGR pathology the increase in EG-VEGF and receptors observed in this study further supports the hypothesis that this system could be a compensatory mechanism in response to vascularisation defects associated to

IUGR placentas. In fact, studies by Chen and coworkers showed a significant decrease in villi vascular density within the IUGR placentas, suggesting a decrease in branching angiogenesis during this disease (Chen et al. 2002). One can therefore speculate that EG-VEGF is increased in response to failure in the vascular system development in IUGR.

Speculations about EG-VEGF and receptors as compensatory actors in case of placental development defects are to take with precaution as another explanation for the elevation of EG-VEGF and receptors system could be drawn in respect to the control of EVT invasion by EG-VEGF during the first trimester of pregnancy. In fact, we have previously demonstrated that EG-VEGF is a negative regulator of EVT migration and invasion, two crucial processes in spiral arteries remodelling (Hoffmann et al. 2009). One can therefore speculate that a sustained expression of EG-VEGF over the first trimester of pregnancy, in response to external stimuli; might contribute to failure in EVT invasion. A defect that is known to be a major cause for the development of uteroplacental hypoxia, a central phenomenon to most IUGR pregnancies (Khong et al. 1986, Zhou et al. 1997). Furthermore, it is well known that an association exists between hypoxia, decreased placental size, and the development of IUGR (Tapanainen et al. 1994). Given the correlation between the pattern of EG-VEGF and PROKR1 expression within the hypoxic period of placental development and knowing that failure in placental angiogenesis is thought to contribute to IUGR development, one can speculate on the potential implication of this factor and/or its receptors in the development of this pathology. However, only a prospective study examining the expression of EG-VEGF and/or receptors during the first trimester of pregnancy in women who go on to develop IUGR will allow to determine whether elevated expression of this factor in third trimester of IUGR pregnancies is a cause or a consequence of the pathology.

Here, we appended to EG-VEGF functions, mostly reported by our group in the placenta, a new role directly related to placental growth and development. Interestingly, recent finding from our team further support the proposal that EG-VEGF is not an independent actor in the villi and that its profile of secretion is most likely under a fine regulation by strong placental stimuli. In fact, we have reported that EG-VEGF and receptors are up regulated by hypoxia and by hCG (human chorionic gonadotropin), two key actors of normal placental development and which dysregulation is established in pregnancy pathologies.

Altogether, our results show that EG-VEGF can be considered as a novel growth factor in the placenta via its stimulatory effects on proliferation and survival of cytotrophoblastic cells, its inhibition of EVT invasion and migration (Hoffmann et al. 2009), and via its angiogenic

effect on placental endothelial cells (Brouillet et al. 2010). Further studies are however required to determine whether its dysregulation is a cause or consequence of IUGR pathology.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the staff of the Department of Gynecology/Obstetrics (Pr. F; Sergent) at the University Hospital of Grenoble for giving us access to human placentas. We acknowledge the following sources of funding: INSERM (U1036), University Joseph Fourier, Commissariat à l'Energie Atomique (DSV/iRTSV/BCI), the Région Rhône-Alpes (CIBLE-2008). S.B. was supported by doctoral scholarships from the French Ministry of Education and Research and from the Fondation pour la Recherche Médicale.

Figures Legend

Figure 1. EG-VEGF stimulates cytotrophoblast proliferation via PROKR1. **Fig. 1A** shows the levels of [3H]Thymidine incorporation into serum-deprived cytotrophoblast cells, in the absence (white bar) or presence of EG-VEGF at indicated concentrations (black bars) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus control). Data represent the mean \pm SEM of triplicate determinations from three independent experiments. **Fig. 1B** shows the levels of [3H]Thymidine incorporation into serum-deprived cytotrophoblast cells that have been transfected with scramble siRNA or PROKR1 siRNA (0, 10, 25, 50 nM) and subsequently treated with EG-VEGF (* $p < 0.05$ versus control). Data represent the mean \pm SEM of triplicate determinations from three independent experiments. **Fig. 1C** shows a representative Western blot of phospho-MAPK after treatment of cytotrophoblast cells with 50 ng/mL of EG-VEGF. Standardization of the protein signals was done with antibodies against MAPK.

Figure 2. EG-VEGF increases the proliferation of villous and anchoring cytotrophoblast cells in placental explants. **Fig. 2A** shows Ki-67 staining of placental explants treated or not with 50 ng/mL EG-VEGF. Photographs in A and C show Ki67 staining in control placental villi and a placental column, respectively. Photographs in B and D show the same staining after EG-VEGF treatment. **Fig. 2B** shows percentage of Ki67 positive cytotrophoblast cells quantified in three independent experiments. Data represent the mean \pm SEM of triplicate (* $p < 0.05$ versus control).

Figure 3. EG-VEGF effect on apoptosis in placental villi. **Fig. 3A** shows representative photographs of TUNEL staining (in brown) in placental explants that have been treated or not with EG-VEGF. First-trimester placental explants were treated for 24 h with EG-VEGF and then fixed in 4% buffered formaldehyde, paraffin embedded, and processed for TUNEL staining. **Fig. 3B** shows a representative Western blot of AKT phosphorylation after treatment with 50 ng/mL of EG-VEGF. Standardization of the protein signals was done with antibodies against AKT. Quantification of the intensity of the bands is illustrated in **Fig. 3C**. Data represent the mean \pm SEM of triplicate determinations (* $p < 0.05$ versus control).

Figure 4. EG-VEGF effect on cytotrophoblast syncytialisation. **Fig. 4A** shows quantitative RT-PCR analysis of syncytin-1, syncytin-2, and β -hCG mRNA levels after 24h exposure to EG-VEGF. **Fig. 4B** shows effect of forskolin (50 μ M) on primary trophoblast syncytialisation (positive control). **Fig. 4C** shows syncytial fusion of primary trophoblasts in the absence or presence of EG-VEGF, using desmoplakin staining. Desmoplakin boundaries are stained in green and nuclei in blue. **Fig. 4D** shows a quantification of the number of syncytia formed per field. Data represent the mean \pm SEM of triplicate determinations (* $p < 0.05$ versus control).

Figure 5. EG-VEGF effect on the vascularisation of first trimester placental villi. **Fig. 5A** shows representative photographs of CD31 staining (in brown) in placental explants that have been treated or not with EG-VEGF. **Fig. 5B** shows a representative Western blot for CD31 protein after treatment of placental explants with 10-25-50 and 100 ng/ml of EG-VEGF. Standardization of the protein signals was done with antibodies against β -actin. Quantification of the intensity of the bands is illustrated in **Fig. 5C**. Data represent the mean \pm SEM of triplicate determinations (* $p < 0.05$ versus control).

Figure 6. Carboxic anhydrase (CA9) expression in IUGR vs control placentas. **Fig. 6A** shows representative photographs of CA9 staining (brown) in control and IUGR placentas at

30 and 35 weeks of gestation. **Fig. 6B** shows a representative western blot of CA9 expression in control and IUGR. Standardization of the protein signals was done with antibodies against beta actin. Quantification of the intensity of the bands is illustrated in **Fig. 6C**. Data represent the mean \pm SEM of triplicate (* $p < 0.05$ versus control).

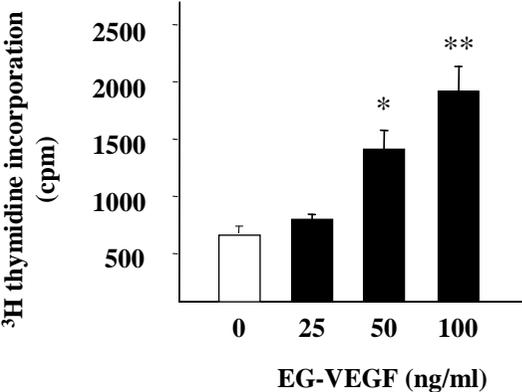
Figure 7. EG-VEGF expression is up-regulated in IUGR pregnancies in the third trimester. **Fig. 7A** shows EG-VEGF serum levels in normal and IUGR pregnant women (30-36 WG). 11 serum samples from normal and 11 serum samples from IUGR pregnancies were analysed. EG-VEGF levels were measured by ELISA. (* $p < 0.05$). **Fig. 7B** shows chorionic villi sections immunostained with anti-EG-VEGF antibody. Villous cytotrophoblasts and syncytiotrophoblasts were positively stained. A strong immunostaining of EG-VEGF was observed in IUGR chorionic villi.

Figure 8. PROKR1 and PROKR2 mRNA expression in placental tissue from normal and IUGR pregnancies in the third trimester. **Fig. 8A** shows a quantification of PROKR1 mRNA levels expression in placental tissues from normal and IUGR pregnancies. 15 normal and 15 IUGR placentas were analysed (***) $p < 0.001$). **Fig. 8B** shows a quantification of PROKR2 mRNA levels expression in placental tissues from normal and IUGR pregnancies in the third trimester. 15 normal and 15 IUGR placentas were analysed (***) $p < 0.001$).

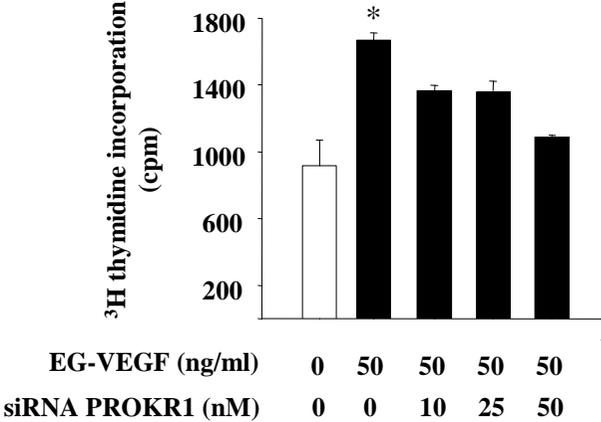
Figure 9. PROKR1 and PROKR2 protein expression in placental tissue from normal and IUGR pregnancies in the third trimester. **Fig. 9A** shows representative photographs of PROKR1 and PROKR2 stainings in control and IUGR placentas **Fig. 9B** shows representative western blots of PROKR1 and PROKR2 expression in control and IUGR. Standardization of the protein signals was done with antibodies against beta actin. Quantification of the intensity of the bands is illustrated in **Fig. 9C**. Data represent the mean \pm SEM of triplicate (* $p < 0.05$ versus control).

Figure 1

A



B



C

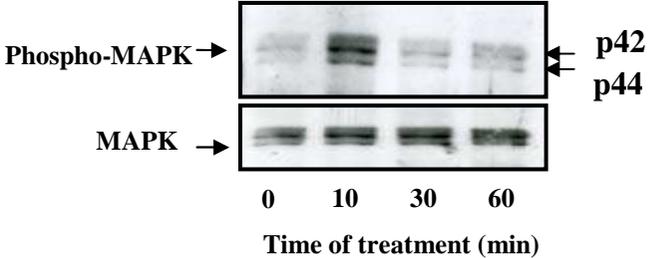
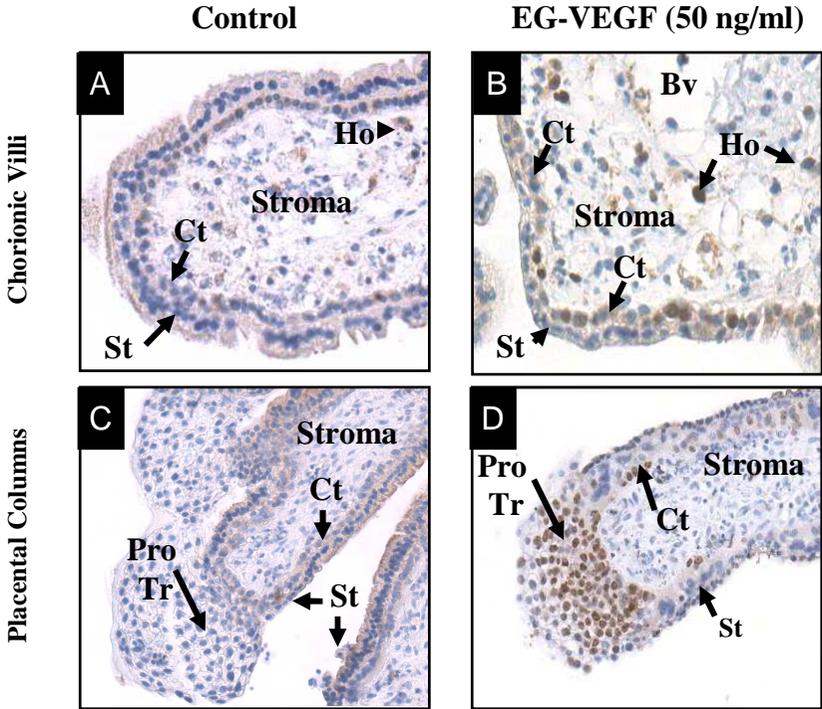


Figure 2

A



B

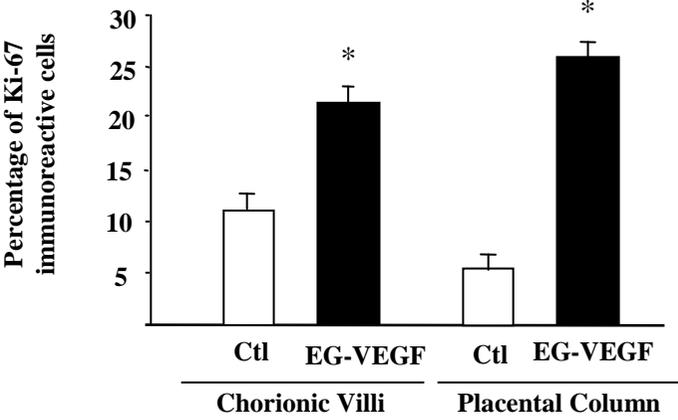


Figure 3

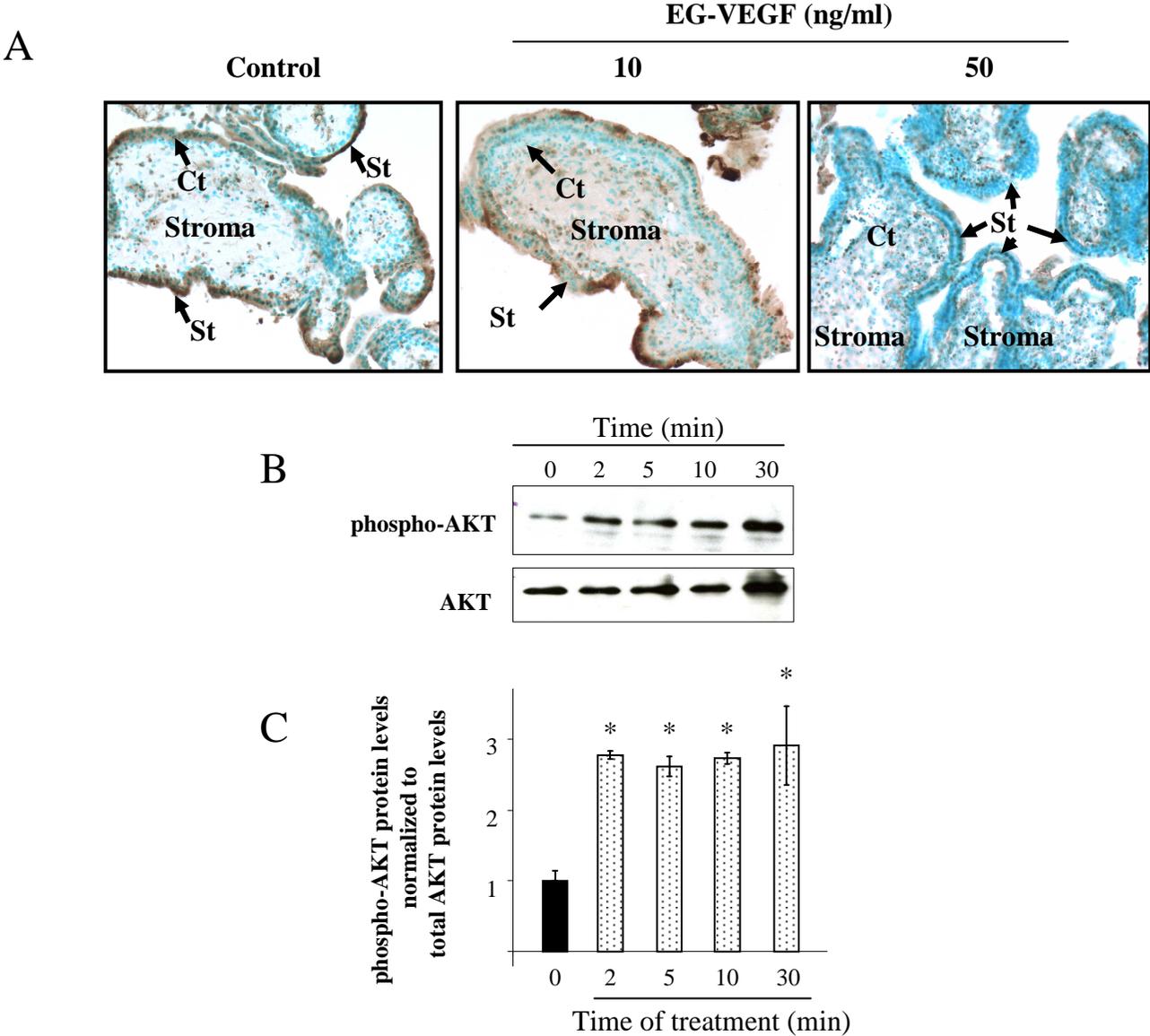


Figure 4

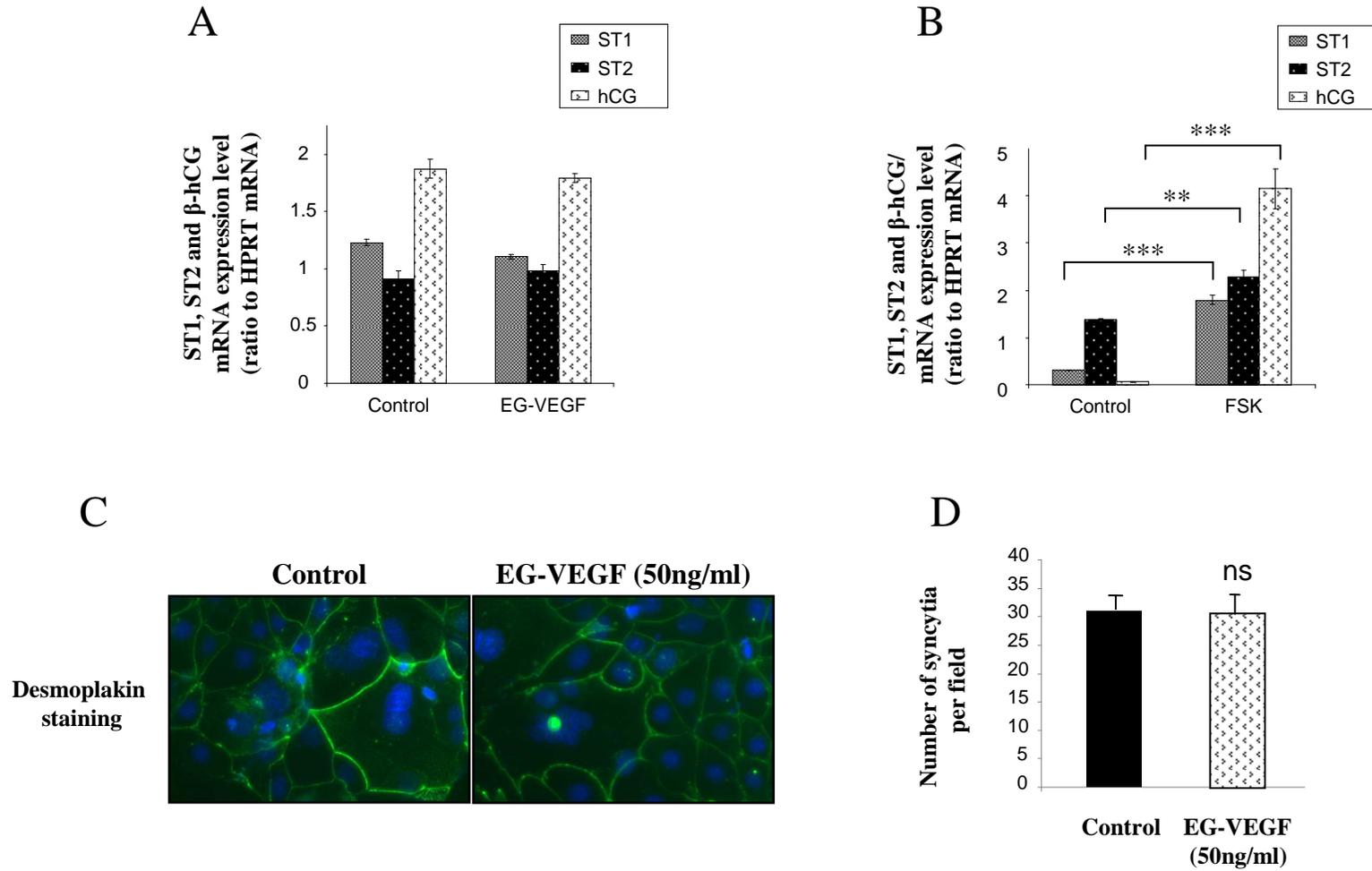
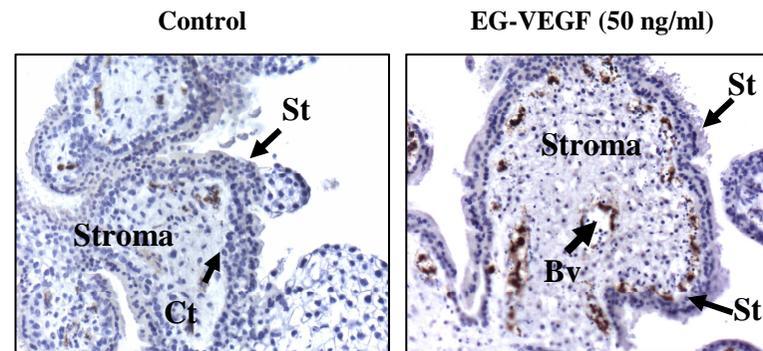
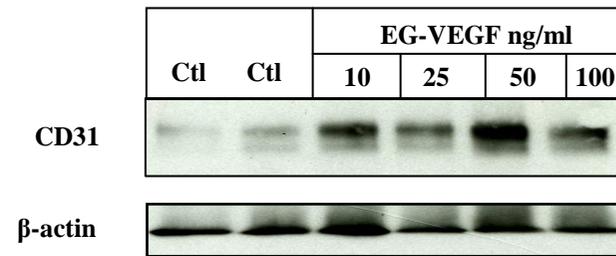


Figure 5

A



B



C

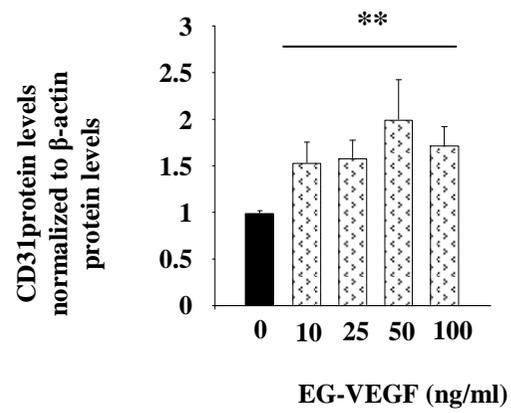


Figure 6

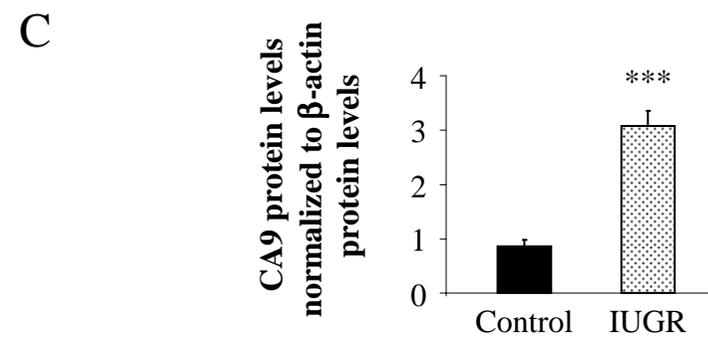
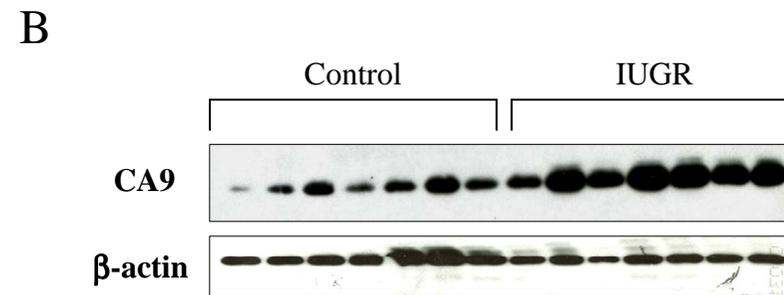
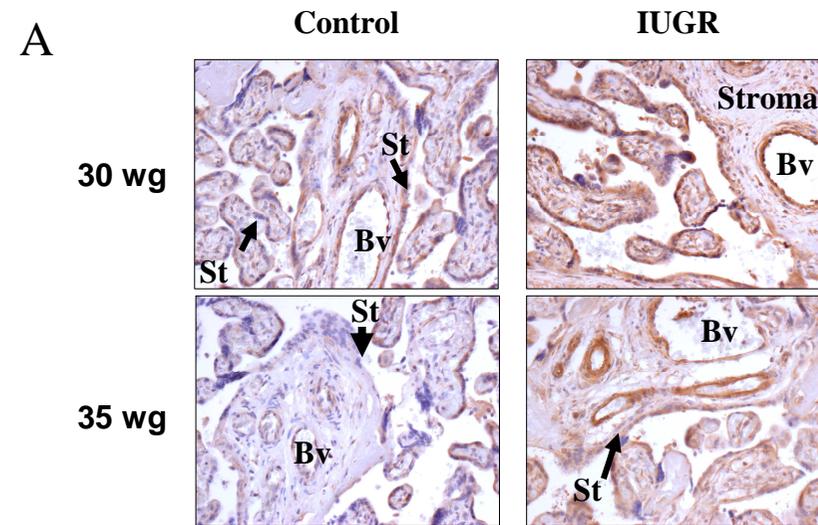


