

Table des matières

Liste des illustrations et des tableaux	11
Abréviations	15
INTRODUCTION	19
I. Le placenta humain	19
1.1 Mise en place du placenta humain	21
1.1.1. Phase préimplantatoire	21
1.1.2. Phase implantatoire : La placentation.....	21
1.1.1.1. Stade prélacunaire.....	23
1.1.1.2. Stade lacunaire	23
1.1.1.3. Stade vilieux.....	23
1.2 Mise en place de la villosité placentaire	25
1.2.1. Formation des villosités primaires	25
1.2.2. Formation des villosités secondaires	25
1.2.3. Formation des villosités tertiaires	25
1.2.4. Villosités crampons et villosités flottantes.....	25
1.2.4.1. Différenciation trophoblastique	25
1.2.4.2. Cytotrophoblaste vilieux	27
1.2.4.3. Cytotrophoblaste extravilleux.....	27
1.3 Prolifération, invasion trophoblastique et remodelage des artères spiralées utérines	29
1.3.1. Prolifération et invasion trophoblastique	29
1.3.2. Les bouchons trophoblastiques et le remodelage des artères spiralées utérines.....	31
1.3.2.1. Remodelage indépendant de l'invasion trophoblastique	33
1.3.2.2. Remodelage vasculaire induit par des facteurs sécrétés par le trophoblaste extravilleux interstitiel.....	33
1.3.2.3. Remodelage induit par une interaction directe entre le trophoblaste extravilleux et les composants de la paroi artérielle	35
1.4 Pathologies de la grossesse liées à un défaut du développement placentaire	35
1.4.1. Le retard de croissance intra-utérin (RCIU).....	35
1.4.2. La Pré-Eclampsie (PE) ou Toxémie Gravidique (TG)	37
1.4.3. Principaux marqueurs pronostics de la Pré-éclampsie connus à ce jour.....	39
1.4.3.1. Le récepteur soluble du VEGF, sFlt-1.....	39

1.4.3.2.	Autre marqueur de dysfonction endothélial: l'endogline soluble	41
1.5	Le placenta murin	41
1.5.1.	Les premières étapes du développement	43
1.5.2.	La placentation	45
1.5.3.	Comparaison entre les placentas murin et humain	47
1.5.4.	Modèles murins de pathologies placentaires : cas de la PE.....	49
1.6	L'hématopoïèse placentaire	51
1.6.1.	L'ontogenèse de l'hématopoïèse	51
1.6.1.1.	Chez la souris	51
1.6.1.2.	Chez l'humain	55
1.6.2.	Le placenta	59
1.6.2.1.	Chez la souris	59
1.6.2.2.	Chez l'humain	65
1.6.3.	Origines possibles des cellules souches hématopoïétiques	65
1.6.3.1.	Hémangioblaste.....	67
1.6.3.2.	L'endothélium hématogène	71
II.	Les Prokinétines	75
2.1	Les Prokinétines et leurs récepteurs.....	75
2.1.1.	Découverte des Prokinétines	75
2.1.1.1.	MIT-1 et Bv8	75
2.1.1.2.	Les prokinétines	77
2.1.1.3.	L'EG-VEGF	77
2.1.2.	Les gènes des prokinétines	79
2.1.3.	Les protéines des prokinétines	79
2.1.4.	Les récepteurs des prokinétines	83
2.1.4.1.	Les voies de signalisation des prokinétines	85
2.1.4.2.	Affinités des prokinétines pour leurs récepteurs	85
2.1.4.3.	Les rôles spécifiques des récepteurs aux prokinétines.....	85
2.2	Régulations locales de l'expression des prokinétines	87
2.2.1.	Régulation par l'hypoxie.....	87
2.2.2.	Régulation par les stéroïdes	89
2.2.3.	Régulation par l'hCG.....	89
2.3	Expression de l'EG-VEGF/PROK1 et de ses récepteurs dans le placenta	91
2.3.1.	Expression de l'EG-VEGF et de ses récepteurs dans le placenta humain.....	91

2.3.1.1.	Le taux de l'EG-VEGF circulant au cours de la grossesse.....	91
2.3.1.2.	Expression placentaire de l'EG-VEGF et de ses récepteur au cours du 1er trimestre de grossesse	93
2.3.1.3.	Expression de l'EG-VEGF et de ses récepteurs au 3ème trimestre de grossesse..	95
2.3.2.	Expression de l'EG-VEGF et de ses récepteurs dans le placenta murin	95
2.4	Fonctions des prokinéticines	97
2.4.1.	Prokinéticines et hématopoïèse.....	97
2.4.2.	Le rôle de l'EG-VEGF dans le contrôle de l'invasion trophoblastique	99
2.4.3.	Le rôle de l'EG-VEGF dans l'angiogenèse placentaire	101
III.	Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ (PPAR γ).....	105
3.1	Généralités sur les PPAR γ	105
3.2	Structures des PPARs.....	107
3.3	Les ligands des PPARs.....	109
3.4	Patron d'expression des PPARs	109
3.5	PPAR γ et le développement placentaire humain.....	113
3.5.1.	PPAR γ et l'invasion trophoblastique	113
3.5.2.	PPAR γ , la différenciation trophoblastique et la régulation hormonale	115
3.6	Modèles animaux de PPAR γ	117
	OBJECTIFS	121
	RESULTATS	125
I.	Etude de la régulation du facteur EG-VEGF par le récepteur nucléaire PPAR γ	125
1.1	Contexte et présentation de la publication.....	125
1.2	Discussion de la première publication	129
1.2.1.	Résumé des résultats	129
1.2.1.1.	Effet de PPAR γ sur la sécrétion de l'EG-VEGF	129
1.2.1.2.	Effet de PPAR γ sur l'expression placentaire de l'EG-VEGF et de ses récepteurs	129
1.2.1.3.	Effet de RXR sur la sécrétion et l'expression de l'EG-VEGF	129
1.2.1.4.	Effet de l'EG-VEGF sur l'expression de PPAR γ	131
1.2.1.5.	L'EG-VEGF contribue à l'effet de PPAR γ sur la vascularisation utéroplacentaire	131
1.2.1.6.	L'EG-VEGF contribue à l'effet de PPAR γ sur l'invasion trophoblastique	131
1.2.1.7.	Expression de l'EG-VEGF dans les placentas murins invalidés pour PPAR γ	133
1.2.2.	Conclusion	135
1.2.3.	Discussion des résultats.....	135
1.2.3.1.	Expression de l'EG-VEGF dans le modèle murin invalidé pour PPAR γ	135

1.2.3.2.	Nouvelle boucle de régulation entre l'EG-VEGF et PPAR γ	137
1.2.3.3.	PPAR γ et l'EG-VEGF sont impliqués dans l'inhibition de l'invasion trophoblastique 137	
1.2.3.4.	PPAR γ et l'EG-VEGF sont impliqués dans la vascularisation utéro-placentaire ..	139
II.	Détermination du rôle de l'EG-VEGF dans la différenciation hématopoïétique placentaire.....	143
2.1	Contexte et présentation de la publication.....	143
2.2	Discussion de la deuxième publication	147
2.2.1.	Résumé des résultats	147
2.2.1.1.	La surexpression de l'EG-VEGF induit une diminution du nombre de cellules hématopoïétiques dans le placenta murin	147
2.2.1.2.	Le traitement simultané par les antagonistes PROKR1 et PROKR2 induit une élévation du nombre de cellules hématopoïétiques dans le placenta murin.....	147
2.2.1.3.	Effet d'une surexpression de l'EG-VEGF sur les cellules endothéliales dans le placenta murin	147
2.2.1.4.	Tests fonctionnels et voie de signalisation.....	149
2.2.1.5.	Effet de l'EG-VEGF sur l'expression des marqueurs hématopoïétiques et/ou endothélial dans le placenta murin.....	149
2.2.1.6.	Effet de l'EG-VEGF sur les cellules exprimant des marqueurs hématopoïétiques dans le placenta humain	151
2.2.1.7.	Effet de l'EG-VEGF sur les niveaux d'expression des marqueurs CD34, CD45 et CD235A ainsi que des facteurs de transcription Runx1 et GATA-2 chez l'humain.....	151
2.2.2.	Conclusion	153
2.2.3.	Discussion des résultats.....	153
2.2.3.1.	Chez la souris.....	153
2.2.3.2.	Chez l'humain	155
III.	Contribution au développement d'un modèle animal de la Pré-éclampsie	159
3.1	Contexte et présentation de l'étude	159
3.2	Discussion de la troisième étude.....	161
3.2.1.	Résumé des résultats	161
3.2.1.1.	Effets du maintien de l'EG-VEGF sur le poids placentaire et fœtal et sur l'efficacité placentaire à 15,5 et 18,5 jpc	161
3.2.1.2.	Effet du maintien de l'EG-VEGF sur l'invasion trophoblastique murine	163
3.2.1.3.	Le maintien de l'expression de l'EG-VEGF induit une hypertension artérielle ...	163
3.2.1.4.	Le maintien de l'expression de l'EG-VEGF induit un dysfonctionnement rénal..	163
3.2.1.5.	Expression de l'EG-VEGF chez des mâles	163

3.2.1.6. Le maintien de l'expression de l'EG-VEGF induit une élévation de l'expression de sFlt-1 et sEndogline	165
3.2.2. Conclusion	167
3.2.3. Discussion	167
CONCLUSION ET DISCUSSION	169
PERSPECTIVES	179
Liste de publications et de communications.....	185
REFERENCES	191

Liste des illustrations et des tableaux

- Figure 1 : Le placenta humain
Figure 2 : La grossesse humaine
Figure 3 : De la fécondation à la morula
Figure 4 : Blastocyste
Figure 5 : Implantation du blastocyste
Figure 6 : Représentation schématique des principales étapes du développement placentaire humain
Figure 7 : Formation des villosités choriales
Figure 8 : Représentation schématique de la villosité choriale
Figure 9 : Les deux voies de différenciation des cytotrophoblastes *in vitro*
Figure 10 : La villosité choriale et les cytotrophoblastes extravilloux
Figure 11 : Structure des villosités flottantes
Figure 12 : La villosité choriale flottante
Figure 13 : Trajets hypothétiques des trophoblastes extravilloux endovasculaires
Figure 14 : Remodelage des artères spiralées maternelles
Figure 15 : Etapes majeures du développement intra-utérin chez la souris
Figure 16 : Vue ventrale de l'appareil reproducteur de la femelle chez la souris
Figure 17 : Développement placentaire murin
Figure 18 : Organisation du placenta murin
Figure 19 : Structure du placenta hémo-trichorial murin
Figure 20 : Comparaison anatomique des placentas humain et murin
Figure 21 : Ontogenèse de l'hématopoïèse placentaire
Figure 22 : Développement des îlots sanguins du sac vitellin de souris entre E7,5 et E9,5
Figure 23 : Sites hématopoïétiques au cours du développement embryonnaire humain
Figure 24 : Comparaison des sites hématopoïétiques pendant le développement murin et humain
Figure 25 : Evolution cinétique de la quantité de précurseurs hématopoïétiques et de CSH au cours du développement embryonnaire
Figure 26 : Comparaison entre l'hématopoïèse du sac vitellin et celle de l'aorte
Figure 27 : Structure des gènes *prok1* et *prok2*
Figure 28 : Séquence d'acides aminés des protéines matures de la famille AVIT dans différentes espèces
Figure 29 : Structure secondaire de MIT-1 et de la colipase
Figure 30 : L'activation des PROKRs peut impliquer de nombreuses voies intracellulaires de signalisation
Figure 31 : Localisation des PROKs et des PROKRs
Figure 32 : Profil d'expression sérique d'EG-VEGF au cours de la grossesse
Figure 33 : Localisation de l'EG-VEGF et de ses récepteurs dans le placenta au cours du premier trimestre de grossesse
Figure 34 : Expression d'EG-VEGF en ARNm et protéine au premier trimestre de grossesse
Figure 35 : Schéma de la structure de PPAR γ
Figure 36 : Schéma de la fixation de l'hétérodimère PPAR γ /RXR α sur l'élément de réponse PPRE
Figure 37 : Les ligands des PPAR
Figure 38 : Protocole expérimental de la culture primaire de trophoblastes et d'explants placentaires
Figure 39 : Mécanismes de régulation de PPAR γ sur l'invasion trophoblastique et la vascularisation placentaire
Figure 40 : Protocole expérimental de la surexpression de l'EG-VEGF
Figure 41 : Protocole expérimentale de l'antagonisation de l'EG-VEGF
Figure 42 : Action potentielle de l'EG-VEGF sur les cellules endothéliales hémogéniques
Figure 43 : Développement d'un modèle murin de la Pré-éclampsie.
Figure 44 : Tableau récapitulatif des effets macroscopiques du maintien de l'expression de l'EG-VEGF
Figure 45 : L'EG-VEGF altère l'invasion trophoblastique à 15,5 jpc

- Figure 46 : Evolution de la pression artérielle maternelle au cours de la gestation.
- Figure 47: Le maintien de l'expression de l'EG-VEGF induit une protéinurie
- Figure 48: Le maintien de l'expression de l'EG-VEGF entraine le développement de glomérules anormaux
- Figure 49: Le maintien de l'expression de l'EG-VEGF induit une élévation de la sécrétion de sFlt-1 et de l'endogline soluble
- Figure 50 : Voies d'action de l'EG-VEGF sur la fonction rénale
- Figure 51 : Niveaux d'expression de PPAR γ et de l'EG-VEGF dans les membranes fœtales au cours du 3^{ème} trimestre de grossesse chez la femme.

Abréviations

15-dPGJ₂ :	15-Deoxy-Delta-12,14-prostaglandine J₂
ADN:	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc:	ADN complémentaire
AGM:	Aorte-Gonades-Mesonephros
ARN:	Acide RiboNucléique
ARNm:	ARN messenger
BSA:	Bovine Serum Albumin
Bv8:	Bombina variegata 8kDa
CAFC:	Cobblestone Area-Forming Cells
CE:	Cellule Endothéliale
CFC :	Colony-Forming Cell
CH:	Cellule Hématopoïétique
Cox-2 :	prostaglandin-endoperoxide synthase type 2/Cyclooxygenase type 2
CSH :	Cellule Souche Hématopoïétique
CT :	CytoTrophoblaste
CTEV:	CytoTrophoblaste ExtraVilleux
CTV:	CytoTrophoblaste Villeux
DBD:	DNA Binding Domain
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle Medium
E:	Jour Embryonnaire
EG-VEGF:	Endocrine Gland-derived Vascular Endothelial Growth Factor
ES:	Cellule Souche Embryonnaire
Flt-1:	Fms-related tyrosine kinase 1
Gl:	Glomérule
hCG:	human Chorionic Gonadotropin
HIF-1:	Hypoxia-Inductible Factor 1
HPEC:	Human Placental Endothelial Cells
hPL:	Hormone Lactogène Placentaire
HUVEC:	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
IgG:	ImmunoGlobuline
IgGL:	ImmunoGlobuline de Lapin
IgGS:	ImmunoGlobuline de Souris
IVG :	Interruption Volontaire de Grossesse
jpc:	jour post-coïtal/jour post-conception

kDa:	Kilo Dalton
LBD:	Ligand Binding Domain
LTC-IC:	Long-Term Culture Initiating Cell
MCI:	Masse Cellulaire Interne
MIT-1:	Mamba Intestinal Toxin 1
MMP:	Matrix MétalloProteinase
NK:	Natural Killer
PAS :	Periodic Acid Schiff
PBS:	Phosphate Buffer Saline
PE:	Pré-Eclampsie
pI :	point Isoélectrique
PPAR:	Peroxisome Proliferator Activited Receptor
PPRE:	Element de Reponse aux PPARs
ppO2:	pression partielle de dioxygène
PROK1:	Prokineticine-1
PROK2:	Prokineticine-2
PROKR1:	Prokineticine Receptor-1
PROKR2:	Prokineticine Receptor-2
p-SP:	SPlancnopleure Para-aortique
q-PCR:	quantitative-Polymerase Chain Reaction
RCIU:	Retard de Croissance Intra-Utérin
RCPG:	Récepteur Couplé aux Protéines G
RT-PCR:	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
RXR:	Recepteur de l'Acide Rétinoïque 9cis
SA:	Semaine d'Aménorrhée
sEng:	Endogline soluble
sFlt-1:	soluble Fms-like tyrosine kinase 1
SG:	Semaine de Grossesse
SDS:	Sodium Dodecyl Sulfate
ST:	Syncytiotrophoblaste
SVF:	Serum de Veau Fœtal
TG:	Toxémie Gravidique
TGFβ:	Transforming Growth Factor β
Tr:	cellule Trophoblastique
VEGF:	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR-1:	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1
VPRA:	Venom Protein A

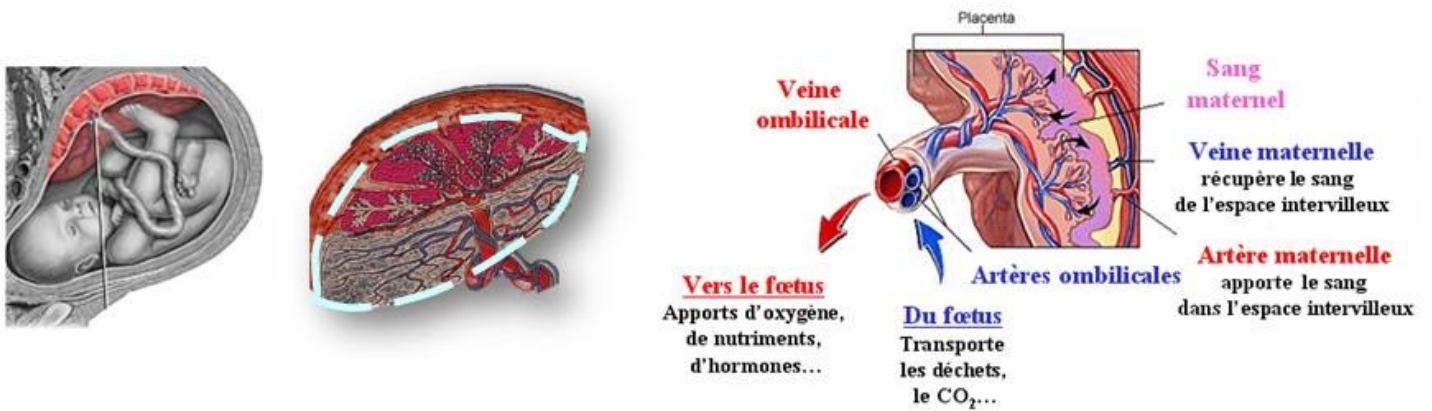


Figure 1 : Le placenta humain

Adaptation de *the McGraw-Hill Companies, 1997* et d'images obtenues dans la bibliothèque nationale US, NIH : <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/>

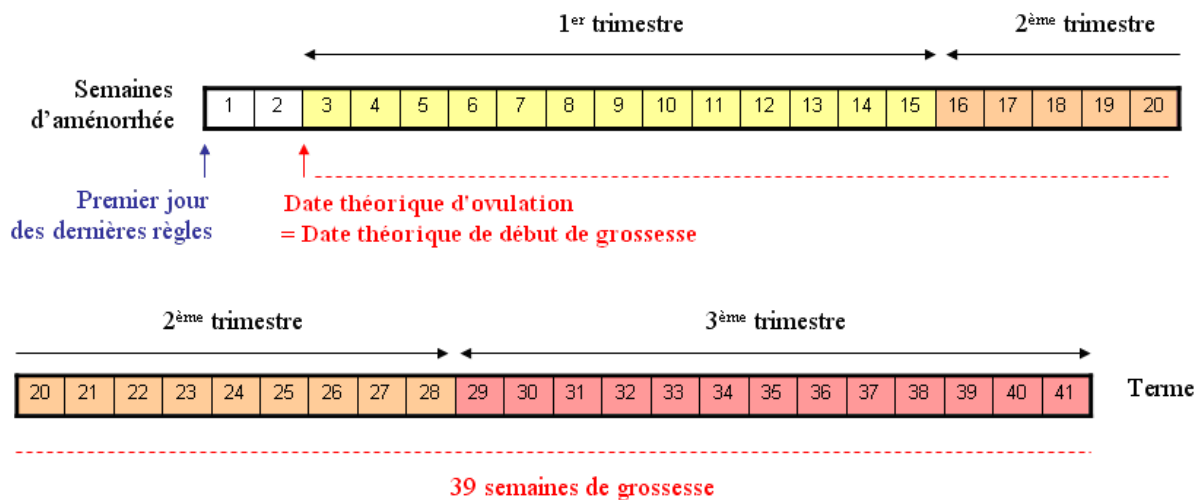


Figure 2 : La grossesse humaine se déroule en 41 semaines de grossesse ou en 39 semaines d'aménorrhée

INTRODUCTION

I. Le placenta humain

Huit jours après la fécondation, le blastocyte a épuisé l'intégralité de ses réserves nutritives. Afin de parer à ce déficit, il met en place conjointement avec l'organisme maternel, à partir du trophoctoderme, un organe transitoire : le placenta. Le placenta, considéré comme une annexe extra-embryonnaire caractéristique des Mammifères Supérieurs dits Euthériens (ou Mammifères Placentaires Vrais) est un organe autonome indispensable au développement du fœtus et au maintien de la grossesse (Figure 1). Bien plus qu'une simple barrière entre le fœtus et l'endomètre décidualisé, cet organe assure des fonctions essentielles à la croissance fœtale. Il régule les échanges fœtaux-maternels, intervient dans la synthèse et la sécrétion d'hormones, dans l'élimination des déchets fœtaux, mais aussi dans l'adaptation de l'organisme maternel, dans le mécanisme de parturition et même dans l'hématopoïèse. Le placenta possède également la capacité de s'adapter de manière progressive aux besoins métaboliques croissants du fœtus. C'est pourquoi la moindre altération placentaire présente une menace évidente sur le développement embryonnaire et le maintien de la grossesse.

Chez l'espèce humaine, il s'écoule environ 39 semaines entre la fécondation et l'accouchement. Ainsi, la grossesse se caractérise par trois périodes de trois mois communément nommées trimestres. Deux manières de calculer le terme d'une grossesse sont pratiquées, soit en *semaines d'aménorrhée* (SA), aménorrhée signifiant absence de menstruation, ou bien en *semaines de grossesse* (SG). La semaine d'aménorrhée est une unité de mesure obstétrique. Elle représente le nombre de semaines écoulées depuis le premier jour des dernières règles de la femme enceinte. Ainsi, l'utilisation de cette unité de mesure décale le temps de grossesse, celui-ci avoisinant les 41 semaines, l'écart de deux semaines correspondant donc à la période entre le dernier jour des dernières règles et la fécondation. En revanche, lorsque l'on s'exprime en semaine de grossesse ou semaine de développement, seules les semaines après la fécondation sont prises en compte (Figure 2).

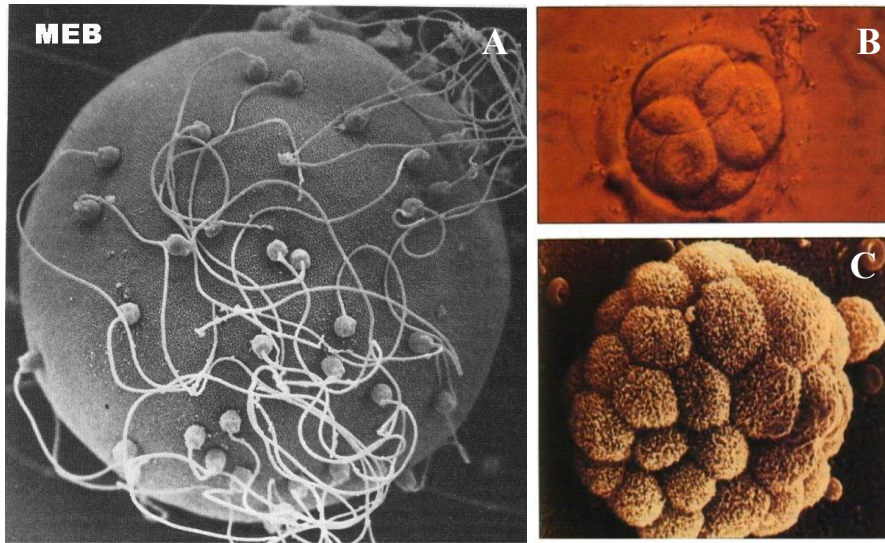


Figure 3: De la fécondation à la morula.

A- Ovocyte fécondé

B- Embryon (150 µm) à 2 jours après fécondation

C- Embryon à 4 jours après fécondation

Images de <http://imagesbiogeolfxm.free.fr/reproduction/thumb.html>

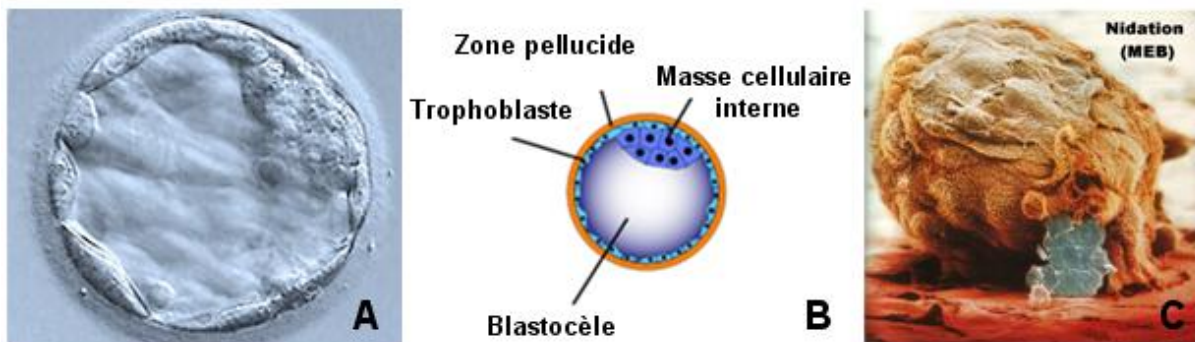


Figure 4: Blastocyste.

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>

1.1 Mise en place du placenta humain

La placentation humaine est de type hémomonochorial, c'est-à-dire qu'une seule couche de chorion sépare le sang fœtal du sang maternel (Tsatsaris et al. 2006 ; Boyd and Hamilton 1970). Elle est caractérisée par une invasion précoce et profonde du trophoblaste extravilloux dans la décidue ainsi que d'un remodelage des artères spiralées utérines. L'invasion trophoblastique est un processus physiologique finement régulé dans le temps et dans l'espace, elle débute dès la 3^{ème} SA et perdure jusqu'à la 14^{ème} SA, s'arrête au tiers supérieur du myomètre et est spécifiquement dirigée vers les artères utérines (Tsatsaris et al. 2006 ; Aplin et al. 1991). Ces caractéristiques sont propres au développement du placenta humain et des primates supérieurs, ce qui fait de cet organe un modèle de différenciation cellulaire unique dans le règne animal (Fournier and Tsatsaris 2008).

1.1.1. Phase préimplantatoire

La fécondation de l'ovule par le spermatozoïde au sein des trompes de Fallope a lieu 24 à 48 heures après l'ovulation. Le long de sa progression dans la trompe, le zygote humain se divise de manière asynchrone à des intervalles de plus en plus courts et sans augmentation de taille à l'intérieur de la zone pellucide¹. Il atteint la partie supérieure de la cavité utérine au 4^{ème} jour post-fécondation, sous forme d'une morula compacte de 16 blastomères (Figure 3). Progressivement la corona radiata² se dissocie du zygote, seule la zone pellucide persiste encore. Les divisions cellulaires mènent à la transformation de l'embryon par un phénomène de compaction en blastocyste³. Les cellules de la surface externe se différencient alors en trophoblastes pour former le trophoctoderme. Ces cellules donneront par la suite les structures extra-embryonnaires, dont le placenta. Quant à celles de la masse interne du blastocyste, elles donneront le bouton embryonnaire à l'origine de l'embryon. A partir du stade blastocyste, l'embryon va alors grossir et perdre sa zone pellucide, permettant alors le contact direct entre les trophoblastes du blastocyste et l'endomètre⁴ de l'utérus (Figure 4).

1.1.2. Phase implantatoire : La placentation

Le développement placentaire peut être divisé en trois stades à partir de la phase implantatoire: les stades prélacunaire, lacunaire et villosité.

¹ Coque glycoprotéique qui entoure l'ovocyte.

² Ensemble de cellules folliculaires issues de la granulosa et qui forment une couronne autour de l'ovocyte.

³ Stade embryonnaire caractérisé par la formation d'une cavité interne remplie de fluide, le blastocèle.

⁴ Egalement nommé muqueuse utérine, il correspond à un tissu conjonctif richement vascularisé qui recouvre l'intérieur de la cavité utérine.

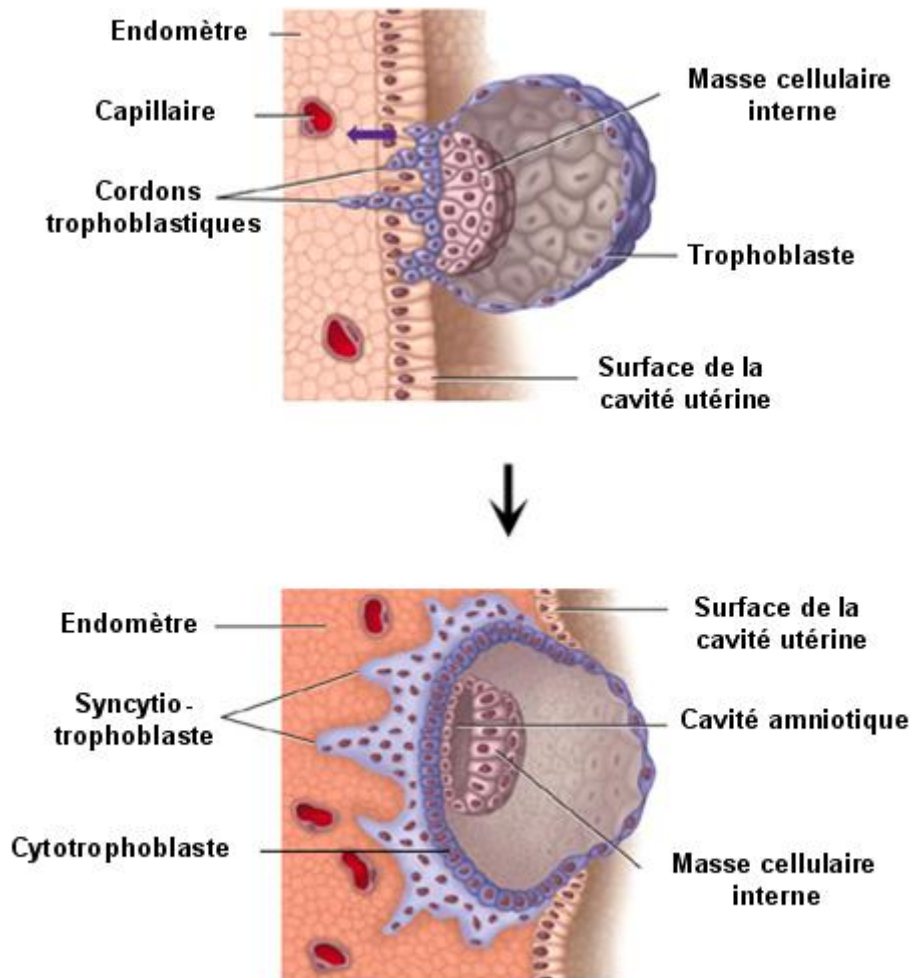


Figure 5: Implantation du blastocyste.

Schémas adaptés de la *figure 20-25, Sherwood 2007 Human physiology: from cells to systems.*

1.1.1.1. Stade prélacunaire

Le 6^{ème} jour après la fécondation est marqué par la phase d'apposition. Par l'intermédiaire des pinopodes⁵ ainsi que des microvillosités du trophoctoderme, le blastocyste va s'accoler à la muqueuse utérine maternelle. Au niveau de la zone de contact, deux assises vont se différencier : une assise cellulaire interne issue du trophoctoderme et constituée de cytotrophoblastes, et une assise cellulaire externe multinucléée qui va constituer le syncytiotrophoblaste (ST) (Figures 5 et 6.A, B). Ce dernier constitue l'unité endocrine placentaire, il sécrète de nombreuses hormones de grossesse notamment l'hCG (*human Chorionic Gonadotropin*). Hautement invasif à ce stade, il pénètre progressivement dans l'épithélium utérin et envahit l'endomètre, grâce à son activité protéolytique. Il permet ainsi l'ancrage, puis l'enfouissement complet du blastocyste (Aplin 1991). A partir de cette invasion, une brèche va se former, facilitant ainsi la nidation du blastocyste au sein de la muqueuse utérine.

1.1.1.2. Stade lacunaire

Vers le 8^{ème} jour après la fécondation, des vacuoles apparaissent dans cette masse syncytiale formant progressivement des lacunes entre les travées syncytiales. Ces lacunes sont à l'origine de la création d'une cavité limitée par du syncytiotrophoblaste qui deviendra la chambre intervillieuse (Figure 6.C).

1.1.1.3. Stade villeux

Le stade villeux se met en place à partir du 13^{ème} jour post-fécondation et se poursuit jusqu'à l'accouchement. Il correspond à la phase de développement des villosités placentaires et se distingue en deux périodes. La première s'étendant du 13^{ème} jour post-fécondation à la fin du quatrième mois, il s'agit de la période d'élaboration placentaire caractérisée par la formation des villosités choriales. La seconde, quant à elle, se déroule du cinquième mois au terme et correspond à la période stationnaire (Mihu et al. 2009). Le placenta est alors formé et se développe par croissance du système vasculaire principalement (Figures 6 et 7).

⁵ Micro-protusions de la membrane apicale de l'épithélium utérin

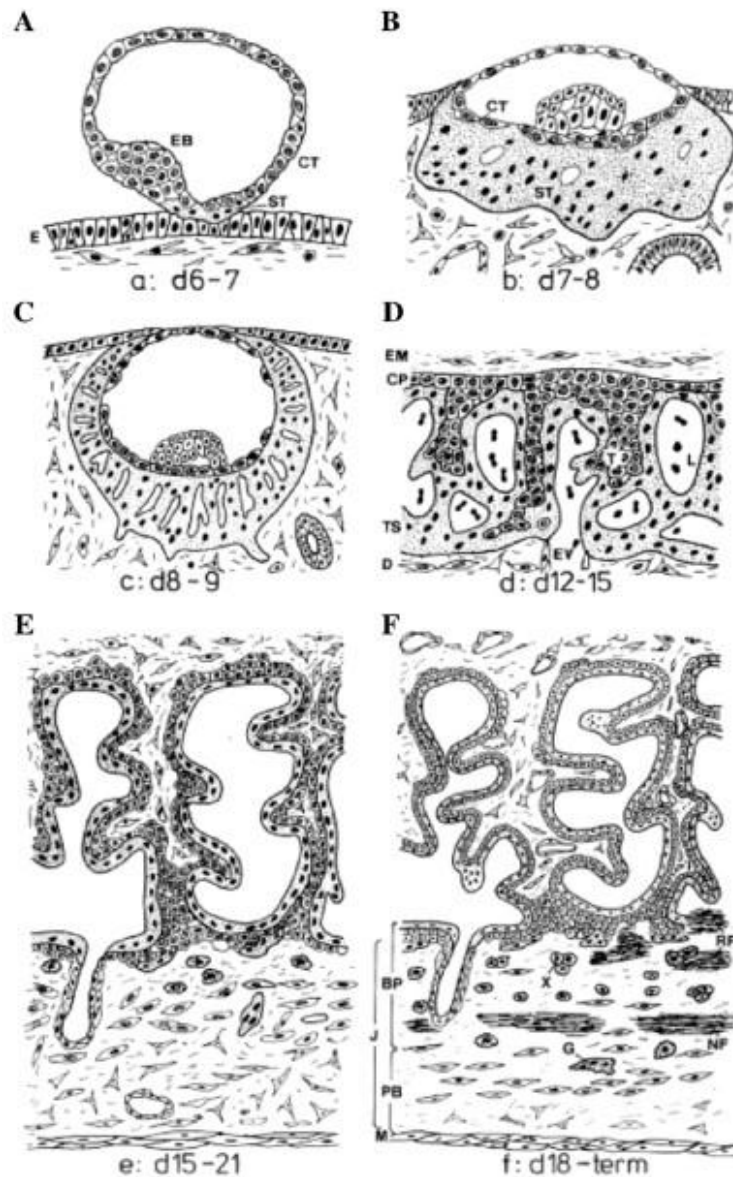


Figure 6 : Représentation schématique des principales étapes du développement placentaire humain

A et B. Stade prélacunaire. **C.** Stade lacunaire. **D.** Stade villeux et villosités primaires.

E. Stade villeux et villosités secondaires. **F.** Stade villeux et villosités tertiaires.

BP : plaque basale ; CP : plaque choriale ; CT : cytotrophoblaste ; D : décidue ; E : épithélium endométrial ; EB : bouton embryonnaire ; EM : mésoderme embryonnaire ; EV : vaisseau endométrial ; G : cellules géantes ; J : zone jonctionnelle ; L : lacunes de sang maternel ; PB : lit placentaire ; RF et NF : fibrinoïde ; ST : syncytiotrophoblaste ; T : villosité primaire ; TS : coque cytotrophoblastique ; X : trophoblaste extravilleux. (d'après Benirscke et Kaufmann, 2000).

1.2 Mise en place de la villosité placentaire

1.2.1. Formation des villosités primaires

Au 12^{ème} jour, les cytotrophoblastes proliférant à partir de la masse cellulaire interne, vont s'insinuer dans les travées de syncytium formant ainsi des excroissances qui envahissent la paroi utérine. Ces excroissances forment les villosités chorales primaires et sont composées de cytotrophoblastes. Elles s'allongent en réponse à la prolifération des cytotrophoblastes en leur centre alors que débute leur arborisation. Sont alors formées les villosités flottantes, en périphérie, et les villosités crampons, conservant leur contact avec l'assise de trophoblastes à la base (Figure 6.D).

1.2.2. Formation des villosités secondaires

Quinze jours après la fécondation, le mésenchyme embryonnaire provenant de la plaque chorale basale pénètre dans le tronc de ces villosités primaires les transformant en villosités secondaires (Figure 6.E).

1.2.3. Formation des villosités tertiaires

Enfin, trois semaines après la fécondation, le mésoblaste extra-embryonnaire se différencie en tissu conjonctif et les capillaires fœtaux apparaissent dans l'axe mésenchymateux par un processus de vasculogenèse (Demir et al. 1989). La villosité chorale est recouverte de cytotrophoblastes villositaires (CTV) régénérant le feuillet épithélial externe des villosités, le ST. Ce dernier est en relation directe avec la circulation sanguine maternelle au sein des chambres intervillositaires formées à partir des lacunes trophoblastiques. Cette vascularisation caractérise la formation de la villosité tertiaire qui perdure jusqu'au terme. Dès lors, les diffusions des gaz, des éléments nutritifs, et des déchets se font au travers de 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 (Figure 6.F).

1.2.4. Villosités crampons et villosités flottantes

1.2.4.1. Différenciation trophoblastique

L'unité structurale et fonctionnelle du placenta est la villosité chorale qui atteint sa structure définitive au 21^{ème} jour de grossesse. Cette dernière est constituée d'un axe mésenchymateux contenant les vaisseaux fœtaux et recouverte d'un épithélium. Les villosités

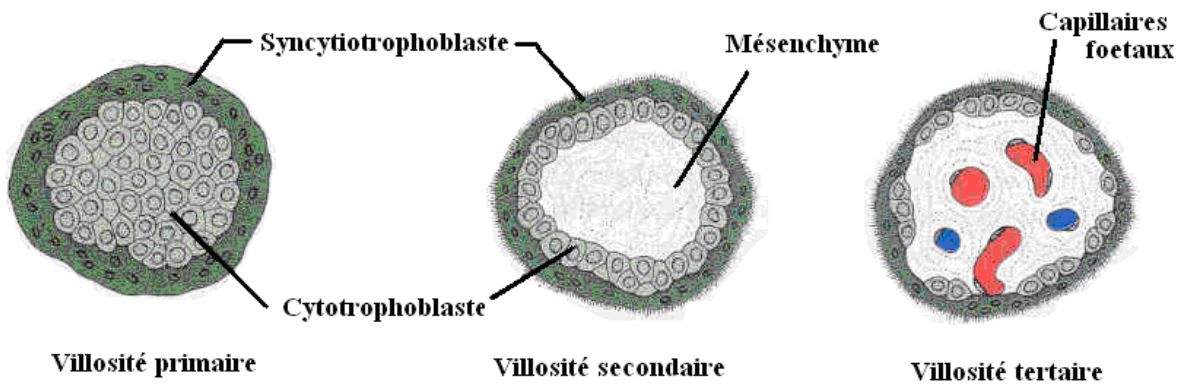


Figure 7 : Formation des villosités chorales.

Schéma adapté de <http://www.md.ucl.ac.be/didac/anat110/Chapitre1/placenta1.png>

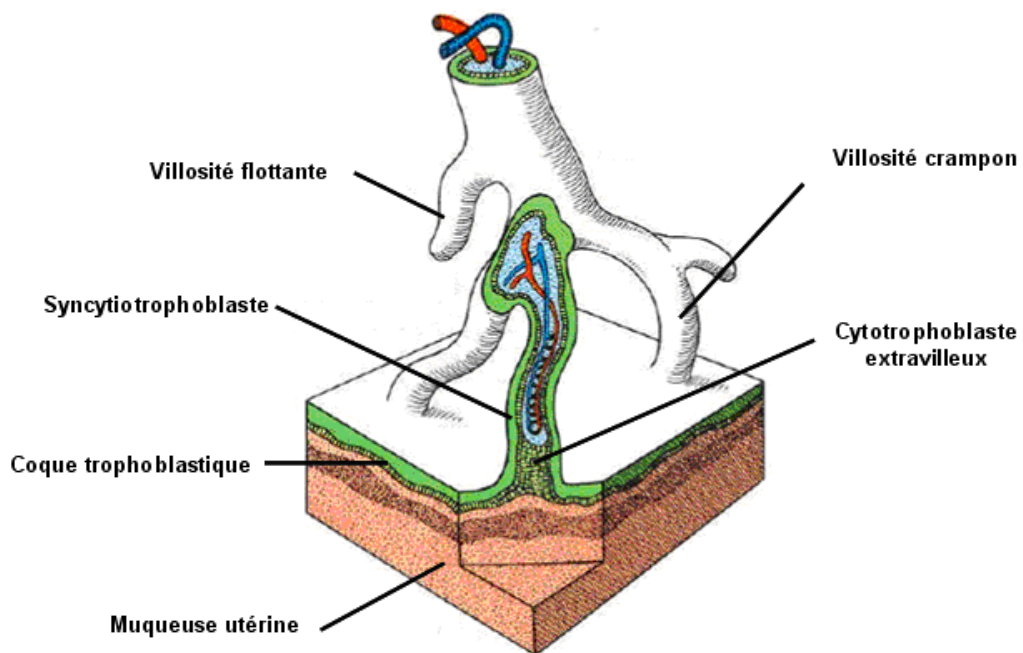


Figure 8 : Représentation schématique de la villosité chorale.

Schéma adapté de <http://homepage.mac.com/danielbalas/EMBRYO/embdes/embdes22.jpg>

placentaires sont de deux natures : les villosités flottantes ou bien les villosités crampons (Figure 8). Les premières baignent librement dans la chambre intervillieuse tandis que les secondes sont ancrées dans l'endomètre maternel. Après la nidation se distinguent également deux voies de différenciation du cytotrophoblaste, d'une part celle des cytotrophoblastes villex (CTV) endocrines et, d'autre part, celle des cytotrophoblastes extravilloux (CTEV) invasifs (Cross et al. 1994) (Figure 9).

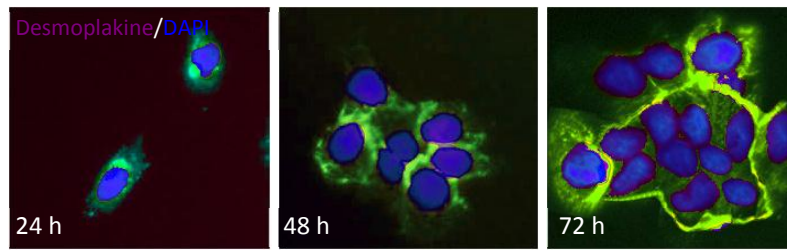
1.2.4.2. Cytotrophoblaste villex

Le cytotrophoblaste villex est une cellule mononucléée de type épithélial qui recouvre la villosité chorale dans sa structure définitive. Ces cellules ont également la particularité de s'agréger et de fusionner entre elles pour donner le tissu endocrine du placenta, le syncytiotrophoblaste (ST), générant ainsi deux assises de cellules épithéliales ; une assise mononucléée de CTV et une assise multinucléée de ST. Cette dernière est en contact direct avec le sang maternel dès la fin du premier trimestre de grossesse et constitue la première couche de la barrière placentaire séparant la circulation maternelle de la circulation fœtale. Une fois formé, le ST assure les échanges fœto-maternels d'ions et de nutriments tout en produisant des hormones polypeptidiques et stéroïdes dont l'hormone chorionique gonadotrope (hCG), l'hormone lactogène placentaire (hPL) et l'hormone de croissance placentaire (PGH), toutes trois essentielles au maintien et au succès de la grossesse. Il participe également aux fonctions métaboliques d'hémostase (Tsatsaris et al. 2006). Le ST évolue vers une mort cellulaire par apoptose. Les noyaux entrés en apoptose se condensent et deviennent inactifs. Ils forment alors des agrégats isolés à l'intérieur de sacs membraneux dérivant de fragments du syncytium : les nœuds syncytiaux (*syncytial knots* pour les anglo-Saxons). Ces nœuds se détachent du syncytium engendrant la formation de débris syncytiaux polynucléés au sein de la circulation maternelle (Huppertz et al. 1999). Le ST est renouvelé de manière continue par la fusion des CTV sous-jacents au cours de la grossesse cependant ce phénomène est souvent exacerbé en cas de souffrance placentaire.

1.2.4.3. Cytotrophoblaste extravilloux

Les villosités crampons forment des colonnes de cellules polarisées, agrégées les unes aux autres reposant sur une lame basale au contact du tissu décidual. Ces colonnes représentent un site de croissance longitudinale, siège des cytotrophoblastes extravilloux. Ces derniers, indispensables à l'implantation et au remodelage des vaisseaux utérins, prolifèrent

Cytotrophoblastes Villeux



Cytotrophoblastes extravilleux

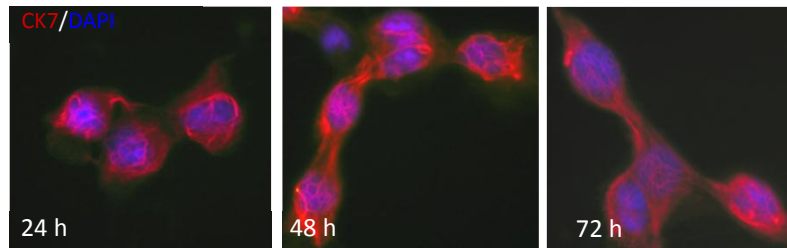


Figure 9 : Les deux voies de différenciation des cytotrophoblastes *in vitro*
(D'après des immunoflorescences de Thierry Fournier)

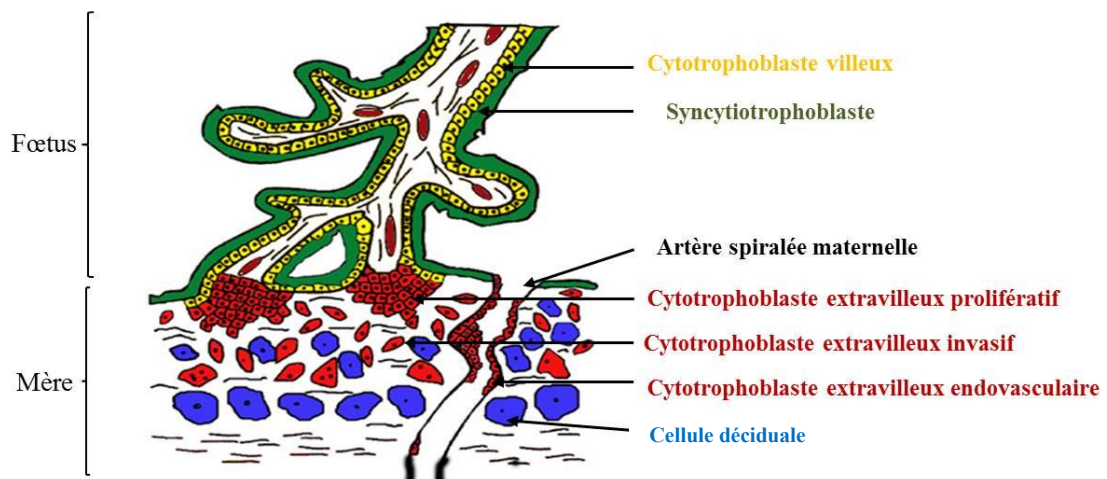


Figure 10 : La villosité choriale et les cytotrophoblastes extravilleux
(Schéma adapté de Fournier et al. 2007)

dans la région proximale de la colonne villositaire avant de quitter progressivement le cycle cellulaire à partir des 10 - 12^{èmes} SA, perdant ainsi leur caractère prolifératif au niveau distal de la colonne. Ils se différencient alors en cytotrophoblastes extravillieux invasifs, puis ils migrent dans la décidue et envahissent l'endomètre maternel jusqu'au tiers supérieur du myomètre et les parois des artères utérines. Deux populations de CTEV participent au remodelage des artères spiralées: les *cytotrophoblastes extravillieux endovasculaires* et les *cytotrophoblastes extravillieux interstitiels*. Les CTEV 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, tandis que les CTEV interstitiels envahissent la muqueuse utérine, migrent et érodent les parois des artères spiralées. Une fois la migration interstitielle achevée, les CTEV se différencient en cellules géantes multi-nucléées (Tsatsaris et al. 2006).

1.3 Prolifération, invasion trophoblastique et remodelage des artères spiralées utérines

1.3.1. Prolifération et invasion trophoblastique

Le placenta humain est un modèle unique d'invasion pseudo-tumorale limitée et dûment contrôlée.

Le caractère prolifératif du cytotrophoblaste extravillieux est situé à la base de la villosité crampon au niveau de la colonne proximale. Dans un premier temps, les cytotrophoblastes vont passer d'un stade de cellules épithéliales, polarisées, adhérentes à une matrice de lamine et exprimant l'E-cadhérine, à un état prolifératif avec perte de leur polarité (Kaufmann et al. 1997). Ils participent également à l'allongement de la villosité crampon. Quant aux cytotrophoblastes extravillieux de la région distale de la villosité crampon, ils se différencient en cellules invasives au phénotype mésenchymateux après avoir quitté le cycle cellulaire. Ces cellules vont ensuite migrer et envahir l'endomètre maternel en interagissant avec les cellules déciduales⁶ (Pijnenborg 1998). Elles interagissent également avec des cellules immunocompétentes intradéciduales, telles que les macrophages et les cellules NK (*natural killer*) (Loke and King 1993). L'absence de rejet des cytotrophoblastes par ces cellules maternelles est liée à l'existence sur leur surface d'antigènes de classe 1 particuliers (HLA-G) ainsi qu'à la sécrétion de nombreuses cytokines et de facteurs immunomodulateurs (Murphy et al. 2004; Le Bouteiller et al. 1997). Les cytotrophoblastes extravillieux invasifs poursuivent

⁶ Cellules stromales maternelles différenciées sous l'effet des œstrogènes et de la progestérone lors du processus de décidualisation.

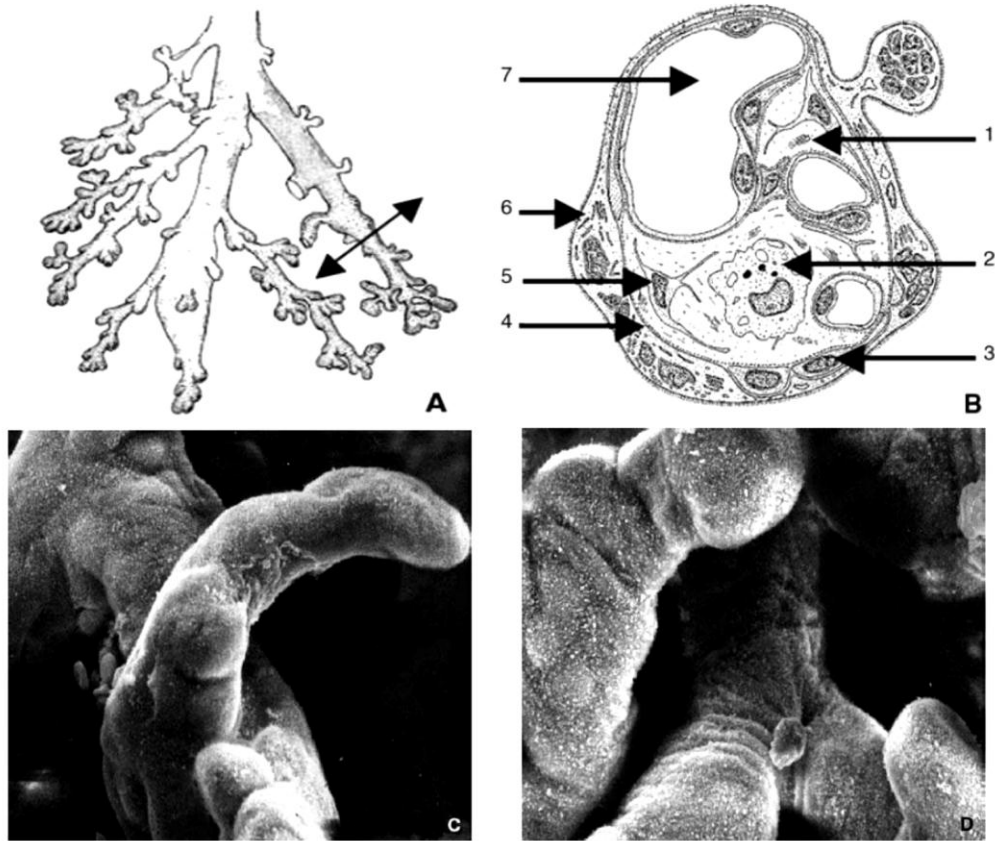


Figure 11 : Structure des villosités flottantes

A. Arborisation des villosités flottantes. B. Coupe transversale d'une villosité flottante (d'après Bernischke et Kaufmann, 2000). 1. Mésenchyme ; 2. Cellule de Hofbauer ; 3. Cytotrophoblaste villex ; 4. Membrane basale ; 5. Fibroblaste ; 6. Syncytiotrophoblaste ; 7. Capillaire sanguin fœtal. C. Villosité flottante à 20 semaines d'aménorrhée (SA) vue en microscopie électronique (image du professeur Foidart). D. Villosité flottante à 30 SA vue en microscopie électronique (image du professeur Foidart).

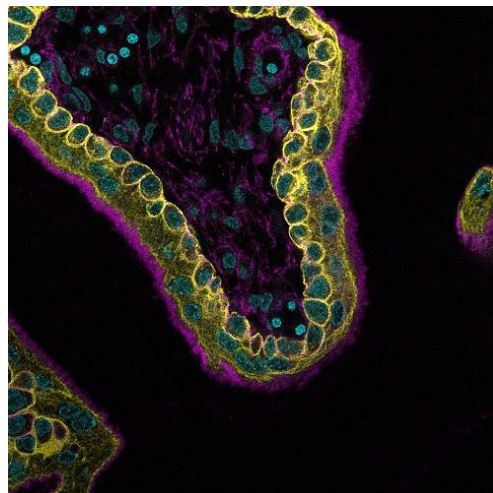


Figure 12 : La villosité chorale flottante.

Immunohistofluorescence (coupe épaisse de villosités chorales incluses en agarose) couplée à la microscopie confocale. Visualisation du marquage cytokératine 7 (marqueur spécifique des trophoblastes dans le placenta), de l'actine et des noyaux. (Dr Bruno Saubamea, René Lai Kuen, Service Commun d'Imagerie Cellulaire et Moléculaire).

leur migration jusqu'au tiers supérieur du myomètre et notamment de manière spécifique vers les parois des artères utérines, réalisant l'invasion interstitielle.

1.3.2. Les bouchons trophoblastiques et le remodelage des artères spiralées utérines

Au cours du premier trimestre de grossesse, les cytotrophoblastes extravilloux sont également à l'origine de la formation d'un bouchon trophoblastique obstruant les artères spiralées utérines. Le développement placentaire se déroule alors en milieu hypoxique (20 mmHg à 8 SA, correspondant à une ppO_2 de 2-3%). Cette relative hypoxie est essentielle pour le bon développement de la villosité placentaire, dont dépendent la prolifération et l'angiogenèse. Elle est aussi nécessaire à la survie de la cellule trophoblastique qui possède initialement peu de défenses anti-oxydantes (catalase, glutathion peroxidase, superoxyde dismutase) (Jauniaux et al. 2000).

A partir de la 5^{ème} SA, les cytotrophoblastes extravilloux vont s'étendre et s'intercaler entre la couche du syncytiotrophoblaste et la muqueuse utérine, recouvrant ainsi l'ensemble de la face maternelle du placenta d'une *coque trophoblastique*. Les cytotrophoblastes extravilloux endovasculaires de cette coque vont également proliférer à l'intérieur des artères spiralées maternelles et vont former rapidement des *bouchons trophoblastiques*, obstruant les artères spiralées. A ce terme aucun élément figuré (notamment les hématies) n'est présent au niveau de la chambre intervillouse. Le bouchon disparaît progressivement vers 9 - 10 SA, ce qui permet la perfusion graduelle de la chambre intervillouse ainsi qu'une augmentation progressive de la pression partielle en oxygène (55 mmHg à 12 SA, correspondant à une ppO_2 de 7,2% environ). Parallèlement, est observée une augmentation progressive des défenses anti-oxydantes (Jauniaux, et al. 2000).

Le remodelage de la vascularisation utérine par les trophoblastes est un processus physiologique crucial pour le bon développement et la bonne croissance du fœtus. L'origine des cytotrophoblastes extravilloux vasculaires est actuellement débattue. Ils proviendraient soit des cytotrophoblastes extravilloux invasifs interstitiels ayant envahi la paroi artérielle (*phénomène d'intravasation*) soit des amas trophoblastiques endovasculaires qui obstruent les artères spiralées (*phénomène d'extravasation*). Une coexistence des deux phénomènes est suggérée par l'équipe de Loke (Jaffe et al. 1997 ; Kam et al. 1999 ; Kaufmann et al. 2003 ; Red-Horse et al. 2005) (Figure 13).

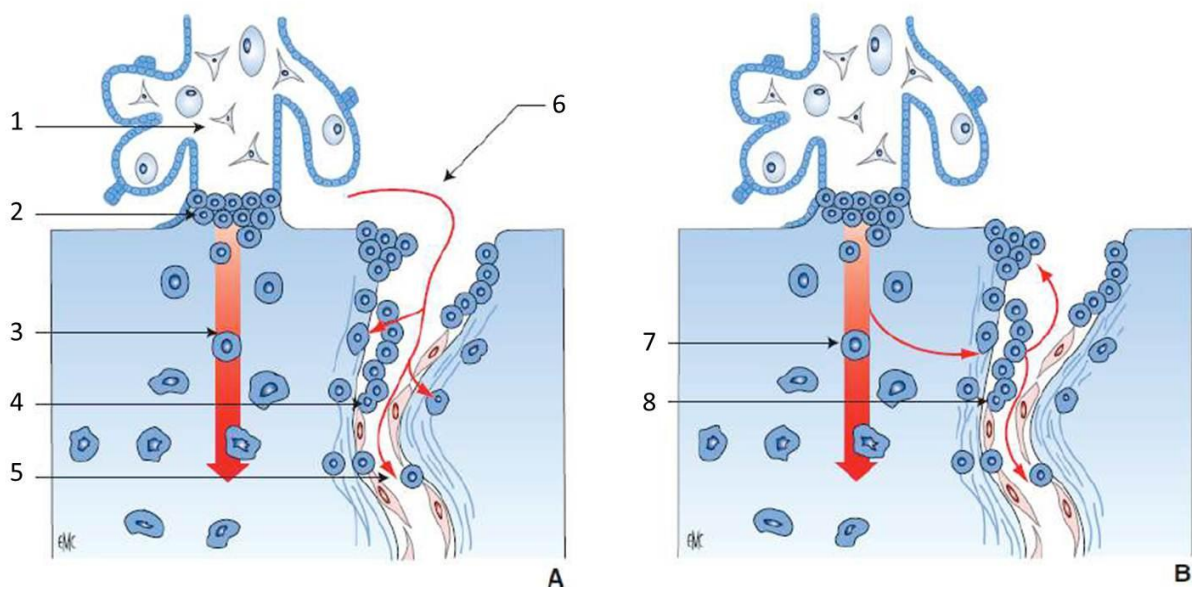


Figure 13 : Trajets hypothétiques des trophoblastes extravilleux endovasculaires

A. En cas d'*extravasation*, le trophoblaste extravilleux colonise la lumière par voie endoluminale et remonte le long de la paroi vasculaire à contre-courant vers le myomètre. L'origine de ces trophoblastes extravilleux reste méconnue. **B.** A l'inverse, en cas d'*intravasation*, le trophoblaste endovasculaire est issu du trophoblaste interstitiel qui a envahi la paroi artérielle.

1. Ancrage villos ; 2. Colonne de cellules ; 3. Trophoblaste interstitiel invasif ; 4. Artère utéro-placentaire ; 5. Trophoblaste endovasculaire invasif ; 6. Espace intervilloux.

(D'après Kaufmann et al. 2003)

A la lumière des dernières études, les modifications des vaisseaux utérins peuvent être schématiquement divisées en trois étapes :

- Le remodelage vasculaire myométrial indépendant de l'invasion trophoblastique
- Le remodelage vasculaire induit par des facteurs diffusibles issus du trophoblaste extravilleux interstitiel
- Le remodelage induit par une interaction directe entre le trophoblaste extravilleux et les composants de la paroi artérielle

1.3.2.1. Remodelage indépendant de l'invasion trophoblastique

Dès la 5^{ème} SA, avant le processus d'invasion trophoblastique, les artères spiralées sont sujettes à des modifications morphologiques caractérisées non seulement par une vacuolisation des cellules endothéliales, mais aussi par une désorganisation et une hypertrophie des cellules musculaires lisses. Une dilatation luminale est également observée (Harris et al. 2010 ; Kaufmann et al. 2003 ; Craven et al. 1998). Ces modifications, qui surviennent aussi bien dans la zone d'implantation que dans la portion déciduale non concernée par l'implantation, seraient dues à une activation du système rénine-angiotensine déciduale ou à des facteurs hormonaux circulants maternels (Craven et al. 1998).

1.3.2.2. Remodelage vasculaire induit par des facteurs sécrétés par le trophoblaste extravilleux interstitiel

Avant que les artères utérines ne soient envahies par les CTEV invasifs, ces derniers sécrètent des facteurs qui permettent d'amorcer la dilatation des artères. Ce remodelage se caractérise par un amincissement de la média⁷ et par un dépôt de fibrinoïdes au sein de la paroi artérielle (Kaufmann et al. 2003). Ainsi certaines études suggèrent que les cellules avoisinant les artères utérines, synthétiseraient et sécrèteraient des vasodilatateurs tels que l'oxyde nitrique (NO) et le monoxyde de carbone (CO). En outre, le CTEV sécrète de multiples facteurs angiogéniques susceptibles d'être impliqués dans le remodelage vasculaire, dont le plus connu est, le vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) (Ferrara et al. 1997 ; Carmeliet et al. 2000). De manière intéressante le VEGF-A est exprimé à la fois par les CTV et les CTEV (Clark et al. 1998).

⁷ La tunique intermédiaire d'un vaisseau artériel.

1.3.2.3. Remodelage induit par une interaction directe entre le trophoblaste extravilleux et les composants de la paroi artérielle

Le remodelage vasculaire par les CTEV d'origine endovasculaire et interstitielle se définit par une modification des caractéristiques d'élasticité des artères spiralées. Dans un premier temps un œdème se forme, puis les trophoblastes induisent l'apoptose des cellules endothéliales et s'y substituent (Red-Horse et al. 2006). La tunique élastique artérielle est alors transformée en une paroi fibreuse atone n'offrant que peu de résistance au flux sanguin maternel, ce qui permet un flux constant dans l'espace intervilloux (Harris and Aplin 2007; Pijnenborg et al. 1983). Ce processus physiologique est indispensable à la perfusion de la chambre intervillieuse par le sang maternel et donc à la croissance fœtale. Un défaut d'invasion et de remodelage vasculaires aboutissent à une altération de l'irrigation sanguine de la chambre intervillieuse et à une hypoperfusion du placenta, ce qui est à l'origine d'une des complications majeures de la grossesse : la Pré-éclampsie.

1.4 Pathologies de la grossesse liées à un défaut du développement placentaire

1.4.1. Le retard de croissance intra-utérin (RCIU)

Le Retard de Croissance Intra-Utérin (RCIU) ou l'hypotrophie fœtale est la 3^{ème} cause de mortalité périnatale après la prématurité et les malformations. Il est caractérisé par une restriction de croissance d'un fœtus par rapport à un potentiel de croissance (Wollmann 1998). En général, il est défini par des critères échographiques, avec des biométries fœtales placées en dessous du 10^{ème} percentile (parfois 3^{ème} percentile pour les RCIU sévères) pour le sexe et l'âge gestationnel du fœtus, ce qui signifie que le poids de naissance du nouveau-né appartient aux 10% des poids les plus légers pour ce sexe et cet âge gestationnel donné (Battaglia and Lubchenco 1967 ; Usher and McLean 1969). Deux types de retard homogène de croissance du fœtus sont décrits: l'hypotrophie disharmonieuse (asymétrique) caractérisée par un retard qui prédomine au niveau d'une région de l'organisme; le pôle céphalique, l'abdomen ou les membres, et l'hypotrophie harmonieuse (symétrique) définie par un retard homogène du fœtus (Campbelle and Thoms 1977).