Figure 7

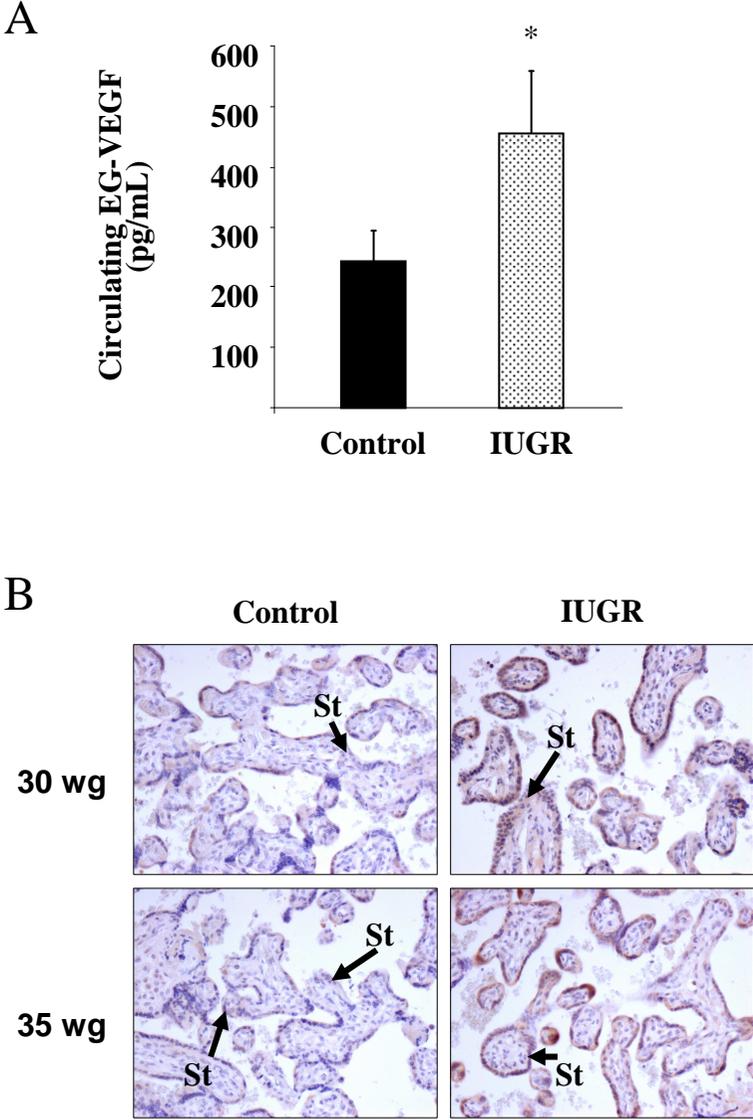


Figure 8

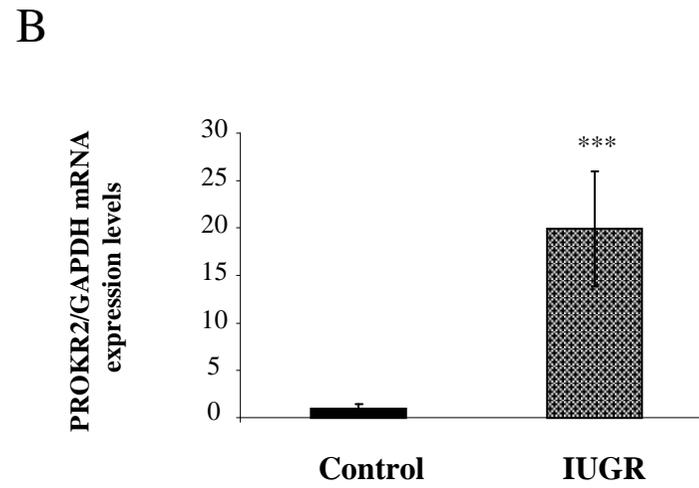
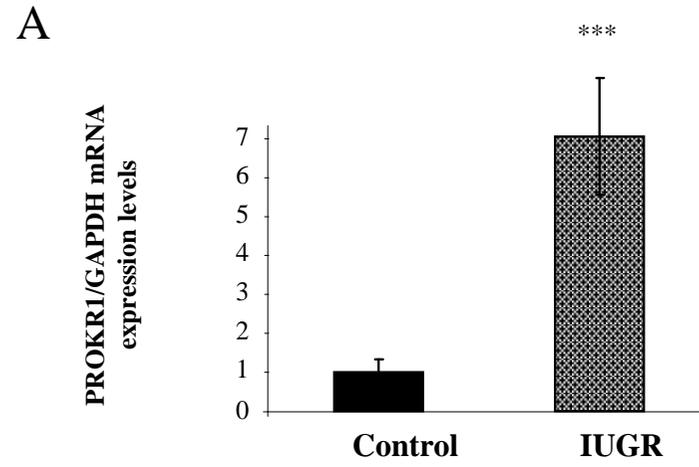
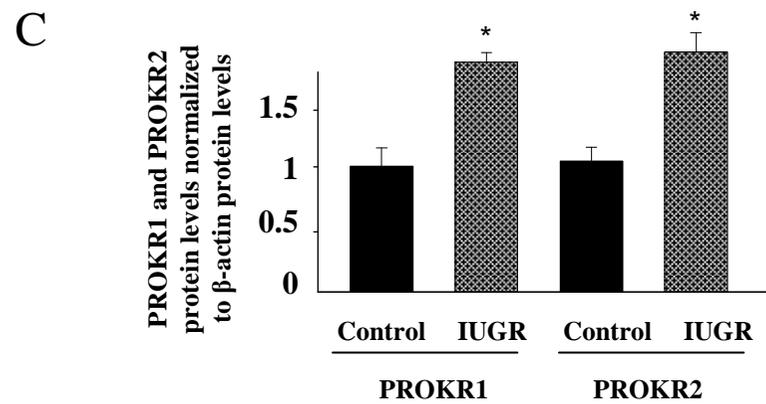
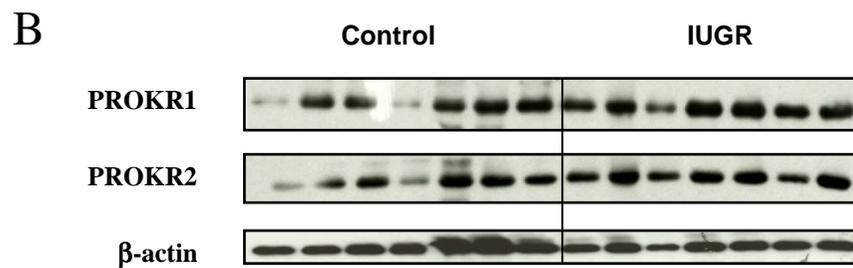
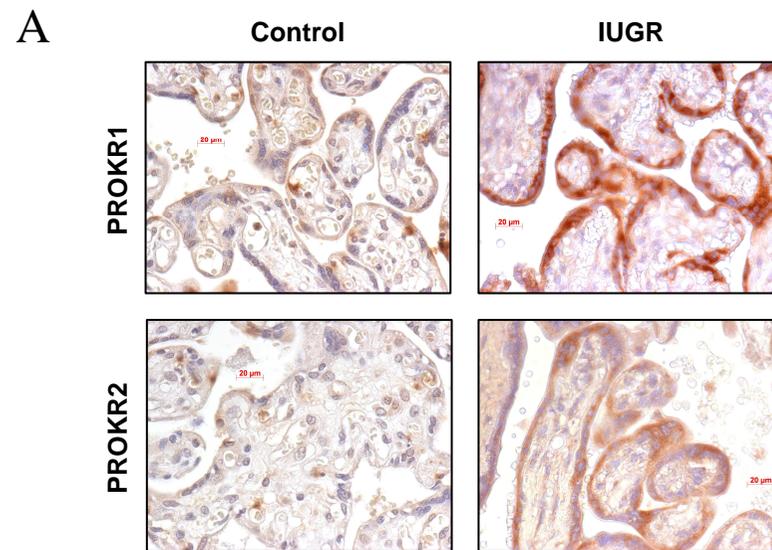


Figure 9



3.2 Discussion de la troisième publication

Dans cet article, nous avons caractérisé l'effet d'EG-VEGF sur la prolifération, la survie et la différenciation des trophoblastes en culture primaire. Nous avons dans un deuxième temps déterminé les niveaux circulants, ainsi que l'expression d'EG-VEGF et de ses récepteurs dans les grossesses RCIU de troisième trimestre.

A. Bref résumé des résultats

a) Effet d'EG-VEGF sur les trophoblastes

A travers nos expériences, nous avons pu compléter les rôles d'EG-VEGF dans la placentation physiologique, et ainsi démontrer qu'il était un facteur de croissance de la villosité placentaire. En effet, nous avons déterminé qu'EG-VEGF était un stimulant de la prolifération trophoblastique via son récepteur PROKR1, et qu'il avait un effet significatif sur la survie des trophoblastes. Par contre, aucun effet n'a été caractérisé sur la différenciation des cytotrophoblastes en syncytiotrophoblastes, ce qui semble démontrer que ce facteur n'intervient pas dans ce processus de différenciation trophoblastique. Dans des publications antérieures du laboratoire, nous avons démontré qu'EG-VEGF inhibait l'invasion des trophoblastes extravilleux, et stimulait l'angiogenèse des cellules endothéliales microvasculaires placentaires. L'ensemble de nos données montre qu'EG-VEGF joue un rôle important dans le développement du placenta en agissant sur différents types cellulaires placentaires (voir la partie « discussion » pour plus de détails).

b) Expression d'EG-VEGF et des PROKRs dans les grossesses RCIU

Nous avons démontré que les taux circulants d'EG-VEGF étaient significativement augmentés dans les sera de patients RCIU au 3^{ème} trimestre de la grossesse. De plus, une surexpression importante des ARNm et des protéines de PROKR1 et PROKR2 a été démontrée dans les placentas de ces grossesses pathologiques.

c) Conclusion

EG-VEGF est un facteur important pour la croissance trophoblastique. L'expression du système EG-VEGF/PROKRs est fortement augmentée dans les grossesses RCIU au 3^{ème} trimestre de la grossesse.

B. Discussion des résultats

a) Rôle différentiel d'EG-VEGF sur les trophoblastes villeux et extravilleux

EG-VEGF possède des rôles opposés sur les TEV et les trophoblastes villeux (TV). En effet, il inhibe fortement la prolifération (données non publiées), la migration et la formation de réseaux pseudo-vasculaires via PROKR2, ainsi que l'invasion par les trophoblastes extravilleux (Hoffmann et al. 2009). En revanche, il augmente significativement la prolifération (via PROKR1), et la survie des trophoblastes villeux. Une explication possible pourrait être le niveau différentiel des récepteurs PROKR1 et PROKR2 dans ces deux types cellulaires. En effet, les TEV expriment très majoritairement PROKR2 (Hoffmann et al. 2009), alors que les TV expriment presque exclusivement PROKR1 (Hoffmann et al. 2006). Des données récentes de la littérature attribuent des effets spécifiques à chacun des récepteurs d'EG-VEGF, avec en particulier une implication de PROKR1 dans les effets stimulants d'EG-VEGF sur la prolifération, la survie et l'angiogenèse (Urayama et al. 2007, Urayama et al. 2008). L'expression préférentielle de PROKR1 par les TV pourrait expliquer, au moins en partie, les effets positifs d'EG-VEGF sur la prolifération et la survie, processus qui sont fortement inhibés dans les TEV, qui expriment majoritairement PROKR2. Des répertoires de protéines G ou des voies de signalisation spécifiques à ces deux types cellulaires peuvent également participer aux effets particuliers des PROKRs, qui sont deux RCPG. De nombreuses expériences complémentaires sont à réaliser pour comprendre l'effet opposé d'EG-VEGF sur les TEV et les TV.

b) Facteur(s) responsable(s) de l'augmentation d'EG-VEGF dans les grossesses RCIU

L'augmentation d'EG-VEGF dans les sera de patientes RCIU soulèvent la question des facteurs responsables de cette dérégulation, et de leur mécanisme. Plusieurs explications non exclusives sont envisageables. Tout d'abord, l'hypoxie placentaire, qui est un facteur associé aux grossesses RCIU (Tapanainen et al. 1994), pourrait contribuer à l'augmentation d'EG-VEGF et des PROKRs, décrites comme induites par ce facteur, et possédant des éléments de réponse à l'hypoxie dans leur séquence promotrice (Hoffmann et al. 2006, LeCouter et al. 2001). Une autre explication possible serait une augmentation de sécrétion d'EG-VEGF par les placentas RCIU. EG-VEGF est produit très majoritairement par les syncytiotrophoblastes

(Hoffmann et al. 2006). De ce fait, sa surexpression au 3^{ème} trimestre dans les grossesses RCIU suggère une possible augmentation de la différenciation trophoblastique dans cette pathologie. Des données de la littérature confirment cette hypothèse. Elles démontrent la baisse des cytotrophoblastes prolifératifs dans les grossesses RCIU, et la différenciation accrue de cytotrophoblastes prolifératifs prématures en syncytiotrophoblastes (Fitzgerald et al. 2011, Newhouse et al. 2007). Ces différences sont suggérées comme étant à l'origine de l'augmentation de l'expression sérique de marqueurs de la couche syncytiale (Fitzgerald et al. 2011), ce qui est complètement extrapolable pour EG-VEGF. En revanche, l'augmentation rapportée de l'apoptose trophoblastique dans les grossesses RCIU (Ishihara et al. 2002, Levy and Nelson 2000, Smith et al. 1997), et en particulier des syncytiotrophoblastes, pourrait être responsable de la diminution rapportée de l'aire syncytiotrophoblastique dans les grossesses RCIU (Arroyo and Winn 2008, Mayhew et al. 2003). De nombreuses expériences complémentaires sont nécessaires à l'amélioration de la compréhension des mécanismes qui mènent à la dérégulation d'EG-VEGF et de ses récepteurs dans les grossesses RCIU.

c) Augmentation d'EG-VEGF : cause ou conséquence du RCIU ?

L'augmentation d'EG-VEGF et de ses récepteurs dans les placentas issus de grossesses RCIU ne concernent ici que le 3^{ème} trimestre. Ces résultats doivent être considérés avec beaucoup de retenue vis-à-vis de l'extrapolation des taux de ce facteur et de ses récepteurs au 1^{er} trimestre dans des grossesses RCIU. En effet, plusieurs facteurs décrits comme augmentés au 2^{ème} et 3^{ème} trimestre, ont été inversement décrits comme inhibés au 1^{er} trimestre de grossesse ; inhibition et augmentation étant significativement associées au RCIU respectivement. Par exemple, pour la PPAP-A et la β -hCG libre, plusieurs équipes ont montré que leur diminution au 1^{er} trimestre de grossesse était associée significativement au développement d'un RCIU (Dugoff et al. 2004, Kirkegaard et al. 2011, Krantz et al. 2004, Montanari et al. 2009, Spencer et al. 2008) alors que c'était leur augmentation qui était associée avec le RCIU au 2^{ème} et au 3^{ème} trimestre de grossesse (Audibert et al. 2005, Gagnon et al. 2008, Odibo et al. 2006, Toal et al. 2008). Seul un dosage effectif d'EG-VEGF au cours du 1^{er} trimestre dans des grossesses RCIU permettra de savoir s'il existe un taux anormal de ce facteur, et s'il est associé avec l'apparition de maladies de la grossesse comme le RCIU. Des travaux antérieurs du laboratoire avaient établi la dérégulation d'EG-VEGF dans une autre pathologie de la grossesse, la Toxémie Gravérique (Hoffmann et al. 2009).

Ces données concernaient le 3^{ème} trimestre de grossesse également, ce qui ne permettait pas de déterminer si l'augmentation d'EG-VEGF était une cause ou une conséquence de la pathologie.

C. Conclusion des résultats

Nous avons montré qu'EG-VEGF avait des effets significatifs sur la prolifération et la survie des trophoblastes, mais n'avait pas d'effet sur leur différenciation en syncytiotrophoblastes. Ces résultats suggèrent qu'EG-VEGF serait impliqué dans la constitution et le maintien d'une population proliférative de trophoblastes, ce qui est crucial pour l'établissement de la coque trophoblastique dans la physiologie placentaire. Les trophoblastes prolifératifs sont également impliqués indirectement dans le maintien de la couche de syncytiotrophoblastes, cellules fortement apoptotiques qui ne prolifèrent pas, et qui sont de ce fait dépendantes de l'incorporation continue de cytotrophoblastes par fusion dans la couche syncytiotrophoblastique préexistante. Enfin, la population de trophoblastes prolifératifs est également déterminante dans la constitution des colonnes d'invasion au niveau des villosités crampons, préparant ainsi « une réserve » de cytotrophoblastes pour la phase de remodelage des artères spiralées maternelles par les TEV. Sans pouvoir le démontrer, l'ensemble de nos données suggère qu'une dérégulation d'EG-VEGF au cours du 1^{er} trimestre de grossesse pourrait entraîner des dysfonctionnements importants du développement placentaire, et ainsi participer à la mise en place du RCIU ou de la TG.

RÉSULTATS

Conclusion générale

Etude EGEVE

Lors de votre première échographie obstétricale, votre échographiste pourra vous proposer de participer à l'étude EGEVE qui se déroule au CHU de Grenoble.

L'objectif de cette étude est de déterminer si l'EG-VEGF molécule naturellement présente dans le sang, peut permettre de détecter précocement les grossesses à risque de certaines complications vasculaires.

N'hésitez pas à en parler à votre échographiste

Une indemnité est prévue

Merci de soutenir la recherche clinique

Pour toute information complémentaire sur l'étude, Veuillez contacter le Centre d'Investigation Clinique de Grenoble : 04 76 76 92 60



Figure 67 : Affiche de l'étude clinique EGEVE, en collaboration avec le service de Gynécologie-Obstétrique du CHU de Grenoble et du CIC de Grenoble.

IV. Conclusion générale des trois publications

En conclusion de ce travail, nous avons pu montrer qu'EG-VEGF agit sur de nombreux types cellulaires placentaires, et qu'il joue de ce fait un rôle important dans la placentation. Son rôle significatif dans le développement placentaire via son action sur les trophoblastes et les cellules endothéliales microvasculaires HPEC, son expression physiologique maximale au cours du 1^{er} trimestre de la grossesse, et la dérégulation significative de tout le système EG-VEGF/PROKRs au 3^{ème} trimestre dans les grossesses RCIU, suggèrent qu'une dérégulation précoce de son expression pourrait conduire à de graves altérations de la placentation, et ainsi participer potentiellement à l'établissement de pathologies de la grossesse comme le RCIU ou la Toxémie Gravidique. La découverte d'un marqueur prédictif pour ces pathologies serait une avancée majeure dans la prévention des risques associés à ces grossesses pathologiques, où la croissance fœtale est gravement altérée, et représente une cause majeure de mortalité périnatale (Kady and Gardosi 2004). Un dépistage précoce des fœtus à risque permettrait une surveillance appropriée, limitant ainsi au maximum la souffrance fœtale, et permettant d'identifier avec plus de précision le moment optimal pour la survenue de l'accouchement, tout en respectant le critère « bénéfiques mère/fœtus ».

Des expériences complémentaires sur l'expression d'EG-VEGF et de ses récepteurs au cours du 1^{er} et 2^{ème} trimestre dans des grossesses pathologiques permettront d'établir leurs implications dans la survenue du RCIU ou de la Toxémie Gravidique. Dans le cadre de l'étude DHOS/INSERM que notre équipe a développé avec le service de Gynécologie-Obstétrique du CHU de Grenoble, nous sommes actuellement au cours d'étude clinique (Etude EGEVE, voir figure 67) en collaboration avec le CIC de Grenoble et le service de Gynécologie-Obstétrique, afin de déterminer si EG-VEGF pourrait être considéré comme un marqueur du développement de la TG et/ou du RCIU. Cette étude est financée par un contrat DHOS/INSERM, qui a été accordé en 2009 aux Dr. Alfaidy et au Dr. Hoffmann, investigatrices scientifiques et cliniques. Cette étude comprend la collecte sur deux ans de sera prélevés entre 14 et 18 SA sur 500 patientes environ. Nous devrions ainsi obtenir entre 25 à 30 grossesses avec TG, environ 15 grossesses avec RCIU au 3^{ème} percentile, et 50 grossesses au 10^{ème} percentile. Cette étude nous permettra de déterminer si les concentrations sériques d'EG-VEGF sont significativement dérégulées au début du 2^{ème} trimestre de la grossesse dans ces pathologies de la grossesse, et si c'est le cas, si elles ont une valeur pronostique dans la survenue du RCIU et/ou de la TG.

Cette étude devrait nous permettre d'établir si EG-VEGF peut représenter un marqueur précoce de la survenue de ces deux pathologies de la grossesse, en association ou non avec d'autres facteurs décrits comme spécifiquement dérégulés dans ces deux pathologies, comme le récepteur soluble de type 1 du VEGF (sVEGFR-1), l'hCG, ou l'endogline soluble par exemple.

DISCUSSION

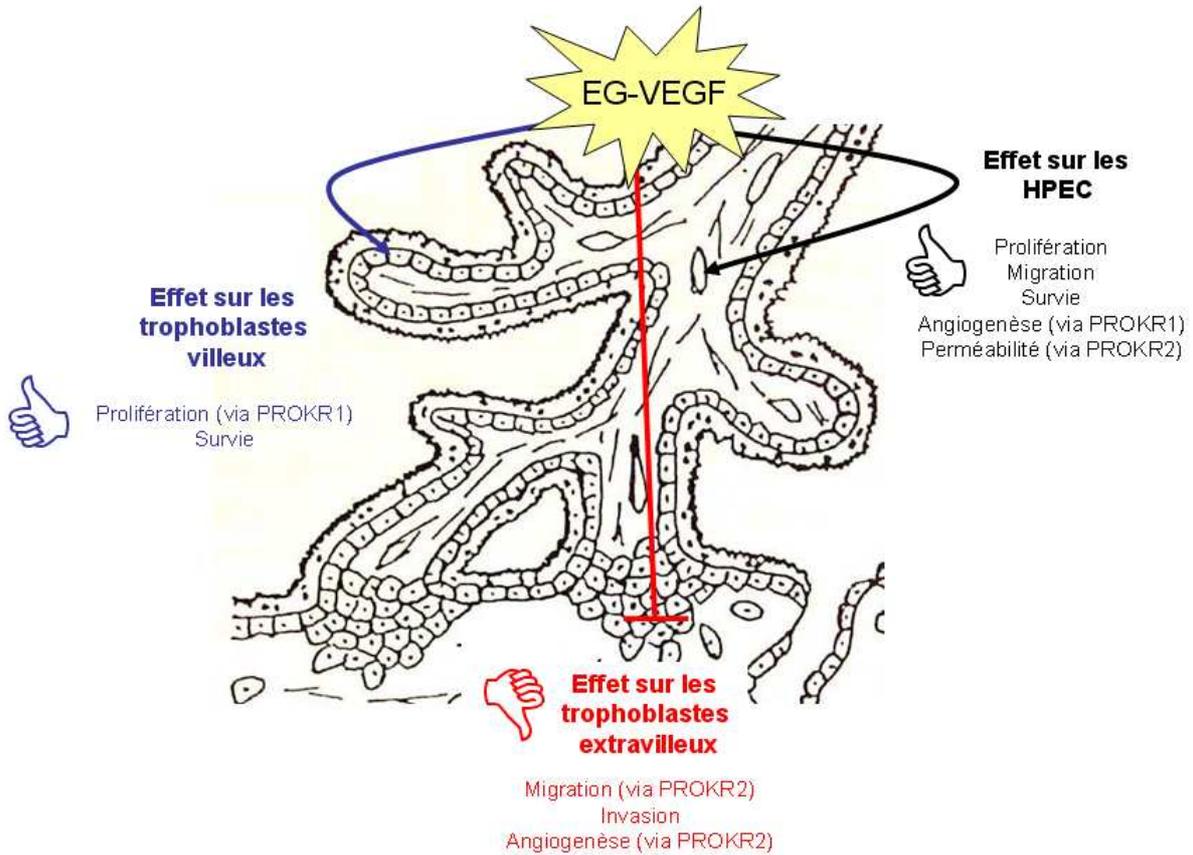


Figure 68 : Schéma récapitulatif des effets d'EG-VEGF dans la villosité chorale. EG-VEGF, sécrété majoritairement par les syncytiotrophoblastes, agit différemment sur les types cellulaires de la villosité chorale. Il induit une augmentation de la prolifération (via PROKR1) et de la survie des trophoblastes villosaires. En revanche, il diminue la migration et l'angiogenèse (via PROKR2), ainsi que l'invasion des TEV. Enfin, il induit une augmentation de la prolifération, la migration, la survie, l'angiogenèse (via PROKR1) et la perméabilité (via PROKR2) des HPEC. Schéma de la villosité adapté de (Fournier et al. 2007).

A travers l'ensemble de nos résultats, nous avons montré qu'EG-VEGF était un facteur important pour le développement placentaire, par ses actions sur de nombreux types cellulaires de la villosité chorale (voir figure 68), ainsi que par sa dérégulation dans deux pathologies de la grossesse. Son expression importante dans le placenta, avec un pic pendant le 1^{er} trimestre, lui confère une spécificité d'expression, contrairement aux facteurs VEGF et PlGF. L'ensemble de ces caractéristiques pourrait en faire une cible de choix comme marqueur du développement placentaire.