La notion de retard de croissance intra-utérin est réservée aux enfants dont on connaît réellement la vitesse de croissance intra-utérine par le suivi échographique des mensurations fœtales et/ou d'une étiologie bien spécifique connue (infection fœtale, exposition intra-utérine à des toxiques, défaut de développement placentaire...). En revanche, il est important de

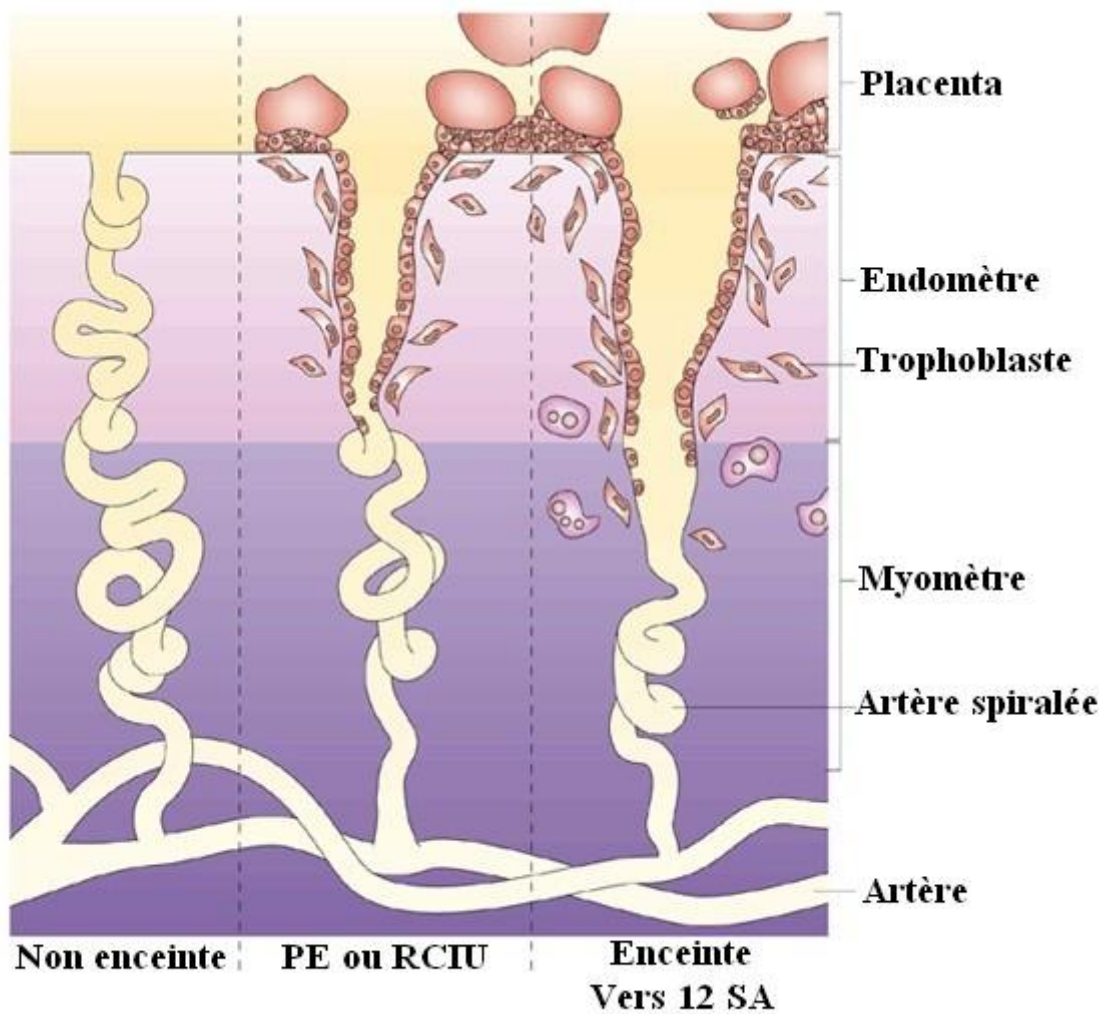


Figure 14 : Remodelage des artères spiralées maternelles.

Artère spiralée chez une femme non enceinte, au cours de premier trimestre de grossesse ou lors du développement de la pré-éclampsie ou d'un RCIU.

Schéma adapté de <http://www.nature.com/nri/journal/v2/n9/images/nri886-f2.gif>

distinguer le RCIU des fœtus qui sont constitutionnellement petits en raison de la taille parentale, du sexe ou encore de l'ethnie.

Le RCIU affecte 8% des grossesses en moyenne. Ses causes sont multiples. Néanmoins compte tenu du fait que la croissance fœtale est majoritairement régulée par l'apport nutritionnel au fœtus via le placenta, qui est au cœur des échanges de nutriments et d'oxygène, le RCIU est par conséquent, en relation étroite avec un développement anormal du placenta (Krebs et al. 1996 ; Regnault et al. 2002 ; Sibley et al. 2005). Il peut également être d'origine fœtale (aneuploïdie, anomalies fœtales, etc.) ou bien maternelle avec des maladies préexistantes d'origine endocrine, cardiovasculaire, ou encore infectieuse (Cetin and Alvino 2009). Lorsque le placenta contribue au RCIU, aucune thérapie n'existe, seules deux issues possibles sont alors envisagées : poursuivre le déroulement de la grossesse au risque d'accroître la probabilité d'anomalies de développement et/ou de mort pour le fœtus, ou bien provoquer l'accouchement avec tous les risques associés à la prématurité.

1.4.2. La Pré-Eclampsie (PE) ou Toxémie Gravidique (TG)

La Pré-éclampsie, encore appelée la Toxémie gravidique, est une physiopathologie obstétricale survenant classiquement à partir du 2^{ème} trimestre, spécifique de l'espèce humaine et qui reste encore imparfaitement connue. Néanmoins, des données moléculaires récentes associées à des études anatomopathologiques plus anciennes orientent la survenue de cette physiopathologie vers un schéma incluant plusieurs étapes successives. Tout d'abord survient un défaut d'invasion et de remodelage vasculaire aboutissant à une altération de l'irrigation sanguine de la chambre intervillieuse, suivi par une hypoperfusion du placenta et un stress oxydant induisant un dysfonctionnement généralisé du ST (Figure 14). Enfin, un dysfonctionnement de l'endothélium maternel apparaît lié à diverses substances libérées par le placenta dans la circulation maternelle telle que des radicaux libres, des lipides oxydés, des cytokines comme le sVEGFR-1 (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1*) et l'endogline soluble. Ce phénomène conduit aux signes cliniques de la maladie 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 (Tsatsaris et al. 2008 ; Redman et al. 2001).

Cette physiopathologie complique 2 à 5% environ des grossesses dans les pays industrialisés (Abalos et al. 2013) et est responsable d'une lourde morbidité maternelle et périnatale. C'est également la première cause de retard de croissance intra-utérin et de prématurité. L'enfant est alors exposé à des complications néonatales, pédiatriques et

métaboliques qui peuvent apparaître à l'âge adulte. L'interruption de la grossesse par césarienne et l'extraction du placenta sont les seuls traitements curatifs à ce jour.

1.4.3. Principaux marqueurs pronostics de la Pré-éclampsie connus à ce jour

1.4.3.1. Le récepteur soluble du VEGF, sFlt-1

Le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) et le PlGF (*Placental Growth Factor*) sont des facteurs mitogènes spécifiques des cellules endothéliales et jouent un rôle clé dans le processus d'angiogenèse et de vasculogenèse. De récents travaux ont montré qu'ils étaient impliqués dans la physiopathologie de la dysfonction endothéliale au cours de la PE (Levine et al. 2004 ; Eremina et al. 2003 ; Tsatsaris et al. 2003). Au cours de la grossesse normale, la cellule trophoblastique sécrète dans la circulation maternelle une forme soluble du récepteur VEGFR-1, nommée sFlt-1 (*soluble Fms-like tyrosine kinase 1*) issue de l'épissage alternatif du gène Flt-1 (*fms-like tyrosine kinase 1*). Cette dernière est dépourvue du domaine cytoplasmique et transmembranaire mais conserve le domaine de liaison au ligand VEGF (Kendall and Thomas 1993 ; Smith et al. 1999). Par conséquent, sFlt-1 est en mesure d'antagoniser le VEGF et le PlGF circulants en s'y liant, les empêchant ainsi d'interagir avec leurs ligands naturels. Au cours de la grossesse les taux sériques de VEGF libre sont effondrés tandis que les taux sériques de PlGF sont relativement maintenues, ceci s'explique par le fait que sFlt-1 a une affinité pour le VEGF plus importante que pour le PlGF (Luttun and Carmeliet 2003 ; Tsatsaris et al. 2003). Dans le cas de PE, la production placentaire de sFlt-1 se trouve considérablement augmentée entraînant un effondrement des taux sériques de VEGF et PlGF. Ces taux abaissés de VEGF et de PlGF libres et des taux élevés de sFlt-1 dans la circulation ont aussi bien été observés chez des patientes toxémiques au moment des premiers symptômes (Koga et al. 2003) que bien avant l'apparition des premiers signes cliniques (Polliotti et al. 2003; Taylor et al. 2003). En outre, il a été montré que la carence en ces deux facteurs est responsable de la dysfonction endothéliale maternelle systémique et de la néphropathie glomérulaire (Eremina et al. 2003 ; Maynard et al. 2003). La ou les raisons pour lesquelles le placenta produit de manière excessive le sFlt-1 est encore méconnue. Cependant, il est possible que la surproduction de ce facteur soit consécutive à une ischémie placentaire. En effet, une étude *in vitro* a montré que la transcription de sFlt-1 par les cytotrophoblastes est sensible à l'hypoxie (Nagamatsu et al. 2004). De même, des cultures d'explants placentaires en hypoxie produisent plus de sFlt-1 que les contrôles normoxiques (Ahmad and Ahmed 2005).

Jour de gestation	Événement
3,5	Formation du blastocyste
4,25 à 4,5	Activation du blastocyste
4,5 à 6	Implantation
6 à 8	Formation du sac vitellin
9 à 10	Développement du placenta chorioallantoïde
8 à 18	Développement de la vascularisation fœtale
20 à 21	Mise bas

Figure 15 : Etapes majeures du développement intra-utérin chez la souris

(D'après Cross et al. 1994)

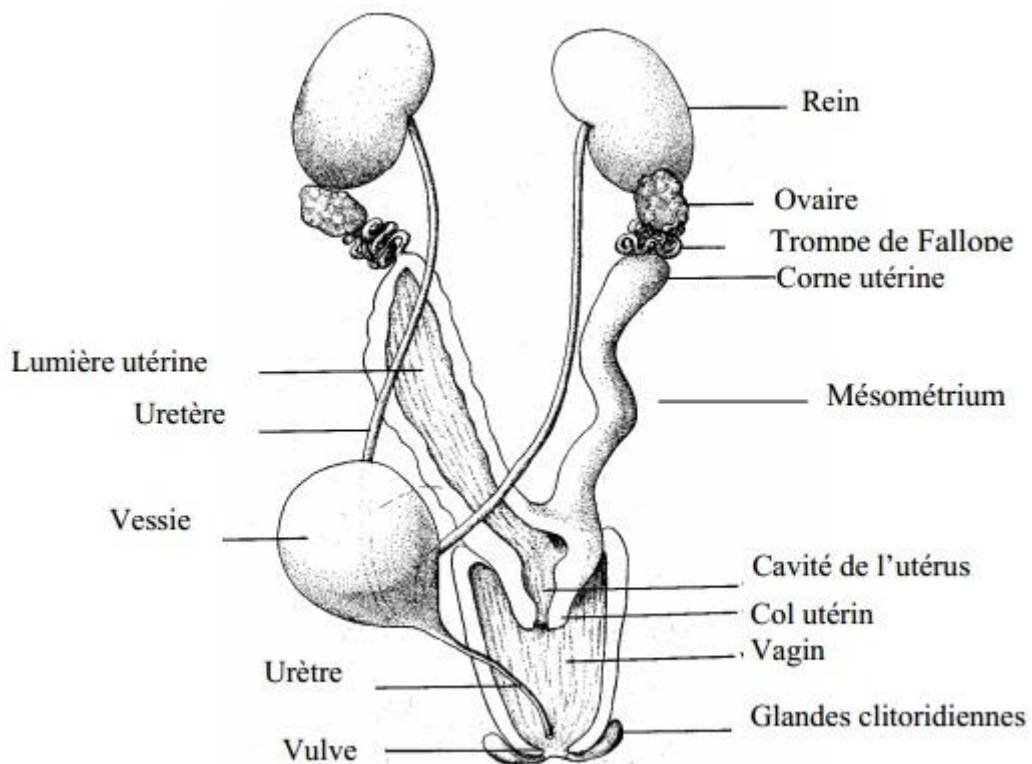


Figure 16 : Vue ventrale de l'appareil reproducteur de la femelle chez la souris

(D'après Rugh 1994)

1.4.3.2. Autre marqueur de dysfonction endothélial: l'endogline soluble

Plus récemment, un autre récepteur, l'endogline soluble (sEng), semble être impliqué dans le dysfonctionnement endothélial survenant lors de la PE. L'endogline ou CD105 est un récepteur membranaire pour les isoformes 1 et 3 du TGF β (*Transforming Growth Factor β*). Il est fortement exprimé au niveau des cellules endothéliales et du syncytiotrophoblaste. Le placenta humain produit également une forme soluble de l'endogline. L'équipe du Pr. Karumanchi a démontré que l'expression de l'endogline et de sa forme soluble, sEng, étaient toutes deux augmentées dans les placentas de patientes toxémiques et que les taux de sEng étaient accrus dans le sérum des patientes toxémiques de manière proportionnelle à la sévérité de la maladie. En outre, sEng potentialise la dysfonction endothéliale induite par sFlt-1, ce qui a pour conséquence une activation de la perméabilité vasculaire (Venkatesha et al. 2006; Gougos et al. 1992). Par ailleurs, chez des rates gestantes, sEng serait impliquée dans la survenue du HELLP syndrome⁸ et d'un retard de croissance des ratons lorsqu'elle était associée à une administration adénovirale de sFlt-1 (Venkatesha et al. 2006).

L'augmentation de sFlt-1 et de sEng est précoce et survient bien avant l'apparition des signes cliniques de PE. Ainsi, il est probable que les signes maternels détectés (œdèmes, hypertension, protéinurie) apparaissent après une phase plus ou moins longue de dysfonction endothéliale. Il semble donc opportun d'envisager le dosage de certaines molécules dans le sang maternel qui pourraient être considérés comme des marqueurs de survenue de toxémie gravidique dans le but d'un dépistage sérique précoce de la PE (Levine et al. 2004 et 2006). Par conséquent, une prévention primaire de cette pathologie pourra être réalisée.

1.5 Le placenta murin

Malgré des différences architecturales, le placenta murin présente des structures et des mécanismes moléculaires semblables à celui de l'homme. En raison de l'accessibilité des placentas murins à des termes avancés, de la courte période de gestation de la souris (environ 21 jours, Figure 15) ainsi que de son utilisation en transgénèse et de l'existence de mutations conditionnelles placentaires, la souris s'avère être un modèle d'étude idéale pour une meilleure compréhension du contrôle du développement placentaire.

⁸ Hemolysis Elevated Liver enzymes & Low Platelet count : Complication de la pré-éclampsie associée à une anémie hémolytique (destruction excessive des hématies), d'une cytolysé hépatique (destruction des cellules hépatiques) et d'une thrombopénie (diminution de plaquettes sanguines).

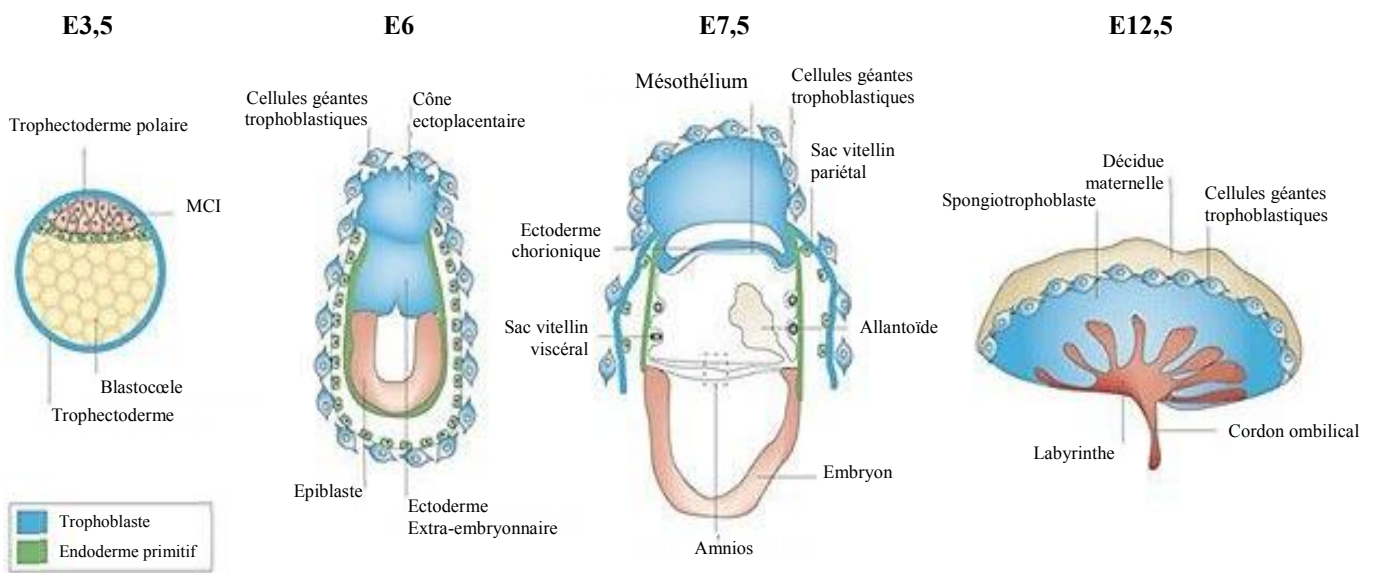


Figure 17: Développement placentaire murin
(D'après Rossant and Cross, 2001)

1.5.1. Les premières étapes du développement

A la différence de celui de la femme, l'utérus de souris, est en forme de « Y », est constitué de deux cornes qui s'étendent des trompes de Fallope à la partie dorsale de la vessie (Figure 16). Une fois la fécondation achevée, l'œuf entame immédiatement une série de divisions mitotiques. Cette segmentation aboutit à la formation du blastocyste au 4^{ème} jour de gestation. Celui-ci est composé de deux lignées cellulaires, la première étant la masse cellulaire interne (MCI) qui donnera l'embryon, et la seconde, un cylindre externe de cellules trophoblastiques formant le trophoctoderme. Le blastocyste est également pourvu d'une cavité, le blastocœle à l'origine du sac vitellin. A ce stade de développement, le blastocyste se fixe à la paroi utérine, c'est le phénomène d'implantation caractérisé par trois phases : la phase d'apposition, la phase d'adhérence ou de pénétration, et la phase d'invasion. Contrairement à l'homme, le phénomène d'invasion trophoblastique est peu prononcé, les trophoblastes n'envahissent que très rarement le myomètre maternel.

Comme chez l'homme, la couche trophoblastique du placenta est issue du trophoctoderme. Lors de l'implantation, celui-ci évolue selon deux voies, en fonction de sa localisation au sein du blastocyste. Dans la région bordant la MCI, le trophoctoderme continue à proliférer et va former l'ectoderme extra-embryonnaire ainsi que le cône ectoplacentaire, tandis que dans la région opposée à la masse cellulaire interne, le trophoctoderme cesse de se diviser. Les cellules trophoblastiques sortent du cycle cellulaire mitotique tout en poursuivant l'endoreplication de leur ADN, ce qui donne lieu à la formation de la première couche de cellules trophoblastiques géantes polyploïdes (5,5 jpc), analogues aux CTEV humains (Waston and Cross, 2005). Celles-ci vont circonscrire la zone de développement de l'embryon. Une seconde vague de production de trophoblastes géants a lieu plus tardivement autour de 7,5 jours post-coïtal (jpc). Les cellules géantes additionnelles ou secondaires sont dérivées de cellules précurseurs situées dans le cône ectoplacentaire et dans la couche de spongiotrophoblastes formés un peu plus tard (Cross 2000). Les fonctions des trophoblastes géants sont de contrôler le processus de l'implantation et de l'invasion de l'embryon mais aussi de produire des hormones et des cytokines afin de favoriser des adaptations physiologiques systémiques et locales au sein de la mère. En outre, de nombreuses études ont souligné l'importance des cellules utérines NK dans la survie fœtale et la croissance placentaires. En effet, il a été montré que les souris transgéniques TgE26, génétiquement déficientes en NK et cellules T, présentaient des placentas peu développés avec des anomalies vasculaires (Guimond et al 1997; Guimond et al. 1996). Cependant, après reconstitution des

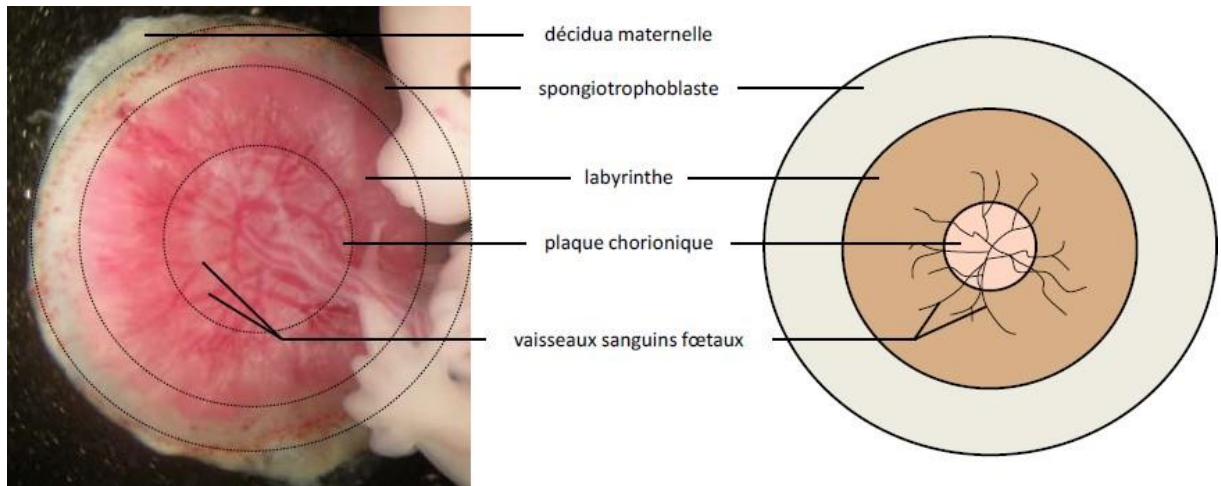


Figure 18: Organisation du placenta murin
 (Illustration à E14,5 à gauche ; d'après Ottersbach et al. 2005 à droite)

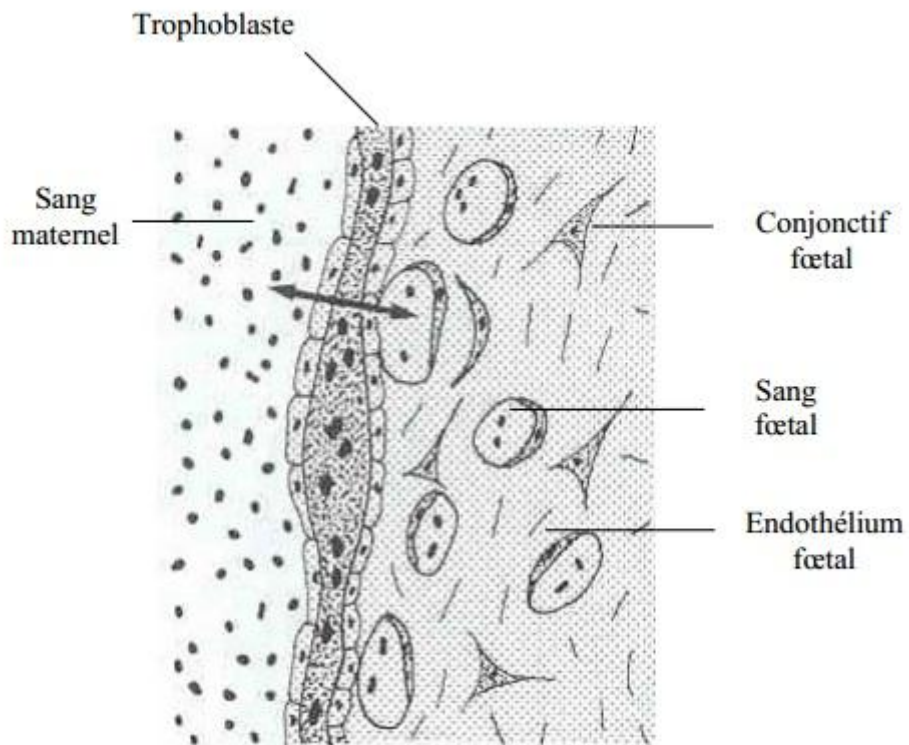


Figure 19: Structure du placenta hémotrichorial murin
 (D'après Kaufmann, 1995)

cellules utérines NK chez ces souris, le développement placentaire ainsi que la vascularisation et la croissance fœtale sont restaurés (Guimond et al. 1998).

1.5.2. La placentation

Vers le 8^{ème} jpc, la placentation débute. L'ectoderme extra-embryonnaire va s'étendre et former l'épithélium chorionique bordé d'une mince couche de cellules mésothéliales. Parallèlement, l'allantoïde se développe à partir du mésoderme à l'extrémité postérieure de l'embryon.

Au 8,5^{ème} jpc, celui-ci croît et entre en contact avec le chorion, il s'agit de la fusion chorioallantoïde. A la base du cône ectoplacentaire, la cavité ectoplacentaire est fortement réduite, les parois, appelées laminae, fusionnent pour former la plaque ectoplacentaire. A ce stade, un pont appelé tige allantoïde, se développe entre l'embryon et le placenta.

A 9,5 jpc, la plaque ectoplacentaire est traversée par des vaisseaux sanguins fœtaux-placentaires en cours de croissance. Ces derniers se ramifient formant un véritable réseau vasculaire parsemé de lacunes remplies de sang maternel. L'ensemble est à l'origine de la formation du labyrinthe, la zone d'échange fœto-maternelle (Rossant and Cross, 2001). Une fois achevé, le labyrinthe est constitué de toute une série de vaisseaux fœtaux et d'espaces remplis de sang maternel imbriqués les uns dans les autres, il est également bordé par une couche de cellules géantes le séparant de la décidue maternelle.

Vers 11,5 jpc, le labyrinthe poursuit sa croissance. Une nouvelle zone, composée de cellules non-syncytiales, apparaît, la zone de jonction ou spongiotrophoblaste (trophospongium) entre le labyrinthe et la couche externe de cellules géantes. Le sang maternel passe alors par cette zone via de larges sinus artériels centraux dans lesquelles les cellules endothéliales maternelles ont été érodées et remplacées par les cellules trophoblastiques endovasculaires. A ce stade, les vaisseaux fœtaux sont présents, le placenta murin devient alors fonctionnel (Figures 17 et 18).

Enfin, autour de 13,5 jpc, des cellules à glycogène émergent du spongiotrophoblaste. Ces dernières vont progresser à travers la décidue maternelle avant de se regrouper autour de l'artère centrale. L'invasion déciduale par ces cellules est complète à 18,5 jpc, mais contrairement à l'homme, celles-ci n'envahissent jamais le myomètre.

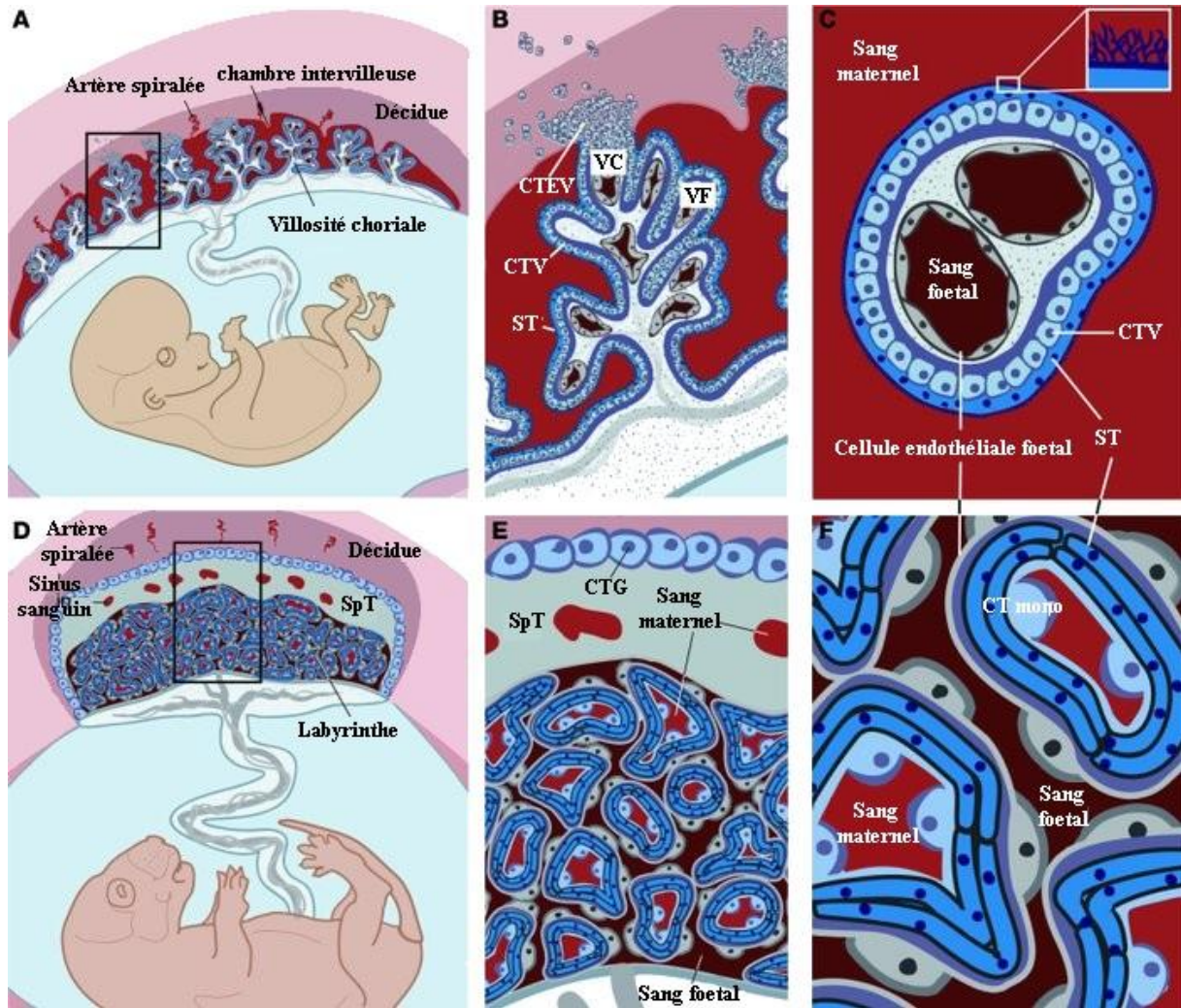


Figure 20 : Comparaison anatomique des placentas humain et murin

A-C. Placenta humain. B. Villosité choriale. C. Coupe d'une villosité flottante D-F. Placenta murin. E. Zone labyrinthique. F. Grossissement du labyrinthe
 CT mono : Cytotrophoblaste mononucléé ; CTEV : cytotrophoblaste extravilleux ; CTG : Cellule Trophoblastique Géante ; CTV : cytotrophoblaste villex ; SpT : Cellules progénitrices des CTG ; ST : Syncytiotrophoblaste ; VC : villosité crampon ; VF : Villosité flottante.
 (Adaptée de Maltepe et al. 2010)

1.5.3. Comparaison entre les placentas murin et humain

En raison d'un grand nombre de similitudes entre la placentation murine et humaine, le modèle murin est utilisé dans de nombreuses études centrées sur le développement placentaire.

Tout d'abord, dans les stades précoces, le développement placentaire murin et humain évolue dans un environnement hypoxique. Puis, la pression en oxygène croît progressivement au sein de la chambre intervillieuse, chez la femme, et dans le labyrinthe, chez la souris. Chez l'humain, la disparition des bouchons trophoblastiques a lieu entre la 8^{ème} et la 12^{ème} SA, parallèlement à la transformation des artères spiralées. Chez la souris, cette augmentation de la teneur en oxygène se déroule après le 10,5 jpc.

Par ailleurs, le phénomène d'invasion placentaire est présent chez les deux espèces. Chez la souris, la couche supérieure du placenta mature est composée de cellules trophoblastiques géantes impliquées dans l'implantation et l'invasion de l'utérus. En outre, au-delà de cette couche de cellules géantes, émergent les cellules à glycogène, qui envahiront la *decidua basalis* mais non le myomètre. Contrairement à l'humain, l'invasion des artères maternelles s'avère limitée. Elle s'arrête au niveau du spongiotrophoblaste et les artères maternelles ne sont pas envahies par les trophoblastes dans la région myométriale. Ces cellules trophoblastiques géantes peuvent être comparées aux cytotrophoblastes extravillieux invasifs de la seconde phase d'invasion interstitielle et endovasculaire, entre la 8^{ème} et la 22^{ème} SA chez la femme, puisqu'ils exercent un rôle similaire (Rossant and Cross 2001 ; Cross 2006).

De plus, leurs zones d'échanges fœto-maternelles présentent de fortes similitudes. Chez l'humain, cette zone est de type hémomonochorial et les échanges s'effectuent au niveau des villosités chorioniques flottantes. Quant à la souris, elle est de type hémotrichorial et les échanges sont réalisés dans le labyrinthe (Figure 19). Ces deux régions sont analogues sur le plan fonctionnel. Leurs villosités placentaires présentent en leur centre des vaisseaux fœtaux et sont recouvertes de ST multinucléés (deux couches de ST directement apposées sur les cellules endothéliales des vaisseaux fœtaux chez les rongeurs) en contact direct avec le sang maternel (Cross 2006). Les deux circulations vont ainsi pouvoir réaliser les échanges nécessaires à la croissance du fœtus. Cependant, des différences subsistent sur le plan architectural, les zones d'échanges chez l'humain, s'apparentent à une arborisation tandis que chez la souris, elles ont une structure labyrinthique (Figure 20).

A noter enfin que dans les deux espèces, la couche la plus externe des villosités chorioniques est composée de trophoblastes, tandis que le centre de ces villosités est formé de mésenchyme allantoïdien ainsi que de vaisseaux en continuité avec ceux du cordon ombilical.

Ces deux placentas sont, par conséquent, de type chorio-allantoïdien (Downs and Bertler 2000).

1.5.4. Modèles murins de pathologies placentaires : cas de la PE

La pré-éclampsie trouve son origine à des stades précoces de la grossesse, rendant son étude difficile. Le développement de modèles animaux est donc nécessaire pour une meilleure compréhension de cette physiopathologie. S'agissant d'une pathologie spécifique à l'espèce humaine, elle n'apparaît pas spontanément dans d'autres espèces. Ainsi, plusieurs modèles de souris ont été générés en surexprimant soit sFLt1 (Kumasawa et al. 2011), soit le système rénine-angiotensine par transgénèse (Takimoto et al. 1996), ou encore en générant une hypertension chronique (Davisson et al. 2002). C'est le cas la lignée murine BPH/5, lignée naturellement hypertendue (plus 20mmHg par rapport aux souris C57BL/6), dont le déclenchement de l'hypertension coïncide parfaitement avec le développement du désordre clinique de la PE (hypertension, protéinurie, œdèmes avec une néphropathie gravidique). Il est également possible d'induire la PE en impliquant l'immunité-innée (avec le système du complément et les TLR) ou l'auto-immunité (avec l'injection d'auto-anticorps) (Bergmann et al. 2010 ; Zhou et al. 2008), d'engendrer une réactivité accrue du placenta en réponse à l'hypoxie, en invalidant le gène *Comt*, une enzyme responsable de la synthèse du 2-méthyl-oestradiol, un inhibiteur de HIF1 α (Kanasaki et al. 2008). Enfin, certaines études ont soulevé l'hypothèse que des gènes soumis à l'empreinte parentale pourraient être impliqués dans la physiopathologie de la PE (avec l'expression de l'allèle d'origine maternelle) (Graves 1998). Le gène STOX1 a ainsi été montré comme soumis à l'empreinte parentale (van Dijk et al. 2005). Il s'agit d'un facteur de transcription impliqué dans la prolifération et l'invasion trophoblastique (van Dijk et al. 2010). La surexpression de la version humaine de ce facteur chez la souris génère au cours de la gestation une hypertension précoce et sévère (plus 80 mmHg) ainsi qu'une protéinurie (Doridot et al. 2012). Chacun de ces modèles a été important pour explorer un aspect de la PE, mais aucun ne récapitule la totalité du syndrome indiquant la complexité de l'étiologie de cette pathologie. Les données de la littérature sont aujourd'hui en accord pour affirmer que la PE ne peut pas être expliquée par un seul mécanisme et qu'une ségrégation de cette pathologie en plusieurs facteurs étiologiques serait la clé de l'identification de ses facteurs de risque. Le fait que la PE ne se développe qu'au cours d'une grossesse laisse supposer, soit que le placenta produit des facteurs responsables de l'inflammation et de la vasoconstriction associées à la PE, soit qu'il existe une prédisposition maternelle (hypertension, maladies rénales ou vasculaires) qui va empêcher une réponse

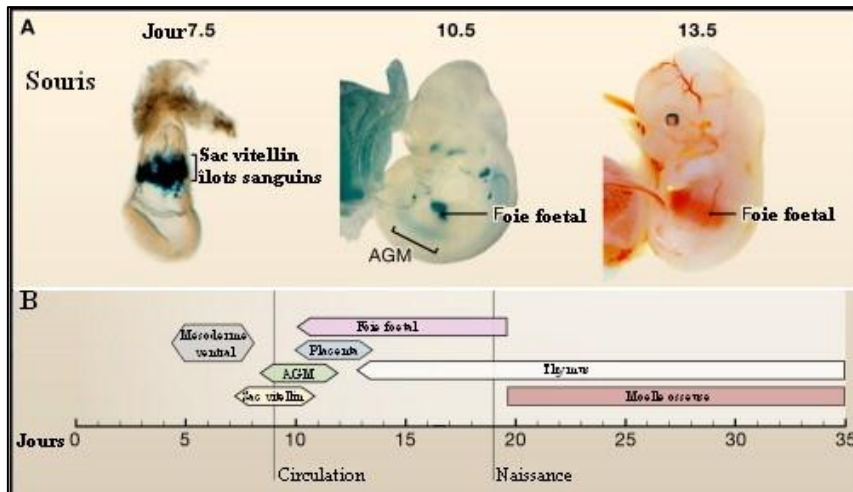


Figure 21: Ontogenèse de l'hématopoïèse placentaire

A. L'hématopoïèse débute au sein du sac vitellin au niveau des îlots sanguins avant d'émerger dans la région de l'AGM, du placenta et du foie foetal. Les îlots sanguins sont visualisés par un marquage LacZ chez des souris transgéniques exprimant GATA-1-LacZ. L'AGM et le foie foetal sont mis en évidence par le marquage lacZ chez des souris transgéniques exprimant Runx1-LacZ.

B. Sites hématopoïétiques au cours du développement. (Figure adaptée de Orkin and Zon 2008)

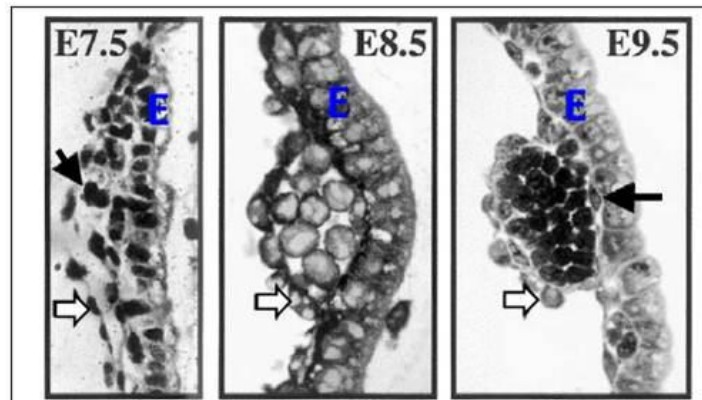


Figure 22: Développement des îlots sanguins du sac vitellin de souris entre E7,5 et E9,5

A E7,5, entre la couche de cellules endodermiques (E) et celle des cellules mésothéliales (flèche blanche) se forment à partir de cellules mésodermiques indifférenciées (flèche noire) les îlots sanguins. Ces derniers vont être à l'origine des érythrocytes nucléés entourés par des cellules endothéliales (flèche noire à E9,5). (D'après Palis et al. 2001)

normale à ces facteurs. Dans mon projet de recherche, je prévois l'utilisation d'un modèle animal de PE afin de valider les hypothèses concernant l'implication de facteurs angiogènes dans cette pathologie.

1.6 L'hématopoïèse placentaire

1.6.1. L'ontogenèse de l'hématopoïèse

1.6.1.1. Chez la souris

Le système hématopoïétique s'établit très tôt au cours du développement embryonnaire. Sa fonction principale est, dans un premier temps, de produire un large nombre de cellules érythroïdes (globules rouges) afin d'assurer la croissance et la survie de l'embryon. Par la suite, elle sera de générer un pool de cellules souches hématopoïétiques (CSHs) qui persistera chez l'adulte. Bien que ces cellules soient localisées dans la moelle osseuse à l'âge adulte, elles ne sont pas originaires de ce tissu. L'hématopoïèse, dans le développement embryonnaire des vertébrés, est caractérisée par l'existence de plusieurs vagues de formation de cellules sanguines : l'hématopoïèse primitive et l'hématopoïèse définitive, et par le transit des CSH à travers plusieurs sites hématopoïétiques durant la vie embryonnaire pour finalement coloniser la moelle osseuse avant la naissance. (Orkin et al. 2008 ; Dzierzak et al. 2008) (Figure 21.).

L'hématopoïèse primitive

Au cours des étapes précoces du développement sanguin, les premières cellules sanguines primitives sont principalement composées de progéniteurs érythroïdes nucléés, organisés sous forme d'îlots sanguins, et associées à des mégacaryocytes et des macrophages. Ces Cellules Hématopoïétiques (CH) apparaissent au sein du mésoderme du sac vitellin extra-embryonnaire à 7-7.5 jpc (Palis et al. 1999). Parallèlement, les Cellules Endothéliales (CE) émergent du même site, entourent les îlots sanguins, et forment avec eux, un système circulatoire primitif (Figure 22.). L'origine des cellules endothéliales et des érythrocytes primitifs fut longuement débattue. Du fait de la différenciation simultanée de ces cellules hématopoïétiques et endothéliales dans les îlots sanguins du sac vitellin ainsi que de la formation concomitante des vaisseaux et du sang, une des théories suggère que ces différentes lignées dériveraient d'un progéniteur bipotent mésodermique commun nommé l'hémangioblaste (Sabin et al. 1920 ; Murray et al. 1932). Ce postulat a été par la suite conforté par de nombreuses expériences (Huber et al. 2004 ; Choi et al. 1998 ; Eichmann et al.

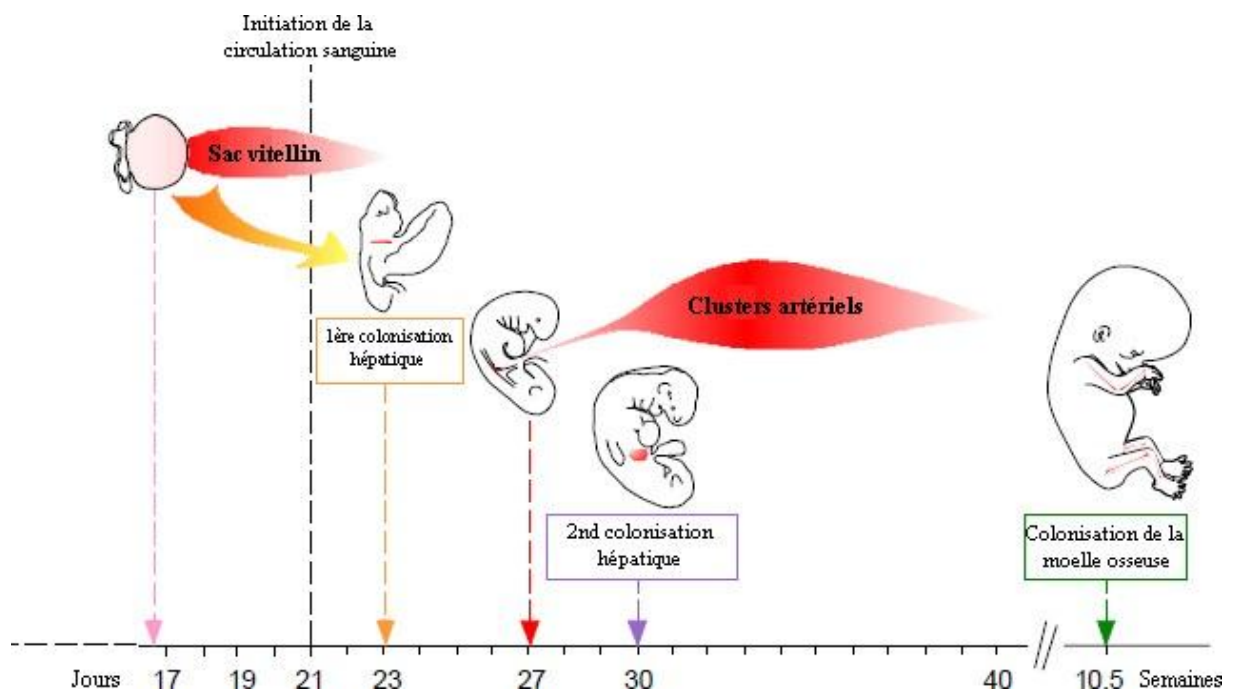


Figure 23: Sites hématopoïétiques au cours du développement embryonnaire humain.

(D'après Tavian et Péault 2005)

1997 et Peault et al. 1983). Par ailleurs, ces érythrocytes primitifs sont indispensables à la survie et à la croissance de l'embryon dans les premières étapes du développement post-implantatoire puisqu'ils assurent l'apport d'oxygène aux tissus embryonnaires, mais leur production n'est que transitoire, ils ne participeront pas à l'édification du système hématopoïétique chez l'adulte (Baron et al. 2012). Longtemps, il fut considéré que les CSHs adultes étaient aussi originaires du sac vitellin (Moore and Owen 1965). Après que les CSHs aient émergé de ce tissu, la pensée principale des années 60 suggérait que ces cellules colonisaient le foie fœtal via la circulation sanguine afin d'accroître leur nombre avant d'atteindre la moelle osseuse. Mais les travaux pionniers de Dieterlen-Lièvre en 1975 effectués sur l'embryon oiseau mirent ce dogme en question. En effet, des expériences de chimères entre des corps embryonnaires de caille et des sacs vitellins de poulets, réalisées avant l'établissement de la circulation entre l'embryon et le sac vitellin, ont clairement démontré que ces cellules d'origine extra-embryonnaire ne participeront pas à l'élaboration du système hématopoïétique retrouvé chez l'adulte. Les CSHs ont une origine intra-embryonnaire et, plus précisément, restreinte à la région aortique (Dieterlen-Lièvre 1975). Plus d'une vingtaine d'années plus tard, ces mêmes conclusions ont été démontrées chez la souris (Muller et al. 1994).

L'hématopoïèse définitive

La seconde vague hématopoïétique coïncide avec le début de la synchronisation des battements cardiaques et de la circulation systémique pulsatile (Lucciti et al. 2007). Les sites de production de CSHs multi-lignages et des cellules progénitrices évoluent au cours de la gestation. Elles prennent naissance de nouveau au sein du sac vitellin, mais pour produire les cellules érythroïdes définitives entre E8,25 et E10,5 (Palis et al. 1999 ; Palis et al. 2001). Puis, les CSHs émergent du placenta autour de E9.5 - E10 (Gekas et al. 2005 ; Otterbach et al. 2005) avant d'apparaître au niveau du plancher de l'aorte dorsale dans la région du Splanchnopleure Para-aortique (p-SP) puis de l'aorte-gonades-mesonephros (AGM) de l'embryon (Cumona et al. 1996 ; Muller et al. 1994 ; Medvinsky et al. 1996). Elles sont également présentes dans les artères vitellines et ombilicales. Les CSHs sont détectées pendant une courte période dans l'aorte (entre E10,5 et E12,5) et le nombre de progéniteurs hématopoïétiques y est très faible en comparaison de ceux du sac vitellin, du placenta et du foie fœtal. Cette constatation suggère que cette région n'est pas un site d'amplification ni de différenciation hématopoïétique, à l'inverse du foie fœtal qui y joue un rôle important et qui est l'un des sites majeurs de l'hématopoïèse définitive avec le placenta.

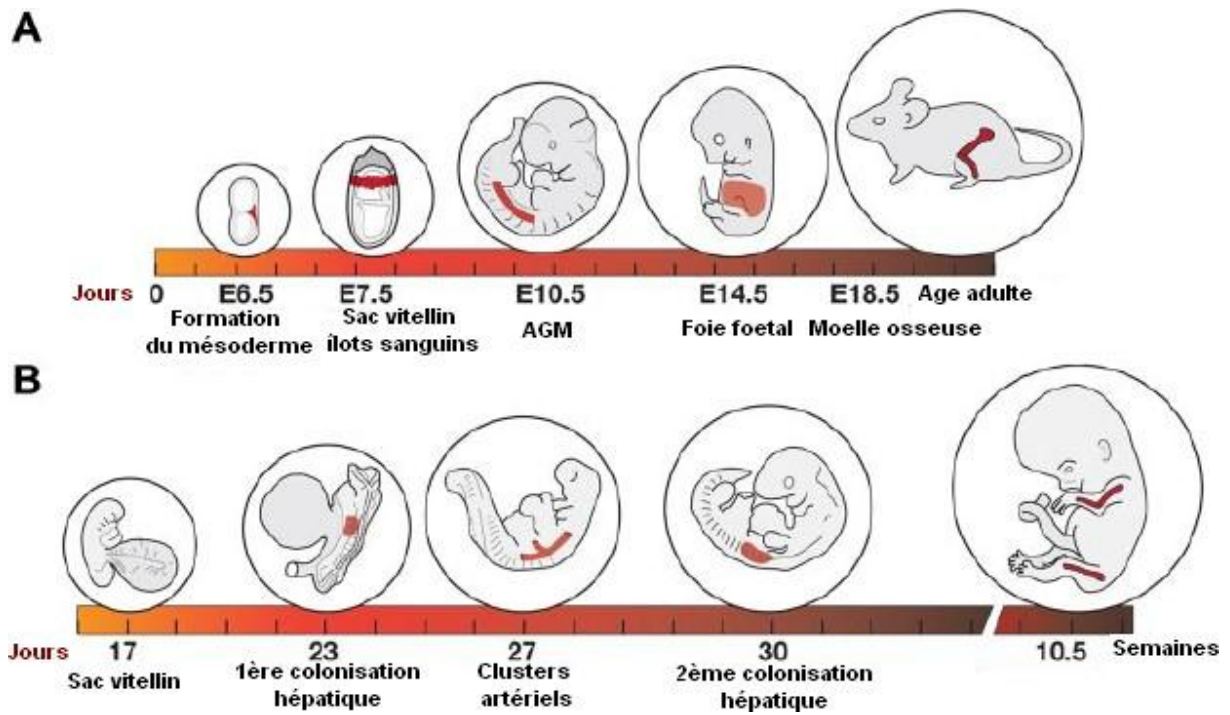


Figure 24: Comparaison des sites hématopoïétiques pendant le développement murin et humain

- A. Développement de l'hématopoïèse chez la souris.
- B. Développement de l'hématopoïèse chez l'humain.
(D'après Baron et al. 2012)

Peu après leur émergence de la région p-Sp/AGM, les CSHs colonisent le foie fœtal vers E10.5 (Sanchez et al. 1996). Les CSHs vont également y proliférer pour constituer un stock suffisant de cellules souches qui coloniseront les organes hématopoïétiques définitifs que sont le thymus, la rate et la moelle osseuse. Cette dernière apparaîtra comme le site prédominant postnatal. Ainsi, au cours du développement embryonnaire se distinguent les sites d'émergence hématopoïétique ; l'AGM, d'émergence et d'amplification ; le sac vitellin, et enfin les organes d'amplification que sont le placenta et le foie fœtal. Contrairement à l'hématopoïèse primitive, les études de ces dernières années seraient plus en faveur de la théorie de l'endothélium hémogénique afin d'expliquer l'origine des cellules sanguines définitives. Ces cellules progénitrices et les CSHs multi-lignages seraient issues de cellules endothéliales vasculaires spécialisées qui acquièrent un potentiel à former des cellules sanguines (endothélium hémogénique) dans le sac vitellin, le placenta et l'AGM.

1.6.1.2. Chez l'humain

L'ontogenèse de l'hématopoïèse humaine présente de nombreuses similitudes avec le développement hématopoïétique de la souris, en raison de l'existence d'une conservation du schéma relatif à l'émergence des CSHs au sein des vertébrés (Tavian et al. 1996) (Figures 23 et 24.). Du fait de la difficulté à réaliser des recherches sur l'embryon humain, l'essentiel des études des CSHs de l'AGM, du foie fœtal et du placenta sont des travaux *in vitro* de tests LTC-IC (*Long Term Culture-Initiating Cell*) permettant d'évaluer le degré de différenciation des CHs dans la suspension cellulaire à tester, des études *in vivo*, consistant à reconstituer le processus hématopoïétique dans des souris NOD-SCID ou encore par des méthodes immunohistologiques.

L'hématopoïèse primitive

Ainsi, tout comme chez la souris, l'hématopoïèse humaine progresse par vagues à travers différents sites embryonnaires : le sac vitellin, p-Sp/AGM, le foie et la moelle osseuse (Tavian and Peault 2005 ; Zambidis et al. 2006). La première d'origine extra-embryonnaire, dite primitive, est initiée dans le mésoderme du sac vitellin dès E17 (Tavian et al. 1999). Les CHs primitives apparaissent avant la mise en place de la circulation sanguine (E21) au niveau des îlots sanguins. Ne possédant pas le potentiel érythromyéloïde, elles ne sont que transitoires et ne participeront pas à l'hématopoïèse définitive chez l'adulte. Ces cellules sanguines sont principalement des érythrocytes nucléés qui synthétisent l'hémoglobine embryonnaire ($\delta\epsilon$) (Peschle et al. 1984).

Colonisations successives du foie

A E21 débutent simultanément la mise en place de la circulation sanguine et l'initiation des battements cardiaques. Ces processus permettent aux cellules sanguines dérivées du sac vitellin, de migrer vers les autres tissus embryonnaires. La transition hématopoïétique entre le sac vitellin et le foie fut étudiée par l'analyse de la nature de l'Hémoglobine (Hb) synthétisée ainsi que par des tests clonogéniques *in vitro*. En effet, la transition de l'Hb embryonnaire ($\delta\epsilon$) en Hb foétale ($\alpha\gamma$) dans le foie reflète la transition des érythrocytes primitifs nucléés (mégalo blasts) en érythrocytes définitifs énucléés (macrocytes) (Peschle et al. 1984,1985). Par ces travaux, les auteurs ont mis en évidence que les cellules issues de l'érythropoïèse primitive du sac vitellin migraient vers le foie, premier organe à subir cette colonisation vers E23. Ce tissu joue un rôle majeur dans la formation des cellules sanguines chez l'embryon avant l'initiation de l'hématopoïèse de la moelle osseuse. Des études postérieures menées par Péault et al. montrèrent qu'il existait deux vagues successives de colonisation ; la première à E23, où les cellules sont $CD34^-CD45^+$, et la seconde à E30 avec les premiers progéniteurs hématopoïétiques $CD34^+CD45^+$. Toutefois, ce n'est qu'après le jour 32 de développement qu'il est possible de maintenir *in vitro* en culture à long terme des précurseurs primitifs du foie (Tavian et al. 1999). Enfin, l'ensemble des travaux réalisés sur ce tissu tendent tous à montrer qu'après 20 SG, le foie n'a plus d'activité hématopoïétique (Tavian and Peault 2005).

L'hématopoïèse définitive

Au 19^{ème} jour de développement, des progéniteurs hématopoïétiques sont détectables dans le splanchnopleure para-aortique (Tavian et al. 2001). Puis à E27, émergent dans la région aortique des cellules hématopoïétiques à potentiel multi-lignage (lymphoïde et myéloïde) accolées à l'endothélium ventral de l'aorte. Dans un premier temps, ces éléments sont détectés sous forme de petits groupes de 2 à 3 cellules dans la région rostrale de l'aorte, avant de rapidement proliférer, pour finalement constituer à E35 des clusters de plusieurs centaines de cellules (Tavian et al. 1996). Ces clusters s'étendent alors jusque dans la région ombilicale de l'aorte et dans l'artère vitelline. A partir de ce moment, le nombre des clusters décroît progressivement et au 40^{ème} jour de gestation, ils ne sont plus détectés (Tavian et al. 1999). Cependant, la présence de CSHs perdure et leur maturation se déroule dans les couches profondes de l'aorte dorsale (Rybtsov et al. 2011). En 2011, Ivanovs et al. étudièrent le potentiel hématopoïétique des cellules de AGM par des expériences de transplantations dans des souris immunodéficientes et décrivent de nouveau la distribution spatio-temporelle des

CSHs dans l'embryon humain. Ils montrèrent que, contrairement à la souris, les CSHs définitives humaines n'apparaissent pas simultanément dans la région de l'AGM, du sac vitellin, du cordon ombilical et du placenta, sans doute en raison de la durée plus longue du développement embryonnaire. En outre, l'AGM est perçu comme le premier site de génération de CSHs à haut potentiel hématopoïétique. Une CSH de cette région a la capacité de produire pas moins de 300 CSHs au cours de 8 mois. Par ailleurs et contrairement à la souris, le placenta humain acquiert l'activité hématopoïétique longtemps après l'émergence des CSHs de la région AGM. Ce qui semble indiquer que chez l'homme, le placenta pourrait être considéré comme un site secondaire de CSHs. Les progéniteurs hématopoïétiques sont retrouvés dans le placenta entre 8 et 17 semaines (Barcena et al. 2009). Par la suite, les cellules érythroïdes définitives sont produites continuellement à partir des CSHs de la moelle osseuse tout au long de la vie post-natale.

Ainsi, pendant que le sac vitellin génère les cellules érythroïdes embryonnaires transitoires, l'AGM est le premier tissu à produire des progéniteurs hématopoïétiques complexes et des cellules souches (Cumano et al. 1996 ; Medvinsky and Dzierzak, 1996). Quant au foie et la moelle osseuse, ils sont considérés comme des tissus sujets à la colonisation de ces cellules et fournissent un microenvironnement puissant pour la croissance fœtale et la pérennité du système sanguin.

1.6.2. Le placenta

1.6.2.1. Chez la souris

Au-delà d'assurer un rôle d'échange entre la mère et le fœtus, d'avoir une fonction endocrine, de jouer un rôle essentiel dans l'établissement et le maintien de la grossesse, dans la croissance et le développement du fœtus, il a été montré qu'il intervenait dans la genèse des cellules hématopoïétiques au cours du développement embryonnaire. A l'origine, le placenta n'était pas considéré comme un organe hématopoïétique. Il a fallu attendre les travaux de transplantations de Till et McCulloch ainsi que de Dancis, dans les années 1960, pour que soit suggérée une activité hématopoïétique au sein du placenta. Les auteurs supposèrent que le placenta était pourvu de cellules immunitaires compétentes. Par des expériences *in vitro*, ils montrèrent également que certaines cellules placentaires présentaient un potentiel hématopoïétique et qu'elles étaient capables de produire des cellules érythrocytaires, lymphocytaires et granulocytaires. Puis, en 1979, Melchers mit en évidence la présence de précurseurs fœtaux de cellules B dans le placenta murin dès E9,5 alors que ces précurseurs apparaissent plus tardivement dans le foie fœtal. Le nombre de ces cellules placentaires atteint

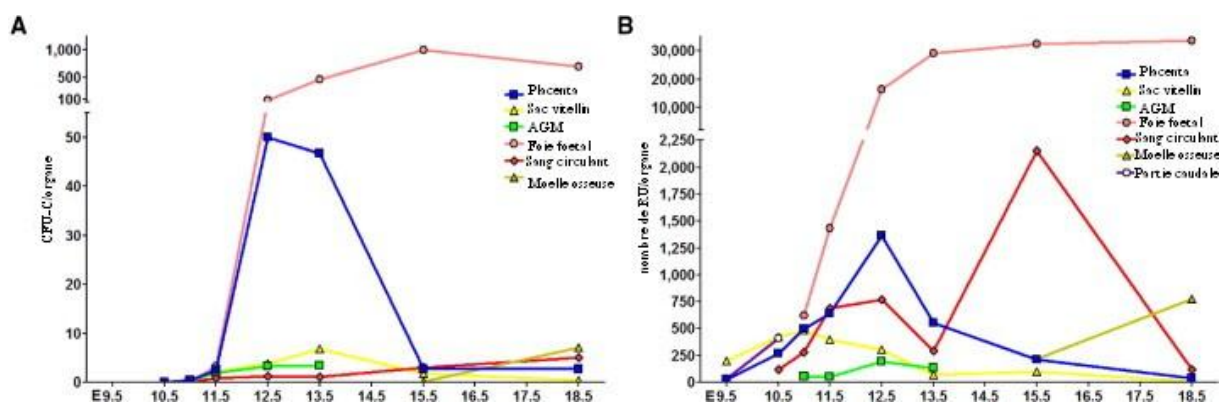


Figure 25: Evolution cinétique de la quantité de précurseurs hématopoïétiques et de CSHs au cours du développement embryonnaire

A. Graphe représentant les résultats obtenus après des tests clonogéniques

B. Graphe représentant les résultats obtenus après des tests de reconstitution hématopoïétique (D'après Gekas et al. 2005)

un pic autour de E12,5 avant de décliner jusqu'à la fin de la gestation. Par la suite, au travers d'expériences de greffes caille-poulet, Caprioli montre en 1998 et en 2001 que dans l'embryon aviaire, l'allantoïde est un producteur de progéniteurs hématopoïétiques. Ces travaux seront affinés dans le placenta murin par les études de l'équipe de Dieterlen-Lièvre. En effet, étant donné que le placenta chorioallantoïque murin se développe par la fusion de l'allantoïde et du cône ectoplacentaire vers E8 - E8,5, Alvarez-Silva suppose que le placenta pourrait participer à l'hématopoïèse fœtale murine. Ainsi, il met en évidence en 2003 par des tests clonogéniques *in vitro* que le placenta est 2 à 4 fois plus enrichi en précurseurs myéloïdes précoces que ne l'est le foie fœtal. Ces progéniteurs hématopoïétiques, qui dérivent du compartiment fœtal et non maternel, sont présents dès E9,5, soit avant qu'ils ne colonisent le foie fœtal. Le placenta serait donc une source riche de progéniteurs multipotentiels hématopoïétiques et jouerait un rôle pendant le développement embryonnaire comme organe hématopoïétique (Alvarez-Silva et al. 2003). Il a fallu ensuite attendre les études de Gekas et de Ottersbach en 2005 pour établir définitivement le placenta comme une niche de cellules souches hématopoïétiques. Par des expériences de transplantations *in vivo* et des tests clonogéniques *in vitro*, Gekas et ses collaborateurs étudièrent de nouveau la distribution anatomique des CSHs fœtales afin de déterminer les niches de CSHs dans l'embryon murin et évaluèrent l'activité hématopoïétique des CSHs dans le placenta. Ils considèrent que cette activité reflète la capacité des cellules à s'auto-renouveler et à reconstituer de manière permanente toutes les lignées du système hématopoïétiques adultes (Figure 25). Ainsi, ils montrèrent que les CSHs émergent du placenta avant leur détection dans la circulation sanguine, ce qui suggère que ces CSHs ont bien une origine distincte de celles des CSHs circulantes. Ils mirent également en évidence que le début de l'activité hématopoïétique des CSHs dans le placenta s'effectue parallèlement à celui de l'AGM, autour de E10,5 - E11. Le pool de CSHs placentaire croît de manière significative jusqu'à E12,5 - E13,5 et contient alors 15 fois plus de CSHs que l'AGM, avant de diminuer d'un facteur 10 à E15,5. Ces résultats sont en accord avec les travaux *in vitro* de Melchers et al. Par ailleurs, la phase de décroissance coïncide avec le moment où les CSHs placentaires débutent leur migration vers le foie fœtal, situé en aval du placenta dans la circulation fœtale, et la période où la quantité de CSHs dans le foie ne cesse d'augmenter. En outre, à E12,5 la circulation sanguine est déjà établie, le pic de CSHs pourrait s'expliquer par la migration de CSHs issues d'autres sites hématopoïétiques. Enfin, du fait que le placenta est localisé en aval de l'aorte dorsale, il est probable qu'après avoir émergé de l'AGM, les CSHs passent par une phase d'amplification dans le placenta. Cette étude a permis de montrer que la cinétique de l'activité

hématopoïétique des CSHs dans le placenta est unique et ne mime pas l'activité des autres organes hématopoïétiques fœtaux. Le placenta serait donc une niche transitoire où migreraient les CSHs/précurseurs hématopoïétiques ayant émergé de l'aorte dorsale afin d'être amplifiés avant de coloniser le foie fœtal. Ottersbach et ses associés réalisèrent également des transplantations chez des souris irradiées qui étayèrent les observations de Gekas. Ils mirent aussi en évidence que les CSHs étaient préférentiellement localisées au niveau de la zone labyrinthique du placenta.

En 2006, des travaux furent menés sur les deux tissus précurseurs du placenta que sont l'allantoïde et le chorion afin de vérifier si le placenta pouvait être considéré comme un réel site d'émergence des CSHs et pas seulement une niche transitoire d'amplification. Par la suite, deux équipes travaillèrent sur des cultures *in vitro* d'explants de chorion et d'allantoïde isolés avant leur fusion. Par des tests de méthyle-cellulose, ils montrèrent que le mésoderme chorionique et allantoïque étaient capables de générer des progéniteurs hématopoïétiques *de novo* (Zeigler et al. 2006 ; Corbel et al. 2007). Enfin, en 2008, des modèles de souris transgéniques sont développés telles que les souris *Ncx1*^{-/-}. L'inactivation de ce gène, qui est létale après E10,5, conduit à une perte des battements cardiaques, liée à un défaut au niveau de la pompe 1 d'échange $\text{Na}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ et à l'absence de la circulation sanguine. Il s'agit d'un modèle unique pour évaluer le potentiel hématopoïétique *de novo* d'un site particulier. La culture d'explants placentaires issus de ces embryons *Ncx1*^{-/-} a permis de mettre en évidence que le placenta est capable de générer des cellules myéloérythroïdes et lymphoïdes B et T. Cela démontre que certaines cellules placentaires possèdent un potentiel hématopoïétique multi-lignage (Rhodes et al. 2008). En outre, au niveau de la vascularisation placentaire du labyrinthe, dans la lumière des gros vaisseaux, des cellules expriment le marqueur CD41 (marqueur des CSHs naissantes et des progéniteurs) ainsi que Runx1 (facteur de transcription exprimé dans les cellules endothéliales et les progéniteurs hématopoïétiques) ce qui suggère que le développement des CSHs est initié dans la vascularisation placentaire et qu'il est indépendant du flux sanguin. Ce processus d'émergence rappelle celui observé au niveau des clusters aortiques mais l'activité mitotique y est plus intense. Le réseau vasculaire du labyrinthe semble donc être un lieu d'amplification hématopoïétique. L'ensemble de ces études démontrent que le placenta est non seulement une niche mais aussi une source de cellules souches hématopoïétiques (Rhodes et al. 2008).