I. EG-VEGF dans la physiologie placentaire

L'ensemble des données obtenues pendant ma thèse permet d'intégrer EG-VEGF dans de multiples processus de la physiologie placentaire. De plus, son expression majoritaire par les ST, et la finesse de sa régulation par l'hCG, suggèrent qu'un dérèglement modéré pourrait avoir des impacts majeurs sur le développement placentaire, et par conséquent sur la croissance fœtale. Nos résultats ouvrent de larges perspectives sur son implication dans des processus physiologiques et pathologiques.

1.1 EG-VEGF, un effet différentiel sur les TV et les TEV

A. Implication potentielle dans le maintien d'une faible pO₂ au cours du 1^{er} trimestre

Au début du 1^{er} trimestre de la grossesse, les cytotrophoblastes des villosités crampons prolifèrent jusqu'à former la coque trophoblastique, qui semble présente à partir de 5 SA et disparaît peu à peu à partir de 10 SA. Cette coque tient un rôle très important dans le maintien de la grossesse, et protège les villosités chorales, qui ne possèdent pas encore d'enzymes anti-oxydantes, du sang oxygéné maternel. Nous avons montré qu'EG-VEGF augmentait la prolifération des cytotrophoblastes en culture de façon dose dépendante via PROKR1 (publication n°3). De plus, nous avons également établi que l'hCG augmentait très fortement la sécrétion d'EG-VEGF par des explants placentaires jusqu'à 9 SA, et cela de façon proportionnelle à la dose d'hCG utilisée (publication n°2). L'ensemble de ces résultats suggère que l'expression physiologique croissante de l'hCG jusqu'à 8-9 SA pourrait être responsable en partie de la forte augmentation de l'expression d'EG-VEGF par la villosité chorale (voir partie « discussion des résultats » de la publication n°2). Cette augmentation

entre 5 SA et 9 SA

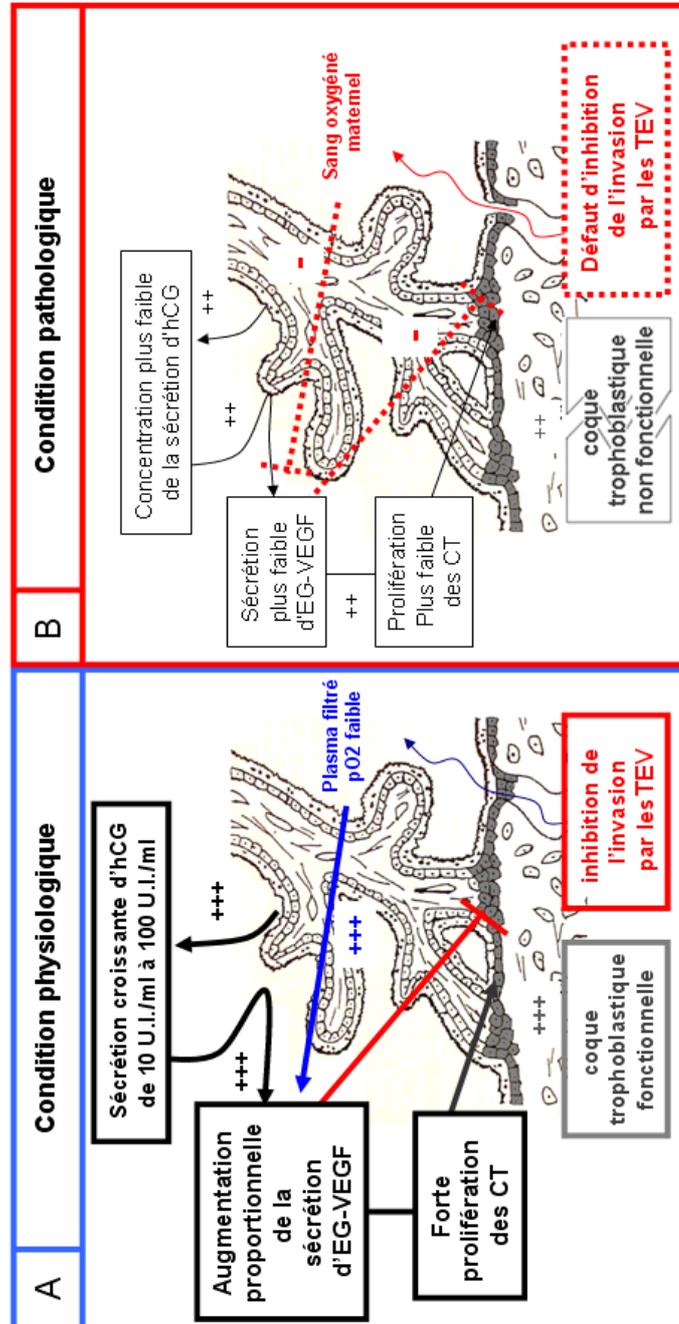


Figure 69 : Implication de nos résultats dans la placentation physiologique et pathologique au 1^{er} trimestre. (A) Rôle potentiel sur l'établissement de la coque trophoblastique, et sur l'inhibition de l'invasion des artères spirales maternelles par les TEV. L'effet différentiel d'EG-VEGF sur les trophoblastes villosus et extravillosus participe, avec d'autres facteurs, au maintien de l'hypoxie placentaire au 1^{er} trimestre de grossesse. (B) La baisse d'expression de l'hCG dans certaines pathologies de la grossesse pourrait participer à une inhibition de la sécrétion d'EG-VEGF au 1^{er} trimestre, et engendrerait ainsi des malformations de la coque trophoblastique, et une mauvaise inhibition de l'invasion des TEV. Cela conduirait potentiellement à une oxygénation trop précoce de l'espace intervilloux, et à une apoptose plus ou moins massive des trophoblastes, qui ne possèdent pas encore les défenses anti-oxydantes. Cela mènerait alors à une involution des villosités et à des défauts majeurs dans le développement placentaire. Ces malformations déboucheraient sur un arrêt de la grossesse, ou sur l'apparition de pathologies comme le RCIU par exemple. Schéma adapté de (Fournier et al. 2007)

physiologique d'EG-VEGF stimulerait à son tour la prolifération des CT vilieux, et participerait de ce fait à l'établissement et au maintien de la coque trophoblastique, ainsi qu'à la constitution des bouchons trophoblastiques (voir figure 69). L'ensemble de ces processus participe au maintien d'une pO_2 faible dans l'espace intervilieux, facteur que nous avons également décrit pour stimuler l'expression d'EG-VEGF (Hoffmann et al. 2006). Ainsi, l'expression entretenue et croissante d'EG-VEGF jusqu'à 9-10 SA participe au maintien de la grossesse, par la protection des villosités chorales d'une oxygénation trop précoce par le sang maternel. L'effet d'EG-VEGF sur les TEV participe également au maintien de l'hypoxie placentaire. En effet, le laboratoire a montré qu'EG-VEGF inhibait la prolifération, la migration et l'invasion des TEV (Hoffmann et al. 2009), empêchant ainsi un envahissement prématuré des vaisseaux maternels. De ce fait, l'expression importante d'EG-VEGF jusqu'à 9-10 SA empêcherait également une oxygénation trop précoce de l'espace intervilieux via le maintien de l'inhibition de l'invasion trophoblastique, et participerait de ce fait au maintien de la grossesse au 1^{er} trimestre.

- **Pathologies associées : fausses couches précoces et RCIU**

Des données de la littérature ont montrées que des taux d'hCG diminués avant 9 SA dans certaines pathologies de la grossesse conduisaient à des fausses couches (Buyalos et al. 1992, Dumps et al. 2002, Gagnon et al. 2008, Tong et al. 2006), ainsi qu'une association entre les taux diminués de la sous unité libre β -hCG entre 8-13 SA et les grossesses avec RCIU (Kirkegaard et al. 2011). D'après nos expériences, nous pouvons supposer que cette baisse pathologique d'hCG avant 9 SA dans ces grossesses pathologiques entraînerait une expression insuffisante d'EG-VEGF dans le placenta pour la mise en place correcte de la coque, et le maintien de l'inhibition de l'invasion des artères spiralées maternelles par les TEV (voir figure 69). On peut supposer que l'atteinte plus ou moins importante de ces deux processus mènerait à une fausse couche dans le cas de défauts majeurs, ou à une grossesse avec RCIU dans le cas de défauts plus modérés. L'équipe de Burton a déjà démontré l'effet toxique de l'oxygène sur les trophoblastes, et son implication dans de nombreuses fausses couches précoces (Burton et al. 2003, Jauniaux et al. 2003). Récemment, des polymorphismes et haplotypes de PROKR1 et PROKR2 ont également été décrits comme associés aux fausses couches récurrentes (Su et al. 2010), concluant ainsi qu'EG-VEGF et ses récepteurs étaient impliqués conjointement dans cette pathologie.

Entre 9 et 11 SA

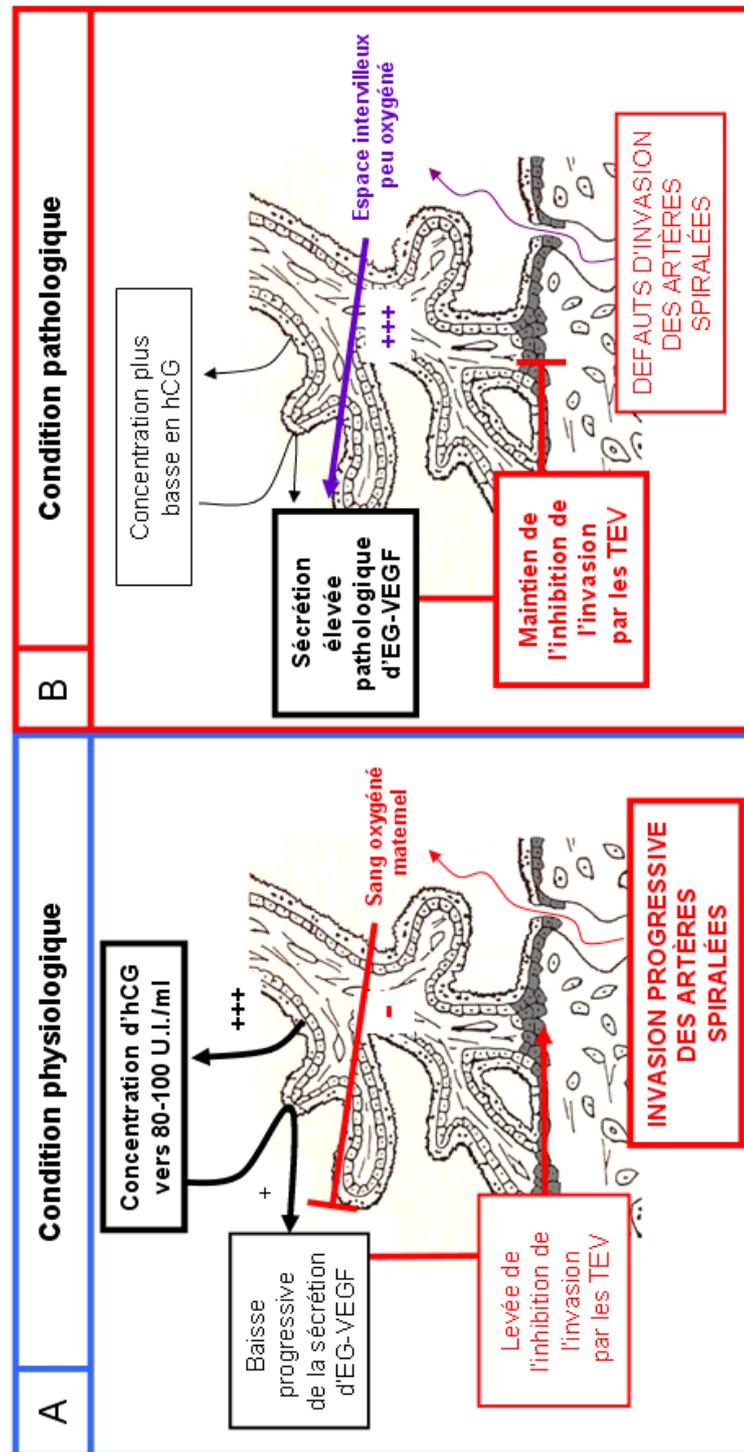


Figure 70 : Implication de nos résultats dans la placentation physiologique et pathologique à la fin du 1^{er} et au début du 2^{ème} trimestre. (A) Rôle potentiel de la baisse d'EG-VEGF sur l'invasion trophoblastique des artères spiralées maternelles par les TEV. (B) L'inhibition décrite de la concentration en hCG à la fin du 1^{er} trimestre dans certaines pathologies de la grossesse pourrait participer au maintien pathologique d'une forte sécrétion d'EG-VEGF à la fin du 1^{er} trimestre (d'après nos résultats de la publication n°2), et inhiberait ainsi l'invasion et le remodelage des artères spiralées par les TEV. L'hypoxie placentaire de l'espace intervilloux serait maintenue à un niveau pathologique, participant ainsi au maintien d'une concentration élevée d'EG-VEGF et au développement de pathologies comme le RCIU ou la TG. Schéma adapté de (Fournier et al. 2007).

B. Implication potentielle d'EG-VEGF dans l'établissement de la normoxie placentaire

A la fin du 1^{er} trimestre, les trophoblastes des villosités crampons vont acquérir un phénotype invasif transitoire, et envahir progressivement l'endomètre. Les artères spiralées maternelles, qui alimentent le placenta, subissent alors des remaniements profonds, et les bouchons trophoblastiques qui les obstruaient disparaissent peu à peu, permettant au sang oxygéné maternel de pénétrer dans l'espace intervilloux. Dans la placentation physiologique, les récepteurs à l'hCG deviennent pleinement fonctionnels et matures à partir de 9 SA, ce qui engendre une régulation différente d'EG-VEGF par l'hCG à partir de cette période là. En effet, nous avons montré que les fortes concentrations d'hCG (alors aux alentours de 80-100 U.I./ml chez la femme enceinte) stimulaient plus modérément la sécrétion d'EG-VEGF, et pouvaient de ce fait participer à la baisse physiologique d'EG-VEGF placentaire à partir de 10 SA (voir partie « discussion des résultats » de la publication n°2). Ce facteur, alors exprimé de façon limitée, ne pourrait plus exercer son contrôle négatif sur la prolifération, la migration et l'invasion trophoblastique, permettant alors peu à peu la transformation des artères spiralées maternelles par les TEV en artères utéro-placentaires. L'augmentation progressive de la pO₂ intervillonnaire participerait également à la baisse de l'expression d'EG-VEGF dans le placenta (figure 70).

- Pathologies associées : la toxémie gravidique et le RCIU

Nous avons montré la dérégulation d'EG-VEGF dans ces deux pathologies de la grossesse. En effet, l'équipe a rapporté en 2009 des taux circulants d'EG-VEGF significativement plus importants chez les patientes toxémiques par rapport aux patientes normales au 3^{ème} trimestre de la grossesse (Hoffmann et al. 2009). Des travaux antérieurs de l'équipe de Zheng n'avaient pas montré de différences dans l'expression en ARNm d'EG-VEGF dans les placentas normaux versus toxémiques (Chung et al. 2004). Ce résultat, contradictoire à première vue, a été confirmé pendant ma thèse (données non publiées), et suggère l'implication d'une régulation non transcriptionnelle dans l'augmentation d'EG-VEGF circulant chez les patientes toxémiques au 3^{ème} trimestre. Des expériences complémentaires sont à envisager, sur l'étude du taux de traduction de l'ARNm d'EG-VEGF et sur la demi-vie de ce facteur par exemple, afin de comprendre plus en détail les mécanismes qui conduisent à cette dérégulation. Nous avons également établi l'augmentation significative au 3^{ème} trimestre de ce facteur dans le RCIU, autre pathologie de la grossesse (publication n°3). Dans la

littérature, il a été rapporté pour ces deux pathologies un remodelage insuffisant des artères spiralées maternelles, ainsi qu'un maintien de l'hypoxie placentaire. Ces données suggèrent une possible dérégulation d'EG-VEGF au 1^{er} trimestre, et une implication éventuelle de ce facteur dans l'établissement de la TG et/ou du RCIU. De plus, il a été rapporté qu'une diminution de la sous-unité β -hCG libre à la fin du 1^{er} trimestre était non seulement associée à la fausse couche précoce (Dugoff et al. 2004), mais également associée significativement au RCIU (Kirkegaard et al. 2011, Krantz et al. 2004). L'ensemble de ces données suggère qu'une diminution de l'hCG à la fin du 1^{er} trimestre pourrait engendrer un maintien de l'expression d'EG-VEGF (d'après les résultats obtenus dans la publication n°2). Notre hypothèse serait alors que le maintien de cette expression élevée pathologique d'EG-VEGF à la fin du 1^{er} trimestre participerait au remodelage incomplet des artères spiralées maternelles, par le contrôle négatif de l'invasion des TEV causé par ce facteur. La perfusion de l'unité fœto-placentaire serait alors insuffisante, ce qui est considérée à ce jour comme le stade I de la TG. Nous testons actuellement l'hypothèse selon laquelle l'expression maintenue d'EG-VEGF participerait potentiellement à l'établissement d'un phénotype ressemblant à celui de la TG ou au RCIU chez la souris. L'avancée de ce projet nous permettra d'infirmer ou de confirmer cette hypothèse dans les mois à venir. Nos résultats préliminaires sont pour l'instant encourageants, et maintiennent la possibilité qu'EG-VEGF puisse être un marqueur précoce de ces deux pathologies.

Pour aller plus loin, il est intéressant de remarquer qu'une augmentation significative des taux d'hCG corrélée avec le développement de la TG ou du RCIU a également été décrite, mais pour des âges gestationnels plus tardifs (Audibert et al. 2005, Gagnon et al. 2008, Odibo et al. 2006, Toal et al. 2008). Ces résultats mettent en évidence l'existence de régulations différentielles entre le 1^{er} et les 2^{ème}-3^{ème} trimestres de grossesse. Cette augmentation a été attribuée récemment à une induction de la différenciation des CT par l'équipe de Keating (Fitzgerald et al. 2011), qui suggère que ce processus soit impliqué dans l'augmentation en milieu de grossesse des marqueurs de la couche syncytiale, comme l'hCG par exemple. De ce fait, ce phénomène pourrait participer également à la dérégulation observée d'EG-VEGF au 3^{ème} trimestre de la grossesse, facteur qui est également exprimé majoritairement par les ST. Des expériences complémentaires nous permettront prochainement d'établir avec plus de précision l'expression d'EG-VEGF dans ces grossesses pathologiques au 1^{er}, 2^{ème} et 3^{ème} trimestre (Etude EGEVE). L'avancée des connaissances en Obstétrique et la découverte d'un

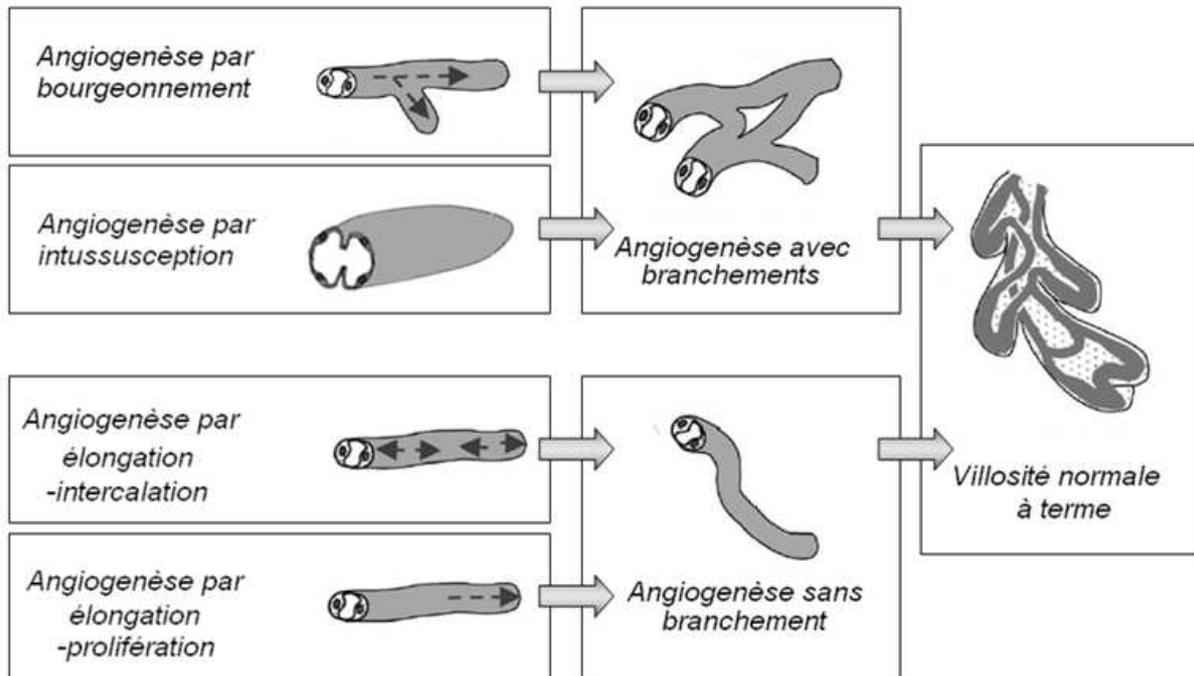


Figure 71 : Participation des différents types d'angiogenèse dans l'architecture et la croissance des villosités choriales. Schéma adapté de (Charnock-Jones et al. 2004)

marqueur pronostique permettraient la prise en charge anticipée et adaptée de ces grossesses à risque, participant ainsi à la réduction significative de la mortalité maternelle et fœtale. Ceci pourrait également proposer à long terme une piste de recherche pour les traitements curatifs.

1.2 Implication potentielle d'EG-VEGF dans les échanges fœto-maternels

Le succès de la grossesse dépend du développement d'un réseau vasculaire complexe entre le fœtus et la mère, afin de subvenir aux demandes fœtales croissantes en oxygène et en nutriments au cours de la grossesse. Il y a deux étapes majeures dans l'élaboration de ce réseau : une étape de vasculogénèse, et une étape d'angiogénèse. L'angiogénèse placentaire, qui se déroule du 32^{ème} JPF jusqu'au terme, connaît d'importants remodelages tout au long de la grossesse. De la 8^{ème} SA à la 27^{ème} SA, c'est l'angiogénèse arborescente (avec branchements) qui est majoritaire, alors qu'à partir de la 22^{ème} SA, c'est l'angiogénèse sans branchement qui prend peu à peu le relais, pour devenir majoritaire à partir de la 27^{ème} SA, et ce jusqu'à la fin de la grossesse. La figure ci-dessous détaille les différents types d'angiogénèse, et leur effet sur la croissance de la vascularisation et l'architecture de la villosité chorale (voir figure 71). Nous avons montré qu'EG-VEGF était un facteur angiogène important (Brouillet et al. 2010). D'après nos expériences, il aurait des effets positifs sur l'angiogénèse avec branchements, via l'augmentation du bourgeonnement des sphéroïdes et du nombre d'intersections des réseaux pseudo-vasculaires d'HPEC ; et sur l'angiogénèse sans branchement, via son effet inducteur sur la prolifération des HPEC (angiogénèse par élongation-prolifération). De plus, nous avons également démontré son effet positif sur la perméabilité des HPEC, paramètre important des processus angiogéniques, mais également dans le transport de nutriments entre la mère et le fœtus. L'effet inducteur d'EG-VEGF sur la perméabilité suggère des actions possibles dans l'angiogénèse par élongation-intercalation, où l'incorporation de cellules endothéliales ou de progéniteurs circulants nécessite une augmentation de la perméabilité, et sur l'angiogénèse par bourgeonnement (voir la partie « Introduction » pour plus de détails).

L'ensemble de ces résultats montre une implication d'EG-VEGF dans les différentes formes d'angiogenèse de la villosité chorale, ainsi que dans la perméabilité de l'endothélium fœtal. De ce fait, il démontre l'implication d'un nouveau facteur de croissance dans cette vascularisation, dont l'expression forte dans le placenta et le profil dynamique au cours de la grossesse, suggèrent un rôle important d'EG-VEGF dans les échanges fœto-maternels tout au long de la grossesse. Les dérégulations de ce facteur et de ces récepteurs, que nous avons mises en évidence au 3^{ème} trimestre dans les grossesses toxémiques et avec RCIU, suggèrent leur implication dans les défauts d'angiogenèse décrites dans ces deux pathologies, et dans la perturbation des échanges entre la mère et le fœtus. Il est bien établi que ces échanges augmentent très fortement au 3^{ème} trimestre, avec la formation des villosités tertiaires et des membranes vasculo-syncytiales, et tiennent un rôle clé dans la satisfaction des demandes fœtales croissantes et dans le bon déroulement de la grossesse (Kaufmann et al. 1979).

Des expériences complémentaires permettront de déterminer avec plus de précision le rôle d'EG-VEGF et de ses récepteurs dans le déroulement de l'angiogenèse placentaire, et dans la régulation des échanges à travers l'endothélium fœtal. En effet, la régulation dynamique d'EG-VEGF et de ses récepteurs au cours de la grossesse participe certainement au déroulement privilégié d'une forme d'angiogenèse par rapport à une autre, ainsi que dans l'accroissement des échanges fœto-maternels au 3^{ème} trimestre de la grossesse. Dans nos expériences, nous avons été confrontés à des effets *dose-dépendant* d'EG-VEGF, avec un effet maximal de la prolifération et de la migration des HPEC à 25-50 ng/mL, alors que le pic d'induction pour les tests de bourgeonnement des sphéroïdes et la formation de réseaux pseudo-vasculaires se situait à 100 ng/ml d'EG-VEGF. Ces résultats sont cohérents avec la physiologie, où l'angiogenèse avec branchement se déroule majoritairement à la fin de 1^{er} trimestre, et continue pendant le 2^{ème} trimestre (période où EG-VEGF est maximale), alors que l'angiogenèse sans branchement prend place au 3^{ème} trimestre de grossesse (période où EG-VEGF est modérément exprimé).

De nombreuses expériences complémentaires sont à envisager pour déterminer l'action éventuelle d'EG-VEGF sur la balance angiogénique branchement/sans branchement, ainsi que sur sa participation dans la perméabilité de l'endothélium fœtal. Dans des données non publiées, nous avons observé une augmentation très importante de PROKR2 dans les placentas à terme, ce qui pourrait participer à l'induction significative de la perméabilité au 3^{ème} trimestre de la grossesse, période où la demande fœtale est la plus importante. En effet, la

formation des villosités terminales, avec les membranes vasculo-syncytiales, est l'événement clé du 3^{ème} trimestre de grossesse, période où ces villosités sont le lieu d'échanges intenses de gaz et de nutriments (Kaufmann et al. 1979). Nous avons observé une augmentation très rapide de PROKR2 par EG-VEGF dans les HPEC (et non de PROKR1), ainsi que la diminution de ZO-1, protéine des jonctions serrées, sous EG-VEGF (données non publiées). Des études plus approfondies sur la régulation des PROKRs et sur les mécanismes régulant les jonctions paracellulaires permettraient d'établir plus clairement le rôle d'EG-VEGF dans la perméabilité de l'endothélium fœtal.

II. EG-VEGF dans la reproduction

L'expression d'EG-VEGF dans le système reproducteur féminin ouvre des perspectives d'implication de ce facteur et de ses récepteurs dans de nombreux processus autres que la placentation, comme l'implantation ou la parturition. L'ensemble de ces processus est à prendre en considération progressivement dans les effets d'EG-VEGF dans la placentation.

2.1 Implication dans la réceptivité endométriale

EG-VEGF et ses récepteurs sont exprimés dans l'endomètre humain, avec une expression dynamique au cours du cycle ovarien pour EG-VEGF, qui présente un pic d'expression dans l'endomètre au moment de la fenêtre implantatoire (voir la partie « Introduction » pour plus de détails). Il a été montré qu'EG-VEGF augmentait l'expression de facteurs de croissance dans l'endomètre (Maldonado-Perez et al. 2009). De plus, EG-VEGF et PROKR1 sont augmentés dans la décidue²⁶ au 1^{er} trimestre de grossesse, et régulent des gènes importants pour l'implantation (Evans J. et al. 2008, Evans J. et al. 2009). EG-VEGF est considéré maintenant comme un marqueur de la réceptivité endométriale (Haouzi et al. 2009). Récemment, son expression a été décrite comme augmentée dans l'endomètre de femmes sujettes aux fausses couches à répétition, causant ainsi une hausse pathologique de la réceptivité endométriale, et un défaut dans la sélection de l'implantation des embryons (Salker et al. 2010). Il est intéressant de noter que la réponse d'EG-VEGF à l'hCG était anormale dans ces grossesses pathologiques, mettant à nouveau en évidence l'importance de cette régulation hCG/EG-VEGF dans l'unité utéro-placentaire. Ce rôle d'EG-VEGF dans la

²⁶ endomètre transformé au cours de la grossesse

réceptivité endométriale est à considérer avec intérêt, car il soulève l'existence de régulations de la placentation par l'endomètre maternel. La complexité du système nécessite de nombreuses études complémentaires visant à établir avec plus de précisions les interactions entre l'endomètre et le placenta au cours de la grossesse.

2.2 Implication dans la parturition

Le déclenchement de l'accouchement est associé à des réactions inflammatoires en chaîne dans l'unité utéro-placentaire. La dérégulation de ces mécanismes peut conduire au déclenchement précoce de l'accouchement et à la prématurité (pour revue voir (Catalano et al. 2010)). Il a été suggéré que PROK1 et PROKR1 pourraient constituer une voie de signalisation initiatrice dans la réponse inflammatoire au 3^{ème} trimestre de la grossesse, par leur action inductrice dans l'expression de facteurs pro-inflammatoires (Denison et al. 2008, Evans J. et al. 2008). De plus, il a été décrit un rôle des PROKs dans l'induction de la contractilité du myomètre via PROKR1, dont l'expression augmente dans le myomètre à terme (Denison et al. 2008). Ces données sont à prendre en compte et à intégrer progressivement dans nos résultats. En effet, le rôle établi des PROKs dans la modulation de la réponse immune et dans la contractilité musculaire, ainsi que leur augmentation dans l'unité utéro-placentaire au moment de l'accouchement nous amène à considérer nos résultats obtenus à partir des placentas à terme avec une certaine retenue. Ces données suggèrent que les expressions mises en évidence à partir de tels placentas ne représentent pas forcément les taux effectifs atteints tout au long du 3^{ème} trimestre de la grossesse. Afin de nous affranchir de ces effets, nous avons utilisé des placentas récupérés après césarienne, où le déclenchement des cascades de signalisation de l'accouchement n'est pas ou peu amorcé. L'ensemble de ces expressions reste néanmoins à considérer avec précaution. Des expériences complémentaires sur les sera de femmes enceintes prélevés tout au long de leur grossesse (étude EGEVE en cours), et idéalement sur des biopsies de villosités choriales physiologiques et pathologiques au cours du 2^{ème} et 3^{ème} trimestre de grossesse, nous permettraient de déterminer avec précision l'expression d'EG-VEGF et de ses récepteurs tout au long de la grossesse physiologique et pathologique.

III. Conclusion

En conclusion de ces trois publications, nous avons montré qu'EG-VEGF est un facteur de croissance pour la villosité chorale, et qu'il possède de nombreux rôles sur les différents types cellulaires du placenta. Son rôle important dans la prolifération des trophoblastes villositaires, dans l'inhibition de l'invasion trophoblastique, et dans l'angiogenèse placentaire suggèrent un rôle majeur dans le développement villositaire placentaire. De plus, la finesse de ces régulations par l'hypoxie, et surtout par l'hCG, lui donne une expression dynamique au cours de la grossesse, et soulève des dérégulations possibles dans des pathologies où l'hCG et l'hypoxie sont dérégulées. La dérégulation d'EG-VEGF et de ses récepteurs dans les grossesses RCIU amène de nombreuses questions, notamment sur la source de cette dérégulation, et sur son apparition au cours de la grossesse. L'étude EGEVE en cours devrait nous permettre de caractériser la période d'apparition de ces dérégulations, ainsi que leur association possible avec la survenue du RCIU et de la TG. De très nombreuses expériences sont nécessaires à la compréhension de ces pathologies de la grossesse, et plus particulièrement dans la caractérisation de l'implication potentielle d'EG-VEGF et de ses récepteurs dans la physiopathologie de ces deux maladies. Les perspectives majeures de mes travaux de thèse, concernant les régulations d'EG-VEGF dans la physiologie placentaire et son implication dans les pathologies, sont discutées dans la partie suivante (voir partie « Perspectives »).

PERSPECTIVES

Les perspectives concernant l'ensemble de nos résultats sont nombreuses, et portent autant sur les mécanismes de régulations de l'expression d'EG-VEGF et de ces récepteurs dans le placenta humain, que sur leurs implications dans les pathologies de la grossesse. Les perspectives majeures à court terme des 3 publications de ma thèse concernent l'étude des interactions entre hCG et EG-VEGF dans la physiologie placentaire (Perspectives n°1 et n°2), ainsi que la caractérisation de l'implication d'EG-VEGF dans la physiopathologie du RCIU et de la TG (Perspective n°3). Les taux d'EG-VEGF au 1^{er} trimestre dans les grossesses toxémiques et dans le RCIU sont actuellement en cours de détermination au laboratoire, ainsi que l'implication potentielle d'un maintien d'EG-VEGF au delà de sa période physiologique d'expression dans la physiopathologie de ces deux maladies, grâce au modèle murin.

I. Perspective n°1 : implication d'EG-VEGF dans les effets angiogènes de l'hCG

Actuellement, de nombreuses données confèrent à l'hCG un nouveau rôle angiogène dans la placentation, avec entre autres l'induction de la production de VEGF par les trophoblastes (Islami et al. 2003). De plus, il a été rapporté récemment une action directe de l'hCG sur les cellules endothéliales microvasculaires placentaires, avec l'augmentation de la prolifération et de l'angiogenèse de ces cellules en culture (Herr et al. 2007). D'après nos données publiées en 2010, nous avons montré qu'EG-VEGF augmentait également ce processus dans les HPEC (Brouillet et al. 2010), et des données ont depuis confirmé cet effet sur le modèle de l'explant placentaire au 1^{er} trimestre de la grossesse (publication n°3). Nos résultats sur l'augmentation d'EG-VEGF par l'hCG (publication n°2) suggèrent que les effets angiogènes de l'hCG décrits sur les cellules endothéliales placentaires pourraient passer par la stimulation d'EG-VEGF dans les HPEC (voir figure 72 et 73). Récemment, une telle régulation a été mise en évidence par l'équipe de Jabbour en 2009, où il a été démontré que l'effet inducteur de l'hCG sur LIF (Leukemia Inhibitory Factor) dans l'endomètre maternel passait par l'induction d'EG-VEGF (Evans J. et al. 2009).

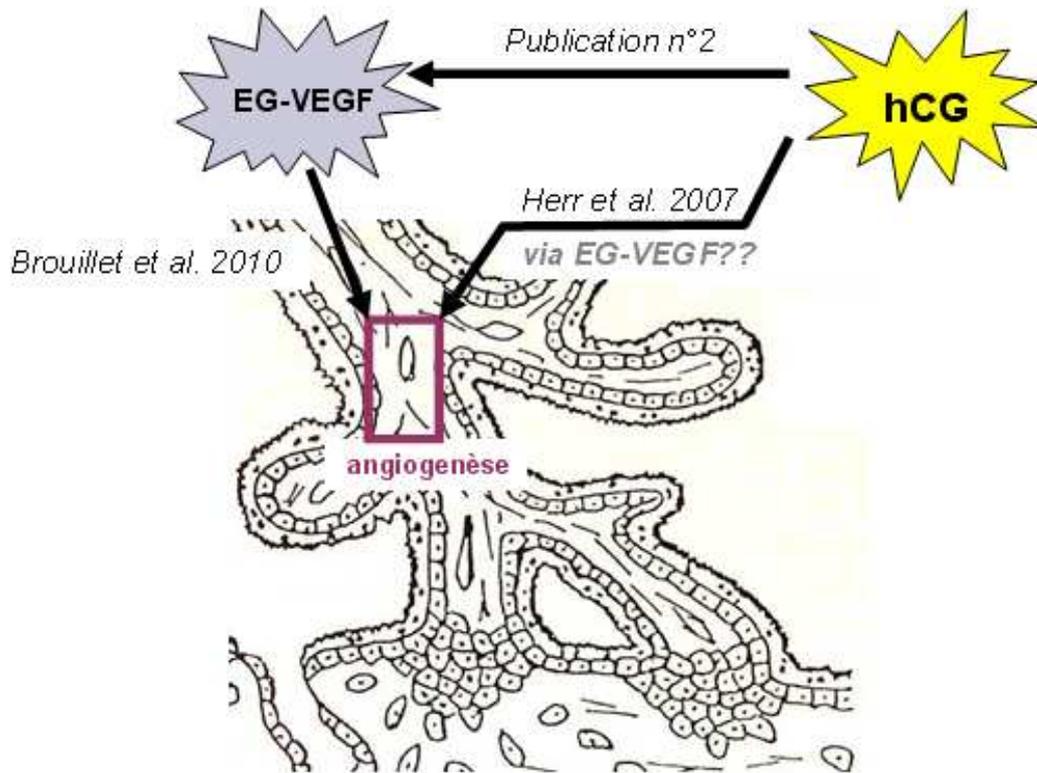
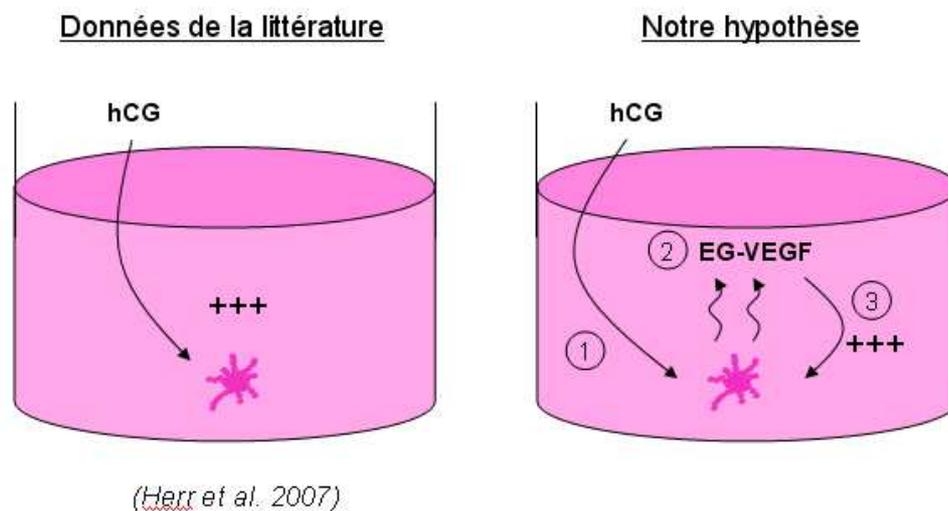


Figure 72 : Les effets de l'hCG sur l'angiogènèse placentaire passeraient-ils par EG-VEGF ? Schéma de la villosité de (Fournier et al. 2007).



(Herr et al. 2007)

Figure 73 : L'hCG augmente le bourgeonnement des sphéroïdes d'HPEC (Herr et al. 2007). Notre hypothèse propose que le traitement par l'hCG des sphéroïdes d'HPEC (1) engendre dans un premier temps l'augmentation de la sécrétion d'EG-VEGF (2), facteur qui stimulerait alors le bourgeonnement des HPEC (3).

Dans l'ensemble de nos résultats, une sécrétion majeure d'EG-VEGF par les syncytiotrophoblastes a été observée. Néanmoins, de nombreux résultats suggéraient une possible expression/sécrétion très modérée par les cellules endothéliales placentaires elles-mêmes. La confirmation de cette hypothèse permettrait de proposer le schéma suivant pour la régulation de l'augmentation de l'angiogenèse dans les HPEC par l'hCG décrite par l'équipe de Zygmont en 2007 (voir Figure 72 et 73) (Herr et al. 2007).

Certaines données du laboratoire et de la littérature indiquent une probable sécrétion d'EG-VEGF par les cellules endothéliales microvasculaires HPEC. En effet, son expression dans l'endothélium placentaire a déjà été rapportée (Denison et al. 2008), et confirmée par notre laboratoire dans des expériences d'Immunohistochimie sur des coupes de placentas de 1^{er} et 3^{ème} trimestre. Nous observons, comme l'équipe de Jabbour, un marquage des cellules endothéliales fœtales dans une partie des vaisseaux fœtaux, suggérant une expression ponctuelle et/ou très faible d'EG-VEGF par les HPEC. De plus, nos expériences sur les sphéroïdes et la perméabilité des HPEC avec les siRNA PROKR1 et PROKR2 (Brouillet et al. 2010) suggèrent une sécrétion endogène d'EG-VEGF par ces cellules, par l'inhibition du niveau basal dans les conditions siRNA. Nous avons également établi l'expression de l'ARNm d'EG-VEGF dans les HPEC isolées (données non publiées). Afin de tester cette hypothèse, des expériences sont prévues sur l'investigation de la sécrétion d'EG-VEGF par les HPEC, ainsi que sur l'effet de l'hCG sur l'induction de cette sécrétion éventuelle d'EG-VEGF et sur la modulation de l'expression des PROKRs par les HPEC. Des expériences de bourgeonnement de sphéroïdes HPEC sous hCG avec des siRNA et/ou des anticorps bloquants EG-VEGF, PROKR1 et PROKR2 sont également envisagées.

II. Perspective n°2 : régulation d'EG-VEGF par l'hCG hyperglycosylée

L'hCG hyperglycosylée, qui partage la même séquence en acides aminés avec l'hCG, est un variant qui possède sa propre structure 3D grâce à des glycosylations différentielles (Cole et al. 1985, Cole 1987, Mizuochi et al. 1983). Cette hormone est produite par le placenta, plus particulièrement par les cytotrophoblastes à des termes très précoces, puis par les

cytotrophoblastes extravilleux endovasculaires (Cole et al. 2006a, Guibourdenche et al. 2010, Handschuh et al. 2007b, Kovalevskaya et al. 2002b). Dans la grossesse précoce, c'est l'hCG-H qui est produite majoritairement (Cole et al. 2003, Sasaki et al. 2008).

Cette hormone joue d'importantes fonctions sur l'implantation, l'invasion trophoblastique et dans le choriocarcinome²⁷ (Cole et al. 2006b, Cole 2009b, Sasaki et al. 2008). Des données préliminaires obtenues pendant ma thèse suggèrent une augmentation circulante d'EG-VEGF chez les femmes qui développent un choriocarcinome. Nous envisageons de confirmer dans un premier temps cette augmentation sur une plus grande cohorte, et d'étudier les mécanismes qui pourraient être à l'origine de cette dérégulation, comme l'effet de l'hCG-H sur l'expression et la sécrétion d'EG-VEGF par le placenta. L'équipe de Fournier a montré récemment que l'expression de l'hCG était inhibée par le PPAR- γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma), qui est un récepteur nucléaire (Handschuh et al. 2007b, Handschuh et al. 2009). Ce facteur a été démontré comme inhibiteur de l'invasion trophoblastique. Par ailleurs, des études *in silico* ont montré que le promoteur d'EG-VEGF possédait des éléments de réponse au PPAR- γ , suggérant une possible régulation d'EG-VEGF par ce facteur. Des expériences complémentaires nous permettront peut-être de comprendre plus en détail les régulations fines entre ces différents facteurs, et l'implication possible d'EG-VEGF dans la physiopathologie du choriocarcinome.

III. Perspective n°3 : Implication dans les pathologies de la grossesse

3.1 Taux d'EG-VEGF au 1^{er} trimestre dans la TG et le RCIU - Etude EGEVE

Nous sommes actuellement en cours d'Etude Clinique avec le CIC de Grenoble et le service de Gynécologie-Obstétrique (Etude EGEVE) afin de déterminer les taux d'EG-VEGF au 2^{ème} trimestre dans les grossesses qui développeront par la suite une TG ou un RCIU. Cette étude a pour but final de déterminer si EG-VEGF pourrait être considéré comme un marqueur pronostique du développement de ces deux pathologies. Cette étude, d'une durée de 2 ans, comprend la collecte de sera entre 14 et 18 SA sur 500 patientes environ, ce qui permettra d'obtenir entre 25 à 30 grossesses avec toxémie gravidique, environ 15 grossesses avec RCIU

²⁷ Tumeur placentaire caractérisée par une invasion dérégulée et intensive des trophoblastes dans l'utérus maternel.

au 3^{ème} percentile, et 50 grossesses au 10^{ème} percentile. De plus, une corrélation intéressante entre les taux d'hCG et le taux d'EG-VEGF semble fortement probable d'après nos résultats. L'association de ces deux facteurs pourrait représenter un marqueur pronostique plus fin pour ces deux pathologies. En effet, aucun facteur ne peut être considéré seul comme marqueur fiable de la survenue de la TG ou du RCIU à ce jour. Ainsi, des facteurs plus spécifiques du placenta, dont le développement anormal est en étroite relation avec ces deux pathologies, et dérégulés précocement dans la grossesse, sont recherchés actuellement. EG-VEGF semble de ce fait être un bon candidat. D'après l'ensemble de nos résultats, nous supposons actuellement une augmentation d'EG-VEGF dans les grossesses RCIU et TG entre 14 et 18 SA (voir partie discussion des résultats pour plus de détails). Cette hypothèse sera confirmée ou infirmée lors du dosage effectif d'EG-VEGF dans ces échantillons. En attendant la fin de cette étude, nous testons actuellement cette hypothèse sur la souris gestante (voir partie 3.2).

3.2 Effet d'un maintien pathologique d'EG-VEGF – Modèle murin

Le laboratoire travaille actuellement sur un modèle animal pour déterminer le rôle d'EG-VEGF dans la placentation physiologique et pathologique. En effet, les placentas murins et humains possèdent plusieurs similitudes, et les résultats déjà publiés du laboratoire sur l'expression des PROKs et de leurs récepteurs dans le placenta murin confirment ces analogies (Hoffmann et al. 2007). Il avait été montré que l'expression placentaire d'EG-VEGF et de ses récepteurs avait des profils d'expression comparables au cours de la gestation murine à ceux observés chez la femme enceinte, et qu'ils étaient localisés dans des types cellulaires correspondants. Actuellement, nous testons l'effet d'une expression soutenue d'EG-VEGF au cours de la gestation murine, et de sa contribution dans l'apparition de pathologies ressemblant à la TG ou/et au RCIU *in vivo* chez la souris. L'expression maintenue du facteur est assurée par des mini-pompes qui délivrent de l'EG-VEGF recombinant sur toute la deuxième partie de la gestation. Le suivi de la pression artérielle des souris gestantes, de la protéinurie, du nombre et du poids des fœtus par portée ; ainsi que le poids et l'histologie des placentas murins ont été ou seront étudiés. A ce jour, nos résultats sont encourageants, et restent à compléter avec de nombreuses nouvelles expériences. L'obtention de souris invalidées pour EG-VEGF reste une perspective envisagée actuellement par le laboratoire.

CONCLUSION

A travers l'ensemble de nos résultats, nous avons pu établir le rôle d'EG-VEGF sur les différents types cellulaires placentaires, et montrer qu'il était un nouveau facteur de croissance du placenta. Sa dérégulation au 3^{ème} trimestre dans les grossesses toxémiques et avec RCIU ouvrent de grandes perspectives concernant son implication dans la physiopathologie de ces deux maladies, notamment au cours du 1^{er} trimestre, période pendant laquelle se met en place de nombreux défauts de la placentation. L'amélioration des connaissances sur le développement placentaire, et la caractérisation des rôles qu'EG-VEGF pourrait jouer sur d'autres types cellulaires du placenta ou de l'endomètre, permettront d'établir sa valeur comme marqueur prédictif dans la survenue de nombreuses pathologies de la grossesse, comme le RCIU ou la TG, mais aussi dans les grossesses ectopiques, les fausses couches récurrentes, l'accouchement prématuré et/ou le choriocarcinome. Les données croissantes de la littérature concernant son implication dans des pathologies de l'unité utéro-placentaire suggèrent une prise en compte grandissante de ce facteur en Obstétrique dans les années à venir, qui déboucheront peut-être sur l'utilisation d'EG-VEGF comme marqueur de processus physiologiques et/ou pathologiques, ainsi que sur l'utilisation de ce facteur comme cible thérapeutique.

BIBLIOGRAPHIE

Achen M. G., Jeltsch M., Kukk E., Makinen T., Vitali A., Wilks A. F., Alitalo K. & Stacker S. A. 1998. Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 548-553.

Adini A., Kornaga T., Firoozbakht F. & Benjamin L. E. 2002. Placental growth factor is a survival factor for tumor endothelial cells and macrophages. *Cancer Res* 62: 2749-2752.

Ahmed A., Li X. F., Dunk C., Whittle M. J., Rushton D. I. & Rollason T. 1995. Colocalisation of vascular endothelial growth factor and its Flt-1 receptor in human placenta. *Growth Factors* 12: 235-243.

Ahmed A., Dunk C., Ahmad S. & Khaliq A. 2000. Regulation of placental vascular endothelial growth factor (VEGF) and placenta growth factor (PlGF) and soluble Flt-1 by oxygen--a review. *Placenta* 21 Suppl A: S16-24.

Aird W. C. 2003. Endothelial cell heterogeneity. *Crit Care Med* 31: S221-230.

Allaire A. D., Ballenger K. A., Wells S. R., McMahon M. J. & Lessey B. A. 2000. Placental apoptosis in preeclampsia. *Obstet Gynecol* 96: 271-276.

Allouche S., Polastron J., Hasbi A., Homburger V. & Jauzac P. 1999. Differential G-protein activation by alkaloid and peptide opioid agonists in the human neuroblastoma cell line SK-N-BE. *Biochem J* 342 (Pt 1): 71-78.

Alsat E. & Cedard L. 1974. [Demonstration of a specific fixation of radio-iodinated human chorionic gonadotropin (HCG I-125) in fragments of human placentas]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 278: 2665-2668.

Andrae J., Gallini R. & Betsholtz C. 2008. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev* 22: 1276-1312.

Antoniades H. N., Scher C. D. & Stiles C. D. 1979. Purification of human platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 1809-1813.

Arroyo J. A. & Winn V. D. 2008. Vasculogenesis and angiogenesis in the IUGR placenta. *Semin Perinatol* 32: 172-177.

Ascoli M., Fanelli F. & Segaloff D. L. 2002. The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective. *Endocr Rev* 23: 141-174.

Atger M., Misrahi M., Sar S., Le Flem L., Dessen P. & Milgrom E. 1995. Structure of the human luteinizing hormone-choriogonadotropin receptor gene: unusual promoter and 5' non-coding regions. *Mol Cell Endocrinol* 111: 113-123.

Audibert F., Benchimol Y., Benattar C., Champagne C. & Frydman R. 2005. Prediction of preeclampsia or intrauterine growth restriction by second trimester serum screening and uterine Doppler velocimetry. *Fetal Diagn Ther* 20: 48-53.

Auerbach R., Alby L., Morrissey L. W., Tu M. & Joseph J. 1985. Expression of organ-specific antigens on capillary endothelial cells. *Microvasc Res* 29: 401-411.

Banerjee S., Smallwood A., Chambers A. E., Papageorghiou A., Loosfelt H., Spencer K., Campbell S. & Nicolaidis K. 2005. A link between high serum levels of human chorionic gonadotrophin and chorionic expression of its mature functional receptor (LHCGR) in Down's syndrome pregnancies. *Reprod Biol Endocrinol* 3: 25.