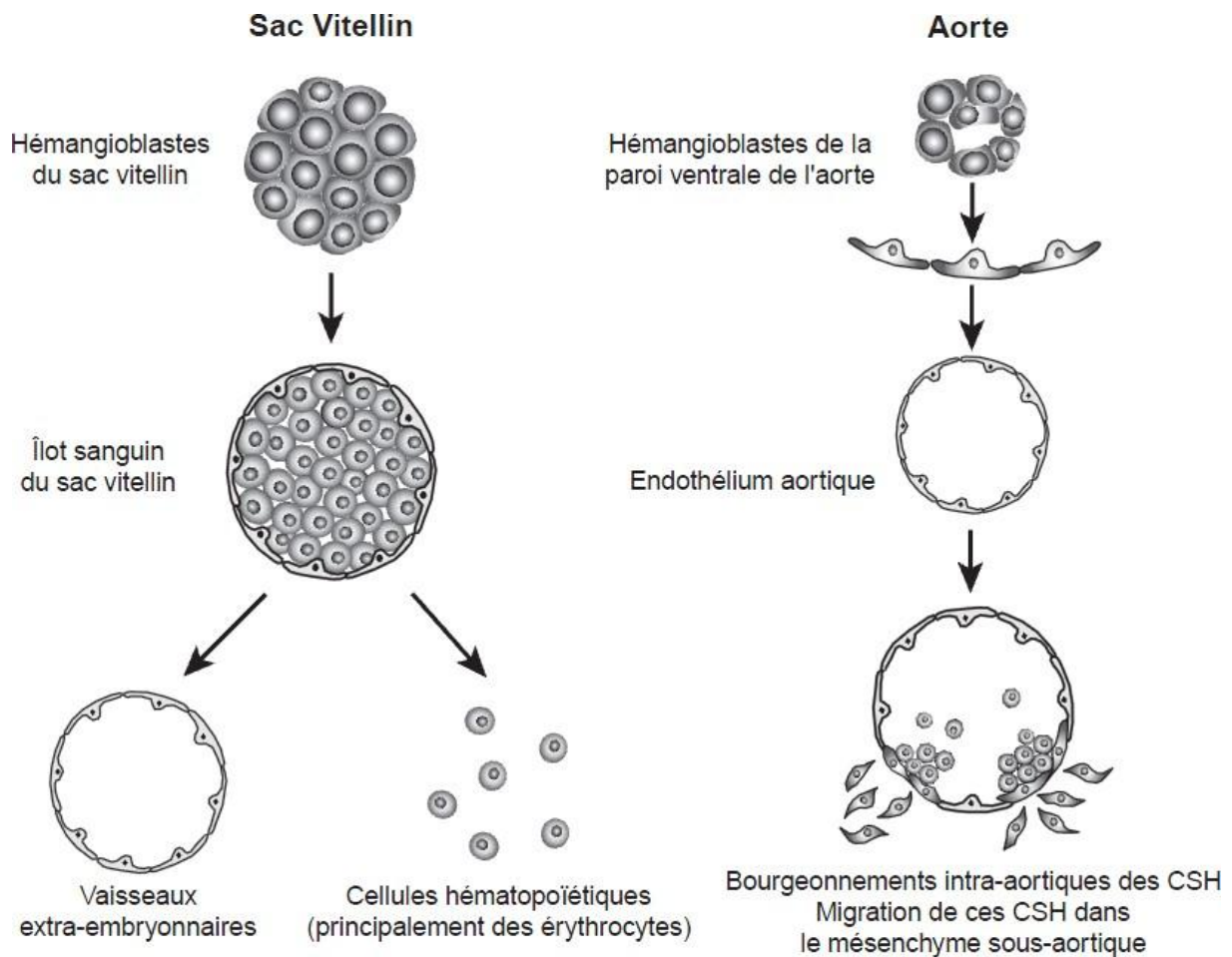


Figure 26: Comparaison entre l'hématopoïèse du sac vitellin et celle de l'aorte.

Les hémangioblastes du sac vitellin donnent naissance aux îlots sanguins, avec en périphérie des CE et au centre des CH. Au cours de leur maturation, ces îlots vont former le système vasculaire extra-embryonnaire et les CH principalement composées des érythrocytes primitifs. Au niveau de l'aorte, les CSHs naissent à partir des CE ventrales, bourgeonnent à l'intérieur du vaisseau ou migrent dans le mésenchyme dorsal. (D'après Pouget et al. 2005)

1.6.2.2. Chez l'humain

En raison des nombreux travaux présentant le placenta murin précoce comme un site d'émergence et d'amplification de CSHs, les recherches sur le placenta humain se sont naturellement axées sur sa capacité à être une source potentielle de CSHs et de progéniteurs hématopoïétiques.

Les travaux de Barcena et al. ont permis de démontrer que le placenta humain présentait des progéniteurs hématopoïétiques exprimant CD34 dès 8 SG (Barcena et al. 2009). La même année, une autre équipe dirigée par Dzierkak s'est intéressée au potentiel hématopoïétique du placenta à des stades plus précoces du développement embryonnaire (Robin et al. 2009). Elle montra que les progéniteurs hématopoïétiques immatures exprimant CD34 étaient détectables dès 6 SG soit très antérieurement après que l'AGM ait débuté sa production de CSHs. Contrairement à la souris, l'activité hématopoïétique du placenta se maintient jusqu'au terme de la grossesse ouvrant la possibilité d'exploiter les CH immatures placentaires à des fins thérapeutiques.

En 2011, les travaux de Robin et al. sont remis en question par Ivanovs et al. Ces derniers stipulent que le placenta n'acquiert son activité hématopoïétique seulement vers 15 SG et ne serait qu'un simple organe hématopoïétique colonisé par les CSHs. Cette divergence de résultats pourrait s'expliquer par les différents fonds génétiques des souris utilisées pour les reconstitutions hématopoïétiques. A ce jour, le débat perdure mais d'autres angles de recherches sur cet organe sont également exploités tels que l'étude des facteurs responsables de l'amplification des CSHs. Ainsi, de tels facteurs pourraient être employés *ex vivo* dans le cadre de thérapies.

1.6.3. Origines possibles des cellules souches hématopoïétiques

L'origine anatomique et la nature exacte des précurseurs directs des CSHs dans l'embryon restent encore à ce jour un sujet de controverse. Plusieurs théories ont été énoncées. L'une d'elles serait en faveur de l'existence d'un précurseur commun aux deux lignées, l'hémangioblaste, tandis qu'une autre pencherait pour une origine endothéliale des CSHs, une cellule endothéliale hémogénique ayant toutes les caractéristiques morphologiques et phénotypiques des cellules endothéliales, mais possédant en plus la capacité à produire les CH. Néanmoins, l'émergence simultanée des lignages hématopoïétique et endothélial au sein du sac vitellin ou encore leur relation étroite dans les clusters du plancher aortique semblent suggérer qu'ils posséderaient tous deux une origine mésodermique.

1.6.3.1. Hémangioblaste

L'hémangioblaste correspondrait *in vivo* à un progéniteur ancestral mésodermique commun aux lignages hématopoïétique et endothélial. La notion d'hémangioblaste est ancienne, et est initiée par les études cytologiques de Ranvier, en 1875, sur les étapes précoces du développement du sac vitellin dans l'embryon de poulet (Murray, 1932). Ce concept est, plus tard, renforcé par le fait que les deux lignées expriment en commun de nombreuses molécules telles que des épitopes de surface, des molécules impliquées dans l'adhérence cellulaire - CD34 (Young et al. 1995; Garcia-Porrero et al. 1998), CD31 (Garcia-Porrero et al. 1998 ; Nishikawa et al. 1998), VE-cadhérine (Nishikawa et al. 1998a et 1998b)...-, des récepteurs membranaires - Flt-1/VEGF-R1 (Choi et al. 1998 ; Dumont et al. 1995)...- ou des facteurs de transcription - GATA2 (Minegishi et al. 1999 ; Silver et al. 1997)...-. Cette notion a été étayée par l'apport des invalidations génétiques chez la souris et le poisson-zèbre montrant qu'un nombre important de gènes était fonctionnellement impliqué dans le développement des CE ainsi que des CH. Ainsi chez le poisson-zèbre, l'invalidation du gène *cloche* (Stainier et al. 1995) conduit à une réduction sévère du nombre des précurseurs endothéliaux et hématopoïétiques (Liao et al. 1997). La présence d'un gène Flk-1/KDR fonctionnel (Shalaby et al. 1995 et 1997) semble être requis au développement des CE et des CH, au niveau des deux compartiments extra- et intra-embryonnaires. Ce résultat suggère que Flk-1/KDR agirait au niveau ou en amont de l'hémangioblaste. Or, des analyses plus récentes ont montré que les cellules ES (*Souches Embryonnaires*) homozygotes étaient capables de produire des CE et des CH. Il semblerait que Flk-1 ne serait pas requis dans la formation de progéniteurs hématopoïétiques/endothéliaux et que l'absence des deux lignages chez les embryons Flk-1^{-/-} serait liée à une anomalie de migration et d'expansion des cellules mésodermiques (Schuh et al. 1999).

Par ailleurs, du fait que la séquence d'événements conduisant à la formation des CE et des CH dans le modèle des cellules ES murines (Wiles and Keller 1991; Keller 1995), ou dans les corps embryoïdes dérivés de ces cellules (Risau et al. 1988) s'avère similaire à celle qui se déroule dans l'embryon, des approches complémentaires faisant appel à ces entités furent également utilisées. Le groupe de Gordon Keller (Choi et al. 1998) s'est attaché à caractériser les étapes qui mènent à la mise en place des différents lignages au cours de la différenciation des corps embryoïdes. Son protocole expérimental fut repris par de nombreuses équipes qui confirmèrent que l'entité mésodermique la plus précoce obtenue à partir des corps embryoïdes avait la capacité d'engager son processus de différenciation vers les cellules des deux lignages. Cette découverte renforça l'hypothèse selon laquelle il existerait un hémangioblaste

bipotent *in vivo*. En 2007, l'équipe de Keller réalisa des recherches sur des cellules ES humaines et aboutit au même constat (Kennedy et al. 2007). Toutefois, la question sur la spécificité de ce précurseur reste entière. Afin de pouvoir attribuer à une cellule la qualité d'hémangioblaste, il est impératif de considérer un certain nombre de critères notamment qu'une cellule unique doit produire à la fois des CE et des CH ou encore, que cette cellule ne doit en aucun cas produire des dérivés mésodermiques autres que ces deux types cellulaires. Or les travaux d'Ema et al. suggèrent que ce précurseur peut également s'engager vers la différenciation en cellules musculaires lisses (Ema et al. 2003).

La découverte de l'existence d'une deuxième vague hématopoïétique dans le compartiment intra-embryonnaire, l'AGM, indépendante du sac vitellin lorsque les vaisseaux sont pleinement fonctionnels, suscite de nouvelles interrogations (Cumona and Godin 2001) et soulève, de nouveau, la question de l'existence d'un hémangioblaste à l'origine des CE et CH. Cette hématopoïèse aortique se caractérise par la production des CSHs qui naissent à partir de l'endothélium ventral du vaisseau à la suite de modifications phénotypiques des CE. Il a été montré chez différentes espèces telles que le xénope (Ciau-Uitz et al. 2000), l'oiseau (Jaffredo et al. 1998), la souris (Garcia-Porrero et al. 1998 ; North et al. 1999) et l'homme (Tavian et al 1996 ; Marshall et al. 1999) que les CE qui tapissent le plancher de l'aorte perdent leur cohérence et sont remplacées par des petits bourgeonnements de cellules rondes qui expriment le marqueur pan-hématopoïétique CD45 ainsi qu'un grand nombre de marqueurs communs aux CE et aux CH. Ces bourgeonnements intra-aortiques font saillie dans la lumière de l'aorte et sont en étroite association avec les CE. Les CH sont ensuite libérées dans la lumière du vaisseau afin de coloniser les organes hématopoïétiques définitifs (Dieterlen-Lièvre et al. 2006). Le lien entre CE et CH au cours de la genèse des CSHs intra-embryonnaires apparaît de nouveau très étroit et plusieurs modèles de formation des bourgeonnements intra-aortiques ont été proposés. L'hypothèse la plus ancienne (Emmel 1916 ; Smith and Glomski 1982) évoque la possibilité que l'endothélium puisse être à l'origine des CSHs, par transdifférenciation transitoire. Cette hypothèse, dite de « l'endothélium hémogénique », prit toute son importance avec la redécouverte des bourgeonnements intra-artériels et fut abordée expérimentalement dans les modèles aviaire et murin (Sabin et al. 2002 ; Goldi et al. 2008 ; Kissa et al. 2010 ; Boisset et al. 2010).

1.6.3.2. L'endothélium hématogène

L'étroite association entre les CE et CH ou les CSHs naissantes au moment de l'émergence des clusters dans le plancher aortique suggère que les CH définitives incluant les CSHs seraient générées à partir d'un intermédiaire endothélial avec un potentiel hématopoïétique, l'endothélium hémogénique (Jaffredo et al. 2005).

Les premiers travaux visant à vérifier cette hypothèse furent réalisés chez l'embryon de poulet. Avant l'apparition des premières CH aortiques, les cellules de l'arbre vasculaire aortique subissent deux types de marquages, l'un à court-terme, l'autre à long terme. Le premier consista à utiliser des lipoprotéines acétylées de faible densité couplées au Dil (*Dil-AcLDL*) qui seront spécifiquement endocytosées par les CE et le second, à employer des rétroviraux exprimant le gène rapporteur de la β -Galactosidase (*LacZ*). Ces expériences de traçage cellulaire aboutirent aux mêmes conclusions et permirent d'établir que les CH issues des bourgeonnements aortiques dériveraient des CE du plancher des vaisseaux (Jaffredo et al. 1998 et 2000). Ces observations ont été confirmées chez la souris. En utilisant des marqueurs spécifiques des CE (VE-cadhérine⁺/CD45⁻/Ter119⁻) et des CH (VE-cadhérine⁺/CD45⁺), les auteurs ont isolé les CE du sac vitellin à E9.5 et ont confirmé *in vitro* que ces cellules avaient la capacité de se différencier aussi bien en CE qu'en CH (Nishikawa et al 1998). Quelques années plus tard, la capacité de cette population particulière de CE fut reconnue *in vivo* dans le modèle murin (Fraser et al. 2003 ; de Bruijn et al. 2002) et chez l'homme (Oberlin et al. 2002). La méthode de traçage *in vivo* à l'aide d'une injection de Dil-AcLDL fut reprise dans les travaux de Sugiyama et al en 2003. Ces derniers injectèrent le Dil-AcLDL dans le cœur d'embryons E10 afin de pouvoir marquer l'ensemble du réseau vasculaire. Dans un premier temps, les cellules Dil⁺ présentèrent un phénotype caractéristique des CE, mais, quelques heures plus tard, presque la moitié de ces cellules avaient un phénotype hématopoïétique. Ainsi, ils montrèrent que ces cellules possédaient la capacité à reconstituer le système hématopoïétique et des travaux ultérieurs mirent en évidence leur participation à la colonisation du foie fœtal à E10.5 (Sugiyama et al 2005). Quelques années plus tard, un modèle de souris transgénique VE-cadhérine/Cre fut développé afin d'étudier la filiation hématopoïétique des premières CE. Ce modèle est basé sur le système CRE/loxP permettant de suivre la descendance des cellules ayant exprimé le marqueur VE-cadhérine à un moment donné du développement. Ainsi, Zovein et al montrèrent que la lignée Ve-cadhérine de l'AGM est capable, à long terme, d'hématopoïèse multi-lignée. Ils confirmèrent également les travaux de Sugiyama concernant la colonisation du foie fœtal par les cellules d'origine

endothéliale, cellules qui migreront par la suite dans la moelle osseuse (Zovein et al. 2008 ; Alva et al. 2006 ; Monvoisin et al. 2006).

En outre, de nombreux travaux s'efforcèrent de mieux caractériser cette population particulière de CE et tous s'accordèrent sur le fait que les CSH définitives étaient contenues dans une population exprimant à la fois le marqueur pan-leucocyte CD45 et le marqueur endothélial VE-cadhérine (Oberlin et al. 2002 et 2010 ; Taoudi et al. 2005 et 2008). Afin d'affiner les connaissances de cette population endothéliale homogène et d'étudier la cinétique de la formation des CSHs aortiques, des études complémentaires furent réalisées. Ainsi, au travers d'expériences de cocultures sur un tapis cellulaire d'OP9, Rybtsov et al. étudièrent l'évolution des cellules endothéliales homogènes en CSHs définitives. Ils établirent l'existence de deux types de pré-CSH. La population de pré-CSHs de type I présente le phénotype VE-cadhérine⁺/CD45⁻ et ne peut être considérée comme des CE homogènes en raison de leur incapacité à former des colonies endothéliales *in vitro*. La population pré-CSHs de type II, plus mature, se caractérise par le phénotype VE-cadhérine⁺/CD45⁺ et formera les CSHs définitives (Rybtsov et al. 2011). Enfin, ces dernières années, le développement de nouvelles techniques a permis de visualiser en temps réel par microscopie confocale, la transitions CE en CH chez la souris et le poisson-zèbre (Boisset et al. 2010 ; Bertrand et al. 2010 ; Kissa and Herbomel 2010 et Lam et al. 2010). La différenciation des cellules ES fut également observée au travers de cette nouvelle ressource. Ainsi l'équipe de Schroeder a montré le détachement progressif des précurseurs hématopoïétiques à partir de CE, VE-cadhérine⁺ à la suite de leur arrondissement (Eilken et al. 2009)

En résumé, l'ensemble de ces travaux a permis d'établir que l'hématopoïèse aortique repose sur une population particulière de CE ayant une capacité homogène nommée l'endothélium hématogène. Cette population se situe dans le plancher de l'aorte qui, sous l'influence de signaux encore méconnus, va subir une série de modifications phénotypiques caractérisées par la perte des marqueurs endothéliaux et l'acquisition des marqueurs hématopoïétiques.

II. Les Prokinéticines

Les Prokinéticines, composées de deux protéines PROK1 et PROK2 et appartenant à la famille des protéines sécrétées, furent récemment mis en évidence (Li et al. 2001 ; LeCouter et al. 2001). Initialement identifiées en tant que régulateur de la contraction gastro-intestinale, elles ont été associées par la suite, à de multiples fonctions biologiques au sein de l'organisme telles que l'angiogenèse, la survie neuronale, le rythme circadien, la nociception, la réponse immunitaire, l'hématopoïèse ou encore la spermatogénèse.

2.1 Les Prokinéticines et leurs récepteurs

2.1.1. Découverte des Prokinéticines

2.1.1.1. MIT-1 et Bv8

L'activité du muscle lisse gastro-intestinal est régulée par des signaux neuronaux intrinsèques et extrinsèques incluant classiquement des neurotransmetteurs, des neuropeptides et des agents hormonaux. En plus des agents endogènes, des peptides exogènes présentant également un rôle dans la contraction du muscle lisse gastro-intestinal ont été identifiés par Scheweitz et al. (1990 et 1999). Ils purifièrent notamment une petite protéine non toxique à partir de venin de Mamba noir (*Dendroaspis polylypis*) qu'ils nommèrent MIT-1 en référence à Mamba Intestinal Toxin 1. Ils caractérisèrent par la suite sa fonction et montrèrent qu'elle stimulait la contraction de l'iléon chez le cochon d'inde. Des études antérieures, menées par Joubert et Strydom, avaient déjà mis en évidence cette même protéine, appelée alors VPRA pour Venom Protein A (Joubert and Taljaard 1980). Parallèlement, aux travaux de Scheweitz, une protéine de taille similaire, riche en cystéine et possédant des propriétés contractiles semblables à MIT-1, a été isolée à partir des sécrétions de peau de la grenouille *Bombina variegata*. Elle a été nommée Bv8 pour son origine et son poids moléculaire de 8 kDa (Mollay et al. 1999). La caractérisation de son rôle a permis de mettre en évidence que, tout comme MIT-1, Bv8 a la capacité d'interagir avec des récepteurs présents dans les tissus des mammifères et de stimuler la contraction de l'iléon des rongeurs (cochon d'inde, rat et souris), de relaxer le colon du rat mais aussi que son injection dans le cerveau de rat conduit au développement d'une hyperalgésie⁹ (Mollay, et al. 1999). L'analyse de sa séquence protéique montre une grande similitude avec celle de MIT-1, son homologue chez le serpent, et une conservation des résidus cystéine et sérine en position 18 et 22 respectivement.

⁹ Perception douloureuse anormalement intense à un stimulus normalement douloureux.

2.1.1.2. Les prokinétines

Le haut degré d'identité entre ces peptides d'amphibien et de reptile suggère que des protéines similaires pourraient exister chez d'autres espèces, telles que les mammifères. C'est ainsi que l'équipe de Zhou, utilisa les séquences d'ADN codant pour MIT-1 et Bv8 comme sondes, afin de rechercher des homologues dans la base de données du génome humain. Deux orthologues furent identifiés. En raison de leur capacité à stimuler la contraction de l'appareil gastro-intestinal chez les rongeurs, ils furent nommés les prokinétines, prokinétine-1 (PROK1) pour MIT-1 et prokinétine-2 (PROK2) pour Bv8. (Li et al. 2001). L'étude de la distribution des prokinétines a montré que, non seulement ils sont exprimés dans l'appareil gastro-intestinal mais aussi dans de nombreux tissus adultes et fœtaux avec généralement un niveau d'expression plus élevé pour PROK1 par rapport à PROK2. L'action contractile sur l'appareil gastro-intestinal de ces deux molécules et l'effet inhibiteur sur les molécules bloquantes des canaux calciques suggèrent une interaction probable avec des récepteurs membranaires. Ainsi, Li et al. ont montré que non seulement les prokinétines agissent via des récepteurs membranaires mais que ces derniers appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G.

2.1.1.3. L'EG-VEGF

La même année, le groupe de Ferrara a décrit un nouveau facteur angiogène exprimé spécifiquement dans les tissus endocrines (glandes stéroïdes, les ovaires, les testicules, le cortex surrénal et le placenta) et agissant sur les cellules endothéliales dérivées de ces tissus. Ce facteur fut isolé à partir d'une banque de protéines humaines sécrétées dont la capacité à induire la prolifération de cultures primaires de cellules endothéliales dérivées de capillaires de cortex surrénalien bovin a été testée. En raison de son activité biologique similaire à celle du VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) sur les cellules endothéliales, il le nomma EG-VEGF pour Endocrine Gland-Derived Vascular Endothelial Growth Factor (LeCouter et al. 2001). Malgré des similitudes d'action et de mécanismes de contrôle de prolifération des cellules endothéliales entre VEGF et EG-VEGF, ces deux facteurs n'ont aucune homologie de structure.

La connaissance de la séquence protéique complète de l'EG-VEGF a permis de réaliser que cette protéine était l'orthologue humain de protéines purifiées antérieurement par d'autres équipes sous d'autres appellations. C'est ainsi que fut découvert que PROK1 et

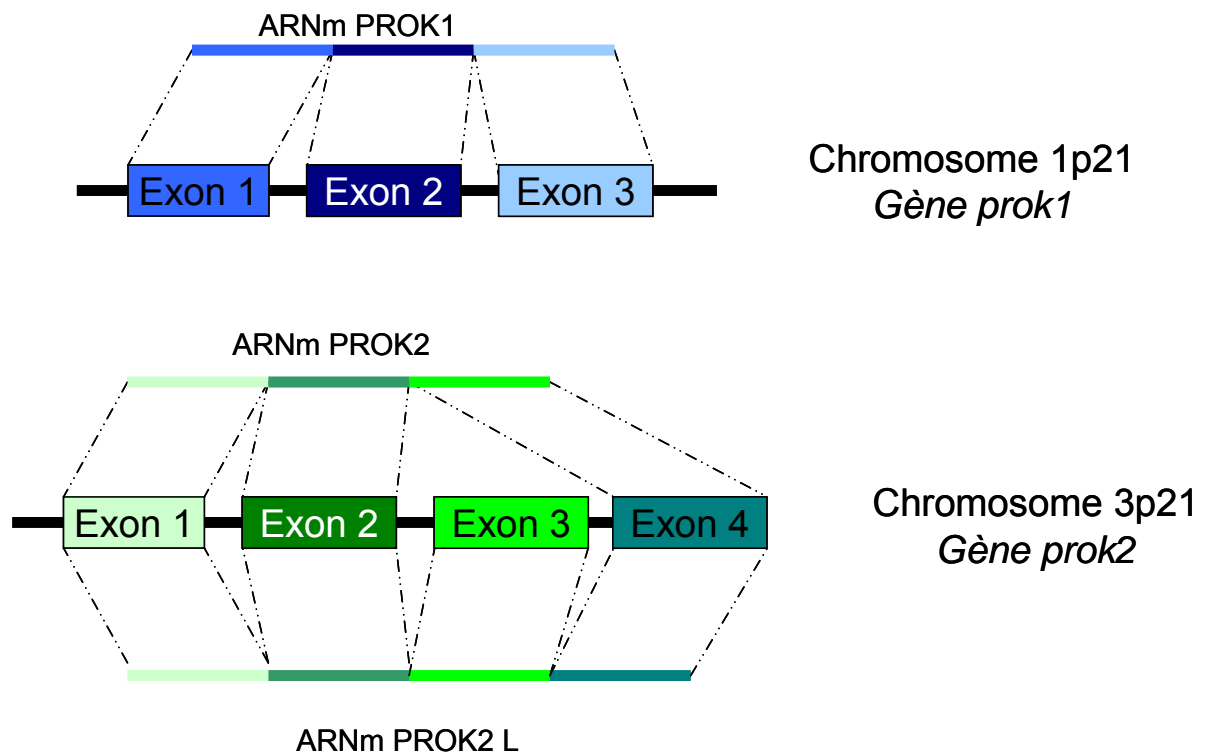


Figure 27: Structure des gènes *prok1* et *prok2*

(D'après Brouillet et al. 2012)

H1	AVITGACERDVQCGAGTCCAISLWLRGLRMC TPL	GREGEECHPGSHKVPFFR-KRKHHTCPCLPNLLC	SRFPDGRYRCSMDLKNINF	86
R1	AVITGACERDVQCGAGTCCAISLWLRGLRLCTPL	GREGEECHPGSHKIPFFR-KRQHHTCPCSPSLLC	SRFPDGRYRCSQDLKNVNF	86
M1	AVITGACERDIQCGAGTCCAISLWLRGLRLCTPL	GREGEECHPGSHKIPFLR-KRQHHTCPCSPSLLC	SRFPDGRYRCFRDLKNANF	86
Mam	AVITGACERDLQCGKGTCCAVSLWIKSVRVCTPV	GTSGEDCHPASHKIPFSGQRKMHTCPCAPNLAC	VQTSPPKFKCLSK	80
Bom	AVITGACDKDVQCGSGTCCAASAWSRNIRFCIPL	GNSGEDCHPASHKVPYDG-KRLSSLCPCKSGLTC	SKSGE-KFKCS	77
F1	AVITGACERDVQCGGLCCAVSLWLRGLRMCAPR	GLEGDECHPFSSHKVPYPG-KRQHHTCPCLPHLVC	TRDRDSKYRCTDDFKNVDLYEVGQTLR	94
H2	AVITGACDKDSQCGGMCCAVSIWVKSIRICTPM	GKLGDSCHPLTRKVPFFG-RRMHHTCPCLPGLAC	LRTSFNRFICLAQK	81
M2	AVITGACDKDSQCGGMCCAVSIWVKSIRICTPM	GQVGDSCHPLTRKVPFFG-RRMHHTCPCLPGLAC	LRTSFNRFICLARK	81
R2	AVITGACDKDSQCGGMCCAVSIWVKSIRICTPM	GQVGDSCHPLTRKVPFFG-RRMHHTCPCLPGLAC	LRTSFNRFICLARK	81
B2	AVITGACDRDPQCGGMCCAVSLWVKSIRICTPM	GKVGDSCHPMTRKVPFLG-RRMHHTCPCLPGLAC	SRTSFNRYTCLAQK	81
F2	AVITGACEKDSQCGGMCCAVSLWIRSLRMC TPM	GREGDCHPMSHTVPFFG-KRLHHTCPCLPNLSC	IPMDEGRAKCLSTYKPYDYYL	88

Figure 28: 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'acides aminés chez l'homme (D'après Kaser et al. 2003).

l'EG-VEGF n'étaient en réalité qu'une seule et même molécule et qu'ils partageaient 80% d'homologie avec MIT-1/VPRA (Maldonado-Pérez et al. 2007). De la même manière, l'alignement des séquences de PROK2 a permis de constater qu'il était un orthologue au Bv8 amphibien. Quelques années plus tard, les orthologues de Bv8 et de MIT-1 furent identifiés dans les sécrétions de peau d'autres amphibiens, chez les lézards, les poissons appartenant à l'espèce *Takifugu*, les souris, les rats, les bovins, et les singes (Negri et al. 2007). Des similitudes entre les prokinétines de différentes espèces sont particulièrement importantes dans les régions N-terminales et centrales. Quant aux différences majeures, elles se situent dans la région C-terminale, où une conservation modérée de cette zone est tolérée pour le maintien de l'activité des prokinétines (Bullock et al. 2004).

2.1.2. Les gènes des prokinétines

Chez l'homme, l'EG-VEGF est transcrit par le gène *prok1* composé de trois exons et localisé sur le chromosome 1 en 1p21 (Li et al. 2001 ; LeCouter et al. 2001 ; Kaser et al. 2003). A ce jour, aucun produit issu d'un épissage alternatif n'a été démontré. A l'inverse, le gène codant la PROK2 situé sur le chromosome 3 en 3p13, présente, quant à lui, quatre exons et produit par épissage alternatif deux protéines. La forme la plus active, PROK2, est dépourvue de l'exon 3 et se compose de 81 acides aminés alors que le variant, PROK2L, comporte tous les exons et comprend 102 acides aminés (Figure 27.). Les promoteurs du *prok2* et de son orthologue murin sont hautement conservés chez ces espèces ce qui suggère une régulation transcriptionnelle similaire. En revanche, la divergence des promoteurs du gène *prok1* et de son orthologue murin révèle une spécificité dans la régulation transcriptionnelle de ces deux gènes (Maldonado-Pérez et al. 2007 ; Bullock et al. 2004 ; LeCouter et al. 2003)

2.1.3. Les protéines des prokinétines

La protéine mature de l'EG-VEGF, constitutivement sécrétée, est composée de 86 acides aminés et présente une masse moléculaire relative de 8,6 kDa. Son ADN complémentaire (ADNc) code pour une protéine de 105 acides aminés dont un peptide signal de 19 acides aminés. Quant à PROK2, il est composé de 81 acides aminés tandis que la seconde forme, PROK2L, est pourvue de 102 acides aminés. L'EG-VEGF Humain/PROK1 et Bv8/PROK2 partagent 44% d'identité (Maldonado-Pérez et al. 2007) et présentent tous deux 10 cystéines formant 5 ponts disulfures. De manière intéressante, chez toutes les espèces, la région N-terminale présente une séquence hexa-peptidique complètement conservée,

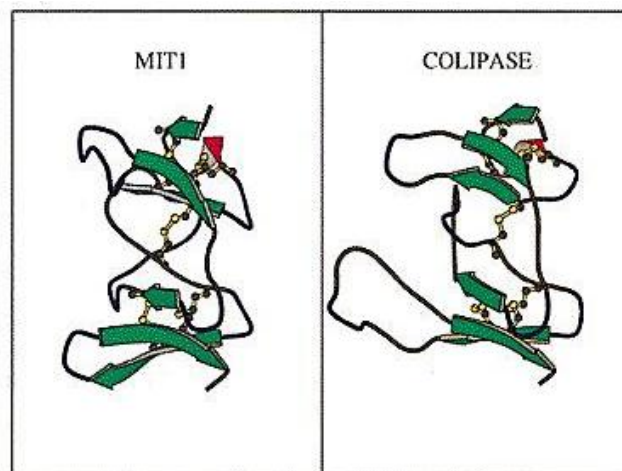


Figure 29: Structure secondaire de MIT-1 et de la colipase
(D'après Boisbouvier et al. 1998)

AVITGA, séquence d'acides aminés à l'origine du nom de cette famille de protéines ; « Famille AVIT » (Kaser et al. 2003) (Figure 28). Cette caractéristique est essentielle pour leurs activités biologiques et leurs liaisons aux récepteurs PROKR1 et PROKR2. Des substitutions, délétions ou encore des insertions dans cet hexapeptide N-terminal conduisent à la perte de l'activité agoniste. Ainsi, il a été montré que des mutations de cette séquence par une substitution de la première alanine « N-terminal » par une méthionine, par l'insertion d'une méthionine en aval de l'alanine N-terminale (Bullock et al. 2004) ou encore par une délétion des deux premiers acides aminés (Negri et al. 2005), inhibent l'activité des récepteurs aux prokinéticines. Ces mutants se comportent alors comme des antagonistes de ces récepteurs. Les régions centrales sont également conservées chez ces espèces.

Par ailleurs, un groupe de protéines présentant de forte homologie structurale et séquentielle avec MIT-1/Bv8/PROK et appartenant à la famille MIT-like atracotoxin (ACTX) a été identifié chez les invertébrés. Elles ont notamment été découvertes dans le venin des araignées *Hadronyche versuta* (Szeto et al. 2000 ; Wen et al. 2005), le système des allomones¹⁰ chez les cnidaires (Sher et al. 2005) et dans les hémocytes¹¹ de la crevette (Soderhall et al. 2005). Tous ces homologues sont dépourvus de six acides aminés dans leur région N-terminale, les rendant incapables d'activer les récepteurs des prokinéticines chez les mammifères. En 1998, l'analyse de la structure tridimensionnelle de MIT-1 par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) a mis en évidence que cette molécule présente de nombreuses ressemblances avec une protéine de l'appareil digestif, la colipase¹² (Boisbouvier et al. 1998) (Figure 29). En effet, toutes deux présentent une séquence peptidique comprenant dix cystéines à l'origine de la formation de cinq ponts disulfures. Ces ponts disulfures sont essentiels à l'activité, un mauvais repliement de protéines recombinantes ou des mutations dans les cystéines conduisant à des protéines incapables d'activer leurs récepteurs (Bullock et al. 2004). Néanmoins, bien que ces protéines présentent de fortes homologies structurales, leurs fonctions demeurent distinctes. Les prokinéticines ne peuvent stimuler l'activité des lipases pancréatiques (Boisbouvier et al. 1998 ; Kaser et al. 2003). A ce jour, aucune structure de l'EG-VEGF ainsi que de Bv8 n'a été proposée. Cependant, il est fort probable compte tenu de la séquence peptidique et de la répartition des cystéines, que leur structure soit proche de

¹⁰ Substance chimique, composée de neurotoxines, sécrétée par les anémones de mer et les hydres

¹¹ Cellules réalisant la phagocytose chez la crevette

¹² Polypeptide nécessaire à l'activité enzymatique de la lipase pancréatique

celle de MIT-1. Les prokinétines 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 prokinétines puissent être régulées par séquestration dans le compartiment extracellulaire *in vivo* (LeCouter et al. 2001). Enfin, il a été montré que les prokinétines régulent diverses fonctions biologiques incluant notamment la motilité du muscle lisse gastro-intestinal et l'angiogenèse, et que Bv8/PROK2 est associé au système nerveux, tandis que l'EG-VEGF/PROK1 est associé à l'appareil reproducteur et aux organes endocrines.