Barker D. J. 1992. Fetal growth and adult disease. *Br J Obstet Gynaecol* 99: 275-276.

Baschat A. A., Kasdaglis T., Aberdeen G., Turan O., Kopelman J., Atlas R., Jenkins C., Blitzler M. & Harman C. 2010. First-trimester angiopoietin-2: relationships with maternal and placental characteristics. *Am J Perinatol* 27: 9-14.

Bass K. E., Morrish D., Roth I., Bhardwaj D., Taylor R., Zhou Y. & Fisher S. J. 1994. Human cytotrophoblast invasion is up-regulated by epidermal growth factor: evidence that paracrine factors modify this process. *Dev Biol* 164: 550-561.

Bassil A. K., Dass N. B., Murray C. D., Muir A. & Sanger G. J. 2005. Prokineticin-2, motilin, ghrelin and metoclopramide: prokinetic utility in mouse stomach and colon. *Eur J Pharmacol* 524: 138-144.

Bates D. O., Cui T. G., Doughty J. M., Winkler M., Sugiono M., Shields J. D., Peat D., Gillatt D. & Harper S. J. 2002. VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 62: 4123-4131.

Battaglia F. C. & Lubchenco L. O. 1967. A practical classification of newborn infants by weight and gestational age. *J Pediatr* 71: 159-163.

Battersby S., Critchley H. O., Morgan K., Millar R. P. & Jabbour H. N. 2004. Expression and regulation of the prokineticins (endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor and Bv8) and their receptors in the human endometrium across the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 2463-2469.

Bellik L., Vinci M. C., Filippi S., Ledda F. & Parenti A. 2005. Intracellular pathways triggered by the selective FLT-1-agonist placental growth factor in vascular smooth muscle cells exposed to hypoxia. *Br J Pharmacol* 146: 568-575.

Bellomo D., Headrick J. P., Silins G. U., Paterson C. A., Thomas P. S., Gartside M., Mould A., Cahill M. M., Tonks I. D., Grimmond S. M., Townson S., Wells C., Little M., Cummings M. C., Hayward N. K. & Kay G. F. 2000. Mice lacking the vascular endothelial growth factor-B gene (*Vegfb*) have smaller hearts, dysfunctional coronary vasculature, and impaired recovery from cardiac ischemia. *Circ Res* 86: E29-35.

Belmonte A., Ticconi C., Dolci S., Giorgi M., Zicari A., Lenzi A., Jannini E. A. & Piccione E. 2005. Regulation of phosphodiesterase 5 expression and activity in human pregnant and non-pregnant myometrial cells by human chorionic gonadotropin. *J Soc Gynecol Investig* 12: 570-577.

Benirschke K & P. K. 2000. *Pathology of the human placenta* New York : Springer Verlag.

Benjamin L. E., Hemo I. & Keshet E. 1998. A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development* 125: 1591-1598.

Benjamin L. E., Golijanin D., Itin A., Pode D. & Keshet E. 1999. Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J Clin Invest* 103: 159-165.

Berndt S., Perrier d'Hauterive S., Blacher S., Pequeux C., Lorquet S., Munaut C., Applanat M., Herve M. A., Lamande N., Corvol P., van den Brule F., Frankenne F., Poutanen M., Huhtaniemi I., Geenen V., Noel A. & Foidart J. M. 2006. Angiogenic activity of human chorionic gonadotropin through LH receptor activation on endothelial and epithelial cells of the endometrium. *FASEB J* 20: 2630-2632.

Bernstein I. M., Horbar J. D., Badger G. J., Ohlsson A. & Golan A. 2000. Morbidity and mortality among very-low-birth-weight neonates with intrauterine growth restriction. The Vermont Oxford Network. *Am J Obstet Gynecol* 182: 198-206.

Berridge M. J. & Irvine R. F. 1984. Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 312: 315-321.

Bicknell R. 1993. Heterogeneity of the endothelial cell. *Behring Inst Mitt*: 1-7.

Bischof P., Meisser A., Campana A. & Tseng L. 1998. Effects of decidua-conditioned medium and insulin-like growth factor binding protein-1 on trophoblastic matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Placenta* 19: 457-464.

Boisbouvier J., Albrand J. P., Blackledge M., Jaquinod M., Schweitz H., Lazdunski M. & Marion D. 1998. A structural homologue of colipase in black mamba venom revealed by NMR floating disulphide bridge analysis. *J Mol Biol* 283: 205-219.

Boyd P. A. & Scott A. 1985. Quantitative structural studies on human placentas associated with pre-eclampsia, essential hypertension and intrauterine growth retardation. *Br J Obstet Gynaecol* 92: 714-721.

Breier G. 2000. Angiogenesis in embryonic development--a review. *Placenta* 21 Suppl A: S11-15.

Brouillet S., Hoffmann P., Benharouga M., Salomon A., Schaal J. P., Feige J. J. & Alfaidy N. 2010. Molecular characterization of EG-VEGF-mediated angiogenesis: differential effects on microvascular and macrovascular endothelial cells. *Mol Biol Cell* 21: 2832-2843.

Bukovsky A., Indrapichate K., Fujiwara H., Cekanova M., Ayala M. E., Dominguez R., Caudle M. R., Wimalsena J., Elder R. F., Copas P., Foster J. S., Fernando R. I., Henley D. C. & Upadhyaya N. B. 2003. Multiple luteinizing hormone receptor (LHR) protein variants, interspecies reactivity of anti-LHR mAb clone 3B5, subcellular localization of LHR in human placenta, pelvic floor and brain, and possible role for LHR in the development of abnormal pregnancy, pelvic floor disorders and Alzheimer's disease. *Reprod Biol Endocrinol* 1: 46.

Bullock C. M., Li J. D. & Zhou Q. Y. 2004. Structural determinants required for the bioactivities of prokineticins and identification of prokineticin receptor antagonists. *Mol Pharmacol* 65: 582-588.

Burchell R. C. 1967. Arterial blood flow into the human intervillous space. *Am J Obstet Gynecol* 98: 303-311.

Burri P. H. & Tarek M. R. 1990. A novel mechanism of capillary growth in the rat pulmonary microcirculation. *Anat Rec* 228: 35-45.

Burton G. J. & Jauniaux E. 1995. Sonographic, stereological and Doppler flow velocimetric assessments of placental maturity. *Br J Obstet Gynaecol* 102: 818-825.

Burton G. J., Watson A. L., Hempstock J., Skepper J. N. & Jauniaux E. 2002. Uterine glands provide histiotrophic nutrition for the human fetus during the first trimester of pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 2954-2959.

Burton G. J., Skepper J. N., Hempstock J., Cindrova T., Jones C. J. & Jauniaux E. 2003. A reappraisal of the contrasting morphological appearances of villous cytotrophoblast cells during early human pregnancy; evidence for both apoptosis and primary necrosis. *Placenta* 24: 297-305.

Burton G. J., Charnock-Jones D. S. & Jauniaux E. 2009. Regulation of vascular growth and function in the human placenta. *Reproduction* 138: 895-902.

Buyalos R. P., Glassman L. M., Rifka S. M., Falk R. J., Macarthy P. O., Tyson V. J. & DiMattina M. 1992. Serum beta-human chorionic gonadotropin, estradiol and progesterone as early predictors of pathologic pregnancy. *J Reprod Med* 37: 261-266.

Byzova T. V., Goldman C. K., Jankau J., Chen J., Cabrera G., Achen M. G., Stacker S. A., Carnevale K. A., Siemionow M., Deitcher S. R. & DiCorleto P. E. 2002. Adenovirus encoding vascular endothelial growth factor-D induces tissue-specific vascular patterns in vivo. *Blood* 99: 4434-4442.

Caniggia I., Grisar-Graunosky S., Kuliszewsky M., Post M. & Lye S. J. 1999. Inhibition of TGF-beta 3 restores the invasive capability of extravillous trophoblasts in preeclamptic pregnancies. *J Clin Invest* 103: 1641-1650.

Caniggia I., Mostachfi H., Winter J., Gassmann M., Lye S. J., Kuliszewski M. & Post M. 2000. Hypoxia-inducible factor-1 mediates the biological effects of oxygen on human trophoblast differentiation through TGFbeta(3). *J Clin Invest* 105: 577-587.

Cao Y., Chen H., Zhou L., Chiang M. K., Anand-Apte B., Weatherbee J. A., Wang Y., Fang F., Flanagan J. G. & Tsang M. L. 1996. Heterodimers of placenta growth

factor/vascular endothelial growth factor. Endothelial activity, tumor cell expression, and high affinity binding to Flk-1/KDR. *J Biol Chem* 271: 3154-3162.

Carmeliet P., Ferreira V., Breier G., Pollefeyt S., Kieckens L., Gertsenstein M., Fahrig M., Vandenhoek A., Harpal K., Eberhardt C., Declercq C., Pawling J., Moons L., Collen D., Risau W. & Nagy A. 1996. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380: 435-439.

Carmeliet P. 2000. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6: 389-395.

Carmeliet P. & Jain R. K. 2000. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407: 249-257.

Carmeliet P., Moons L., Luttun A., Vincenti V., Compornolle V., De Mol M., Wu Y., Bono F., Devy L., Beck H., Scholz D., Acker T., DiPalma T., Dewerchin M., Noel A., Stalmans I., Barra A., Blacher S., Vandendriessche T., Ponten A., Eriksson U., Plate K. H., Foidart J. M., Schaper W., Charnock-Jones D. S., Hicklin D. J., Herbert J. M., Collen D. & Persico M. G. 2001. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med* 7: 575-583.

Carmeliet P. 2003. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 9: 653-660.

Castellucci M., Scheper M., Scheffen I., Celona A. & Kaufmann P. 1990. The development of the human placental villous tree. *Anat Embryol (Berl)* 181: 117-128.

Catalano R. D., Lannagan T. R., Gorowiec M., Denison F. C., Norman J. E. & Jabbour H. N. 2010. Prokineticins: novel mediators of inflammatory and contractile pathways at parturition? *Mol Hum Reprod* 16: 311-319.

Cetin I. & Alvino G. 2009. Intrauterine growth restriction: implications for placental metabolism and transport. A review. *Placenta* 30 Suppl A: S77-82.

Chambers A. E., Stanley P. F., Randeve H. & Banerjee S. 2011. Microvesicle-mediated release of soluble LH/hCG receptor (LHCGR) from transfected cells and placenta explants. *Reprod Biol Endocrinol* 9: 64.

Chan J. S., Chiu T. T. & Wong Y. H. 1995. Activation of type II adenylyl cyclase by the cloned mu-opioid receptor: coupling to multiple G proteins. *J Neurochem* 65: 2682-2689.

Chappell L. C., Seed P. T., Briley A., Kelly F. J., Hunt B. J., Charnock-Jones D. S., Mallet A. I. & Poston L. 2002. A longitudinal study of biochemical variables in women at risk of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 187: 127-136.

Charnock-Jones D. S. 2002. Soluble flt-1 and the angiopoietins in the development and regulation of placental vasculature. *J Anat* 200: 607-615.

Charnock-Jones D. S., Kaufmann P. & Mayhew T. M. 2004. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. I. Molecular regulation. *Placenta* 25: 103-113.

Chen C. P., Bajoria R. & Aplin J. D. 2002. Decreased vascularization and cell proliferation in placentas of intrauterine growth-restricted fetuses with abnormal umbilical artery flow velocity waveforms. *Am J Obstet Gynecol* 187: 764-769.

Chen J., Kuei C., Sutton S., Wilson S., Yu J., Kamme F., Mazur C., Lovenberg T. & Liu C. 2005. Identification and pharmacological characterization of prokineticin 2 beta as a selective ligand for prokineticin receptor 1. *Mol Pharmacol* 67: 2070-2076.

Chen L., Endler A. & Shibasaki F. 2009. Hypoxia and angiogenesis: regulation of hypoxia-inducible factors via novel binding factors. *Exp Mol Med* 41: 849-857.

Cheng M. Y., Bullock C. M., Li C., Lee A. G., Bermak J. C., Belluzzi J., Weaver D. R., Leslie F. M. & Zhou Q. Y. 2002. Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus. *Nature* 417: 405-410.

Cheng M. Y., Leslie F. M. & Zhou Q. Y. 2006. Expression of prokineticins and their receptors in the adult mouse brain. *J Comp Neurol* 498: 796-809.

- Chung J. Y., Song Y., Wang Y., Magness R. R. & Zheng J.** 2004. Differential expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), endocrine gland derived-VEGF, and VEGF receptors in human placentas from normal and preeclamptic pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 2484-2490.
- Clark D. E., Smith S. K., Sharkey A. M. & Charnock-Jones D. S.** 1996. Localization of VEGF and expression of its receptors flt and KDR in human placenta throughout pregnancy. *Hum Reprod* 11: 1090-1098.
- Clark D. E., Smith S. K., Licence D., Evans A. L. & Charnock-Jones D. S.** 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: 459-467.
- Cleaver O. & Melton D. A.** 2003. Endothelial signaling during development. *Nat Med* 9: 661-668.
- Clements J. A., Reyes F. I., Winter J. S. & Faiman C.** 1976. Studies on human sexual development. III. Fetal pituitary and serum, and amniotic fluid concentrations of LH, CG, and FSH. *J Clin Endocrinol Metab* 42: 9-19.
- Cole L. A., Birken S. & Perini F.** 1985. The structures of the serine-linked sugar chains on human chorionic gonadotropin. *Biochem Biophys Res Commun* 126: 333-339.
- Cole L. A.** 1987. The O-linked oligosaccharide structures are strikingly different on pregnancy and choriocarcinoma HCG. *J Clin Endocrinol Metab* 65: 811-813.
- Cole L. A., Kardana A., Andrade-Gordon P., Gawinowicz M. A., Morris J. C., Bergert E. R., O'Connor J. & Birken S.** 1991. The heterogeneity of human chorionic gonadotropin (hCG). III. The occurrence and biological and immunological activities of nicked hCG. *Endocrinology* 129: 1559-1567.
- Cole L. A., Kardana A., Park S. Y. & Braunstein G. D.** 1993. The deactivation of hCG by nicking and dissociation. *J Clin Endocrinol Metab* 76: 704-710.
- Cole L. A., Khanlian S. A., Sutton J. M., Davies S. & Stephens N. D.** 2003. Hyperglycosylated hCG (invasive trophoblast antigen, ITA) a key antigen for early pregnancy detection. *Clin Biochem* 36: 647-655.
- Cole L. A., Dai D., Butler S. A., Leslie K. K. & Kohorn E. I.** 2006a. Gestational trophoblastic diseases: 1. Pathophysiology of hyperglycosylated hCG. *Gynecol Oncol* 102: 145-150.
- Cole L. A., Khanlian S. A., Riley J. M. & Butler S. A.** 2006b. Hyperglycosylated hCG in gestational implantation and in choriocarcinoma and testicular germ cell malignancy tumorigenesis. *J Reprod Med* 51: 919-929.
- Cole L. A.** 2009a. New discoveries on the biology and detection of human chorionic gonadotropin. *Reprod Biol Endocrinol* 7: 8.
- Cole L. A.** 2009b. hCG and hyperglycosylated hCG in the establishment and evolution of hemochorial placentation. *J Reprod Immunol* 82: 112-118.
- Cole L. A.** 2010. Hyperglycosylated hCG, a review. *Placenta* 31: 653-664.
- Connolly D. T., Heuvelman D. M., Nelson R., Olander J. V., Eppley B. L., Delfino J. J., Siegel N. R., Leimgruber R. M. & Feder J.** 1989. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest* 84: 1470-1478.
- Conti M., Harwood J. P., Hsueh A. J., Dufau M. L. & Catt K. J.** 1976. Gonadotropin-induced loss of hormone receptors and desensitization of adenylate cyclase in the ovary. *J Biol Chem* 251: 7729-7731.
- Cooper J. C., Sharkey A. M., Charnock-Jones D. S., Palmer C. R. & Smith S. K.** 1996. VEGF mRNA levels in placentae from pregnancies complicated by pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol* 103: 1191-1196.

- Craven C. M., Morgan T. & Ward K.** 1998. Decidual spiral artery remodelling begins before cellular interaction with cytotrophoblasts. *Placenta* 19: 241-252.
- Cronier L., Bastide B., Herve J. C., Deleze J. & Malassine A.** 1994. Gap junctional communication during human trophoblast differentiation: influence of human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 135: 402-408.
- Cross J. C., Werb Z. & Fisher S. J.** 1994. Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. *Science* 266: 1508-1518.
- Cross M. J., Dixelius J., Matsumoto T. & Claesson-Welsh L.** 2003. VEGF-receptor signal transduction. *Trends Biochem Sci* 28: 488-494.
- Cunningham FG, Mac Donald PC, Leveno KJ, Gant NF & III G. L.** 1993. *Williams obstetrics*, 19th edn. Appleton & Lange, East Norwalk, CT, pp 139-164.
- D'Amore P. A. & Smith S. R.** 1993. Growth factor effects on cells of the vascular wall: a survey. *Growth Factors* 8: 61-75.
- Darland D. C. & D'Amore P. A.** 2001. Cell-cell interactions in vascular development. *Curr Top Dev Biol* 52: 107-149.
- Davies S., Byrn F. & Cole L. A.** 2003. Human chorionic gonadotropin testing for early pregnancy viability and complications. *Clin Lab Med* 23: 257-264, vii.
- Davis J. S., West L. A. & Farese R. V.** 1984. Effects of luteinizing hormone on phosphoinositide metabolism in rat granulosa cells. *J Biol Chem* 259: 15028-15034.
- Davis S., Aldrich T. H., Jones P. F., Acheson A., Compton D. L., Jain V., Ryan T. E., Bruno J., Radziejewski C., Maisonpierre P. C. & Yancopoulos G. D.** 1996. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* 87: 1161-1169.
- De Falco S., Gigante B. & Persico M. G.** 2002. Structure and function of placental growth factor. *Trends Cardiovasc Med* 12: 241-246.
- de Martin R., Haendler B., Hofer-Warbinek R., Gaugitsch H., Wrann M., Schlusener H., Seifert J. M., Bodmer S., Fontana A. & Hofer E.** 1987. Complementary DNA for human glioblastoma-derived T cell suppressor factor, a novel member of the transforming growth factor-beta gene family. *EMBO J* 6: 3673-3677.
- de Vries C., Escobedo J. A., Ueno H., Houck K., Ferrara N. & Williams L. T.** 1992. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 255: 989-991.
- Demir R., Kaufmann P., Castellucci M., Erben T. & Kotowski A.** 1989. Fetal vasculogenesis and angiogenesis in human placental villi. *Acta Anat (Basel)* 136: 190-203.
- Dempsey E. W.** 1972. The development of capillaries in the villi of early human placentas. *Am J Anat* 134: 221-237.
- Denison F. C., Battersby S., King A. E., Szuber M. & Jabbour H. N.** 2008. Prokineticin-1: a novel mediator of the inflammatory response in third-trimester human placenta. *Endocrinology* 149: 3470-3477.
- Derynck R., Jarrett J. A., Chen E. Y., Eaton D. H., Bell J. R., Assoian R. K., Roberts A. B., Sporn M. B. & Goeddel D. V.** 1985. Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature* 316: 701-705.
- DiFederico E., Genbacev O. & Fisher S. J.** 1999. Preeclampsia is associated with widespread apoptosis of placental cytotrophoblasts within the uterine wall. *Am J Pathol* 155: 293-301.
- Dimmeler S., Dernbach E. & Zeiher A. M.** 2000. Phosphorylation of the endothelial nitric oxide synthase at ser-1177 is required for VEGF-induced endothelial cell migration. *FEBS Lett* 477: 258-262.

- Djonov V., Baum O. & Burri P. H.** 2003. Vascular remodeling by intussusceptive angiogenesis. *Cell Tissue Res* 314: 107-117.
- Dode C., Teixeira L., Levilliers J., Fouveaut C., Bouchard P., Kottler M. L., Lespinasse J., Lienhardt-Roussie A., Mathieu M., Moerman A., Morgan G., Murat A., Toublanc J. E., Wolczynski S., Delpech M., Petit C., Young J. & Hardelin J. P.** 2006. Kallmann syndrome: mutations in the genes encoding prokineticin-2 and prokineticin receptor-2. *PLoS Genet* 2: e175.
- Dorsch M., Qiu Y., Soler D., Frank N., Duong T., Goodearl A., O'Neil S., Lora J. & Fraser C. C.** 2005. PK1/EG-VEGF induces monocyte differentiation and activation. *J Leukoc Biol* 78: 426-434.
- Dugoff L., Hobbins J. C., Malone F. D., Porter T. F., Luthy D., Comstock C. H., Hankins G., Berkowitz R. L., Merkatz I., Craigo S. D., Timor-Tritsch I. E., Carr S. R., Wolfe H. M., Vidaver J. & D'Alton M. E.** 2004. First-trimester maternal serum PAPP-A and free-beta subunit human chorionic gonadotropin concentrations and nuchal translucency are associated with obstetric complications: a population-based screening study (the FASTER Trial). *Am J Obstet Gynecol* 191: 1446-1451.
- Dumps P., Meisser A., Pons D., Morales M. A., Anguenot J. L., Campana A. & Bischof P.** 2002. Accuracy of single measurements of pregnancy-associated plasma protein-A, human chorionic gonadotropin and progesterone in the diagnosis of early pregnancy failure. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 100: 174-180.
- Dunwoodie S. L.** 2009. The role of hypoxia in development of the Mammalian embryo. *Dev Cell* 17: 755-773.
- Egbor M., Ansari T., Morris N., Green C. J. & Sibbons P. D.** 2006. Pre-eclampsia and fetal growth restriction: how morphometrically different is the placenta? *Placenta* 27: 727-734.
- Elliott M. M., Kardana A., Lustbader J. W. & Cole L. A.** 1997. Carbohydrate and peptide structure of the alpha- and beta-subunits of human chorionic gonadotropin from normal and aberrant pregnancy and choriocarcinoma. *Endocrine* 7: 15-32.
- Eriksson A., Cao R., Pawliuk R., Berg S. M., Tsang M., Zhou D., Fleet C., Tritsarlis K., Dissing S., Leboulch P. & Cao Y.** 2002. Placenta growth factor-1 antagonizes VEGF-induced angiogenesis and tumor growth by the formation of functionally inactive PlGF-1/VEGF heterodimers. *Cancer Cell* 1: 99-108.
- Esser S., Lampugnani M. G., Corada M., Dejana E. & Risau W.** 1998. Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *J Cell Sci* 111 (Pt 13): 1853-1865.
- Eta E., Ambrus G. & Rao C. V.** 1994. Direct regulation of human myometrial contractions by human chorionic gonadotropin. *J Clin Endocrinol Metab* 79: 1582-1586.
- Evans J., Catalano R. D., Morgan K., Critchley H. O., Millar R. P. & Jabbour H. N.** 2008. Prokineticin 1 signaling and gene regulation in early human pregnancy. *Endocrinology* 149: 2877-2887.
- Evans J., Catalano R. D., Brown P., Sherwin R., Critchley H. O., Fazleabas A. T. & Jabbour H. N.** 2009. Prokineticin 1 mediates fetal-maternal dialogue regulating endometrial leukemia inhibitory factor. *FASEB J* 23: 2165-2175.
- Evans P. W., Wheeler T., Anthony F. W. & Osmond C.** 1998. A longitudinal study of maternal serum vascular endothelial growth factor in early pregnancy. *Hum Reprod* 13: 1057-1062.
- Fajardo L. F.** 1989. The complexity of endothelial cells. A review. *Am J Clin Pathol* 92: 241-250.

Ferrara N. & Henzel W. J. 1989. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 161: 851-858.

Ferrara N., Carver-Moore K., Chen H., Dowd M., Lu L., O'Shea K. S., Powell-Braxton L., Hillan K. J. & Moore M. W. 1996. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380: 439-442.

Ferrara N. 2002. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer* 2: 795-803.

Ferrara N., Frantz G., LeCouter J., Dillard-Telm L., Pham T., Draksharapu A., Giordano T. & Peale F. 2003. Differential expression of the angiogenic factor genes vascular endothelial growth factor (VEGF) and endocrine gland-derived VEGF in normal and polycystic human ovaries. *Am J Pathol* 162: 1881-1893.

Ferrara N., LeCouter J., Lin R. & Peale F. 2004. EG-VEGF and Bv8: a novel family of tissue-restricted angiogenic factors. *Biochim Biophys Acta* 1654: 69-78.

Ferriani R. A., Ahmed A., Sharkey A. & Smith S. K. 1994. Colocalization of acidic and basic fibroblast growth factor (FGF) in human placenta and the cellular effects of bFGF in trophoblast cell line JEG-3. *Growth Factors* 10: 259-268.

Fiddes J. C. & Goodman H. M. 1979. Isolation, cloning and sequence analysis of the cDNA for the alpha-subunit of human chorionic gonadotropin. *Nature* 281: 351-356.

Fiedler U. & Augustin H. G. 2006. Angiopoietins: a link between angiogenesis and inflammation. *Trends Immunol* 27: 552-558.

Filicori M., Fazleabas A. T., Huhtaniemi I., Licht P., Rao Ch V., Tesarik J. & Zygmunt M. 2005. Novel concepts of human chorionic gonadotropin: reproductive system interactions and potential in the management of infertility. *Fertil Steril* 84: 275-284.

Fischer C., Jonckx B., Mazzone M., Zacchigna S., Loges S., Pattarini L., Chorianopoulos E., Liesenborghs L., Koch M., De Mol M., Autiero M., Wyns S., Plaisance S., Moons L., van Rooijen N., Giacca M., Stassen J. M., Dewerchin M., Collen D. & Carmeliet P. 2007. Anti-PlGF inhibits growth of VEGF(R)-inhibitor-resistant tumors without affecting healthy vessels. *Cell* 131: 463-475.

Fisher S. J., Leitch M. S., Kantor M. S., Basbaum C. B. & Kramer R. H. 1985. Degradation of extracellular matrix by the trophoblastic cells of first-trimester human placentas. *J Cell Biochem* 27: 31-41.

Fitzgerald B., Levytska K., Kingdom J., Walker M., Baczyk D. & Keating S. 2011. Villous trophoblast abnormalities in extremely preterm deliveries with elevated second trimester maternal serum hCG or inhibin-A. *Placenta* 32: 339-345.

Folkman J. & Shing Y. 1992. Angiogenesis. *J Biol Chem* 267: 10931-10934.

Ford C. E., Skiba N. P., Bae H., Daaka Y., Reuveny E., Shekter L. R., Rosal R., Weng G., Yang C. S., Iyengar R., Miller R. J., Jan L. Y., Lefkowitz R. J. & Hamm H. E. 1998. Molecular basis for interactions of G protein betagamma subunits with effectors. *Science* 280: 1271-1274.

Fournier T., Handschuh K., Tsatsaris V. & Evain-Brion D. 2007. Involvement of PPARgamma in human trophoblast invasion. *Placenta* 28 Suppl A: S76-81.

Fraser H. M., Bell J., Wilson H., Taylor P. D., Morgan K., Anderson R. A. & Duncan W. C. 2005. Localization and quantification of cyclic changes in the expression of endocrine gland vascular endothelial growth factor in the human corpus luteum. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 427-434.

Fredriksson R. & Schioth H. B. 2005. The repertoire of G-protein-coupled receptors in fully sequenced genomes. *Mol Pharmacol* 67: 1414-1425.

Fujimoto A., Osuga Y., Fujiwara T., Yano T., Tsutsumi O., Momoeda M., Kugu K., Koga K., Morita Y., Wada O. & Taketani Y. 2002. Human chorionic gonadotropin

combined with progesterone for luteal support improves pregnancy rate in patients with low late-midluteal estradiol levels in IVF cycles. *J Assist Reprod Genet* 19: 550-554.

Gagnon A., Wilson R. D., Audibert F., Allen V. M., Blight C., Brock J. A., Desilets V. A., Johnson J. A., Langlois S., Summers A. & Wyatt P. 2008. Obstetrical complications associated with abnormal maternal serum markers analytes. *J Obstet Gynaecol Can* 30: 918-949.

Gale N. W. & Yancopoulos G. D. 1999. Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development. *Genes Dev* 13: 1055-1066.

Garlanda C. & Dejana E. 1997. Heterogeneity of endothelial cells. Specific markers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 1193-1202.

Genbacev O., Zhou Y., Ludlow J. W. & Fisher S. J. 1997. Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science* 277: 1669-1672.

Gerber H. P., McMurtrey A., Kowalski J., Yan M., Keyt B. A., Dixit V. & Ferrara N. 1998. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem* 273: 30336-30343.

Geva E., Ginzinger D. G., Zaloudek C. J., Moore D. H., Byrne A. & Jaffe R. B. 2002. Human placental vascular development: vasculogenic and angiogenic (branching and nonbranching) transformation is regulated by vascular endothelial growth factor-A, angiopoietin-1, and angiopoietin-2. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 4213-4224.

Gilbert S. 2006. *Developmental biology*, Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Gospodarowicz D., Abraham J. A. & Schilling J. 1989. Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 7311-7315.

Gruenwald P. 1977. The development of the placental lobular pattern in the human. Review and reinterpretation of the material. *Obstet Gynecol* 49: 728-732.

Gudermann T., Birnbaumer M. & Birnbaumer L. 1992. Evidence for dual coupling of the murine luteinizing hormone receptor to adenylyl cyclase and phosphoinositide breakdown and Ca²⁺ mobilization. Studies with the cloned murine luteinizing hormone receptor expressed in L cells. *J Biol Chem* 267: 4479-4488.

Guibourdenche J., Handschuh K., Tsatsaris V., Gerbaud P., Leguy M. C., Muller F., Brion D. E. & Fournier T. 2010. Hyperglycosylated hCG is a marker of early human trophoblast invasion. *J Clin Endocrinol Metab* 95: E240-244.

Guilini C., Urayama K., Turkeri G., Dedeoglu D. B., Kurose H., Messaddeq N. & Nebigil C. G. 2009. Divergent roles of prokineticin receptors in the endothelial cells: angiogenesis and fenestration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298: H844-852.

Handschuh K., Guibourdenche J., Tsatsaris V., Guesnon M., Laurendeau I., Evain-Brion D. & Fournier T. 2007a. Human chorionic gonadotropin expression in human trophoblasts from early placenta: comparative study between villous and extravillous trophoblastic cells. *Placenta* 28: 175-184.

Handschuh K., Guibourdenche J., Tsatsaris V., Guesnon M., Laurendeau I., Evain-Brion D. & Fournier T. 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: 5011-5019.

Handschuh K., Guibourdenche J., Cocquebert M., Tsatsaris V., Vidaud M., Evain-Brion D. & Fournier T. 2009. Expression and regulation by PPARgamma of hCG alpha- and beta-subunits: comparison between villous and invasive extravillous trophoblastic cells. *Placenta* 30: 1016-1022.

Haouzi D., Mahmoud K., Fourar M., Bendhaou K., Dechaud H., De Vos J., Reme T., Dewailly D. & Hamamah S. 2009. Identification of new biomarkers of human endometrial receptivity in the natural cycle. *Hum Reprod* 24: 198-205.

Harris L. K. & Aplin J. D. 2007. Vascular remodeling and extracellular matrix breakdown in the uterine spiral arteries during pregnancy. *Reprod Sci* 14: 28-34.

Harris L. K. 2010. Review: Trophoblast-vascular cell interactions in early pregnancy: how to remodel a vessel. *Placenta* 31 Suppl: S93-98.

Hattori K., Heissig B., Wu Y., Dias S., Tejada R., Ferris B., Hicklin D. J., Zhu Z., Bohlen P., Witte L., Hendriks J., Hackett N. R., Crystal R. G., Moore M. A., Werb Z., Lyden D. & Rafii S. 2002. Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment. *Nat Med* 8: 841-849.

Heinrich D., Metz J., Raviola E. & Forssmann W. G. 1976. Ultrastructure of perfusion-fixed fetal capillaries in the human placenta. *Cell Tissue Res* 172: 157-169.

Hellstrom M., Kalen M., Lindahl P., Abramsson A. & Betsholtz C. 1999. Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development* 126: 3047-3055.

Henriksen T. 1999. Foetal nutrition, foetal growth restriction and health later in life. *Acta Paediatr Suppl* 88: 4-8.

Herr F., Baal N., Reisinger K., Lorenz A., McKinnon T., Preissner K. T. & Zygmunt M. 2007. HCG in the regulation of placental angiogenesis. Results of an in vitro study. *Placenta* 28 Suppl A: S85-93.

Hirschi K. K., Rohovsky S. A. & D'Amore P. A. 1998. PDGF, TGF-beta, and heterotypic cell-cell interactions mediate endothelial cell-induced recruitment of 10T1/2 cells and their differentiation to a smooth muscle fate. *J Cell Biol* 141: 805-814.

Hoffman Y. M., Peegel H., Sprock M. J., Zhang Q. Y. & Menon K. M. 1991. Evidence that human chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptor down-regulation involves decreased levels of receptor messenger ribonucleic acid. *Endocrinology* 128: 388-393.

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: 1675-1684.

Hoffmann P., Feige J. J. & Alfaidy N. 2007. Placental expression of EG-VEGF and its receptors PKR1 (prokineticin receptor-1) and PKR2 throughout mouse gestation. *Placenta* 28: 1049-1058.

Hoffmann P., Saudi Y., Benharouga M., Graham C. H., Schaal J. P., Mazouni C., Feige J. J. & Alfaidy N. 2009. Role of EG-VEGF in human placentation: Physiological and pathological implications. *J Cell Mol Med* 13: 2224-2235.

Hoogerwerf W. A. 2006. Prokineticin 1 inhibits spontaneous giant contractions in the murine proximal colon through nitric oxide release. *Neurogastroenterol Motil* 18: 455-463.

Hoshina M., Boothby M., Hussa R., Pattillo R., Camel H. M. & Boime I. 1985. Linkage of human chorionic gonadotrophin and placental lactogen biosynthesis to trophoblast differentiation and tumorigenesis. *Placenta* 6: 163-172.

Houck K. A., Leung D. W., Rowland A. M., Winer J. & Ferrara N. 1992. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem* 267: 26031-26037.

Hu W. P., Zhang C., Li J. D., Luo Z. D., Amadesi S., Bunnett N. & Zhou Q. Y. 2006. Impaired pain sensation in mice lacking prokineticin 2. *Mol Pain* 2: 35.

Hu Z. Z., Tsai-Morris C. H., Buczko E. & Dufau M. L. 1990. Hormonal regulation of LH receptor mRNA and expression in the rat ovary. *FEBS Lett* 274: 181-184.

Huhtaniemi I. & Pelliniemi L. J. 1992. Fetal Leydig cells: cellular origin, morphology, life span, and special functional features. *Proc Soc Exp Biol Med* 201: 125-140.

Huhtaniemi I. T., Korenbrot C. C. & Jaffe R. B. 1977. HCG binding and stimulation of testosterone biosynthesis in the human fetal testis. *J Clin Endocrinol Metab* 44: 963-967.

Hung T. H., Skepper J. N., Charnock-Jones D. S. & Burton G. J. 2002. Hypoxia-reoxygenation: a potent inducer of apoptotic changes in the human placenta and possible etiological factor in preeclampsia. *Circ Res* 90: 1274-1281.

Hung T. H., Charnock-Jones D. S., Skepper J. N. & Burton G. J. 2004. Secretion of tumor necrosis factor-alpha from human placental tissues induced by hypoxia-reoxygenation causes endothelial cell activation in vitro: a potential mediator of the inflammatory response in preeclampsia. *Am J Pathol* 164: 1049-1061.

Hunzicker-Dunn M. & Birnbaumer L. 1976. Adenylyl cyclase activities in ovarian tissues. IV. Gonadotrophin-induced desensitization of the luteal adenylyl cyclase throughout pregnancy and pseudopregnancy in the rabbit and the rat. *Endocrinology* 99: 211-222.

Huppertz B. & Kingdom J. C. 2004. Apoptosis in the trophoblast--role of apoptosis in placental morphogenesis. *J Soc Gynecol Investig* 11: 353-362.

Huppertz B., Kadyrov M. & Kingdom J. C. 2006. Apoptosis and its role in the trophoblast. *Am J Obstet Gynecol* 195: 29-39.

Hussa R. O. 1980. Biosynthesis of human chorionic gonadotropin. *Endocr Rev* 1: 268-294.

Hustin J. & Schaaps J. P. 1987. Echographic [corrected] and anatomic studies of the maternotrophoblastic border during the first trimester of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 157: 162-168.

Irani R. A. & Xia Y. 2008. The functional role of the renin-angiotensin system in pregnancy and preeclampsia. *Placenta* 29: 763-771.

Irving J. A. & Lala P. K. 1995. Functional role of cell surface integrins on human trophoblast cell migration: regulation by TGF-beta, IGF-II, and IGFBP-1. *Exp Cell Res* 217: 419-427.

Ishihara N., Matsuo H., Murakoshi H., Laoag-Fernandez J. B., Samoto T. & Maruo T. 2002. Increased apoptosis in the syncytiotrophoblast in human term placentas complicated by either preeclampsia or intrauterine growth retardation. *Am J Obstet Gynecol* 186: 158-166.

Islami D., Bischof P. & Chardonens D. 2003. Modulation of placental vascular endothelial growth factor by leptin and hCG. *Mol Hum Reprod* 9: 395-398.

Ivan M., Kondo K., Yang H., Kim W., Valiando J., Ohh M., Salic A., Asara J. M., Lane W. S. & Kaelin W. G., Jr. 2001. HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing. *Science* 292: 464-468.

Jaakkola P., Mole D. R., Tian Y. M., Wilson M. I., Gielbert J., Gaskell S. J., Kriegsheim A., Hestreit H. F., Mukherji M., Schofield C. J., Maxwell P. H., Pugh C. W. & Ratcliffe P. J. 2001. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292: 468-472.

Jackson M. R., Mayhew T. M. & Boyd P. A. 1992. Quantitative description of the elaboration and maturation of villi from 10 weeks of gestation to term. *Placenta* 13: 357-370.

Jackson M. R., Carney E. W., Lye S. J. & Ritchie J. W. 1994. Localization of two angiogenic growth factors (PDEC GF and VEGF) in human placentae throughout gestation. *Placenta* 15: 341-353.

Jackson M. R., Walsh A. J., Morrow R. J., Mullen J. B., Lye S. J. & Ritchie J. W. 1995. Reduced placental villous tree elaboration in small-for-gestational-age pregnancies: relationship with umbilical artery Doppler waveforms. *Am J Obstet Gynecol* 172: 518-525.

- Jain R. K.** 2003. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 9: 685-693.
- Jarvenpaa J., Vuoristo J. T., Savolainen E. R., Ukkola O., Vaskivuo T. & Ryynanen M.** 2007. Altered expression of angiogenesis-related placental genes in pre-eclampsia associated with intrauterine growth restriction. *Gynecol Endocrinol* 23: 351-355.
- Jauniaux E., Burton G. J., Moscoso G. J. & Hustin J.** 1991a. Development of the early human placenta: a morphometric study. *Placenta* 12: 269-276.
- Jauniaux E., Jurkovic D. & Campbell S.** 1991b. In vivo investigations of the anatomy and the physiology of early human placental circulations. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1: 435-445.
- Jauniaux E., Bao S., Eblen A., Li X., Lei Z. M., Meuris S. & Rao C. V.** 2000a. HCG concentration and receptor gene expression in placental tissue from trisomy 18 and 21. *Mol Hum Reprod* 6: 5-10.
- Jauniaux E., Watson A. L., Hempstock J., Bao Y. P., Skepper J. N. & Burton G. J.** 2000b. Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress. A possible factor in human early pregnancy failure. *Am J Pathol* 157: 2111-2122.
- Jauniaux E., Watson A. & Burton G.** 2001. Evaluation of respiratory gases and acid-base gradients in human fetal fluids and uteroplacental tissue between 7 and 16 weeks' gestation. *Am J Obstet Gynecol* 184: 998-1003.
- Jauniaux E., Hempstock J., Greenwold N. & Burton G. J.** 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: 115-125.
- Jeltsch M., Kaipainen A., Joukov V., Meng X., Lakso M., Rauvala H., Swartz M., Fukumura D., Jain R. K. & Alitalo K.** 1997. Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science* 276: 1423-1425.
- Jewell U. R., Kvietikova I., Scheid A., Bauer C., Wenger R. H. & Gassmann M.** 2001. Induction of HIF-1alpha in response to hypoxia is instantaneous. *FASEB J* 15: 1312-1314.
- Jones C. J. & Fox H.** 1991. Ultrastructure of the normal human placenta. *Electron Microsc Rev* 4: 129-178.
- Joubert F. J. & Taljaard N.** 1980. Snake venoms. The amino acid sequences of two proteinase inhibitor homologues from *Dendroaspis angusticeps* venom. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 361: 661-674.
- Joukov V., Kaipainen A., Jeltsch M., Pajusola K., Olofsson B., Kumar V., Eriksson U. & Alitalo K.** 1997. Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C. *J Cell Physiol* 173: 211-215.
- Jussila L. & Alitalo K.** 2002. Vascular growth factors and lymphangiogenesis. *Physiol Rev* 82: 673-700.
- Kady S. & Gardosi J.** 2004. Perinatal mortality and fetal growth restriction. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 18: 397-410.
- Kaelin W. G., Jr.** 2002. Molecular basis of the VHL hereditary cancer syndrome. *Nat Rev Cancer* 2: 673-682.
- Kaser A., Winklmayr M., Lepperdinger G. & Kreil G.** 2003. The AVIT protein family. Secreted cysteine-rich vertebrate proteins with diverse functions. *EMBO Rep* 4: 469-473.
- Kash J. C. & Menon K. M.** 1998. Identification of a hormonally regulated luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor mRNA binding protein. Increased mrna binding during receptor down-regulation. *J Biol Chem* 273: 10658-10664.
- Kashida S., Sugino N., Takiguchi S., Karube A., Takayama H., Yamagata Y., Nakamura Y. & Kato H.** 2001. Regulation and role of vascular endothelial growth factor in the corpus luteum during mid-pregnancy in rats. *Biol Reprod* 64: 317-323.

- Kato Y. & Braunstein G. D.** 1990. Purified first and third trimester placental trophoblasts differ in in vitro hormone secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 70: 1187-1192.
- Kaufmann P., Sen D. K. & Schweikhart G.** 1979. Classification of human placental villi. I. Histology. *Cell Tissue Res* 200: 409-423.
- Kaufmann P.** 1982. Development and differentiation of the human placental villous tree. *Bibl Anat*: 29-39.
- Kaufmann P., Bruns U., Leiser R., Luckhardt M. & Winterhager E.** 1985. The fetal vascularisation of term human placental villi. II. Intermediate and terminal villi. *Anat Embryol (Berl)* 173: 203-214.
- Kaufmann P., Black S. & Huppertz B.** 2003. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biol Reprod* 69: 1-7.
- Kaufmann P., Mayhew T. M. & Charnock-Jones D. S.** 2004. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. II. Changes during normal pregnancy. *Placenta* 25: 114-126.
- Keck P. J., Hauser S. D., Krivi G., Sanzo K., Warren T., Feder J. & Connolly D. T.** 1989. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 246: 1309-1312.
- Keramidas M., Faudot C., Cibiel A., Feige J. J. & Thomas M.** 2008. Mitogenic functions of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor and Bombina variegata 8 on steroidogenic adrenocortical cells. *J Endocrinol* 196: 473-482.
- Kevil C. G., Payne D. K., Mire E. & Alexander J. S.** 1998. Vascular permeability factor/vascular endothelial cell growth factor-mediated permeability occurs through disorganization of endothelial junctional proteins. *J Biol Chem* 273: 15099-15103.
- Khaliq A., Li X. F., Shams M., Sisi P., Acevedo C. A., Whittle M. J., Weich H. & Ahmed A.** 1996. Localisation of placenta growth factor (PlGF) in human term placenta. *Growth Factors* 13: 243-250, color plates I-II, pre bk cov.
- Khaliq A., Dunk C., Jiang J., Shams M., Li X. F., Acevedo C., Weich H., Whittle M. & Ahmed A.** 1999. Hypoxia down-regulates placenta growth factor, whereas fetal growth restriction up-regulates placenta growth factor expression: molecular evidence for "placental hyperoxia" in intrauterine growth restriction. *Lab Invest* 79: 151-170.
- Khong T. Y., De Wolf F., Robertson W. B. & Brosens I.** 1986. Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and by small-for-gestational age infants. *Br J Obstet Gynaecol* 93: 1049-1059.
- Kimball E. S., Prouty S. P., Pavlick K. P., Wallace N. H., Schneider C. R. & Hornby P. J.** 2007. Stimulation of neuronal receptors, neuropeptides and cytokines during experimental oil of mustard colitis. *Neurogastroenterol Motil* 19: 390-400.
- Kingdom J., Huppertz B., Seaward G. & Kaufmann P.** 2000. Development of the placental villous tree and its consequences for fetal growth. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 92: 35-43.
- Kingdom J. C. & Kaufmann P.** 1997. Oxygen and placental villous development: origins of fetal hypoxia. *Placenta* 18: 613-621; discussion 623-616.
- Kirkegaard I., Henriksen T. B. & Uldbjerg N.** 2011. Early fetal growth, PAPP-A and free beta-hCG in relation to risk of delivering a small-for-gestational age infant. *Ultrasound Obstet Gynecol* 37: 341-347.
- Kisliouk T., Levy N., Hurwitz A. & Meidan R.** 2003. Presence and regulation of endocrine gland vascular endothelial growth factor/prokineticin-1 and its receptors in ovarian cells. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 3700-3707.

Kisliouk T., Podlovni H. & Meidan R. 2005a. Unique expression and regulatory mechanisms of EG-VEGF/prokineticin-1 and its receptors in the corpus luteum. *Ann Anat* 187: 529-537.

Kisliouk T., Podlovni H., Spanel-Borowski K., Ovadia O., Zhou Q. Y. & Meidan R. 2005b. Prokineticins (endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor and BV8) in the bovine ovary: expression and role as mitogens and survival factors for corpus luteum-derived endothelial cells. *Endocrinology* 146: 3950-3958.

Kliman H. J., Nestler J. E., Sermasi E., Sanger J. M. & Strauss J. F., 3rd. 1986. Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinology* 118: 1567-1582.

Knoth M. 1968. Ultrastructure of chorionic villi from a four-somite human embryo. *J Ultrastruct Res* 25: 423-440.

Kohn S., Nagy J. A., Dvorak H. F. & Dvorak A. M. 1992. Pathways of macromolecular tracer transport across venules and small veins. Structural basis for the hyperpermeability of tumor blood vessels. *Lab Invest* 67: 596-607.

Konopatskaya O., Churchill A. J., Harper S. J., Bates D. O. & Gardiner T. A. 2006. VEGF165b, an endogenous C-terminal splice variant of VEGF, inhibits retinal neovascularization in mice. *Mol Vis* 12: 626-632.

Koo Y. B., Ji I., Slaughter R. G. & Ji T. H. 1991. Structure of the luteinizing hormone receptor gene and multiple exons of the coding sequence. *Endocrinology* 128: 2297-2308.

Kovalevskaya G., Birken S., Kakuma T., Ozaki N., Sauer M., Lindheim S., Cohen M., Kelly A., Schlatterer J. & O'Connor J. F. 2002a. Differential expression of human chorionic gonadotropin (hCG) glycosylation isoforms in failing and continuing pregnancies: preliminary characterization of the hyperglycosylated hCG epitope. *J Endocrinol* 172: 497-506.

Kovalevskaya G., Genbacev O., Fisher S. J., Caceres E. & O'Connor J. F. 2002b. Trophoblast origin of hCG isoforms: cytotrophoblasts are the primary source of choriocarcinoma-like hCG. *Mol Cell Endocrinol* 194: 147-155.

Krantz D., Goetzl L., Simpson J. L., Thom E., Zachary J., Hallahan T. W., Silver R., Pergament E., Platt L. D., Filkins K., Johnson A., Mahoney M., Hogge W. A., Wilson R. D., Mohide P., Hershey D. & Wapner R. 2004. Association of extreme first-trimester free human chorionic gonadotropin-beta, pregnancy-associated plasma protein A, and nuchal translucency with intrauterine growth restriction and other adverse pregnancy outcomes. *Am J Obstet Gynecol* 191: 1452-1458.

Krebs C., Macara L. M., Leiser R., Bowman A. W., Greer I. A. & Kingdom J. C. 1996. Intrauterine growth restriction with absent end-diastolic flow velocity in the umbilical artery is associated with maldevelopment of the placental terminal villous tree. *Am J Obstet Gynecol* 175: 1534-1542.

Kukk E., Lymboussaki A., Taira S., Kaipainen A., Jeltsch M., Joukov V. & Alitalo K. 1996. VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development. *Development* 122: 3829-3837.

Kurtzman J. T., Spinnato J. A., Goldsmith L. J., Zimmerman M. J., Klem M., Lei Z. M. & Rao C. V. 1999. Human chorionic gonadotropin exhibits potent inhibition of preterm delivery in a small animal model. *Am J Obstet Gynecol* 181: 853-857.

Kurtzman J. T., Wilson H. & Rao C. V. 2001. A proposed role for hCG in clinical obstetrics. *Semin Reprod Med* 19: 63-68.

Kurz H., Wilting J., Sandau K. & Christ B. 1998. Automated evaluation of angiogenic effects mediated by VEGF and PlGF homo- and heterodimers. *Microvasc Res* 55: 92-102.

- Lambert C. M., Machida K. K., Smale L., Nunez A. A. & Weaver D. R.** 2005. Analysis of the prokineticin 2 system in a diurnal rodent, the unstriped Nile grass rat (*Arvicanthis niloticus*). *J Biol Rhythms* 20: 206-218.
- Lang I., Hoffmann C., Olip H., Pabst M. A., Hahn T., Dohr G. & Desoye G.** 2001. Differential mitogenic responses of human macrovascular and microvascular endothelial cells to cytokines underline their phenotypic heterogeneity. *Cell Prolif* 34: 143-155.
- Lang I., Pabst M. A., Hiden U., Blaschitz A., Dohr G., Hahn T. & Desoye G.** 2003. Heterogeneity of microvascular endothelial cells isolated from human term placenta and macrovascular umbilical vein endothelial cells. *Eur J Cell Biol* 82: 163-173.
- LaPolt P. S., Oikawa M., Jia X. C., Dargan C. & Hsueh A. J.** 1990. Gonadotropin-induced up- and down-regulation of rat ovarian LH receptor message levels during follicular growth, ovulation and luteinization. *Endocrinology* 126: 3277-3279.
- Laphorn A. J., Harris D. C., Littlejohn A., Lustbader J. W., Canfield R. E., Machin K. J., Morgan F. J. & Isaacs N. W.** 1994. Crystal structure of human chorionic gonadotropin. *Nature* 369: 455-461.
- Lash G. E., Taylor C. M., Trew A. J., Cooper S., Anthony F. W., Wheeler T. & Baker P. N.** 2002. Vascular endothelial growth factor and placental growth factor release in cultured trophoblast cells under different oxygen tensions. *Growth Factors* 20: 189-196.
- Laugwitz K. L., Offermanns S., Spicher K. & Schultz G.** 1993. μ and δ opioid receptors differentially couple to G protein subtypes in membranes of human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neuron* 10: 233-242.
- Leach L., Babawale M. O., Anderson M. & Lammiman M.** 2002. Vasculogenesis, angiogenesis and the molecular organisation of endothelial junctions in the early human placenta. *J Vasc Res* 39: 246-259.
- LeCouter J., Kowalski J., Foster J., Hass P., Zhang Z., Dillard-Telm L., Frantz G., Rangell L., DeGuzman L., Keller G. A., Peale F., Gurney A., Hillan K. J. & Ferrara N.** 2001. Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium. *Nature* 412: 877-884.
- LeCouter J., Lin R., Frantz G., Zhang Z., Hillan K. & Ferrara N.** 2003a. Mouse endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor: a distinct expression pattern from its human ortholog suggests different roles as a regulator of organ-specific angiogenesis. *Endocrinology* 144: 2606-2616.
- LeCouter J., Lin R., Tejada M., Frantz G., Peale F., Hillan K. J. & Ferrara N.** 2003b. The endocrine-gland-derived VEGF homologue Bv8 promotes angiogenesis in the testis: Localization of Bv8 receptors to endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 2685-2690.
- LeCouter J., Zlot C., Tejada M., Peale F. & Ferrara N.** 2004. Bv8 and endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor stimulate hematopoiesis and hematopoietic cell mobilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 16813-16818.
- Lee J., Gray A., Yuan J., Luoh S. M., Avraham H. & Wood W. I.** 1996. Vascular endothelial growth factor-related protein: a ligand and specific activator of the tyrosine kinase receptor Flt4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 1988-1992.
- Lee J. W., Bae S. H., Jeong J. W., Kim S. H. & Kim K. W.** 2004. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) α : its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med* 36: 1-12.
- Lee Y. L., Chan Y. L., Chow W. N., Ng E. H., Lee K. F., Yeung W. S. & Ho P. C.** 2009. Endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor stimulates proliferation and tube formation in human uterine microvascular endothelial cell through the mitogen-activated protein kinase but not through the Akt pathway. *Fertil Steril* 91: 2163-2171.