2.1.4. Les récepteurs des prokinétines

Trois équipes de recherche indépendantes identifiaient simultanément deux récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) et qui promeuvent la mobilisation de Ca^{2+} intracellulaire, comme étant les récepteurs des prokinétines chez les mammifères (Lin et al. 2002 ; Masuda et al. 2002 et Soga et al. 2002). Ces derniers s'avéraient proches structurellement des récepteurs des neuropeptides Y (NPY) mais ne répondaient à aucun neuropeptide connu (Parker et al. 2000). Dans un premier temps, ils furent nommés GPR73A et B, puis prokinétine récepteur 1 (PROKR1) et prokinétine récepteur 2 (PROKR2) respectivement par l'équipe de Zhou, en référence à leur forte identité (80%) avec un récepteur orphelin décrit chez la souris, le GPR73 (Lin et al. 2002). PROKR1 et PROKR2 partagent 85% d'homologie de leur séquence en acides aminés mais divergent au niveau de leur partie extracellulaire en N-terminale (Lin et al, 2002 et Masuda et al. 2002). En revanche, leurs domaines transmembranaires sont comparables suggérant que leur mécanisme d'activation est identique (Soga et al. 2002). PROKR1 est composé de 393 acides aminés tandis que PROKR2 est pourvu de 384 acides aminés (Soga et al. 2002). Chez l'homme, les gènes *prokr1* et *prokr2* comportant chacun deux exons, sont localisés sur deux chromosomes distincts, les chromosomes 2 en 2q14 et 20 en 20p13, respectivement. Cela indique que ces deux RCPG sont codés dans le génome humain par des gènes indépendants (Kaser et al. 2003 et Lin et al. 2002). Les diverses études du patron d'expression tissulaire de ces PROKRs ont montré des différences pour les deux récepteurs. En outre, ils répondraient de manière tissu-spécifique et de façon concentration-dépendante aux ligands PROK1 et PROK2 (Soga et al. 2002).

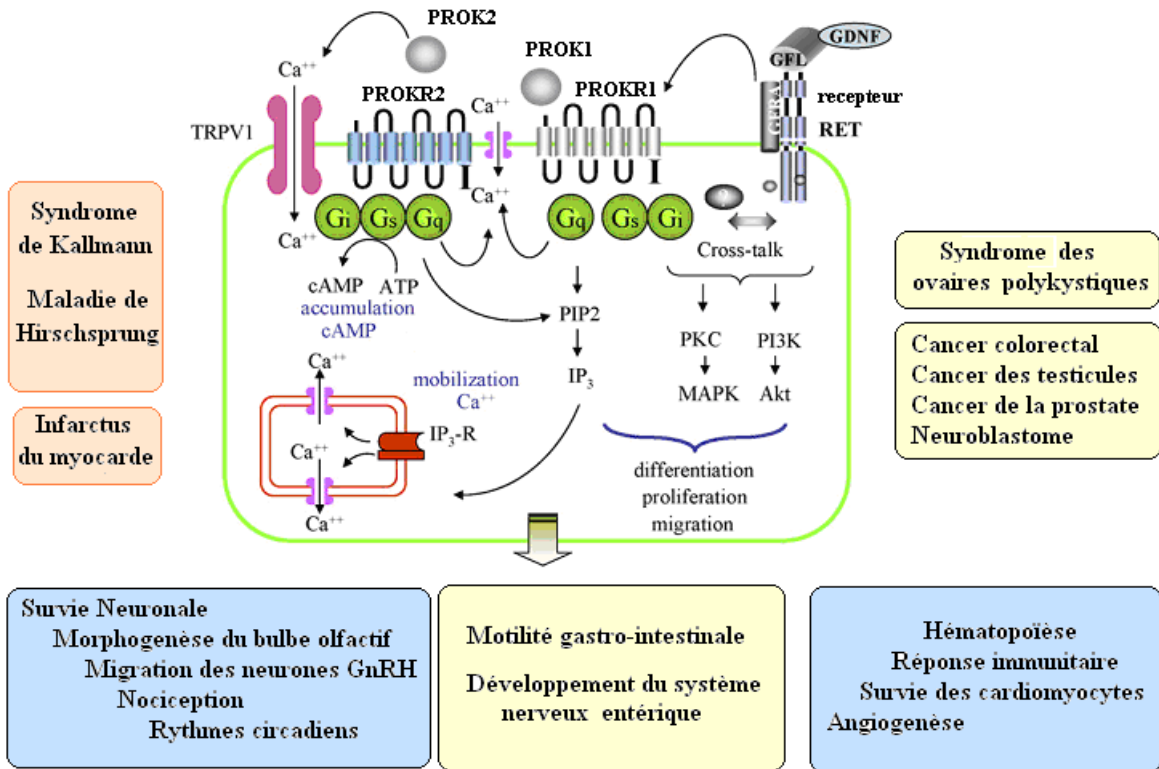


Figure 30: L'activation des PROKRs peut impliquer de nombreuses voies intracellulaires de signalisation.
(Schéma adapté de Ngan and Tam 2008)

2.1.4.1. Les voies de signalisation des prokinéticines

A noter également que les récepteurs recrutent les protéines G_i , G_q et G_s , indiquant qu'ils activent diverses cascades de signalisation intracellulaire (Figure 30). Dans les cellules endothéliales de capillaires du cortex surrénalien (ACE), la liaison des prokinéticines sur leurs récepteurs induit l'activation de la voie de signalisation PKC (Protein Kinase C)-MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) ou PI3K (Phosphoinositide 3 Kinase)-AKT (protéine kinase-B), et peut être inhibée par la toxine *pertussis*, suggérant que ces récepteurs se lient à la protéine G_i (Lin et al. 2002). Au contraire, l'activation des PROKRs dans les cellules CHO¹³ transfectées par les ADNc des PROKR1 et 2 induit la mobilisation de Ca^{2+} intracellulaire, sous-entendant que les récepteurs sont couplés à la protéine G_q (Lin et al. 2002 ; Soga et al. 2002). Enfin, les PROKRs activés dans les cellules HEK293¹⁴ augmentent l'accumulation d'AMPc (Cyclic Adenosine monophosphate), ce qui implique la liaison de la protéine G_s (Chen et al. 2005).

2.1.4.2. Affinités des prokinéticines pour leurs récepteurs

L'étude des IC_{50} ¹⁵ des prokinéticines pour leurs récepteurs révèle des affinités relativement comparables, néanmoins, quelques différences sont à relever. Ainsi, PROK2/Bv8 possède une plus forte affinité pour les PROKRs (IC_{50} de $4,5 \pm 0,8$ nM pour PROKR1 et de $6,4 \pm 1,3$ nM pour PROKR2), alors que PROK1/EG-VEGF montre une affinité plus modérée pour ces deux récepteurs (IC_{50} de $27,6 \pm 8,2$ nM pour PROKR1 et de $52,2 \pm 16,4$ nM pour PROKR2) (Maldonado-Pérez et al. 2007, Li et al. 2002 ; Soga et al. 2002). L'ordre de grandeur des affinités est conservé pour les deux prokinéticines et leurs récepteurs. Le paramètre qui influencera en grande partie la liaison de tel ligand sur tel récepteur sera la quantité de l'un ou de l'autre dans le tissu cible.

2.1.4.3. Les rôles spécifiques des récepteurs aux prokinéticines

Enfin, des rôles spécifiques de PROKR1 ou PROKR2 ont récemment été rapportés. Il a ainsi été décrit que PROKR1 serait spécifiquement impliqué dans des processus de prolifération, survie, migration et angiogenèse, tandis que PROKR2 augmenterait la perméabilité, la fenestration, et serait impliqué dans l'hypertrophie cellulaire (Brouillet et al. 2010 ; Guilini et al. 2009 ; Hoffmann et al. 2009 ; Urayama et al. 2007 et 2008). Les mécanismes intervenant dans ces effets distincts ne sont pas encore clairement définis.

¹³ Cellules dérivées de l'Ovaire d'Hamster Chinois

¹⁴ Cellules de rein d'embryon humain

¹⁵ Concentration d'un composé inhibant 50% de l'effet observé.

Cependant, ces différences de rôles confortent l'idée de l'importance de la distribution de ces protéines dans une cellule cible afin d'activer la bonne voie de signalisation induisant la fonction biologique requise. Différents patrons d'expression des prokinétines et de leurs récepteurs ont déjà été rapportés dans de nombreux tissus.

2.2 Régulations locales de l'expression des prokinétines

A ce jour, nos connaissances au sujet des régulations locales de l'expression du système PROK/PROKR sont limitées. Une caractérisation complète de leurs promoteurs pourrait permettre de déterminer des régulateurs potentiels de ce système. Le profil dynamique de l'expression de l'EG-VEGF/PROK1 et de ses récepteurs au cours de la grossesse suggère que leur expression est finement contrôlée dans le placenta. Différentes études ont permis d'identifier certains régulateurs de PROK1. Ainsi, dans le système reproducteur de la femme, les hormones stéroïdes (les œstrogènes et la progestérone), l'hCG (*human Chorionic Gonadotropin*) et le HIF-1 (*Hypoxia-Inductible Factor 1*) réguleraient son expression (Battersby et al. 2004 ; Ngan et al. 2006 ; Hoffmann et al. 2006 ; Maldonado-Pérez et al. 2007 ; Brouillet et al. 2012). Cependant, les mécanismes impliqués ne sont pas encore caractérisés.

2.2.1. Régulation par l'hypoxie

La teneur faible en oxygène est un paramètre clé dans le contrôle de l'expression de nombreux gènes au cours du 1^{er} trimestre de grossesse. Le niveau d'expression élevé de l'EG-VEGF et de PROKR1 pendant la période hypoxique de la placentation humaine (10 – 12 SA) suggère qu'ils pourraient être, eux aussi, régulés par l'hypoxie. L'analyse de la région promotrice des gènes *prok1* et *prok2* a mis en évidence la présence d'un élément de réponse fonctionnel à l'hypoxie, un site de liaison à l'HIF-1. Ainsi, lorsque les SW13 et H295R (lignées tumorales de surrénales) et P19 (cellules murines de carcinome embryonnaire) sont maintenues dans un environnement hypoxique, HIF-1 est capable de se lier au promoteur des prokinétines et d'induire leur expression (LeCouter et al. 2001 et 2003). Une expérience similaire a été réalisée sur des cytotrophoblastes isolés et a démontré le même résultat. La pression en oxygène est un régulateur de l'EG-VEGF mais aussi de PROKR1 (Hoffmann et al. 2006). L'équipe est allée plus loin et a cherché à déterminer la nature du mécanisme impliquée. Elle a étudié l'effet d'inhibiteurs de la transcription (DRB : 5,6-dichloro-1-bêta-D-ribofuranosylbenzimidazole) et de la traduction (cycloheximide) dans un environnement pauvre en oxygène sur l'expression de l'EG-VEGF et PROKR1, et a conclu que l'hypoxie régulerait

leur expression au niveau transcriptionnel dans un premier temps et, secondairement, au niveau de leur synthèse protéique (Hoffmann et al. 2006). L'ensemble de ces données souligne l'importance du rôle de l'EG-VEGF et de PROKR1 au cours du premier trimestre de grossesse, le maintien de leur expression pendant la période normoxique de la placentation humaine pourrait être associé aux pathologies de la grossesse. Dans cette idée, des études ont rapporté que chez des patientes pré-éclamptiques et dans les RCIU, l'expression et le taux circulant de l'EG-VEGF étaient augmentés au cours du 2^{ème} et 3^{ème} trimestre (Chung et al. 2004 ; Hoffmann et al. 2009 ; Brouillet et al. 2012).

2.2.2. Régulation par les stéroïdes

Les glandes endocrines sécrètent de nombreux stéroïdes. L'analyse du promoteur du gène *prok1* a révélé un site de liaison potentiel pour SF-1 (Steroidogenic factor-1), facteur transcriptionnel impliqué dans la différenciation stéroïdogénique. En outre, il a été montré que les hormones stéroïdes, telles que les œstrogènes et la progestérone, régulent positivement l'expression de PROK1 dans le système reproducteur (Battersby et al. 2004; Ngan et al. 2006).

2.2.3. Régulation par l'hCG

Le fait que l'expression de l'EG-VEGF ne soit pas maximale pendant toute la période hypoxique placentaire suggère une régulation éventuelle par d'autres facteurs. Or, l'expression de l'hCG (Hormone Chorionique Gonadotrope humaine) au cours de la grossesse présente un profil d'expression similaire à celui de l'EG-VEGF avec un pic à 8 SA, soit peu avant celui de l'EG-VEGF. Ceci suggère une régulation potentielle de l'EG-VEGF par l'hCG (Brouillet al. 2012). L'hCG, composée de deux sous-unités, α et β , est une glycoprotéine fortement glycosylée spécifique de la gestation humaine (Pierce and Parsons, 1981). Elle est indispensable au maintien de la grossesse, puisqu'elle stimule la production de progestérone par l'ovaire et participe au développement précoce du placenta en régulant la différenciation trophoblastique (Cronier et al. 1995 ; Shi et al. 1993) et l'invasion des cytotrophoblastes extravilloux. En effet, il a été décrit que l'hCG sécrétée par le CTEV invasif, stimule ce processus d'invasion (Handschuch et al. 2007). Des études ont montré également qu'elle intervenait dans l'angiogenèse placentaire en augmentant à la fois la sécrétion du facteur VEGF dans les trophoblastes en culture mais aussi la formation de nouveaux capillaires à partir de cellules endothéliales des micro-vaisseaux placentaires (Islami et al. 2003). Des travaux menés chez le babouin ont décrit que l'hCG augmentait l'ARNm de l'EG-VEGF *in*

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 interstitiel	Cellules endothéliales du tissu interstitiel	(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 atrélique, 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 extravilloux, 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 hémato-poïétiques, monocytes, neutrophiles, cellules dendritiques	Cellules souches hémato-poïétiques, cellules sanguines matures dont lymphocytes	Cellules souches hémato-poïétiques, 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)

Figure 31 : Localisation des PROKs et des PROKRs

vivo (Evans et al. 2009). Des recherches qui furent également réalisées dans les cellules épithéliales endométriales humaines et dans la décidue du 1^{er} trimestre, aboutirent aux mêmes conclusions (Evans et al. 2009). Ces résultats 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 l'EG-VEGF. Il a d'ailleurs été décrit que l'EG-VEGF serait un biomarqueur de la réceptivité de l'endomètre (Haouzi et al. 2009). Il a également été rapporté que l'hCG augmentait *in vitro* l'expression en ARNm de PROK1 dans les cellules de la granulosa et du corps jaune au sein de l'ovaire (Fraser et al. 2005). Dans le but de déterminer l'effet de l'hCG sur l'expression de l'EG-VEGF et de ses récepteurs, PROKR1 et PROKR2, dans le placenta au cours du 1^{er} trimestre de grossesse, deux systèmes physiologiques ont été utilisés des cultures d'explants placentaires, entre 6 et 11 SA, ainsi que des cultures primaires de trophoblastes. Dans un premier temps, il a été montré que le récepteur de l'hCG, LH/CGR, est exprimé dans le ST ainsi que les CT. Brouillet et al. ont décrit une nouvelle régulation physiologique dans laquelle l'hCG, synthétisée par le ST, agirait de manière autocrine sur ces mêmes cellules afin d'augmenter l'expression en ARNm et en protéines de l'EG-VEGF et de PROKR2 (préférentiellement exprimés dans le ST), de manière dose-dépendante et temps-dépendant. L'hCG agirait également de manière paracrine sur les CT pour stimuler l'expression de PROKR1. L'effet de cette hormone de grossesse serait à la fois transcriptionnel et post-transcriptionnel et impliquerait l'AMPc (Brouillet et al. 2012). Ces résultats mettent en lumière l'hCG comme un nouveau régulateur de l'EG-VEGF et de ses récepteurs au cours du développement placentaire.

2.3 Expression de l'EG-VEGF/PROK1 et de ses récepteurs dans le placenta

L'expression de l'EG-VEGF au sein du placenta a été rapportée pour la première fois par l'équipe de Ferrara en 2001 (LeCouter et al. 2001), d'autres groupes approfondirent l'étude par la suite (Burton et al. 2003 ; Denison et al 2009 ; Haouzi et al. 2009, Lee et al. 2009). L'essentiel des données relatant son expression, sa régulation et son rôle dans le placenta au cours de la grossesse ainsi que de ses récepteurs fut décrit par notre laboratoire.

2.3.1. Expression de l'EG-VEGF et de ses récepteurs dans le placenta humain

2.3.1.1. Le taux de l'EG-VEGF circulant au cours de la grossesse

Une expression dynamique de l'EG-VEGF a été rapportée dans le sérum de femme enceinte. Le laboratoire a comparé le profil d'expression sérique de l'EG-VEGF chez la femme enceinte pendant les trois trimestres avec la femme non enceinte (Figure 32). Chez

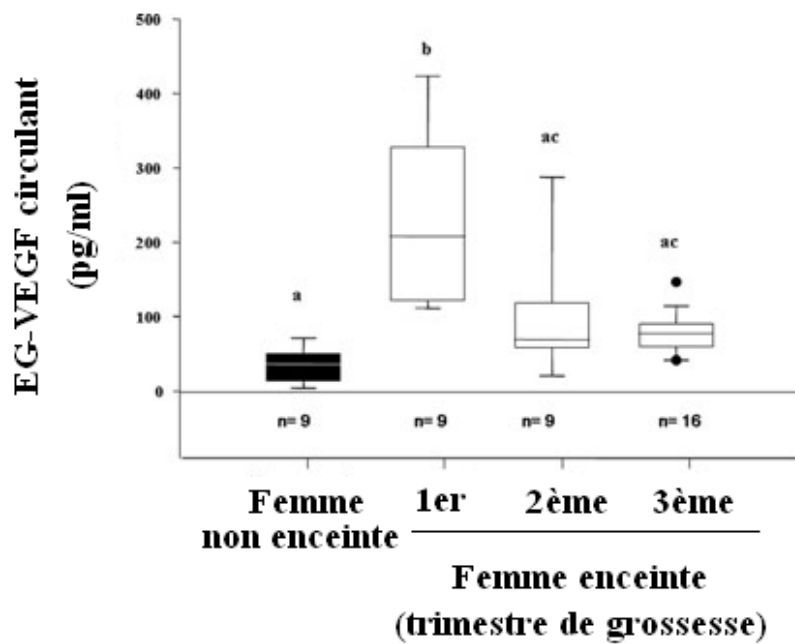


Figure 32: Profil d'expression sérique d'EG-VEGF au cours de la grossesse.

(Figure adaptée de Hoffmann et al. 2009)

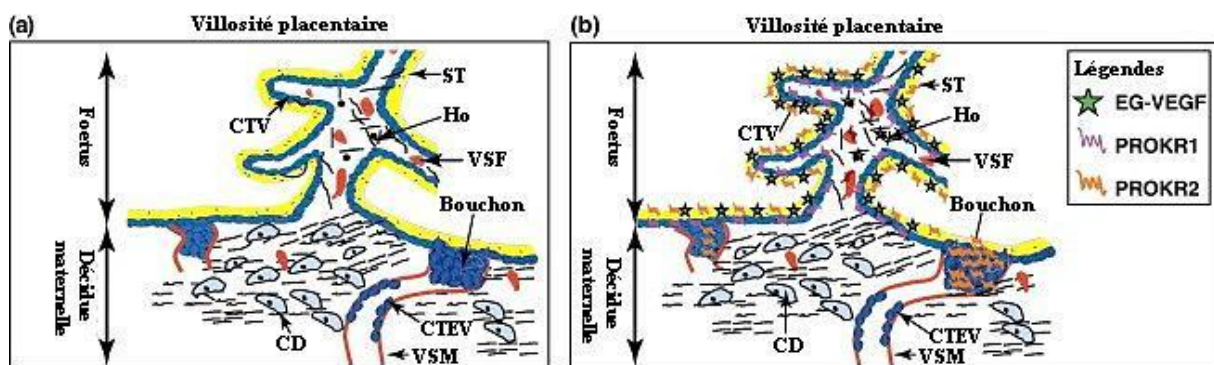


Figure 33: Localisation de l'EG-VEGF et de ses récepteurs dans le placenta au cours du premier trimestre de grossesse.

a) Schéma représentant la villosité placentaire et les différents types cellulaires. b) Schéma de la villosité placentaire et de la localisation de l'EG-VEGF et de ses récepteurs, PROKR1 et PROKR2. EG-VEGF est principalement exprimé dans le syncytiotrophoblaste (ST). PROKR1 est présent dans le CTV et PROKR2 est localisé dans le ST, le cytotrophoblaste extravilloux (CTEV) et les cellules endothéliales. CD : cellules déciduales ; VSF : vaisseau sanguin foetal ; Ho : cellules de Hofbauer ; VSM : vaisseau sanguin maternel ; bouchon : agrégats de cellules trophoblastiques. (D'après Brouillet et al. 2012)

cette dernière, le niveau plasmatique de l'EG-VEGF avoisine les 50 pg/mL, alors qu'au cours du 1^{er} trimestre, il est cinq fois plus élevé, environ 250 pg/mL. Le taux circulant de l'EG-VEGF décroît ensuite progressivement jusqu'à atteindre vers la fin de la période gestationnelle, un niveau plus proche de celui de la femme non enceinte, 70 pg/ml en moyenne (Hoffmann et al. 2009). Cette élévation du taux sérique de l'EG-VEGF semble supposer que le placenta pourrait être la principale source de cette cytokine. La production de l'EG-VEGF par le placenta a été confirmée dans les milieux conditionnés de cultures *ex vivo* d'explants placentaires (Hoffmann et al. 2007 et Brouillet et al. 2010). Néanmoins, d'autres études ont montré que le placenta pourrait ne pas être la seule source de l'EG-VEGF circulant, spécifiquement au début de la grossesse. En effet, l'EG-VEGF semble hautement exprimé dans les cellules dérivant de la granulosa du corps jaune (*corpus luteum*) pendant la phase lutéale du cycle (Fraser et al. 2005). Des études préliminaires au sein de l'équipe semblent confirmer ce constat.

2.3.1.2. Expression placentaire de l'EG-VEGF et de ses récepteur au cours du 1er trimestre de grossesse

La présence de l'EG-VEGF dans le placenta et sa régulation par l'hypoxie, suscita l'intérêt de notre laboratoire pour déterminer le patron d'expression de l'EG-VEGF, de son analogue PROK2 et de leurs récepteurs dans le placenta humain au cours de la grossesse. Ainsi, l'étude du patron d'expression a montré que ce facteur est exprimé de manière dynamique au cours du premier trimestre de grossesse. L'EG-VEGF est présent dès la 6^{ème} SA dans le tissu endocriné du placenta, le syncytiotrophoblaste (ST). Son expression est restreinte au ST jusqu'à la 8^{ème} SA, puis à des âges gestationnels plus avancés (9 – 12 SA), il est localisé dans le ST, les cellules de Hofbauer et les CTV (Hoffmann et al. 2006). Son expression n'a jamais été montrée dans les CTEV. Ses deux récepteurs, PROKR1 et PROKR2 sont, eux aussi, exprimés dans le placenta, mais avec une distribution et en proportion différentes. PROKR1 est principalement présent dans les CTV, tandis que PROKR2 est localisé dans le ST, les CTEV et les cellules endothéliales microvasculaires placentaires (Hoffmann et al. 2006 et 2009) (Figure 33). Quant à l'ARNm de PROKR1, il s'avère 80 fois plus abondant que celui de PROKR2 dans les trophoblastes en culture primaire. Cette dissemblance d'expression des PROKRs au sein des différents types cellulaires suggère la possibilité d'effets distincts de l'EG-VEGF sur ces cellules. Le profil d'expression de l'EG-VEGF et de PROKR1 sont relativement proches et présentent un pic d'expression en ARNm et en protéines peu de temps avant l'établissement de la circulation fœto-maternelle, entre 10

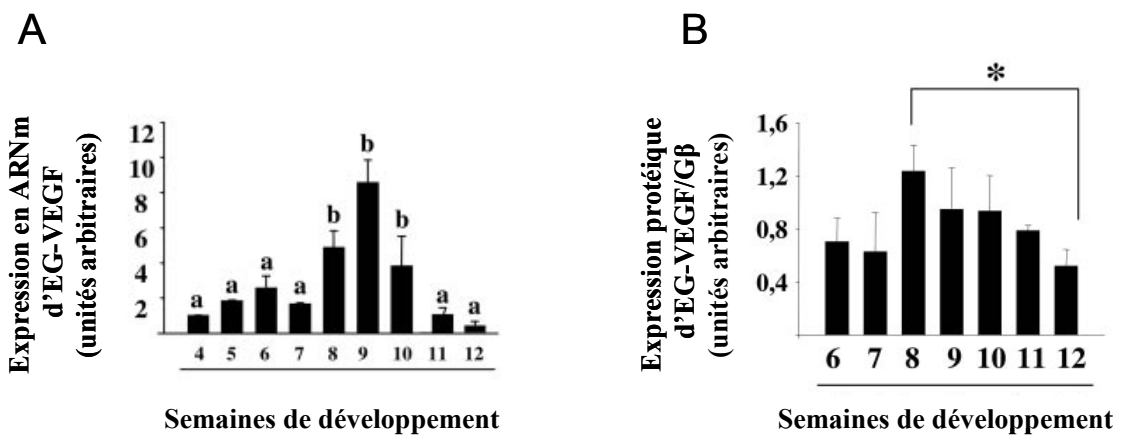


Figure 34: Expression d'EG-VEGF en ARNm et protéine au premier trimestre de grossesse (a et b sont significativement différents). Les âges gestationnels sont en semaines de développement (il faut ajouter 2 semaines pour avoir les âges en semaines d'aménorrhée). (Figures adaptées de Hoffmann et al. 2006).

et 12 SA, avant de décroître drastiquement (Hoffmann et al. 2006) (Figure 34). Ce profil est en accord avec la modification de la pression en oxygène au sein du placenta après la 12^{ème} SA. En effet, au-delà de ce stade, les bouchons trophoblastiques qui obstruaient les artères spiralées utérines, se désagrègent progressivement, laissant entrer le sang maternelle dans la chambre intervillieuse et ainsi augmenter la teneur en oxygène. Quant à PROKR2, son profil d'expression est plus stable au 1^{er} trimestre. En outre, PROKR2 n'est pas détecté dans le placenta humain avant 8 SA. Son expression en ARNm et en protéines est très faible et perdure seulement jusqu'à 10 SA (Hoffmann et al. 2006).

2.3.1.3. Expression de l'EG-VEGF et de ses récepteurs au 3ème trimestre de grossesse

En raison des difficultés à obtenir du tissu placentaire sain au 2^{ème} trimestre, la majorité des données traitant de l'EG-VEGF et de ses récepteurs au-delà du 1^{er} trimestre, provient de tissus du 3^{ème} trimestre issus de césarienne. Ainsi, il a été montré que l'EG-VEGF et ses récepteurs sont localisés dans le ST, les cytotrophoblastes, l'endothélium fœtal et les macrophages (Brouillet et al. 2010, Denison et al. 2008).

2.3.2. Expression de l'EG-VEGF et de ses récepteurs dans le placenta murin

Dans le but de pouvoir disposer d'un modèle animal et compte tenu des grandes similitudes entre la placentation humaine et murine, l'expression de l'EG-VEGF et de ses récepteurs a été étudiée tout au long de la gestation murine (Hoffmann et al. 2007). Des résultats comparables avec ceux obtenus chez l'humain ont été retrouvés. L'EG-VEGF est principalement localisé dans le labyrinthe correspondant au placenta hémochorial de la femme. A l'image de l'homme, une diminution de l'expression protéique et en ARNm de cette cytokine est observée chez la souris. Ce phénomène précède l'augmentation de la teneur en oxygène au sein du labyrinthe soit autour de 10,5 jpc. En outre, le patron d'expression et la localisation de PROKR1 ainsi que de PROKR2 diffèrent. PROKR1 est exprimé dans le labyrinthe et présente le même profil d'expression que l'EG-VEGF. En revanche, l'expression de PROKR2 est maintenue au-delà de 10,5 jpc et celui-ci est localisé dans les cellules trophoblastiques mais aussi endothéliales du placenta murin. Cela suggère, comme chez l'humain, un rôle angiogène de l'EG-VEGF dans le développement placentaire qui passerait par le récepteur PROKR2 (Hoffmann et al. 2007).

2.4 Fonctions des prokinéticines

La distribution tissulaire variée, la diversité des protéines G recrutées et la régulation différentielle des prokinéticines suggèrent une implication de ces facteurs dans une multitude de fonctions *in vivo*. En effet, initialement identifiés en tant que stimulateur de la motilité gastro-intestinale (Li et al. 2001), les prokinéticines ont été montrées comme associées à de multiples fonctions biologiques au sein de l'organisme, telles que l'angiogenèse (LeCouter et al. 2001 et 2003), la sensibilité à la douleur (Hu et al. 2006 ; Negri et al. 2002 et 2006), le rythme circadien (Cheng et al. 2002, Li et al. 2006 ; Prosser et al. 2007), le développement du système olfactif périphérique (Matsumoto et al. 2006), 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 et Ngan et al. 2006), la reproduction (Maldonado-Pérez et al. 2007), l'angiogenèse (LeCouter et al. 2001 et 2003) ainsi que la placentation (Brouillet et al. 2010 et 2012, Hoffmann et al. 2006, 2007 et 2009). Les gènes codant pour les prokinéticines ont des sites d'expression différents. Les transcrits de *prok1* abondent dans les ovaires et le placenta alors que ceux de *prok2* sont localisés majoritairement dans les testicules et le système nerveux (Maldonado-Pérez et al. 2007). Le fait que PROK2 soit indétectable dans les organes reproducteurs féminins (Ferrara et al. 2004 ; Fraser et al. 2005) et dans le placenta (Brouillet et al. 2012 ; Hoffmann et al. 2009) confère à l'EG-VEGF la place de prokinéticine majeure de ces organes. Des données grandissantes de la littérature placent le système EG-VEGF/PROKRs au centre de la fonction reproductive chez la femme et, plus particulièrement, au cœur des régulations entre l'embryon et l'endomètre. Dans la suite de ce manuscrit, seuls les rôles de l'EG-VEGF dans la placentation et l'hématopoïèse placentaire seront explicités.

2.4.1. Prokinéticines et hématopoïèse

De récentes études ont démontré que les placentas humains et murins constituent des niches, mais aussi des sites de génération des cellules souches hématopoïétiques (Rhodes et al. ; 2008 ; Robien et al. 2009). LeCouter et al. ont montré que les prokinéticines (l'EG-VEGF et Bv8) jouent un rôle direct dans la différenciation hématopoïétique au niveau de la moelle osseuse. PROK2/Bv8 est exprimé dans les cellules sanguines, en particulier les monocytes, les neutrophiles, et les cellules dendritiques (LeCouter et al. 2004). Il est également présent dans les neutrophiles localisés sur le site d'inflammation et peut stimuler la migration des

monocytes (LeCouter et al. 2004) tandis que PROK1 est exprimée dans les lymphocytes B et T, ainsi que dans les tissus enflammés (Dorsh et al. 2005). Quant à leurs récepteurs, ils ont également été détectés dans les cellules souches hématopoïétiques (CSH) et dans certaines cellules sanguines matures, telles que les lymphocytes (LeCouter et al. 2004). En outre, les deux prokinétines semblent augmenter le nombre de colonies de granulocytes et de monocytes formées lors de culture de CSHs et favoriser leur survie ainsi que leur différenciation (Dorsh et al. 2005 ; LeCouter et al. 2004). Cependant, à ce jour, il existe très peu de données concernant les régulateurs potentiels d'une différenciation vers des cellules endothéliales et/ou hématopoïétiques dans le placenta. En raison de l'expression importante de l'EG-VEGF au cours du premier trimestre, d'une activité hématopoïétique du placenta murin précédant le pic d'expression de l'EG-VEGF, mais aussi de ses effets sur la différenciation des cellules hématopoïétiques au niveau de la moelle osseuse et de son rôle pro-angiogène au sein de la villosité placentaire, il était légitime de supposer que ce facteur pourrait jouer un rôle dans la différenciation hémangioblastique placentaire humaine et murine. Ceci constitue l'un de mes projets de thèse.