- Leung D. W., Cachianes G., Kuang W. J., Goeddel D. V. & Ferrara N.** 1989. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246: 1306-1309.
- Levy R. & Nelson D. M.** 2000. To be, or not to be, that is the question. Apoptosis in human trophoblast. *Placenta* 21: 1-13.
- Li B., Sharpe E. E., Maupin A. B., Teleron A. A., Pyle A. L., Carmeliet P. & Young P. P.** 2006a. VEGF and PlGF promote adult vasculogenesis by enhancing EPC recruitment and vessel formation at the site of tumor neovascularization. *FASEB J* 20: 1495-1497.
- Li J. D., Hu W. P., Boehmer L., Cheng M. Y., Lee A. G., Jilek A., Siegel J. M. & Zhou Q. Y.** 2006b. Attenuated circadian rhythms in mice lacking the prokineticin 2 gene. *J Neurosci* 26: 11615-11623.
- Li J. D., Hu W. P. & Zhou Q. Y.** 2009. Disruption of the circadian output molecule prokineticin 2 results in anxiolytic and antidepressant-like effects in mice. *Neuropsychopharmacology* 34: 367-373.
- Li M., Bullock C. M., Knauer D. J., Ehlert F. J. & Zhou Q. Y.** 2001. Identification of two prokineticin cDNAs: recombinant proteins potently contract gastrointestinal smooth muscle. *Mol Pharmacol* 59: 692-698.
- Licht P., Cao H., Lei Z. M., Rao C. V. & Merz W. E.** 1993. Novel self-regulation of human chorionic gonadotropin biosynthesis in term pregnancy human placenta. *Endocrinology* 133: 3014-3025.
- 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: 37-47.
- Lin D. C., Bullock C. M., Ehlert F. J., Chen J. L., Tian H. & Zhou Q. Y.** 2002a. Identification and molecular characterization of two closely related G protein-coupled receptors activated by prokineticins/endocrine gland vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 277: 19276-19280.
- Lin R., LeCouter J., Kowalski J. & Ferrara N.** 2002b. Characterization of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor signaling in adrenal cortex capillary endothelial cells. *J Biol Chem* 277: 8724-8729.
- Lindahl P., Johansson B. R., Leveen P. & Betsholtz C.** 1997. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science* 277: 242-245.
- Liu Y., Cox S. R., Morita T. & Kourembanas S.** 1995. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ Res* 77: 638-643.
- Long P. A., Abell D. A. & Beischer N. A.** 1980. Fetal growth retardation and pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol* 87: 13-18.
- Lu D. L., Peegel H., Mosier S. M. & Menon K. M.** 1993. Loss of lutropin/human choriongonadotropin receptor messenger ribonucleic acid during ligand-induced down-regulation occurs post transcriptionally. *Endocrinology* 132: 235-240.
- Luttrell L. M.** 2008. Reviews in molecular biology and biotechnology: transmembrane signaling by G protein-coupled receptors. *Mol Biotechnol* 39: 239-264.
- Luttun A., Tjwa M., Moons L., Wu Y., Angelillo-Scherrer A., Liao F., Nagy J. A., Hooper A., Priller J., De Klerck B., Compennolle V., Daci E., Bohlen P., Dewerchin M., Herbert J. M., Fava R., Matthys P., Carmeliet G., Collen D., Dvorak H. F., Hicklin D. J. & Carmeliet P.** 2002. Revascularization of ischemic tissues by PlGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. *Nat Med* 8: 831-840.

Madhra M., Gay E., Fraser H. M. & Duncan W. C. 2004. Alternative splicing of the human luteal LH receptor during luteolysis and maternal recognition of pregnancy. *Mol Hum Reprod* 10: 599-603.

Madisen L., Webb N. R., Rose T. M., Marquardt H., Ikeda T., Twardzik D., Seyedin S. & Purchio A. F. 1988. Transforming growth factor-beta 2: cDNA cloning and sequence analysis. *DNA* 7: 1-8.

Maggio R., Barbier P., Colelli A., Salvadori F., Demontis G. & Corsini G. U. 1999. G protein-linked receptors: pharmacological evidence for the formation of heterodimers. *J Pharmacol Exp Ther* 291: 251-257.

Maggio R., Innamorati G. & Parenti M. 2007. G protein-coupled receptor oligomerization provides the framework for signal discrimination. *J Neurochem* 103: 1741-1752.

Maglione D., Guerriero V., Viglietto G., Delli-Bovi P. & Persico M. G. 1991. Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 9267-9271.

Maisonpierre P. C., Suri C., Jones P. F., Bartunkova S., Wiegand S. J., Radziejewski C., Compton D., McClain J., Aldrich T. H., Papadopoulos N., Daly T. J., Davis S., Sato T. N. & Yancopoulos G. D. 1997. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 277: 55-60.

Maldonado-Perez D., Evans J., Denison F., Millar R. P. & Jabbour H. N. 2007. Potential roles of the prokineticins in reproduction. *Trends Endocrinol Metab* 18: 66-72.

Maldonado-Perez D., Brown P., Morgan K., Millar R. P., Thompson E. A. & Jabbour H. N. 2009. Prokineticin 1 modulates IL-8 expression via the calcineurin/NFAT signaling pathway. *Biochim Biophys Acta* 1793: 1315-1324.

Mandriota S. J. & Pepper M. S. 1998. Regulation of angiopoietin-2 mRNA levels in bovine microvascular endothelial cells by cytokines and hypoxia. *Circ Res* 83: 852-859.

Marsango S., Bonaccorsi di Patti M. C., Barra D. & Miele R. 2010. Evidence that prokineticin receptor 2 exists as a dimer in vivo. *Cell Mol Life Sci*.

Marsh J. M., Mills T. M. & Lemaire W. J. 1973. Preovulatory changes in the synthesis of cyclic AMP by rabbit Graafian follicles. *Biochim Biophys Acta* 304: 197-202.

Martucci C., Franchi S., Giannini E., Tian H., Melchiorri P., Negri L. & Sacerdote P. 2006. Bv8, the amphibian homologue of the mammalian prokineticins, induces a proinflammatory phenotype of mouse macrophages. *Br J Pharmacol* 147: 225-234.

Massotte D., Brillet K., Kieffer B. & Milligan G. 2002. Agonists activate Gi1 alpha or Gi2 alpha fused to the human mu opioid receptor differently. *J Neurochem* 81: 1372-1382.

Masuda Y., Takatsu Y., Terao Y., Kumano S., Ishibashi Y., Suenaga M., Abe M., Fukusumi S., Watanabe T., Shintani Y., Yamada T., Hinuma S., Inatomi N., Ohtaki T., Onda H. & Fujino M. 2002. Isolation and identification of EG-VEGF/prokineticins as cognate ligands for two orphan G-protein-coupled receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 293: 396-402.

Matsumoto S., Yamazaki C., Masumoto K. H., Nagano M., Naito M., Soga T., Hiyama H., Matsumoto M., Takasaki J., Kamohara M., Matsuo A., Ishii H., Kobori M., Katoh M., Matsushime H., Furuichi K. & Shigeyoshi Y. 2006. Abnormal development of the olfactory bulb and reproductive system in mice lacking prokineticin receptor PKR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 4140-4145.

Matzuk M. M., DeMayo F. J., Hadsell L. A. & Kumar T. R. 2003. Overexpression of human chorionic gonadotropin causes multiple reproductive defects in transgenic mice. *Biol Reprod* 69: 338-346.

- Mayhew T. M.** 2002. Fetoplacental angiogenesis during gestation is biphasic, longitudinal and occurs by proliferation and remodelling of vascular endothelial cells. *Placenta* 23: 742-750.
- Mayhew T. M., Ohadike C., Baker P. N., Crocker I. P., Mitchell C. & Ong S. S.** 2003. Stereological investigation of placental morphology in pregnancies complicated by pre-eclampsia with and without intrauterine growth restriction. *Placenta* 24: 219-226.
- Mayhew T. M., Charnock-Jones D. S. & Kaufmann P.** 2004a. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. III. Changes in complicated pregnancies. *Placenta* 25: 127-139.
- Mayhew T. M., Wijesekara J., Baker P. N. & Ong S. S.** 2004b. Morphometric evidence that villous development and fetoplacental angiogenesis are compromised by intrauterine growth restriction but not by pre-eclampsia. *Placenta* 25: 829-833.
- McCarthy C., Cotter F. E., McElwaine S., Twomey A., Mooney E. E., Ryan F. & Vaughan J.** 2007. Altered gene expression patterns in intrauterine growth restriction: potential role of hypoxia. *Am J Obstet Gynecol* 196: 70 e71-76.
- McFarland K. C., Sprengel R., Phillips H. S., Kohler M., Roseblit N., Nikolics K., Segaloff D. L. & Seeburg P. H.** 1989. Lutropin-choriogonadotropin receptor: an unusual member of the G protein-coupled receptor family. *Science* 245: 494-499.
- Meeson A. P., Argilla M., Ko K., Witte L. & Lang R. A.** 1999. VEGF deprivation-induced apoptosis is a component of programmed capillary regression. *Development* 126: 1407-1415.
- Melchiorri D., Bruno V., Besong G., Ngomba R. T., Cuomo L., De Blasi A., Copani A., Moschella C., Storto M., Nicoletti F., Lepperdinger G. & Passarelli F.** 2001. The mammalian homologue of the novel peptide Bv8 is expressed in the central nervous system and supports neuronal survival by activating the MAP kinase/PI-3-kinase pathways. *Eur J Neurosci* 13: 1694-1702.
- Menon K. M. & Jaffe R. B.** 1973. Chorionic gonadotropin sensitive adenylate cyclase in human term placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 36: 1104-1109.
- Menon K. M. & Gunaga K. P.** 1974. Role of cyclic AMP in reproductive processes. *Fertil Steril* 25: 732-750.
- Menon K. M., Munshi U. M., Clouser C. L. & Nair A. K.** 2004. Regulation of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor expression: a perspective. *Biol Reprod* 70: 861-866.
- Menon K. M., Menon B., Wang L., Gulappa T. & Harada M.** 2010. Molecular regulation of gonadotropin receptor expression: relationship to sterol metabolism. *Mol Cell Endocrinol* 329: 26-32.
- Meyer M., Clauss M., Lepple-Wienhues A., Waltenberger J., Augustin H. G., Ziche M., Lanz C., Buttner M., Rziha H. J. & Dehio C.** 1999. A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 18: 363-374.
- Michiels C.** 2003. Endothelial cell functions. *J Cell Physiol* 196: 430-443.
- Migdal M., Huppertz B., Tessler S., Comforti A., Shibuya M., Reich R., Baumann H. & Neufeld G.** 1998. Neuropilin-1 is a placenta growth factor-2 receptor. *J Biol Chem* 273: 22272-22278.
- Mignatti P., Mazziari R. & Rifkin D. B.** 1991. Expression of the urokinase receptor in vascular endothelial cells is stimulated by basic fibroblast growth factor. *J Cell Biol* 113: 1193-1201.
- Mihu C. M., Susman S., Rus Ciuca D., Mihu D. & Costin N.** 2009. Aspects of placental morphogenesis and angiogenesis. *Rom J Morphol Embryol* 50: 549-557.

Miller-Kasprzak E. & Jagodzinski P. P. 2008. 5-Aza-2'-deoxycytidine increases the expression of anti-angiogenic vascular endothelial growth factor 189b variant in human lung microvascular endothelial cells. *Biomed Pharmacother* 62: 158-163.

Minegishi T., Nakamura K., Takakura Y., Miyamoto K., Hasegawa Y., Ibuki Y., Igarashi M. & Minegishi T. 1990. Cloning and sequencing of human LH/hCG receptor cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* 172: 1049-1054.

Mizuochi T., Nishimura R., Derappe C., Taniguchi T., Hamamoto T., Mochizuki M. & Kobata A. 1983. Structures of the asparagine-linked sugar chains of human chorionic gonadotropin produced in choriocarcinoma. Appearance of triantennary sugar chains and unique biantennary sugar chains. *J Biol Chem* 258: 14126-14129.

Mollay C., Wechselberger C., Mignogna G., Negri L., Melchiorri P., Barra D. & Kreil G. 1999. Bv8, a small protein from frog skin and its homologue from snake venom induce hyperalgesia in rats. *Eur J Pharmacol* 374: 189-196.

Monnier J. & Samson M. 2008. Cytokine properties of prokineticins. *FEBS J* 275: 4014-4021.

Montanari L., Alfei A., Albonico G., Moratti R., Arossa A., Beneventi F. & Spinillo A. 2009. The impact of first-trimester serum free beta-human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein A on the diagnosis of fetal growth restriction and small for gestational age infant. *Fetal Diagn Ther* 25: 130-135.

Montesano R., Vassalli J. D., Baird A., Guillemin R. & Orci L. 1986. Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 7297-7301.

Morrish D. W., Dakour J., Li H., Xiao J., Miller R., Sherburne R., Berdan R. C. & Guilbert L. J. 1997. In vitro cultured human term cytotrophoblast: a model for normal primary epithelial cells demonstrating a spontaneous differentiation programme that requires EGF for extensive development of syncytium. *Placenta* 18: 577-585.

Morton A. J., Wood N. I., Hastings M. H., Hurelbrink C., Barker R. A. & Maywood E. S. 2005. Disintegration of the sleep-wake cycle and circadian timing in Huntington's disease. *J Neurosci* 25: 157-163.

Mossman H. 1987. Vertebrate foetal membranes : comparative ontogeny and morphology, evolution, phylogenetic significance, basic functions, research opportunities. Rutgers University Press, New Brunswick, NJ.

Muhlhauser J., Crescimanno C., Kasper M., Zaccheo D. & Castellucci M. 1995. Differentiation of human trophoblast populations involves alterations in cytokeratin patterns. *J Histochem Cytochem* 43: 579-589.

Muhlhauser J., Marzioni D., Morroni M., Vuckovic M., Crescimanno C. & Castellucci M. 1996. Codistribution of basic fibroblast growth factor and heparan sulfate proteoglycan in the growth zones of the human placenta. *Cell Tissue Res* 285: 101-107.

Murray J. D. 2003. On the mechanochemical theory of biological pattern formation with application to vasculogenesis. *C R Biol* 326: 239-252.

Murthi P., So M., Gude N. M., Doherty V. L., Brennecke S. P. & Kalionis B. 2007. Homeobox genes are differentially expressed in macrovascular human umbilical vein endothelial cells and microvascular placental endothelial cells. *Placenta* 28: 219-223.

Murthi P., Hiden U., Rajaraman G., Liu H., Borg A. J., Coombes F., Desoye G., Brennecke S. P. & Kalionis B. 2008. Novel homeobox genes are differentially expressed in placental microvascular endothelial cells compared with macrovascular cells. *Placenta* 29: 624-630.

Muyan M. & Boime I. 1997. Secretion of chorionic gonadotropin from human trophoblasts. *Placenta* 18: 237-241.

- Nakamura K., Yamashita S., Omori Y. & Minegishi T.** 2004. A splice variant of the human luteinizing hormone (LH) receptor modulates the expression of wild-type human LH receptor. *Mol Endocrinol* 18: 1461-1470.
- Neer E. J.** 1995. Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* 80: 249-257.
- Negri L., Lattanzi R., Giannini E., Metere A., Colucci M., Barra D., Kreil G. & Melchiorri P.** 2002. Nociceptive sensitization by the secretory protein Bv8. *Br J Pharmacol* 137: 1147-1154.
- Negri L., Lattanzi R., Giannini E., De Felice M., Colucci A. & Melchiorri P.** 2004. Bv8, the amphibian homologue of the mammalian prokineticins, modulates ingestive behaviour in rats. *Br J Pharmacol* 142: 181-191.
- Negri L., Lattanzi R., Giannini E., Colucci M., Margheriti F., Melchiorri P., Vellani V., Tian H., De Felice M. & Porreca F.** 2006. Impaired nociception and inflammatory pain sensation in mice lacking the prokineticin receptor PKR1: focus on interaction between PKR1 and the capsaicin receptor TRPV1 in pain behavior. *J Neurosci* 26: 6716-6727.
- Negri L., Lattanzi R., Giannini E. & Melchiorri P.** 2007. Bv8/Prokineticin proteins and their receptors. *Life Sci* 81: 1103-1116.
- Neufeld G., Cohen T., Gengrinovitch S. & Poltorak Z.** 1999. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 13: 9-22.
- Newhouse S. M., Davidge S. T., Winkler-Lowen B., Demianczuk N. & Guilbert L. J.** 2007. In vitro differentiation of villous trophoblasts from pregnancies complicated by intrauterine growth restriction with and without pre-eclampsia. *Placenta* 28: 999-1003.
- Ng K. L., Li J. D., Cheng M. Y., Leslie F. M., Lee A. G. & Zhou Q. Y.** 2005. Dependence of olfactory bulb neurogenesis on prokineticin 2 signaling. *Science* 308: 1923-1927.
- Ngan E. S., Lee K. Y., Yeung W. S., Ngan H. Y., Ng E. H. & Ho P. C.** 2006. Endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor is expressed in human peri-implantation endometrium, but not in endometrial carcinoma. *Endocrinology* 147: 88-95.
- Ngan E. S., Lee K. Y., Sit F. Y., Poon H. C., Chan J. K., Sham M. H., Lui V. C. & Tam P. K.** 2007a. Prokineticin-1 modulates proliferation and differentiation of enteric neural crest cells. *Biochim Biophys Acta* 1773: 536-545.
- Ngan E. S., Sit F. Y., Lee K., Miao X., Yuan Z., Wang W., Nicholls J. M., Wong K. K., Garcia-Barcelo M., Lui V. C. & Tam P. K.** 2007b. Implications of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor/prokineticin-1 signaling in human neuroblastoma progression. *Clin Cancer Res* 13: 868-875.
- Ngan E. S. & Tam P. K.** 2008. Prokineticin-signaling pathway. *Int J Biochem Cell Biol* 40: 1679-1684.
- Nishizuka Y.** 1984. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* 308: 693-698.
- Nisula B. C., Blithe D. L., Akar A., Lefort G. & Wehmann R. E.** 1989. Metabolic fate of human choriogonadotropin. *J Steroid Biochem* 33: 733-737.
- Noden D. M.** 1989. Embryonic origins and assembly of blood vessels. *Am Rev Respir Dis* 140: 1097-1103.
- Odibo A. O., Sehdev H. M., Stamilio D. M. & Macones G. A.** 2006. Evaluating the thresholds of abnormal second trimester multiple marker screening tests associated with intrauterine growth restriction. *Am J Perinatol* 23: 363-367.
- Oh H., Takagi H., Suzuma K., Otani A., Matsumura M. & Honda Y.** 1999. Hypoxia and vascular endothelial growth factor selectively up-regulate angiopoietin-2 in bovine microvascular endothelial cells. *J Biol Chem* 274: 15732-15739.

- Olofsson B., Pajusola K., Kaipainen A., von Euler G., Joukov V., Saksela O., Orpana A., Pettersson R. F., Alitalo K. & Eriksson U.** 1996. Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 2576-2581.
- Papetti M. & Herman I. M.** 2002. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 282: C947-970.
- Pardanaud L., Yassine F. & Dieterlen-Lievre F.** 1989. Relationship between vasculogenesis, angiogenesis and haemopoiesis during avian ontogeny. *Development* 105: 473-485.
- Park J. E., Keller G. A. & Ferrara N.** 1993. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell* 4: 1317-1326.
- Park J. E., Chen H. H., Winer J., Houck K. A. & Ferrara N.** 1994. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J Biol Chem* 269: 25646-25654.
- Pasquali D., Rossi V., Staibano S., De Rosa G., Chieffi P., Prezioso D., Mirone V., Mascolo M., Tramontano D., Bellastella A. & Sinisi A. A.** 2006. The endocrine-gland-derived vascular endothelial growth factor (EG-VEGF)/prokineticin 1 and 2 and receptor expression in human prostate: Up-regulation of EG-VEGF/prokineticin 1 with malignancy. *Endocrinology* 147: 4245-4251.
- Patan S., Haenni B. & Burri P. H.** 1996a. Implementation of intussusceptive microvascular growth in the chicken chorioallantoic membrane (CAM): 1. pillar formation by folding of the capillary wall. *Microvasc Res* 51: 80-98.
- Patan S., Munn L. L. & Jain R. K.** 1996b. Intussusceptive microvascular growth in a human colon adenocarcinoma xenograft: a novel mechanism of tumor angiogenesis. *Microvasc Res* 51: 260-272.
- Patan S.** 2000. Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling. *J Neurooncol* 50: 1-15.
- Piegel H., Randolph J., Jr., Midgley A. R. & Menon K. M.** 1994. In situ hybridization of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor messenger ribonucleic acid during hormone-induced down-regulation and the subsequent recovery in rat corpus luteum. *Endocrinology* 135: 1044-1051.
- Pepper M. S., Tille J. C., Nisato R. & Skobe M.** 2003. Lymphangiogenesis and tumor metastasis. *Cell Tissue Res* 314: 167-177.
- Perrin R. M., Konopatskaya O., Qiu Y., Harper S., Bates D. O. & Churchill A. J.** 2005. Diabetic retinopathy is associated with a switch in splicing from anti- to pro-angiogenic isoforms of vascular endothelial growth factor. *Diabetologia* 48: 2422-2427.
- Persico M. G., Vincenti V. & DiPalma T.** 1999. Structure, expression and receptor-binding properties of placenta growth factor (PlGF). *Curr Top Microbiol Immunol* 237: 31-40.
- Phillips R. J., Tyson-Capper Nee Pollard A. J., Bailey J., Robson S. C. & Europe-Finner G. N.** 2005. Regulation of expression of the chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptor gene in the human myometrium: involvement of specificity protein-1 (Sp1), Sp3, Sp4, Sp-like proteins, and histone deacetylases. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 3479-3490.
- Pidoux G., Gerbaud P., Marpeau O., Guibourdenche J., Ferreira F., Badet J., Evain-Brion D. & Frenzo J. L.** 2007a. Human placental development is impaired by abnormal human chorionic gonadotropin signaling in trisomy 21 pregnancies. *Endocrinology* 148: 5403-5413.
- Pidoux G., Gerbaud P., Tsatsaris V., Marpeau O., Ferreira F., Meduri G., Guibourdenche J., Badet J., Evain-Brion D. & Frenzo J. L.** 2007b. Biochemical

characterization and modulation of LH/CG-receptor during human trophoblast differentiation. *J Cell Physiol* 212: 26-35.

Pierce J. G. & Parsons T. F. 1981. Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu Rev Biochem* 50: 465-495.

Pijnenborg R., Dixon G., Robertson W. B. & Brosens I. 1980. Trophoblastic invasion of human decidua from 8 to 18 weeks of pregnancy. *Placenta* 1: 3-19.

Pijnenborg R., Bland J. M., Robertson W. B., Dixon G. & Brosens I. 1981. The pattern of interstitial trophoblastic invasion of the myometrium in early human pregnancy. *Placenta* 2: 303-316.

Pijnenborg R., Bland J. M., Robertson W. B. & Brosens I. 1983. Uteroplacental arterial changes related to interstitial trophoblast migration in early human pregnancy. *Placenta* 4: 397-413.

Pipp F., Heil M., Issbrucker K., Ziegelhoeffer T., Martin S., van den Heuvel J., Weich H., Fernandez B., Golomb G., Carmeliet P., Schaper W. & Clauss M. 2003. VEGFR-1-selective VEGF homologue PlGF is arteriogenic: evidence for a monocyte-mediated mechanism. *Circ Res* 92: 378-385.

Pitteloud N., Zhang C., Pignatelli D., Li J. D., Raivio T., Cole L. W., Plummer L., Jacobson-Dickman E. E., Mellon P. L., Zhou Q. Y. & Crowley W. F., Jr. 2007. Loss-of-function mutation in the prokineticin 2 gene causes Kallmann syndrome and normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 17447-17452.

Plouet J., Schilling J. & Gospodarowicz D. 1989. Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells. *EMBO J* 8: 3801-3806.

Podlovni H., Ovadia O., Kisliouk T., Klipper E., Zhou Q. Y., Friedman A., Alfaidy N. & Meidan R. 2006. Differential expression of prokineticin receptors by endothelial cells derived from different vascular beds: a physiological basis for distinct endothelial function. *Cell Physiol Biochem* 18: 315-326.

Poole T. J. & Coffin J. D. 1989. Vasculogenesis and angiogenesis: two distinct morphogenetic mechanisms establish embryonic vascular pattern. *J Exp Zool* 251: 224-231.

Potgens A. J., Lubsen N. H., van Altena M. C., Vermeulen R., Bakker A., Schoenmakers J. G., Ruiten D. J. & de Waal R. M. 1994. Covalent dimerization of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor is essential for its biological activity. Evidence from Cys to Ser mutations. *J Biol Chem* 269: 32879-32885.

Prather P. L., McGinn T. M., Erickson L. J., Evans C. J., Loh H. H. & Law P. Y. 1994. Ability of delta-opioid receptors to interact with multiple G-proteins is independent of receptor density. *J Biol Chem* 269: 21293-21302.

Prosser H. M., Bradley A., Chesham J. E., Ebling F. J., Hastings M. H. & Maywood E. S. 2007. Prokineticin receptor 2 (Prokr2) is essential for the regulation of circadian behavior by the suprachiasmatic nuclei. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 648-653.

Rafii S., Avezilla S., Shmelkov S., Shido K., Tejada R., Moore M. A., Heissig B. & Hattori K. 2003. Angiogenic factors reconstitute hematopoiesis by recruiting stem cells from bone marrow microenvironment. *Ann N Y Acad Sci* 996: 49-60.

Rahman N. A. & Rao C. V. 2009. Recent progress in luteinizing hormone/human chorionic gonadotrophin hormone research. *Mol Hum Reprod* 15: 703-711.

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: 696-710.

Rao C. V., Li X., Toth P., Lei Z. M. & Cook V. D. 1993. Novel expression of functional human chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptor gene in human umbilical cords. *J Clin Endocrinol Metab* 77: 1706-1714.

Rao C. V. 1996. The beginning of a new era in reproductive biology and medicine : Expression of low functional luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptors in nongonadal tissues. *J Physiol Pharmacol* 47: 41-53.

Rao C. V. & Lei Z. M. 2007. The past, present and future of nongonadal LH/hCG actions in reproductive biology and medicine. *Mol Cell Endocrinol* 269: 2-8.

Redman C. W. 1991. Current topic: pre-eclampsia and the placenta. *Placenta* 12: 301-308.

Redman C. W. & Sargent I. L. 2000. Placental debris, oxidative stress and pre-eclampsia. *Placenta* 21: 597-602.

Redman C. W. & Sargent I. L. 2001. The pathogenesis of pre-eclampsia. *Gynecol Obstet Fertil* 29: 518-522.

Regnault T. R., Galan H. L., Parker T. A. & Anthony R. V. 2002. Placental development in normal and compromised pregnancies-- a review. *Placenta* 23 Suppl A: S119-129.

Reshef E., Lei Z. M., Rao C. V., Pridham D. D., Chegini N. & Luborsky J. L. 1990. The presence of gonadotropin receptors in nonpregnant human uterus, human placenta, fetal membranes, and decidua. *J Clin Endocrinol Metab* 70: 421-430.

Resnick N. & Gimbrone M. A., Jr. 1995. Hemodynamic forces are complex regulators of endothelial gene expression. *FASEB J* 9: 874-882.

Risau W. 1995. Differentiation of endothelium. *FASEB J* 9: 926-933.

Risau W. & Flamme I. 1995. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11: 73-91.

Risau W. 1997. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386: 671-674.

Roberts J. M., Taylor R. N., Musci T. J., Rodgers G. M., Hubel C. A. & McLaughlin M. K. 1989. Preeclampsia: an endothelial cell disorder. *Am J Obstet Gynecol* 161: 1200-1204.

Roberts J. M. 2000. Preeclampsia: what we know and what we do not know. *Semin Perinatol* 24: 24-28.

Roberts J. M. & Cooper D. W. 2001. Pathogenesis and genetics of pre-eclampsia. *Lancet* 357: 53-56.

Rodesch F., Simon P., Donner C. & Jauniaux E. 1992. Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy. *Obstet Gynecol* 80: 283-285.

Roh C. R., Budhraja V., Kim H. S., Nelson D. M. & Sadovsky Y. 2005. Microarray-based identification of differentially expressed genes in hypoxic term human trophoblasts and in placental villi of pregnancies with growth restricted fetuses. *Placenta* 26: 319-328.

Rosenbaum D. M., Rasmussen S. G. & Kobilka B. K. 2009. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* 459: 356-363.

Rousseau-Merck M. F., Misrahi M., Atger M., Loosfelt H., Milgrom E. & Berger R. 1990. Localization of the human luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor gene (LHCGR) to chromosome 2p21. *Cytogenet Cell Genet* 54: 77-79.

Runting A. S., Stacker S. A. & Wilks A. F. 1993. tie2, a putative protein tyrosine kinase from a new class of cell surface receptor. *Growth Factors* 9: 99-105.

Salker M., Teklenburg G., Molokhia M., Lavery S., Trew G., Aojanpong T., Mardon H. J., Lokugamage A. U., Rai R., Landles C., Roelen B. A., Quenby S., Kuijk E. W., Kavelaars A., Heijnen C. J., Regan L., Macklon N. S. & Brosens J. J. 2010. Natural selection of human embryos: impaired decidualization of endometrium disables embryo-maternal interactions and causes recurrent pregnancy loss. *PLoS One* 5: e10287.

Salven P., Lymboussaki A., Heikkila P., Jaaskela-Saari H., Enholm B., Aase K., von Euler G., Eriksson U., Alitalo K. & Joensuu H. 1998. Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C are expressed in human tumors. *Am J Pathol* 153: 103-108.

- Samson M., Peale F. V., Jr., Frantz G., Rioux-Leclercq N., Rajpert-De Meyts E. & Ferrara N.** 2004. Human endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor: expression early in development and in Leydig cell tumors suggests roles in normal and pathological testis angiogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 4078-4088.
- Sasaki Y., Ladner D. G. & Cole L. A.** 2008. Hyperglycosylated human chorionic gonadotropin and the source of pregnancy failures. *Fertil Steril* 89: 1781-1786.
- Sato T. N., Qin Y., Kozak C. A. & Audus K. L.** 1993. Tie-1 and tie-2 define another class of putative receptor tyrosine kinase genes expressed in early embryonic vascular system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 9355-9358.
- Sato Y., Tsuboi R., Lyons R., Moses H. & Rifkin D. B.** 1990. Characterization of the activation of latent TGF-beta by co-cultures of endothelial cells and pericytes or smooth muscle cells: a self-regulating system. *J Cell Biol* 111: 757-763.
- Scholler R. & coll.** 1980. Surveillance hormonale de la grossesse: *Encycl. Méd. Chir. Paris, Obstétrique*, 5015 A 10, 11.
- Schweitz H., Bidard J. N. & Lazdunski M.** 1990. Purification and pharmacological characterization of peptide toxins from the black mamba (*Dendroaspis polylepis*) venom. *Toxicon* 28: 847-856.
- Schweitz H., Pacaud P., Diochot S., Moinier D. & Lazdunski M.** 1999. MIT(1), a black mamba toxin with a new and highly potent activity on intestinal contraction. *FEBS Lett* 461: 183-188.
- Segaloff D. L., Wang H. Y. & Richards J. S.** 1990. Hormonal regulation of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor mRNA in rat ovarian cells during follicular development and luteinization. *Mol Endocrinol* 4: 1856-1865.
- Senger D. R., Galli S. J., Dvorak A. M., Perruzzi C. A., Harvey V. S. & Dvorak H. F.** 1983. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219: 983-985.
- Senger D. R., Perruzzi C. A., Feder J. & Dvorak H. F.** 1986. A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines. *Cancer Res* 46: 5629-5632.
- Seval Y., Sati L., Celik-Ozenci C., Taskin O. & Demir R.** 2008. The distribution of angiopoietin-1, angiopoietin-2 and their receptors tie-1 and tie-2 in the very early human placenta. *Placenta* 29: 809-815.
- Shalaby F., Rossant J., Yamaguchi T. P., Gertsenstein M., Wu X. F., Breitman M. L. & Schuh A. C.** 1995. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 376: 62-66.
- Shams M. & Ahmed A.** 1994. Localization of mRNA for basic fibroblast growth factor in human placenta. *Growth Factors* 11: 105-111.
- Sharkey A. M., Charnock-Jones D. S., Boocock C. A., Brown K. D. & Smith S. K.** 1993. Expression of mRNA for vascular endothelial growth factor in human placenta. *J Reprod Fertil* 99: 609-615.
- Sher D., Knebel A., Bsoir T., Neshor N., Tal T., Morgenstern D., Cohen E., Fishman Y. & Zlotkin E.** 2005. Toxic polypeptides of the hydra--a bioinformatic approach to cnidarian allomones. *Toxicon* 45: 865-879.
- Shi Q. J., Lei Z. M., Rao C. V. & Lin J.** 1993. Novel role of human chorionic gonadotropin in differentiation of human cytotrophoblasts. *Endocrinology* 132: 1387-1395.
- Shi Y. & Massague J.** 2003. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113: 685-700.
- Shibuya M. & Claesson-Welsh L.** 2006. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res* 312: 549-560.

- Shore V. H., Wang T. H., Wang C. L., Torry R. J., Caudle M. R. & Torry D. S.** 1997. Vascular endothelial growth factor, placenta growth factor and their receptors in isolated human trophoblast. *Placenta* 18: 657-665.
- Sibai B., Dekker G. & Kupferminc M.** 2005. Pre-eclampsia. *Lancet* 365: 785-799.
- Sibley C. P., Turner M. A., Cetin I., Ayuk P., Boyd C. A., D'Souza S. W., Glazier J. D., Greenwood S. L., Jansson T. & Powell T.** 2005. Placental phenotypes of intrauterine growth. *Pediatr Res* 58: 827-832.
- Slattery M. M., Brennan C., O'Leary M. J. & Morrison J. J.** 2001. Human chorionic gonadotrophin inhibition of pregnant human myometrial contractility. *BJOG* 108: 704-708.
- Smit M. J., Vischer H. F., Bakker R. A., Jongejan A., Timmerman H., Pardo L. & Leurs R.** 2007. Pharmacogenomic and structural analysis of constitutive g protein-coupled receptor activity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47: 53-87.
- Smith S. C., Baker P. N. & Symonds E. M.** 1997. Increased placental apoptosis in intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 177: 1395-1401.
- Soderhall I., Kim Y. A., Jiravanichpaisal P., Lee S. Y. & Soderhall K.** 2005. An ancient role for a prokineticin domain in invertebrate hematopoiesis. *J Immunol* 174: 6153-6160.
- Soga T., Matsumoto S., Oda T., Saito T., Hiyama H., Takasaki J., Kamohara M., Ohishi T., Matsushime H. & Furuichi K.** 2002. Molecular cloning and characterization of prokineticin receptors. *Biochim Biophys Acta* 1579: 173-179.
- Soothill P. W., Nicolaides K. H., Rodeck C. H. & Campbell S.** 1986. Effect of gestational age on fetal and intervillous blood gas and acid-base values in human pregnancy. *Fetal Ther* 1: 168-175.
- Spencer K., Cowans N. J., Avgidou K., Molina F. & Nicolaides K. H.** 2008. First-trimester biochemical markers of aneuploidy and the prediction of small-for-gestational age fetuses. *Ultrasound Obstet Gynecol* 31: 15-19.
- Stockell Hartree A. & Renwick A. G.** 1992. Molecular structures of glycoprotein hormones and functions of their carbohydrate components. *Biochem J* 287 (Pt 3): 665-679.
- Su M. T., Lin S. H., Lee I. W., Chen Y. C., Hsu C. C., Pan H. A. & Kuo P. L.** 2010. Polymorphisms of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor gene and its receptor genes are associated with recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod* 25: 2923-2930.
- Sugino N., Kashida S., Takiguchi S., Karube A. & Kato H.** 2000. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in the human corpus luteum during the menstrual cycle and in early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 3919-3924.
- Szeto T. H., Wang X. H., Smith R., Connor M., Christie M. J., Nicholson G. M. & King G. F.** 2000. Isolation of a funnel-web spider polypeptide with homology to mamba intestinal toxin 1 and the embryonic head inducer Dickkopf-1. *Toxicon* 38: 429-442.
- Takasugi N., Iguchi T., Kurihara J., Tei A. & Takase M.** 1985. Changes in gonads of male and female offspring of mice receiving a continuous intravenous infusion of human chorionic gonadotropin during gestation. *Exp Clin Endocrinol* 86: 273-283.
- Talmadge K., Boorstein W. R. & Fiddes J. C.** 1983. The human genome contains seven genes for the beta-subunit of chorionic gonadotropin but only one gene for the beta-subunit of luteinizing hormone. *DNA* 2: 281-289.
- Tanaka N., Ikawa M., Mata N. L. & Verma I. M.** 2006. Choroidal neovascularization in transgenic mice expressing prokineticin 1: an animal model for age-related macular degeneration. *Mol Ther* 13: 609-616.
- Tao Y. X., Lei Z. M., Hofmann G. E. & Rao C. V.** 1995. Human intermediate trophoblasts express chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptor gene. *Biol Reprod* 53: 899-904.

- Tapanainen P. J., Bang P., Wilson K., Unterman T. G., Vreman H. J. & Rosenfeld R. G.** 1994. Maternal hypoxia as a model for intrauterine growth retardation: effects on insulin-like growth factors and their binding proteins. *Pediatr Res* 36: 152-158.
- te Velde E. A., Exalto N., Hesselink P. & van der Linden H. C.** 1997. First trimester development of human chorionic villous vascularization studied with CD34 immunohistochemistry. *Hum Reprod* 12: 1577-1581.
- ten Dijke P., Hansen P., Iwata K. K., Pieler C. & Foulkes J. G.** 1988. Identification of another member of the transforming growth factor type beta gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 4715-4719.
- Terman B. I., Dougher-Vermazen M., Carrion M. E., Dimitrov D., Armellino D. C., Gospodarowicz D. & Bohlen P.** 1992. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 187: 1579-1586.
- Tertemiz F., Kayisli U. A., Arici A. & Demir R.** 2005. Apoptosis contributes to vascular lumen formation and vascular branching in human placental vasculogenesis. *Biol Reprod* 72: 727-735.
- Tesarik J., Hazout A. & Mendoza C.** 2003. Luteinizing hormone affects uterine receptivity independently of ovarian function. *Reprod Biomed Online* 7: 59-64.
- Than N. G., Itakura A., Rao Ch V., Nohira T., Toth P., Mansell J. P., Isaka K., Nishi H., Takayama M. & Than G. N.** 2003. Clinical applications of pregnancy-related proteins--a workshop report. *Placenta* 24 Suppl A: S60-64.
- Thurston G., Rudge J. S., Ioffe E., Zhou H., Ross L., Croll S. D., Glazer N., Holash J., McDonald D. M. & Yancopoulos G. D.** 2000. Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nat Med* 6: 460-463.
- Toal M., Chaddha V., Windrim R. & Kingdom J.** 2008. Ultrasound detection of placental insufficiency in women with elevated second trimester serum alpha-fetoprotein or human chorionic gonadotropin. *J Obstet Gynaecol Can* 30: 198-206.
- Tong S., Wallace E. M. & Rombauts L.** 2006. Association between low day 16 hCG and miscarriage after proven cardiac activity. *Obstet Gynecol* 107: 300-304.
- Torry D. S., Wang H. S., Wang T. H., Caudle M. R. & Torry R. J.** 1998. Preeclampsia is associated with reduced serum levels of placenta growth factor. *Am J Obstet Gynecol* 179: 1539-1544.
- Torry D. S., Hinrichs M. & Torry R. J.** 2004. Determinants of placental vascularity. *Am J Reprod Immunol* 51: 257-268.
- Toth P., Li X., Rao C. V., Lincoln S. R., Sanfilippo J. S., Spinnato J. A., 2nd & Yussman M. A.** 1994. Expression of functional human chorionic gonadotropin/human luteinizing hormone receptor gene in human uterine arteries. *J Clin Endocrinol Metab* 79: 307-315.
- Toth P., Lukacs H., Gimes G., Sebestyen A., Pasztor N., Paulin F. & Rao C. V.** 2001. Clinical importance of vascular LH/hCG receptors--a review. *Reprod Biol* 1: 5-11.
- Trollmann R., Amann K., Schoof E., Beinder E., Wenzel D., Rascher W. & Dotsch J.** 2003. Hypoxia activates the human placental vascular endothelial growth factor system in vitro and in vivo: up-regulation of vascular endothelial growth factor in clinically relevant hypoxic ischemia in birth asphyxia. *Am J Obstet Gynecol* 188: 517-523.
- Urayama K., Guilini C., Messaddeq N., Hu K., Steenman M., Kurose H., Ert G. & Nebigil C. G.** 2007. The prokineticin receptor-1 (GPR73) promotes cardiomyocyte survival and angiogenesis. *FASEB J* 21: 2980-2993.
- Urayama K., Guilini C., Turkeri G., Takir S., Kurose H., Messaddeq N., Dierich A. & Nebigil C. G.** 2008. Prokineticin receptor-1 induces neovascularization and epicardial-derived progenitor cell differentiation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28: 841-849.

- Urayama K., Dedeoglu D. B., Guilini C., Frantz S., Ertl G., Messaddeq N. & Nebigil C. G.** 2009. Transgenic myocardial overexpression of prokineticin receptor-2 (GPR73b) induces hypertrophy and capillary vessel leakage. *Cardiovasc Res* 81: 28-37.
- Usher R. & McLean F.** 1969. Intrauterine growth of live-born Caucasian infants at sea level: standards obtained from measurements in 7 dimensions of infants born between 25 and 44 weeks of gestation. *J Pediatr* 74: 901-910.
- Valdes G. & Corthorn J.** 2011. Review: The angiogenic and vasodilatory utero-placental network. *Placenta* 32 Suppl 2: S170-175.
- Vuorela P., Hatva E., Lymboussaki A., Kaipainen A., Joukov V., Persico M. G., Alitalo K. & Halmesmaki E.** 1997. Expression of vascular endothelial growth factor and placenta growth factor in human placenta. *Biol Reprod* 56: 489-494.
- Walker J. J.** 2000. Pre-eclampsia. *Lancet* 356: 1260-1265.
- Wang G. L., Jiang B. H., Rue E. A. & Semenza G. L.** 1995. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 5510-5514.
- Wechselberger C., Puglisi R., Engel E., Lepperdinger G., Boitani C. & Kreil G.** 1999. The mammalian homologues of frog Bv8 are mainly expressed in spermatocytes. *FEBS Lett* 462: 177-181.
- Wen S., Wilson D. T., Kuruppu S., Korsinczky M. L., Hedrick J., Pang L., Szeto T., Hodgson W. C., Alewood P. F. & Nicholson G. M.** 2005. Discovery of an MIT-like atracotoxin family: spider venom peptides that share sequence homology but not pharmacological properties with AVIT family proteins. *Peptides* 26: 2412-2426.
- Wetschreck N. & Offermanns S.** 2005. Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev* 85: 1159-1204.
- Wheeler T., Elcock C. L. & Anthony F. W.** 1995. Angiogenesis and the placental environment. *Placenta* 16: 289-296.
- Woolard J., Wang W. Y., Bevan H. S., Qiu Y., Morbidelli L., Pritchard-Jones R. O., Cui T. G., Sugiono M., Waine E., Perrin R., Foster R., Digby-Bell J., Shields J. D., Whittles C. E., Mushens R. E., Gillatt D. A., Ziche M., Harper S. J. & Bates D. O.** 2004. VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. *Cancer Res* 64: 7822-7835.
- Yoshida Y.** 2005. Secretion of human chorionic gonadotropin in early pregnancy. *Med Mol Morphol* 38: 104-111.
- Zetter B. R.** 1981. The endothelial cells of large and small blood vessels. *Diabetes* 30: 24-28.
- Zhang E. G., Smith S. K., Baker P. N. & Charnock-Jones D. S.** 2001. The regulation and localization of angiopoietin-1, -2, and their receptor Tie2 in normal and pathologic human placentae. *Mol Med* 7: 624-635.
- Zhou Q. Y.** 2006. The prokineticins: a novel pair of regulatory peptides. *Mol Interv* 6: 330-338.
- Zhou Y., Damsky C. H. & Fisher S. J.** 1997a. 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: 2152-2164.
- Zhou Y., Fisher S. J., Janatpour M., Genbacev O., Dejana E., Wheelock M. & Damsky C. H.** 1997b. Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion? *J Clin Invest* 99: 2139-2151.
- Zhou Y., Genbacev O., Damsky C. H. & Fisher S. J.** 1998. Oxygen regulates human cytotrophoblast differentiation and invasion: implications for endovascular invasion in normal pregnancy and in pre-eclampsia. *J Reprod Immunol* 39: 197-213.

Ziche M., Maglione D., Ribatti D., Morbidelli L., Lago C. T., Battisti M., Paoletti I., Barra A., Tucci M., Parise G., Vincenti V., Granger H. J., Viglietto G. & Persico M. G. 1997. Placenta growth factor-1 is chemotactic, mitogenic, and angiogenic. *Lab Invest* 76: 517-531.

Zuo J., Lei Z. M. & Rao C. V. 1994. Human myometrial chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptors in preterm and term deliveries. *J Clin Endocrinol Metab* 79: 907-911.

Zygmunt M., Herr F., Keller-Schoenwetter S., Kunzi-Rapp K., Munstedt K., Rao C. V., Lang U. & Preissner K. T. 2002. Characterization of human chorionic gonadotropin as a novel angiogenic factor. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 5290-5296.

RÉSUMÉ

Le développement normal du placenta est la clé du succès de la grossesse. La croissance trophoblastique et vasculaire est une composante cruciale du développement placentaire. Un déficit dans ces processus conduit à des complications de la grossesse, telles que la Toxémie Gravidique (TG) ou le Retard de Croissance Intra-Utérin (RCIU). Récemment, un nouveau facteur angiogène spécifique des glandes endocrines vient d'être découvert : EG-VEGF pour « Endocrine Gland-derived Vascular Endothelial Growth Factor » ou PROK1 pour Prokineticin 1, facteur qui se lie à deux récepteurs couplés aux protéines G, PROKR1 et PROKR2. Dans des publications récentes du laboratoire, l'équipe a montré que : **I**) EG-VEGF est fortement exprimé dans le placenta, **II**) son expression est majoritaire au 1^{er} trimestre et **III**) les niveaux circulants d'EG-VEGF sont augmentés dans la TG, pathologie qui résulte de défauts vasculaires importants. L'ensemble de ces résultats convergeait vers un effet potentiel important d'EG-VEGF sur le placenta. Les objectifs de ma thèse ont été de caractériser **(1)** l'effet angiogène d'EG-VEGF sur les cellules endothéliales microvasculaires placentaires (HPEC), **(2)** d'étudier sa régulation par l'hCG (human Chorionic Gonadotropin), et **(3)** d'étudier son expression au 3^{ème} trimestre dans les grossesses avec RCIU. J'ai montré que **1)** EG-VEGF est un facteur angiogène important, et que ses effets angiogènes sont médiés par PROKR1, alors que c'est PROKR2 qui est impliqué dans ses effets sur la perméabilité, **2)** l'hCG augmente la sécrétion d'EG-VEGF, ainsi que l'expression des PROKR au 1^{er} trimestre de la grossesse, et **3)** EG-VEGF augmente la prolifération et la survie des trophoblastes, et est induit ainsi que ses récepteurs au 3^{ème} trimestre dans les grossesses avec RCIU. L'ensemble de ces résultats montre qu'EG-VEGF est un nouveau facteur de croissance du placenta. Sa dérégulation dans la TG et le RCIU suggère qu'il pourrait servir de marqueur précoce prédictif pour ces pathologies et être utilisé comme cible thérapeutique potentielle dans l'avenir.

Mots clés: grossesse, placenta, EG-VEGF, PROK1, angiogenèse, RCIU, hCG, pathologie

ABSTRACT

Growth of the placental villi is a key event in placental development during human pregnancy. Many growth factors have been shown to control this process; however their ubiquitous expression makes them less specific to this tissue. Recently, a new growth factor named EG-VEGF (Endocrine Gland-derived Vascular Endothelial Growth Factor), specific to endocrine glands including the placenta, has been identified. It mediates its biological activity via two G protein coupled receptors, Prokineticin Receptor 1 and 2 (PROKR1 and PROKR2). In recent work from our laboratory, we have shown that: **I**) EG-VEGF is abundantly expressed in human placenta **II**) EG-VEGF levels are highest during the first trimester and **III**) EG-VEGF circulating levels are increased in preeclampsia (PE). Altogether, our results suggested that EG-VEGF might be an important regulatory factor in the placenta. My aim was to investigate **(1)** EG-VEGF angiogenic effects on microvascular cells within the placenta (HPEC), **(2)** its hormonal regulation with hCG (human Chorionic Gonadotropin), and **(3)** its expression in IUGR (Intrauterine Growth Restriction) pregnancies in the third trimester. Our results show that **1)** EG-VEGF increases angiogenic processes in HPEC cells via PROKR1, and also their permeability via PROKR2 **2)** hCG increases EG-VEGF secretion and PROKR expression in the first trimester placenta and **3)** EG-VEGF increases both trophoblast proliferation and survival, and its expression is dysregulated in IUGR in the third trimester of pregnancy. Altogether, our results show that EG-VEGF is a new placental growth factor. Its dysregulation in PE and IUGR suggests that it can be considered as a potential diagnostic marker and a potential therapeutic target in future.

Keywords: pregnancy, placenta, EG-VEGF, PROK1, angiogenesis, IUGR, hCG, pathology