2.4.2. Le rôle de l'EG-VEGF dans le contrôle de l'invasion trophoblastique

Le développement embryonnaire précoce se déroule dans un environnement hypoxique afin de protéger le développement des organes contre les effets néfastes des espèces radicalaires, puisqu'à cet âge développemental, l'embryon n'exprime que faiblement les enzymes anti-oxydantes (Jauniaux et al. 2000). La stratégie de défense mise en place est l'apparition de bouchons trophoblastiques, qui obstruent la lumière des artères spiralées utérines maternelles, empêchant ainsi l'entrée d'éléments figurés dans la chambre intervillieuse. La formation de ces bouchons résulte de la prolifération de cytotrophoblastes extravillieux (CTEV) à la base de la villosité crampon. Vers 10 – 12 SA, ces CTEV envahissent la décidue et la paroi des artères spiralées utérines afin d'établir la circulation fœto-maternelle. Ce phénomène est concomitant avec la disparition progressive des bouchons trophoblastiques (Jauniaux et al. 2000 et 2001). Cette invasion profonde dans la paroi utérine est un événement crucial et finement contrôlé. Des dysfonctionnements de ce phénomène sont corrélés avec le développement de pathologies de la grossesse. Une faible invasion des vaisseaux maternels est associée à la pré-éclampsie et/ou au retard de croissance intra-utérin (Sibai et al. 2005) tandis qu'une invasion trophoblastique excessive est liée aux môles invasives, au placenta accreta et au choriocarcinome (Saley et al. 2007). De nombreux facteurs de croissance ont été rapportés comme régulant positivement la prolifération, la

différenciation ainsi que l'invasion des cellules trophoblastiques, mais peu de données mentionnent l'existence de régulateurs négatifs de la différenciation trophoblastique. En revanche, il a été montré que PPAR γ inhibait l'invasion trophoblastique (Tarrade et al. 2001), de même que TGF- β , au travers de la stimulation d'inhibiteurs de la sécrétion des métalloprotéases (MMPs) (Graham et al. 1993). Dans la physiologie placentaire les MMPs sont indispensables au remodelage de la matrice extracellulaire *in vivo*. En raison de l'expression majoritaire de PROKR2 dans les CTEV, de la baisse de l'expression de l'EG-VEGF au niveau local et au niveau circulant qui coïncide avec le début de l'invasion trophoblastique, de sa régulation par des éléments clés du développement placentaire (l'oxygène et l'hCG), l'EG-VEGF apparaît comme un candidat potentiel dans le contrôle de la prolifération et de l'invasion trophoblastique. Ainsi, il a été montré que l'EG-VEGF était responsable du contrôle de la migration, de l'invasion et de l'organisation en réseaux pseudo-vasculaires des CETV au cours du 1^{er} trimestre de la grossesse (Hoffmann et al. 2006 et 2009). L'effet inhibiteur de l'EG-VEGF sur la migration et l'organisation fut totalement aboli par l'utilisation d'ARN interférant PROKR2, indiquant son implication dans la médiation de ces effets. Des études complémentaires ont également montré que l'EG-VEGF induisait la diminution de la production de MMP2 et MMP9 par les trophoblastes extravilloux et les explants placentaires (Hoffmann et al. 2009), métalloprotéinases qui sont importantes pour le remodelage de la matrice extracellulaire (Bischof et al. 1998 et Fisher et al. 1985). L'ensemble de ces résultats suggère que l'EG-VEGF est impliqué dans le contrôle de l'invasion trophoblastique en inhibant leur migration au cours du 1^{er} trimestre de la grossesse. Par ses effets sur le contrôle de l'invasion, l'EG-VEGF semble protéger la villosité placentaire d'un remodelage anticipé des artères spiralées maternelles et, par conséquent, d'une oxygénation trop précoce, qui induirait un stress oxydatif important. Au-delà de 10 SA, la baisse physiologique de l'EG-VEGF entraînerait la levée de cette inhibition, permettant ainsi aux CTEV d'envahir la décidue maternelle. L'élargissement des artères spiralées et l'insensibilité de leur paroi aux éléments vaso-actifs permettraient alors l'oxygénation optimale de la chambre intervillieuse, et le déroulement correct de la grossesse au 2^{ème} et 3^{ème} trimestre.

2.4.3. Le rôle de l'EG-VEGF dans l'angiogenèse placentaire

Au cours de cette dernière décennie, de nombreuses études ont souligné le rôle angiogénique de l'EG-VEGF dans les organes endocrines tels que les testicules et les ovaires (LeCouter et al. 2003). LeCouter et al. ont également rapporté qu'il n'intervenait pas dans

l'activation des HUVEC, cellules endothéliales dérivées de la veine ombilicale humaine, mais aucune donnée concernant le potentiel angiogénique de l'EG-VEGF sur les cellules endothéliales du placenta n'avait été relevée. Or, le placenta est un organe fortement vascularisé, son réseau vasculaire avoisine, à terme, les 500 km (Burton and Jauniaux 1995). Il est, par conséquent, un site privilégié d'expressions de facteurs angiogéniques dont l'EG-VEGF et ses récepteurs. En outre, le taux sérique de l'EG-VEGF est maximal au 1^{er} trimestre de grossesse, période où l'angiogenèse placentaire est fortement activée, et son pic d'expression a lieu peu avant l'établissement de la circulation fœto-maternelle. A la lumière de l'ensemble de ces données, notre laboratoire a comparé les effets de l'EG-VEGF sur les cellules endothéliales placentaires micro-vasculaires (HPEC) et macro-vasculaires (HUVEC). D'après les connaissances antérieures, il est établi que les HPEC couvrant les capillaires fœtaux de la villosité choriale et assurant les échanges fœtaux- maternelles, sont les plus soumises à l'influence d'un pro-angiogène par rapport aux HUVEC, situées dans le cordon ombilical. Les résultats ont clairement établi que l'EG-VEGF stimule de nombreux processus angiogéniques dont la prolifération endothéliale, la survie, la migration, l'organisation tubulaire, la perméabilité ainsi que le transport paracellulaire (Brouillet al. 2010). De manière intéressante, l'ensemble de ces effets a uniquement été observé chez les HPEC. Sur les HUVEC, l'équipe a confirmé les résultats rapportés par LeCouter et al. en montrant l'absence d'effet sur leur prolifération mais elle a également démontré que l'EG-VEGF n'avait aucune influence sur leur migration, leur invasion et leur organisation tubulaire (Brouillet et al. 2010). En outre, il existerait une expression différentielle des récepteurs PROKR1 et PROKR2 entre les deux types cellulaires. En effet, les HPEC expriment les deux récepteurs tandis que les HUVEC expriment seulement PROKR1. Enfin, il fut également relevé, que les effets orchestrés par l'EG-VEGF sur les HPEC étaient attribués à l'un ou l'autre des récepteurs. Par l'intermédiaire de PROKR1, l'EG-VEGF induit la prolifération et la migration alors que via l'activation de PROKR2, l'EG-VEGF augmente la perméabilité des HPEC (Brouillet et al. 2010). Ces effets différentiels ont aussi été retrouvés au niveau des cellules cardiaques (Urayama et al. 2007 et 2008). Par conséquent, l'ensemble de ces résultats démontre que ce facteur est directement impliqué dans l'angiogenèse placentaire, un processus essentiel à la croissance placentaire et aux échanges fœto-maternels.

III. Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ (PPAR γ)

3.1 Généralités sur les PPAR γ

Les récepteurs activés par les activateurs de la prolifération des peroxysomes (Peroxisome proliferators-activated receptors : PPARs) sont des facteurs de transcription appartenant au groupe de récepteurs nucléaires NR1C, mais aussi à la super-famille des récepteurs nucléaires aux hormones incluant les récepteurs de l'acide rétinoïque (RAR) et de l'acide 9-cis-rétinoïque (RXR), des hormones stéroïdiennes (progestérone PGR, androgènes AR, œstrogènes ER, glucocorticoïdes GR, minéralocorticoïdes MR) des hormones thyroïdiennes (THR), de la vitamine D3 (VDR), des acides biliaires (FXR), de l'ecdysone (EcR), des oxystérols (LXR) ainsi que des récepteurs orphelins dont les ligands ne sont pas encore connus tels que COUP-TF, HNF-4 (Hépatocyte Nuclear Factor 4 et ERR (Estrogen Related Receptor) (Laudet et al. 1992). Découverts en 1990, les PPARs ont, dans un premier temps été décrits comme le récepteur des fibrates, une classe de médicaments hypolipémiant¹⁶ utilisés chez l'homme depuis les années 1960 (Chinetti-Gbaguidi et al. 2005). Leur nom fut initialement choisi en référence à leur capacité à induire la prolifération des peroxysomes chez les rongeurs (Issemann and Green 1990), mais depuis lors, de nombreuses fonctions leurs sont associées. Outre leur rôle de sensibilisateur à l'action de l'insuline, ils interviennent dans le contrôle de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique et dans de nombreux processus cellulaires tels que la prolifération, l'inflammation ou encore l'apoptose (Ricote and Glass, 2007 ; Scher et al. 2005 ; Lim et al. 2006). Ils deviennent rapidement la cible thérapeutique dans le diabète, le syndrome métabolique, l'athérosclérose et le cancer. Ces facteurs de transcription ont été identifiés dans de nombreuses espèces telles que le xénope, la souris, le rat et l'humain. Chez chacune d'entre elles, les PPARs sont présents sous trois isotopes, issus de trois gènes distincts. Ils sont couramment désignés sous les noms de PPAR α , PPAR β ou δ et PPAR γ . Ces protéines présentent un profil de distribution tissulaire distinct, mais une organisation structurale commune à tous les autres récepteurs nucléaires. Leurs séquences des domaines de liaisons à l'ADN sont très conservées entre les trois sous-types, en revanche, celles des sites de liaison aux ligands diffèrent, suggérant des caractéristiques pharmacologiques distinctes pour chaque sous-type. Cette notion est renforcée par le fait que chaque isotype présente une distribution tissulaire variée et des spécialités fonctionnelles différentes malgré leurs fortes homologues de séquence.

¹⁶ Médicaments destinés à normaliser les taux de lipides sanguins

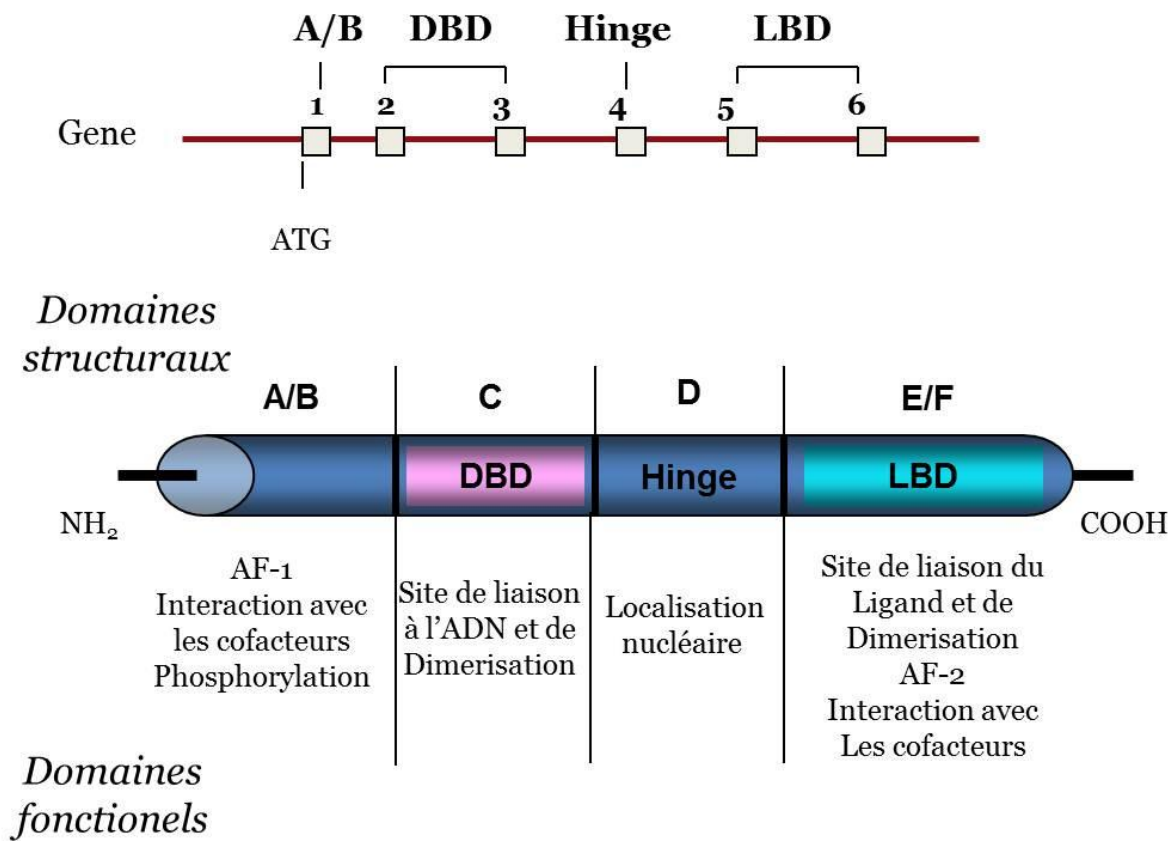


Figure 35: Schéma de la structure de PPAR γ

A. Organisation du gène humain de PPAR γ . B. Fonction des domaines de PPAR γ
(Schéma adapté de Fournier et al. 2006)

3.2 Structures des PPARs

Les gènes de PPAR α , PPAR γ et PPAR δ/β sont localisés chez l'homme respectivement au niveau des chromosomes 22, 6 et 3. Quatre isoformes γ se distinguent ; PPAR γ 1, γ 2, γ 3 et γ 4. Ils dérivent du même gène mais qui a subi un épissage alternatif sous le contrôle de différents promoteurs. Les ARNm de PPAR γ 1, γ 3 et γ 4 sont traduits en une protéine identique, PPAR γ 1, de 49 kDa. Quant à PPAR γ 2, il s'agit d'une protéine de 56 kDa qui possède 30 acides aminés supplémentaires dans sa partie N-terminal (Fajas et al. 1997). PPAR α , PPAR δ/β et PPAR γ 1 et γ 2 sont des protéines de, respectivement, 468, 441, 475 et 505 acides aminés (Fournier et al. 2007). L'analyse de l'alignement de leurs séquences nucléotidiques et protéiques dans différentes espèces a révélé une forte homologie, illustrant l'étroite conservation de ces facteurs au cours de l'évolution et l'existence d'un ancêtre commun (Fajas et al.1997 ; Zhu et al. 1995 ; Krey et al. 1993 et Gearing et al. 1994). PPAR γ présente cependant le plus haut degré de conservation. La structure générale des gènes des PPARs s'articule autour de 6 exons codant pour des protéines à plusieurs domaines structurels et fonctionnels, plus ou moins indépendants les uns des autres. Quatre domaines principaux résultent du codage de ces six exons (figure 35.).

- La **région A/B** en N-terminal ou AF-1 correspond au domaine de transactivation indépendant du ligand et au site de liaison des cofacteurs. Site le moins conservé, il est aussi le siège de phosphorylations qui réguleront l'activité du récepteur,
- la **région C**, hautement conservée, également nommée DBD (*DNA Binding Domain*) forme le domaine de fixation à l'ADN. Il est responsable de la reconnaissance de la séquence nucléotidique PPRE (*PPAR Response Element*) située au niveau des promoteurs des gènes ciblés. Celui-ci est constitué d'un double motif hexanucléotidique AGGTCA espacé par une nucléotide, DR1 (Kliewer et al. 1992) et précédé d'une extension en 5' –A(A/T)CT. De plus, il intervient dans la dimérisation des récepteurs nucléaires (PPAR γ /RXR) (Ijpenberg et al. 1997),
- la **région D**, dite charnière entre le DBD et le domaine de liaison au ligand (LBD), est également très conservée parmi les récepteurs nucléaires et est impliquée dans la localisation nucléaire (Gervois et al. 1999). Récemment, il a été montré que ce domaine pouvait interagir avec des protéines régulatrices (Gray et al. 2006) et contenait des sites de phosphorylation (Gray et al. 2005),
- Enfin, la **région E/F** en C-terminal correspond au site LBD. Elle contient une large poche hydrophobe et permet d'accueillir un grand nombre de ligands lipophiles.

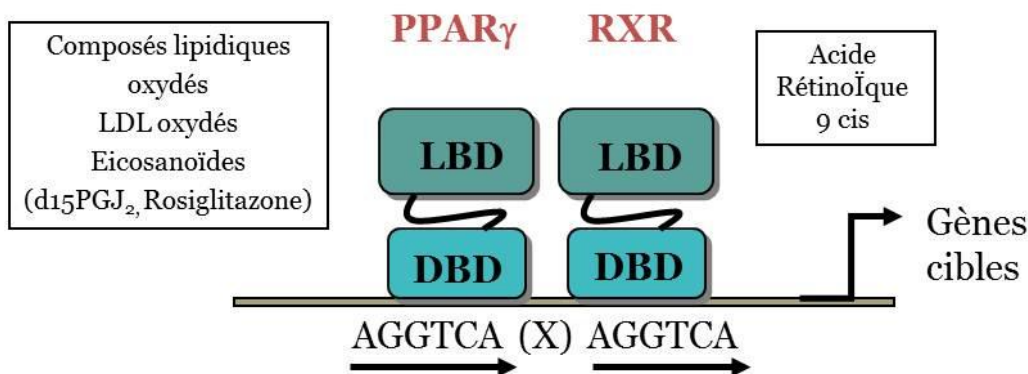


Figure 36: Schéma de la fixation de l'hétérodimère PPAR γ /RXR α sur l'élément de réponse PPRE

(Figure adaptée de Fournier et al.2006)

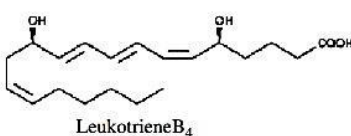
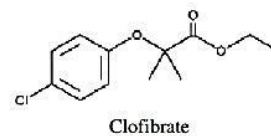
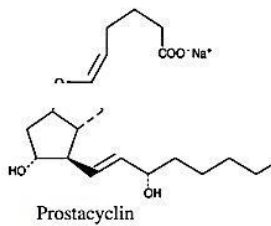
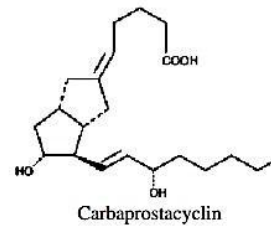
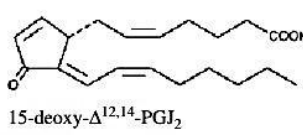
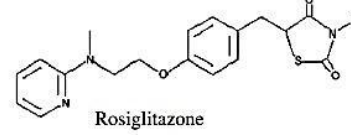
Récepteur	Ligands naturels	Ligands synthétiques	
PPAR α	Arachidonic acid Eicosapentaenoic Linoleic acid Linolenic acid Palmitic acid Stearic acid 8(S)-HETE Leukotriene B ₄		
PPAR β/δ	Arachidonic acid Eicosapentaenoic Linoleic acid Linolenic acid Palmitic acid Stearic acid Prostacyclin		
PPAR γ	Arachidonic acid Eicosapentaenoic Linoleic acid Linolenic acid 15-HETE 9-HODE, 13-HODE 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ ₂ azPC		

Figure 37: Les ligands des PPARs

(D'après Fournier et al. 2006)

Elle forme également le domaine de régulation de la transcription dépendant du ligand appelé AF-2. Cette région intervient aussi dans la dimérisation des récepteurs et interagit avec RXR. (Mangelsdorf et al. 1995).

Par ailleurs, l'activation et la fixation de PPAR γ sur l'ADN via son domaine DBD requiert obligatoirement l'hétérodimérisation avec le récepteur de l'acide rétinoïque 9 cis (RXR α) et la liaison du ligand PPAR γ . Lors de leur fixation au niveau du PPRE, en amont des gènes cibles, PPAR γ est toujours localisé sur l'héxanucléotide en 5' de celui de RXR α (Figure 36). Des régulations post-traductionnelles conduisant à une sumoylation et à une phosphorylation de PPAR γ ont également été décrites (Camp et al. 1999).

3.3 Les ligands des PPARs

Les ligands de ces facteurs transcriptionnels, produits en majorité au niveau de l'utérus pendant la grossesse, sont de petites molécules lipophiles comme les acides gras à chaîne moyenne et longue et les éicosanoïdes. Certains acides gras polyinsaturés à longue chaîne, dont l'acide linoléique, l'acide linoléique et l'acide arachidonique, ont été décrits comme se liant aux trois isotypes. Cependant, les lipides oxydés naturels constituent les ligands privilégiés des PPARs. Les éicosanoïdes comme l'acide 8(s)-hydroxy-eicosatetraénoïque (HETE) et le leukotriène B₄ forment les ligands du PPAR α (Kliewer et al. 1997 ; Devchand et al. 1996) alors que le prostacycline est un ligand de PPAR β/δ (Gupta et al. 2000). Quant au 15-Deoxy-delta (12,14) prostaglandin J₂ (15 Δ -PGJ₂), métabolite provenant de la prostaglandine D₂, il est considéré comme l'agoniste naturel le plus puissant de PPAR γ (Forman et al. 1995 ; Kliewer et al. 1997). Les métabolites oxydés de l'acide linoléique, plus particulièrement les acides 9- et 13-hydroxy-octadécadiéniques (HODE) retrouvés dans les LDL (low-density lipoprotein) oxydées, ont été identifiés comme des ligands spécifiques de PPAR γ (Nagy et al. 1998). En outre, il existe des ligands synthétiques activateurs de PPAR γ . Parmi eux se trouvent des molécules utilisées dans le traitement du diabète non insulino-dépendant de la famille des thiazolidinediones (troglitazone, rosiglitazone, ciglitazone...) (Lehmann et al. 1995) (Figure 37).

3.4 Patron d'expression des PPARs

De nombreuses études ont révélé qu'ils présentaient différents profils d'expression dans les tissus. Ainsi, PPAR α est principalement exprimé dans le foie où il constitue le régulateur majeur du catabolisme des lipides et de leur transport, alors que PPAR γ est fortement

exprimé dans les tissus adipeux blanc et brun. C'est un acteur déterminant dans la différenciation des adipocytes, le stockage et le métabolisme des lipides ainsi que dans l'homéostasie du glucose (Smith 2002, Yessoufou and Wahli 2010). Quant à PPAR β/δ , il est ubiquitairement exprimé à travers l'ensemble du corps et est impliqué dans de nombreux processus biologiques dont le métabolisme des lipides, la réponse inflammatoire, le transport du cholestérol mais aussi dans la différenciation des kératinocytes et la cicatrisation des blessures (Wagner and Wagner 2010, Chong et al. 2009). Par ailleurs, PPAR γ est exprimé dans les tissus impliqués dans la reproduction : gonades (ovaire et testicule), l'utérus, les glandes mammaires, le placenta, la prostate, l'hypophyse et au niveau du système nerveux central (Komar et al. 2001, Mouihate et al. 2004). Dans ce travail, nous nous intéresserons plus particulièrement à son expression au sein du placenta.

Dans les tissus placentaires, les trois isotypes ont été identifiés mais leurs fonctions physiologiques sont encore peu connues. Les transcrits et les protéines de PPAR α , PPAR β/δ et PPAR γ ont été détectés et localisés dans les placentas de rat, de souris et d'homme par différentes méthodologies. PPAR γ fut le premier à être décrit dans le placenta, son implication cruciale dans le développement placentaire fut mise en évidence par l'invalidation de son gène chez la souris (Barak et al. 1999 et Kubota et al. 1999). Hautement exprimé dans cet organe, il est essentiellement présent dans les noyaux des cellules trophoblastiques, suggérant son rôle potentiel dans la différenciation des trophoblastes. Chez les rongeurs, PPAR γ est localisé dans les cellules trophoblastiques de la zone labyrinthique (Kubota et al. 1999 et Asami-Miyagishi et al. 2004). Chez la femme, il est présent dès le début jusqu'au terme de la grossesse dans les CTV, le ST et les CTEV (Wang et al. 2002 ; Waite et al. 2000 et Tarrade et al. 2001). Par des expériences d'immunohistochimie, il a été décrit que PPAR γ était exprimé notamment dans les CTEV en prolifération au niveau des colonnes des villosités chorales, dans les CTEV interstitiels, dans les cellules géantes multinuclées et dans les cytotrophoblastes endo- et péri-vasculaires (Fournier et al. 2007). Il apparaît donc comme un marqueur trophoblastique dans le placenta humain. Contrairement au tissu adipeux, où l'expression de ce récepteur nucléaire croît avec la différenciation des adipocytes (Tontonoz et al. 1994), aucune variation de son expression n'a été répertoriée pendant la différenciation *in vitro* de cytotrophoblastes isolés en ST à terme (Daoud et al. 2005 et Schaiff et al. 2000). En outre, son partenaire obligatoire d'hétérodimérisation, RXR α , est exprimé ubiquitairement, autant dans le noyau des trophoblastes que dans celui des cellules mésenchymateuses ou déciduales (Fournier et al. 2007).

Quant à l'expression de PPAR α et de PPAR β/δ , des études ont montré qu'ils étaient exprimés dans la zone jonctionnelle et dans le labyrinthe des rongeurs. Chez l'homme, ils seraient principalement détectés dans le ST (Wang et al. 2002). Cependant, l'analyse des CTV à terme a révélé que le niveau de transcrits était plus élevé dans les cytotrophoblastes par rapport au ST (Daoud et al. 2005). Enfin, les travaux *in situ* et *in vitro* dans des cultures primaires ou encore des lignées cellulaires établies telles que les cellules JEG-3 (lignée cellulaire de choriocarcinome) ou les HIPEC (lignée cellulaire de CTEV), ont mis en évidence leur expression (Pavan et al. 2003 ; Matsuo and Strauss 1994).

3.5 PPAR γ et le développement placentaire humain

Le haut niveau d'expression de PPAR γ dans le placenta et, plus particulièrement son profil d'expression, suggère un rôle spécifique de ce facteur dans la différenciation et la fonction trophoblastique. Cette hypothèse fut confortée par des expériences menées sur des souris invalidées pour PPAR γ . Ces dernières ont permis de montrer l'importance de ce récepteur nucléaire dans le processus de nidation et le développement précoce du placenta (Barak et al. 1999). Les souris invalidées (KO) mourraient au stade E9,5-10 suite à un développement anormal du placenta, notamment à cause de défauts de différenciation des trophoblastes et de la vascularisation utéroplacentaire (Barak et al. 1999 et Kubota et al. 1999). Une gestation normale peut toutefois être restaurée en générant des placentas chimères tétraploïdes sauvages (Barak et al. 1999). Des anomalies placentaires comparables chez les souris déficientes pour le récepteur RXR α ont également été décrites (Wendling et al. 1999). Ceci laisse à penser que l'hétérodimère PPAR γ /RXR α est nécessaire au développement placentaire.

3.5.1. PPAR γ et l'invasion trophoblastique

L'étroite co-expression de PPAR γ et de son partenaire d'hétérodimérisation RXR α dans les noyaux des CTEV localisés à l'interface fœto-maternelle de l'embryon humain, suggère une régulation potentielle de l'invasion trophoblastique par PPAR γ . Des études *in vitro* ont montré que les agonistes de PPAR γ , aussi bien naturels que synthétiques, inhibent l'invasion des CTEV primaires et immortalisées (HIPEC) de manière dose-dépendante alors que ses antagonistes la promeuvent (Pavan et al. 2003 ; Tarrade et al. 2001). En revanche, les agonistes pan-RXR n'ont pas d'effet significatif sur l'invasion, de même que leurs antagonistes. Cependant la combinaison des agonistes de PPAR γ et de pan-RXR conduit à un

effet synergique qui se traduit par une inhibition plus importante. Des résultats opposés ont été rapportés avec le traitement simultané par des antagonistes de PPAR γ et de pan-RXR, l'invasion trophoblastique est, alors, d'autant plus favorisée (Tarrade et al. 2001). Ainsi, l'hétérodimère PPAR γ /RXR α joue un rôle majeur dans le contrôle de l'invasion trophoblastique. Par ailleurs, l'action similaire de l'EG-VEGF laisse supposer qu'ils pourraient agir de manière synergique.

3.5.2. PPAR γ , la différenciation trophoblastique et la régulation hormonale

Le bon développement du fœtus dépend de la formation du placenta et de la différenciation trophoblastique. Or, peu d'études ont été menées afin de décrire les mécanismes moléculaires impliqués dans la différenciation des trophoblastes humains. La possibilité que PPAR γ puisse jouer un rôle dans cette différenciation fut pour la première fois énoncée par Matsuo et Strauss. Ils montrèrent dans les JEG-3 que lorsqu'un ligand de RXR était ajouté au milieu de culture de ces cellules, la sécrétion de l'hCG était augmentée. En revanche, celle-ci diminuait lorsque les cellules étaient traitées par un ligand de PPAR γ (Matsuo and Strauss 1994). Une étude plus récente a mis en évidence le rôle différentiel de PPAR γ en fonction de la nature de son ligand (Schaiff et al. 2000) dans la lignée cellulaire de choriocarcinome, Bewo. En effet, le ligand synthétique, troglitazone, induit une augmentation de la sécrétion de l'hCG et n'a aucune action apoptique tandis que le ligand naturel, 15 Δ PGJ2 déjà décrit pour induire l'apoptose des monocytes (Chinetti et al. 1998) et des cellules endothéliales (Bishop-Bailey et al. 1999), stimule l'expression de p53 et promeut l'apoptose des trophoblastes. Cette équipe a également montré que l'activation de PPAR γ par le troglitazone dans les CTV à terme induit la formation du ST. De manière intéressante, la différenciation *in vitro* des CTV mononuclés, isolés au premier trimestre, en ST est accompagnée par l'activation de PPAR γ (Tarrade et al. 2001). Des travaux plus récents ont aussi décrit que l'activation de PPAR γ par son agoniste, la rosiglitazone, promeut la différenciation cellulaire des BeWo en structure syncytialisée, mimant la bordure de ST *in vivo*. Ce phénomène résulte de l'augmentation de l'expression du facteur de transcription GCM-1 (Glial Cell missing-1) et de la libération du marqueur de fusion cellulaire hCG β (Levytaska et al. 2014). L'intervention de l'hétérodimère dans la régulation de l'incorporation des acides gras dans les trophoblastes humains, tout comme les autres cibles de PPAR γ , a été également rapportée (Schaiff et al. 2005). Des études *in vitro* réalisées dans des CTV humains différenciés en ST ont montré qu'aussi bien les agonistes de PPAR γ (mais non de PPAR α et PPAR β/δ) que ceux de pan-RXR augmentaient le niveau des transcrits de hCG β et

induisait la sécrétion de l'hCG et de ses sous-unités libres β avec la même efficacité. En combinant les deux types de ligands, l'effet sur la sécrétion de l'hCG est additif (Tarrade et al. 2001). Ces observations sont en accord avec des travaux antérieurs montrant l'importance du rôle de PPAR γ dans la différenciation des trophoblastes humains (Schaiff et al. 2000). En outre, l'activation de l'hétérodimère PPAR γ /RXR α stimule également la synthèse d'autres hormones du ST telles que le hPL (*human Placental Lactogen*), hPGH (*human Placental GH*) et la leptine. La différenciation des adipocytes, des macrophages et des cellules du colon est généralement associée à une augmentation de l'expression de PPAR γ . Or, dans celle des CTV mononucléés en ST multinucléés, aucune différence n'a été rapportée quant à une élévation du niveau de RXR α et de PPAR γ , suggérant ainsi que l'augmentation de l'expression de ces récepteurs n'est pas directement impliquée.

Ainsi l'ensemble de ces études témoigne de l'implication de PPAR γ dans la différenciation trophoblastique.

3.6 Modèles animaux de PPAR γ

Des modèles animaux de PPAR γ ont été développés afin d'affiner les études sur le rôle de ce récepteur nucléaire. En 1999, deux équipes générèrent des souris invalidées pour le gène PPAR γ (Barak et al. 1999 ; Kubota et al 1999). Cette déficience conduisit à la mortalité précoce des embryons, suite à une altération sévère de leur vascularisation placentaire ainsi que de leur différenciation trophoblastique. Ce dysfonctionnement placentaire est aussi responsable d'un amincissement du myocarde. Ces souris ont permis de montrer l'implication directe de PPAR γ dans le développement précoce du placenta. Cependant, la mortalité des embryons autour de E10,5 et E11,5 restreint la caractérisation plus fine du rôle de ce facteur. Ainsi, en 2010, une équipe développa une souris Sox2^{cre}/PPAR γ ^{L2/L2} viable, en raison de l'invalidation de PPAR γ uniquement au niveau de l'épiblaste (Nadra et al. 2010). La survie de ce second modèle murin a permis de corroborer le fait que le défaut placentaire est l'unique cause de la mortalité embryonnaire des souris PPAR γ ^{-/-} et que l'expression de PPAR γ dans le placenta est suffisante pour abolir la létalité des embryons déficients. Cependant ce modèle ne permet pas de répondre quant au rôle de PPAR γ à des stades plus tardifs de la gestation. L'absence de l'expression de ce récepteur nucléaire au sein de l'embryon alors que son expression est quasi-ubiquitaire dans les tissus adultes, ne peut être sans conséquence sur le développement embryonnaire. Cette même équipe montra également que le défaut de la vascularisation placentaire observé dans les souris PPAR γ ^{-/-} serait lié à un déséquilibre de la balance des facteurs pro- et anti-angiogéniques. En outre, afin d'analyser le rôle de PPAR γ à

des stades plus tardifs du développement placentaire, ils traitèrent des souris sauvages gestantes avec l'agoniste de PPAR γ , la rosiglitazone. Ce traitement entraîna une inhibition de l'expression de facteurs pro-angiogènes tels que la proliférine et le VEGF et permit de montrer que PPAR γ contribue au contrôle de l'angiogenèse placentaire (Nadra et al. 2010). Une autre équipe examina également l'influence de l'activation de PPAR γ *in vivo* sur la croissance fœto-placentaire et sur le transport transplacentaire des acides gras (Schaiff et al. 2007), en administrant de la rosiglitazone pendant la seconde moitié de la gestation (E8,5 à E18,5). Ce traitement conduisit à un retard de la croissance fœtale, ainsi que du développement placentaire, associés à une augmentation et une accumulation d'acides gras dans le placenta. Par ailleurs, en raison de la malformation de la zone labyrinthique dans les placentas PPAR γ ^{-/-}, suggérant un rôle critique de PPAR γ dans la progression de la gestation normale, et des données récentes décrivant que le taux des agonistes endogènes de PPAR γ était significativement réduit dans les sérums de femmes pré-éclampsiques en comparaison de femmes enceintes saines (Waite et al. 2005), McCarthy et al. se sont intéressés aux effets de l'antagoniste de PPAR γ , T0070907 chez les rates gestantes (McCarthy et al. 2011). Les rates gestantes qui ont été traitées entre E11 et E15 par du T0070907, développèrent des symptômes associés à la PE, tels qu'une élévation de la pression artérielle, une protéinurie, un dysfonctionnement endothélial, une réduction de poids du nouveau-né ainsi qu'une augmentation de l'agrégation des plaquettes. Les trophoblastes du labyrinthe étaient également moins différenciés mais l'activité proliférative était augmentée.

L'ensemble de ces travaux et le développement de ces modèles animaux ont permis de démontrer le rôle central de PPAR γ dans le développement placentaire et le maintien de la grossesse. Tout défaut dans la régulation de sa fonction affecte la progression normale de la grossesse et peut conduire au développement de la PE.

OBJECTIFS

J'ai réalisé ma thèse au sein du laboratoire de la Biologie du Cancer et de l'Infection dirigé par le Dr. Jean-Jacques Feige, dont la thématique de recherche est centrée sur l'étude de l'angiogenèse physiologique et tumorale au niveau des glandes endocrines (le cortex surrénal et le placenta) en particulier afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques capables d'inhiber l'angiogenèse pathologique, principalement tumorale. Le laboratoire cherche et à comprendre les mécanismes de contrôle de l'angiogenèse dans un contexte physiologique et à développer de nouvelles stratégies thérapeutiques basées sur l'inhibition de l'angiogenèse. L'essentiel de l'activité de recherche est axé sur deux facteurs majeurs de ce processus physiologique, le VEGF (vascular endothelial growth factor) et l'EG-VEGF (endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor).

L'équipe Placenta que j'ai intégrée au sein de BCI, fut fondée en 2003 lors de l'arrivée dans l'unité du Dr. Nadia Alfaidy. En raison de ses connaissances du modèle placenta acquises auprès de Pr. J. Challis à Toronto, elle dirige le projet de l'étude du rôle de l'EG-VEGF dans la vascularisation placentaire, et dans les pathologies de la grossesse d'origine vasculaire telles que la Pré-Eclampsie (PE) et le Retard de Croissance Intra-Utérin (RCIU). L'équipe a caractérisé l'expression de l'EG-VEGF et de ses récepteurs dans le placenta humain et murin (Hoffmann et al. 2006, 2007) et mis en évidence leur régulation par l'hypoxie et l'hCG dans les villosités choriales (Hoffmann et al. 2006 ; Brouillet et al. 2012) ainsi que sa dérégulation dans la PE (Hoffmann et al. 2009). Elle a également établi son rôle inhibiteur dans l'invasion des trophoblastes extravilleux (Hoffmann et al. 2009) et son rôle angiogénique sur les cellules endothéliales placentaires, les HPEC (Brouillet et al. 2010). Enfin, elle a caractérisé l'expression de ce facteur et de ses récepteurs dans les grossesses avec RCIU (Brouillet et al. 2013).

Mon projet de recherche s'inscrit dans la problématique générale de l'équipe qui vise à comprendre le développement du placenta et en particulier la différenciation trophoblastique au cours du 1^{er} trimestre de la grossesse. Je me suis investie pendant ces trois années de thèse à poursuivre la caractérisation du rôle de l'EG-VEGF dans le développement placentaire. Pour ce faire, mon projet s'articule autour de trois axes de recherche :

- L'étude de la régulation du facteur EG-VEGF par le récepteur nucléaire PPAR γ ,
- La détermination du rôle de l'EG-VEGF dans la différenciation hématopoïétique placentaire,
- La contribution au développement d'un modèle animal de la pré-éclampsie.

RESULTATS

I. Etude de la régulation du facteur EG-VEGF par le récepteur nucléaire PPAR γ

1.1 Contexte et présentation de la publication

L'EG-VEGF est une protéine de la famille des prokinétines, famille dont les deux principaux membres (EG-VEGF et Bv8) sont impliqués dans de nombreux processus biologiques tel que l'angiogenèse. Mon équipe s'intéresse depuis dix ans à l'étude du rôle de cette protéine dans le placenta, tissu très vascularisé et où les processus angiogéniques jouent un rôle majeur dans le succès de la grossesse. Des données récentes de notre laboratoire ont montré que l'EG-VEGF joue un rôle essentiel dans le développement de la villosité placentaire au cours du premier trimestre et dans le contrôle de l'invasion précoce des trophoblastes, cellules chargées de l'établissement de la circulation fœto-maternelle à la fin de ce trimestre. En effet, l'EG-VEGF présente un pic d'expression et de production jusqu'à la fin du premier trimestre, empêchant ainsi ces cellules d'envahir la décidue maternelle avant leur différenciation complète. Dans le système d'établissement de la circulation fœto-maternelle, il a aussi été montré que les récepteurs nucléaires RXR α (Acide Rétinoïque 9 cis) et PPAR γ (Peroxisome proliferators-activated receptors) jouent un rôle important dans les régulations fines de l'invasion trophoblastique. J'ai réalisé mon stage de Master II au sein du laboratoire UMR-S767 « Grossesse normale et pathologique » dirigé par le Dr. Danièle Evain-Brion, qui mit en évidence que *in vitro* les agonistes de PPAR γ et de RXR α , aussi bien naturels que synthétiques, inhibent l'invasion trophoblastique alors que leurs antagonistes l'induisent (Tarrade et al. 2001). Aussi, l'inactivation du gène PPAR γ chez la souris est-elle létale au stade E10,5-11,5 suite à un défaut de différenciation des trophoblastes et de la vascularisation utéroplacentaire (Kubota et al. 1999 ; Barak et al. 1999). A la lumière de ces informations et sachant que l'analyse *in silico* de la région promotrice du gène de l'EG-VEGF a montré des sites potentiels de liaison de l'hétérodimère PPAR γ /RXR α , nous avons émis l'hypothèse de la régulation de l'expression de l'EG-VEGF par PPAR γ . C'est pourquoi, ce premier axe de mon projet concerne l'étude de la régulation de l'expression du facteur EG-VEGF par PPAR γ .

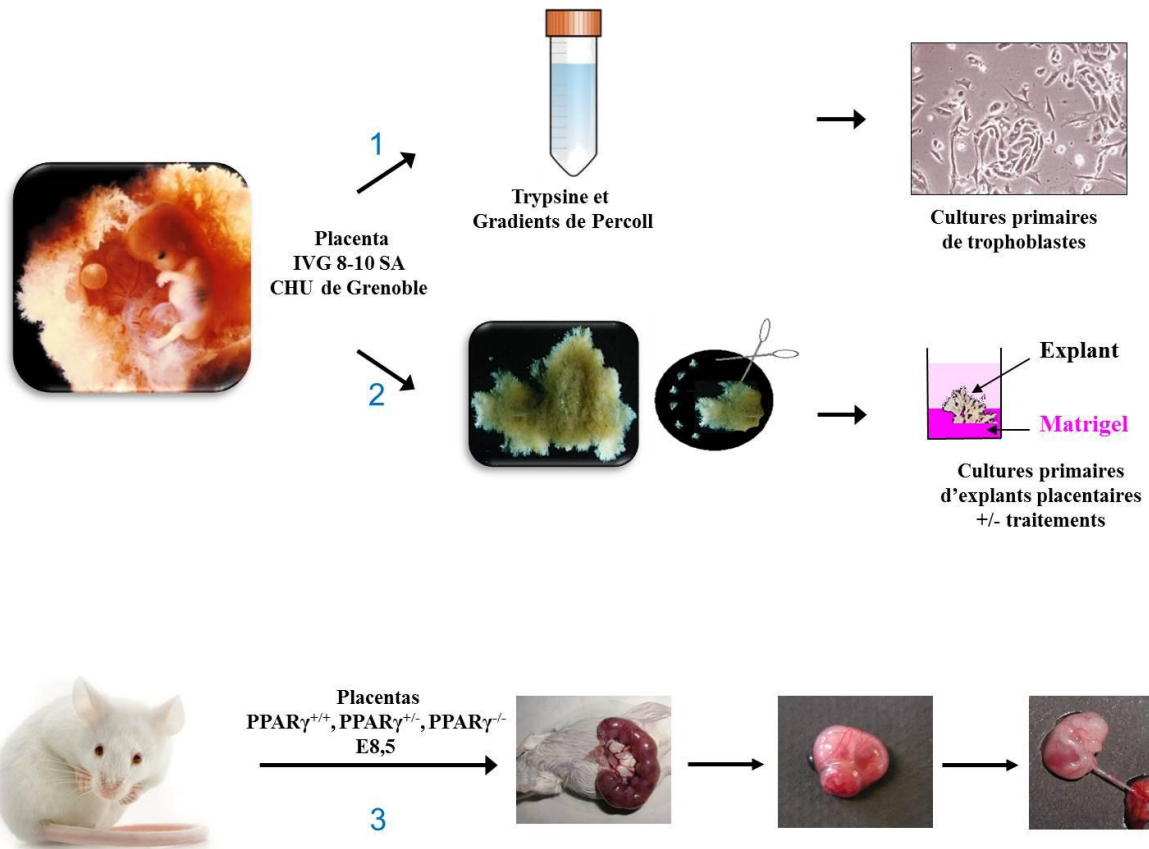


Figure 38: Les trois approches expérimentales utilisées dans l'étude de la régulation du facteur EG-VEGF par le récepteur nucléaire PPAR γ

Les placentas humains issus d'interruption volontaire de grossesse sont collectés entre 8 et 10 SA avant d'être digérés par une solution de trypsine afin d'isoler les cytotrophoblastes villosus dans un gradient de Percoll. Ils seront par la suite mis en culture (1). Les placentas sont également disséqués en explants placentaires et mis en culture sur une matrice de matrigel (2). Enfin, des placentas murins PPAR $\gamma^{+/+}$, PPAR $\gamma^{+/-}$ et PPAR $\gamma^{-/-}$ seront prélevés à E8,5 chez des souris gestantes hétérozygotes pour le gène PPAR γ (3).

Afin de valider cette hypothèse, une partie des expériences a été réalisée sur des explants placentaires entre 8 et 10 SA, modèle qui conserve la structure de la villosité et l'ensemble des types cellulaires placentaires. Il est de ce fait considéré comme étant plus physiologique que le modèle des cultures cellulaires primaires, et est qualifié d'*ex vivo* dans la littérature. Les villosités placentaires sont obtenues après dissection d'un placenta, et mis en culture sur Matrigel. Les explants ont ensuite été traités ou non par la Rosiglitazone (un agoniste de PPAR γ) ou par le T0070907 (un inhibiteur irréversible de PPAR γ) ainsi que des agonistes et antagonistes de pan-RXR (Ro25-7386 et Ro26-5405, respectivement). L'effet de ces molécules est testé sur les niveaux d'expression de l'EG-VEGF et de ses récepteurs au niveau de l'ARNm et au niveau protéique. L'EG-VEGF étant une cytokine circulante nous avons également dosé ses taux de sécrétion par ELISA dans les milieux conditionnés des explants traités ou non par ces molécules. Par ailleurs, dans le cadre d'une collaboration avec le Pr. Béatrice Desvergne de l'université de Lausanne, nous avons eu accès à leur modèle de souris invalidées pour le gène PPAR γ . Ce modèle fut utilisé afin de démontrer les effets d'une dérégulation du récepteur nucléaire PPAR γ , sur l'expression de l'EG-VEGF et de ses récepteurs. En outre, étant donné que l'invalidation du gène PPAR γ chez la souris est létale au stade E10,5 - E11.5 suite à un défaut de la vascularisation utéroplacentaire et que l'EG-VEGF est directement impliqué dans l'angiogenèse placentaire, nous avons cherché à déterminer si les effets de PPAR γ sur la vascularisation placentaire étaient orchestrés par l'EG-VEGF. Pour cela nous avons étudié l'expression du marqueur endothélial, CD31. Enfin, PPAR γ et l'EG-VEGF étant aussi des facteurs de contrôle de l'invasion trophoblastique, nous avons recherché une implication potentielle de l'EG-VEGF dans les effets de PPAR γ sur la migration, l'invasion et la prolifération des cellules trophoblastiques. La lignée cellulaire de cytotrophoblastes extravilleux invasifs, HTR-8/SVneo, fut utilisée pour nos expérimentations.

New insights into the mechanism of PPAR γ regulation of trophoblast invasion and placental vascularization.

Garnier V^{1,2,3}, Traboulsi W^{1,2,3}, Brouillet S^{1,2,3,9}, Fournier T^{4,5,6}, Winkler C⁷, Desvergne B⁷, Hoffmann P^{1,2,3,10}
Zhou QY⁸, Congiu C⁹, Onnis V⁹, Feige JJ^{1,2,3}, Alfaidy, N^{1,2,3}.

Running title: EG-VEGF mediates PPAR γ effects on trophoblast invasion

Keys words: EG-VEGF, trophoblast invasion, PPAR γ , human pregnancy,

1. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 1036, Grenoble. France
2. Université Grenoble Alpes, 38041 Grenoble, France
3. Commissariat à l’Energie Atomique (CEA), iRTSV-BCI, Grenoble, France
4. INSERM, UMR-S 1139, Paris F-75006, France
5. Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris F-75006, France
6. PremUP foundation, Paris F-75006, France
7. University of Lausanne, Center for Integrative Genomics, Switzerland
8. University of California. Department of Pharmacology. 363D Med Surge 2. Mail Code: 4625 Irvine, CA
9. Department of Life and Environmental Sciences, Unit of Pharmaceutical, Pharmacological and Nutraceutical Sciences, University of Cagliari, 09124 Cagliari, Italy
10. University Hospital of Grenoble, Department of Gynaecology and Obstetrics, La Tronche, France

Grant support: INSERM U1036, University Joseph-Fourier, Commissariat à l’Energie Atomique (iRTSV/BCI).

Conference presentation: IFPA (International Federation of Placenta associations) 2014, G2L2 2014 meeting, and at Grenoble hospital clinical research conference. French society of endocrinology 2013.

Corresponding author: Nadia Alfaidy
Unité INSERM U1036. Laboratoire BCI -iRTSV
CEA Grenoble 17, rue des Martyrs
38054 Grenoble cedex 9
Tel. 04 38 78 35 01
Fax 04 38 78 50 58
nadia.alfaidy-benharouga@cea.fr

Abstract

PPAR γ -deficient mice develop severe placental abnormalities with defects in the trophoblast differentiation and in placental vascularization. To date, the mechanisms by which this occurs are still unknown. We demonstrated that the new angiogenic factor EG-VEGF controls the same processes of placental development as PPAR γ . EG-VEGF exerts its functions via prokineticin receptor 1 (PROKR1) and 2 (PROKR2). *In silico* analysis of EG-VEGF promoter showed PPAR γ response elements, suggesting potential regulation of EG-VEGF by PPAR γ . Human placental explants and trophoblast cells were used to investigate the effects of the PPAR γ agonist “Rosiglitazone” on i) EG-VEGF and its receptors expression, ii) EG-VEGF secretion, iii) trophoblast invasion and iv) placental vascularization, in the absence or presence of PROKR1 and PROKR2 antagonists. Placentas collected from gravid wild type (WT), PPAR γ ^{-/+} and PPAR γ ^{-/-} mice were also used to determine the levels of EG-VEGF and its receptors. We demonstrated that rosiglitazone increased i) EG-VEGF secretion (effect that was abolished in the presence of T0070907, a PPAR γ antagonist), ii) EG-VEGF and its receptor expressions at the protein and mRNA levels (this effect was inhibited by DRB), iii) CD31 expression (this effect was reduced in the presence of PROKR1 and PROKR2 antagonists). Rosiglitazone inhibited trophoblast invasion and this effect was in part mediated by PROKR2 but not PROKR1. In gravid PPAR γ ^{-/-} mouse placentas, we observed an increase in EG-VEGF and PROKR2 protein levels and a decrease in PROKR1 levels. Taken together, these data suggest a compensatory mechanism that occurs *in vivo* in response to the absence of PPAR γ . We report a new physiological regulation of EG-VEGF expression and bring new insights into the mechanism of trophoblast invasion and vascularisation controlled by PPAR γ .

Introduction

During human, pregnancy two key angiogenic processes govern placental development and the establishment of the fetomaternal circulation (FC) [1]. These processes are named, intra and extra-villous angiogenesis, respectively. The former one occurs early on during pregnancy to ensure the growth and the branching of the newly formed vasculature [2]. The second one establishes FC and is achieved by specialized placental cells, the cytotrophoblasts (CT). By the end of the first trimester of pregnancy, CT that are present at the anchoring villi generate multilayered columns of highly invasive character called extravillous trophoblasts (EVT). EVT invasion is essential for the transformation of the maternal spiral arteries from high to low resistance vessels [3]. Failure in either intra- or extra-villous angiogenesis is known to be associated with the development of pregnancy pathologies such as early pregnancy loss, fetal growth restriction (FGR) and preeclampsia (PE) [4].

Among factors reported to control both the intra and extra angiogenic processes is the nuclear receptor, peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) [5]. PPAR γ is abundantly expressed in the placenta during the first trimester of pregnancy [6] with a strong expression in the trophoblast labyrinthine zone in rodent placentas and in the CT and syncytiotrophoblast (ST) in the human placenta [7]. DNA binding of PPAR γ to its PPAR-response elements (PPREs) requires obligate heterodimerization with another nuclear receptor, the retinoid X receptor (RXR) [8]. Genetic studies showed that PPAR γ -deficient mice die at day 10.5 of gestation because of placental abnormalities with defects in trophoblast differentiation and in vascular development [6,9]. The demonstration that placental defects were the unique cause of PPAR γ ^{-/-} embryonic lethality came from the “Sox2^{Cre}/PPAR γ ^{L2/L2}” mouse model, a fully viable PPAR γ -null mouse generated by specific and total epiblastic gene deletion [10]. Nevertheless, the mechanism by which PPAR γ /RXR heterodimer controls these processes is still unknown.

We have recently shown that a specific placental angiogenic factor, named endocrine gland derived vascular endothelial growth factor (EG-VEGF) or prokineticin 1, controls the same processes as those described for PPAR γ /RXR α [11], suggesting that some of PPAR γ effects might be mediated by EG-VEGF. Moreover, *in silico* analysis of the promoters of EG-VEGF and its receptors showed potential binding sites of PPAR γ /RXR heterodimer in all of them.

EG-VEGF is highly expressed in the ST layer during early pregnancy [12]. It acts via two G protein-coupled receptors, prokineticin receptors 1 (PROKR1) and 2 (PROKR2) [13-15]. We have recently shown that EG-VEGF controls both intra- and extra-villous angiogenic

processes [16-18,11]. Within the villi, EG-VEGF increases multiple aspects of angiogenesis including microvascular endothelial proliferation, migration, tube-like formation and permeability, as well as trophoblast proliferation and survival [16-18]. At the extra-villous level, we demonstrated that EG-VEGF is rather an inhibitor of early trophoblast invasion [11]. Because of the similarities of action between EG-VEGF and PPAR γ to control intra- and extra-villous angiogenesis, we hypothesized that EG-VEGF and/or its receptors might mediate part of PPAR γ functions during the first trimester of pregnancy.

Three approaches were used to verify this hypothesis, an i) *in vitro* approach using human primary isolated cytotrophoblasts, and the extravillous trophoblast cell line (HTR-8/SVneo), ii) *ex vivo* approach using the human placental explant model, and iii) *in vivo* approach using WT, PPAR γ ^{+/-} and PPAR γ ^{-/-} mouse placentas.

Materials and methods

Tissue collection

A total of 46 first-trimester human placentas from 8–10 weeks of gestation (wg) were obtained from elective terminations of pregnancies at the Grenoble University Hospital. Collection and processing of human placentas were approved by the local hospital ethical committees and informed patient consent was obtained in all cases.

Mouse model

Wild type (WT, n=4), PPAR γ ^{-/-} (n=4) and PPAR γ ^{+/-} (n=4) placentas were collected from female PPAR γ ^{+/-} mice mated with male PPAR γ ^{+/-} mice as described by Rieusset et al. [19]. WT and heterozygous PPAR γ (PPAR γ ^{+/-}) mice, on a mixed genetic background (Sv129/C56BL/6), were maintained at 20°C with a 12 hour light-darkness cycle. Animal experimentations were approved by the relevant commission of the Canton of Vaud (Switzerland). Because PPAR γ ^{-/-} mice die at 9.5 dpc, gravid mice were sacrificed at 8.5 dpc. Embryonic genotyping was performed by PCR amplification using the following primers GACCCAGCTCTACAACAGGC (F) and GGGACAGACCTCACTAACCCGTA ACT (R), which amplified a product of 700 bp derived from the PPAR γ wild-type allele. WT, PPAR γ ^{-/-} and PPAR γ ^{+/-} placentas were collected and used for immunohistochemistry, quantitative RT-PCR and Western blot analyses.

Placental explant and primary cell cultures

Placental explants culture and treatment: Villous explant cultures were established from first trimester human placentas at 8-10 wg. Small fragments of placental villi (30–40 mg wet weight) were placed into 48-well plates pre-coated with 150 μ L per well of diluted Matrigel (Matrigel/DMEM-F12, 1/1) (Becton–Dickinson, Le Pont-de-Claix, France) and polymerized at 37°C for 30 min. Explants were cultured in DMEM Ham's F-12 (medium, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplemented with 100 μ g/ml streptomycin and 100 U/ml penicillin. After 24 h of culture, the medium was changed, and the explants were incubated in the absence or presence of 1 μ M or 10 μ M Rosiglitazone (a PPAR γ agonist, Sigma-Aldrich, France), 4 μ M T0070907 (a PPAR γ antagonist), 4 μ M Ro25-7386 dissolved in ethanol (a pan-RXR agonist, Roche, France), 4 μ M Ro26-5405 (a pan-RXR selective antagonist, Roche, France), or recombinant EG-VEGF at 5 ng/ml, 10 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml and 100 ng/ml range (Peprotech, France) for 0–24 h. For each placenta, three explants were used for each

determination. For statistical analysis, the (n) value represents the number of placentas, not explants. In some experiments, explants were treated with the following compounds: 5, 6-dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazole (DRB, 50 μ g/ml) a potent RNA polymerase inhibitor for 8 h.

Isolation and purification of villous cytotrophoblasts: Villous cytotrophoblast cells (VCT) were isolated from first trimester chorionic villi by differential trypsin digestion according to previous published protocols [20-22]. After Percoll gradient fractionation, cells were diluted to a concentration of 10^6 cells/mL in DMEM supplemented with 10% FCS, 2 mM glutamine, 100 IU/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin and plated on 35-mm or 60-mm culture plates (Techno Plastic Products, Switzerland). VCT were incubated overnight in 5% CO₂ at 37 °C and washed three times to eliminate non-adherent cells. VCT cultures were characterized by controlling expression of cytokeratin 7, a trophoblast cell marker (95% positive cells) and by the observation of cell aggregates and syncytiotrophoblasts at 48 h and 72 h, respectively. After overnight incubation and washes, purified VCT primary cultures were treated for 24 h with 1 μ M Rosiglitazone. Conditioned media from primary cultures were collected, centrifuged and the supernatants stored at -20 °C until use.

HTR cell line culture: The HTR-8/SVneo cells were produced by immortalization of HTR-8 cells, an EVT cell line, with SV40 virus [23]. These cells were generously given to us by Dr CH Graham (Ontario, Canada). Cells were used between 24–30 passages and grown in RPMI-1640 supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin and amphotericin B (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Cells were maintained at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂ in air.

PROKR-1 and PROKR-2 cDNA cloning and BHK cell line transfection

Both PROKR1 and PROKR2 cDNAs were cloned from a human lung cDNA library, fused to a HA tag and inserted in to the pCDNA3.1 eucaryotic plasmid. The plasmids HA-PROKR1 or HA-PROKR2 were transfected into BHK-21 (CCL-10; American Type Culture Collection (ATCC)). BHK cells were cultured in DMEM/F12 culture medium supplemented with 5% of FBS (fetal bovine serum) and methotrexate (0.4 mg/ml) as a selective agent.

Immunohistochemistry

Placental explants from 8 to 10 wg were collected and fixed for 24 h at 4 °C in 4 % (vol/vol) paraformaldehyde, embedded in paraffin, and cut into 5 µm sections as previously described [24]. Adjacent sections were stained using specific antibodies and the avidin–biotin immunoperoxidase detection method was applied. Endogenous peroxidase activity was quenched by pretreatment with 3% (v/v) hydrogen peroxide in methanol for 30 min. In house polyclonal rabbit antibodies were used to detect EG-VEGF, PROKR1 and PROKR2 (Covalab, Lyon, France). CD31 was detected using commercial antibodies (Dako, France). For immunohistochemical detection, antibodies were incubated with the tissue sections for 18 h at 4°C and used at final concentrations of 0.33 µg/ml for anti-EG-VEGF, 0.84 µg/ml for anti-PROKR1 and 0.84 µg/ml for anti-PROKR2. The tissue sections were subsequently washed three times with PBS and incubated with biotinylated goat anti-rabbit IgGs (1:400 dilution in blocking solution; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) for 1 h in a humid chamber. 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.

Western-blot analysis

Placental explants were homogenized in RIPA lysis buffer and protease inhibitors as previously described [25]. 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 CD31 (Abcam, France), PROKR1, PROKR2, EG-VEGF (in house antibodies) and PPAR γ (antibody H100, Santa Cruz Biotechnology). PROKR1 and PROKR2 antibodies were both used at a final concentration of 0.84 µg/mL and PPAR γ antibody H100 was diluted at 1:100. A specific Western-blot protocol was set up to detect EG-VEGF protein (10-17 kD). Briefly, 100 µg of placental proteins were separated on 0.1% SDS-17% polyacrylamide gels, and electrically transferred onto 0.2 µm polyvinylidene difluoride membranes (Millipore, Bedford, MA, USA), for 45 min at 90 V. The blots were washed with PBS-Tween 0.1 % and incubated overnight in blocking solution (5 % skimmed milk in PBS-T). Subsequently, the membranes were immunoblotted with a rabbit antibody against EG-VEGF (0.48 µg/ml) (Covalab Lyon, France) overnight. The blots were then rinsed with PBS-T and incubated with

goat anti-rabbit IgG (1:3000) for 1 hour. After three PBS-T washes, the antibody-antigen complex was detected using the ECL plus detection system (Amersham Pharmacia Biotech). The intensities of immunoreactive bands were measured by scanning the photographic film and analyzing the images on a desktop computer using the Image J software. The *Chemidoc* analyzing system was also used (Image Lab version 4.0.1). To standardize for sample loading, the blots were subsequently stripped using a commercially available kit following the manufacturer's instructions (Re-blot; Millipore) and re-probed with an anti- β -actin antibody (Sigma-Aldrich, France) as an internal control for protein loading.

Proliferation assay

Cell proliferation reagent WST-1 was used to quantify HTR cell proliferation in the absence or presence of Rosiglitazone. 10 000 cells were seeded in three 96-well cell culture plates with 100 μ L culture medium in a humidified atmosphere. After 24 h of incubation, HTR cells were treated with 10 μ M Rosiglitazone, in the absence or the presence of either PROKR1 or PROKR2 antagonists or both. Absorbance at 405 nm was measured against a background control (culture medium alone) using a microplate reader. The reading was repeated at 24 h and 48 h of treatment.

RNA isolation and real-time PCR analysis

Total RNA was extracted from placental explants using Nucleospin RNA II (Macherey-Nagel). Reverse transcription was performed on 1 μ g total RNA (Invitrogen). Primers used are listed in Table 1. EG-VEGF and GAPDH mRNA expressions were quantified by real-time RT-PCR using a Bio-Rad CFX96 apparatus and GoTaq qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI, USA). PCR conditions were: step 1, 94 °C for 10 min; step 2, 45 cycles consisting of 95 °C for 15 s, temperature indicated in Table 2 for 5 s, and 72 °C for 10 s. The results were normalized to GAPDH.

EG-VEGF ELISA

EG-VEGF secretion was measured by ELISA (PeproTech, France) in the collected supernatant of placental explants after 30 min, 3 h, 8 h, overnight and 24 h of treatment. 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.

Invasion assay: This test was used with HTR-8/SVneo cells and the *ex vivo* model using the explants.

HTR-8 invasion: HTR-8 cells were stained with the Vybrant® DiI Cell-Labeling Solution (Molecular Probes®, Invitrogen) for 1 h at 37°C. The top chamber of 8 µm pore size HTR FluoroBlok™ cell culture inserts (BD Biosciences) were pre-coated with 100 µl 1:25 Matrigel Basement Membrane Matrix (BD Biosciences). 2×10^4 DiI-stained HTR cells were seeded per insert in 500 µl RPMI 1640 medium with 1% FBS. The inserts were placed into 24-well-plates containing 750 µl RPMI 1640 medium with 15% FBS per well. Cells were treated with 10 µM Rosiglitazone, 1 µM PROKR2 antagonist or both and incubated for 24 h at 37°C. The chambers were then removed, and fixed with PFA 4%. The membranes of the chambers were excised and placed on glass slides. The cells that invaded and attached to the undersurface of the chamber were visualized under the microscope and counted. Each experiment was performed three separate times in triplicate.

Placental explants: Approximately 150 µl of ice-cold Matrigel (BD Biosciences, Grenoble, France) was layered into each well of 48-well plates. The Matrigel was allowed to solidify completely at 37°C for 1 h. Placental explants were added and incubated at 37°C in an atmosphere of humidified 95% air/5% CO₂ for 4 h. 10 µM Rosiglitazone was added at the time of plating. Daily observations were made under an inverted photomicroscope to document the invasion process.

Validation of PROKR1 and PROKR2 antagonists effects on BHK overexpressing PROKR1 or PROKR2

The wound healing assay was performed to examine the effects of PROKR1 and PROKR2 antagonists on the cell motility of BHK (Baby Hamster Kidney fibroblasts) overexpressing PROKR1 or PROKR2. Cells were seeded in equal number into 12-well plates and processed as previously described [16,11]. Cells were treated with EG-VEGF in the absence or the presence of PROKR1 antagonist [(2-(5-(4-Fluorobenzyl)-1-(4-methoxybenzyl)-1,4,5,6-tetrahydro-4,6-dioxo-1,3,5-triazin-2-ylamino)ethyl)guanidine] (1 µM) [26,27], PROKR2 antagonist (1 µM) [28,29], or both and incubated for 9 h at 37°C.

Statistical analysis

Statistical comparisons were made using Student's t test and one-way ANOVA (both parametric and nonparametric) followed by Dunn's or Bonferroni tests. All data were checked for normality and equal variance. (SigmaPlot and SigmaStat, Jandel Scientific Software). All data are expressed as mean \pm SEM (**p<0.001; *p<0.01; *p<0.05).

Results

PPAR γ effect on EG-VEGF secretion

Placental explants were incubated in the absence or the presence of rosiglitazone for 24 h. Secreted EG-VEGF was measured in conditioned media by ELISA. Figure 1A shows a dose response effect of rosiglitazone, and a time course effect at 30 min, 3 h, 8 h and overnight. Rosiglitazone significantly increased EG-VEGF secretion from 8 h of incubation at both concentrations tested (1 μ M and 10 μ M). To confirm that the observed effect is specific of PPAR γ , we treated human placental explants by the antagonist T0070907 in the absence or the presence of rosiglitazone. Figure 1B shows that T0070907 significantly reversed rosiglitazone effect on EG-VEGF secretion. Importantly, we observed that T0070907 also decreased the basal EG-VEGF secretion, suggesting that EG-VEGF is constantly regulated by PPAR γ . Because EG-VEGF is mainly expressed in the syncytiotrophoblast (ST) layer, we determined the direct effect of rosiglitazone on its secretion by this cell type. Isolated primary cytotrophoblast cells were cultured for 72 h to form a syncytium and then treated with Rosiglitazone. Figure 1C shows that rosiglitazone significantly increased EG-VEGF secretion by ST cells.

PPAR γ effect on EG-VEGF expression

To determine whether PPAR γ increased EG-VEGF expression in the human placenta, we determined the effect of rosiglitazone on its expression at the mRNA level. Figure 2A shows that PPAR γ significantly increased EG-VEGF mRNA after 24h of treatment. This effect was transcriptional because it was abolished in the presence of DRB, an inhibitor of transcription (Figure S1). To confirm the effect of PPAR γ on EG-VEGF production, we compared its protein levels by immunohistochemistry and by Western Blotting analysis in control versus rosiglitazone-treated explants. Figures 2B, 2C and 2D show that rosiglitazone significantly increased EG-VEGF protein expression in the human placental explants.

Effect of RXR activation on EG-VEGF expression

Because PPAR γ requires obligate heterodimerization with RXR α to bind to its response element and consequently to be active, we wondered whether RXR α activation had any effect on EG-VEGF expression. Placental explants were incubated in the absence or the presence of Ro25, a pan-RXR agonist (4 μ M) or Ro26, a pan-RXR antagonist (4 μ M). There was no

effect of these compounds on EG-VEGF placental expression (Figure S2A) or secretion (Figure S2B) after 8 h of treatment. We have also tested the effect of simultaneous activation of PPAR γ and RXR α by their respective agonists. Figure S2C shows that there was no synergistic effect between these compounds to activate EG-VEGF secretion.

Effect of PPAR γ on PROKR1 and PROKR2 expression

Because of the significant effect of PPAR γ activation on EG-VEGF expression in placental explants, we wondered whether this key transcription factor also regulates the expression of EG-VEGF receptors, PROKR1 and PROKR2. Figure 3 shows the effect of PPAR γ activation on PROKR1 and PROKR2 expression at the protein levels in the placental explants. Figure 3A shows that PPAR γ activation increased PROKR2 (photographs in c and d) but not PROKR1 (photographs in a and b) expression. This was substantiated by Western Blotting analysis (Figures 3B and 3C).

***In vitro* validation of PROKR1 and PROKR2 antagonists**

EG-VEGF has been shown to inhibit the migration of different cell types [16,30,31]; we used the wound healing assay to verify the specificity of PROKR1 and PROKR2 antagonists in BHK cells over-expressing either PROKR1 (BHK-R1) or PROKR2 (BHK-R2) proteins. In BHK-R1 cells we demonstrated that EG-VEGF decreased BHK migration and that this effect was abolished in the presence of PROKR1 antagonist (Figure S3), but not in the presence of PROKR2 antagonist, Figure S4. Inversely, in BHK-R2 cells, EG-VEGF effect was abolished in the presence of PROKR2 antagonist (Figure S5), but not in the presence of PROKR1 antagonist (Figure S6).

EG-VEGF mediates PPAR γ effect on intra-villous angiogenesis

We determined the effect of PPAR γ activation on placental angiogenesis using our placental explant model. Figure 4A shows that rosiglitazone significantly increased CD31 staining and levels of expression (Figure 4B). To determine whether EG-VEGF intervenes in the control of PPAR γ -mediated placental angiogenesis, we tested the effect of rosiglitazone in the absence or the presence of EG-VEGF receptor antagonists. Figure 4C and 4D show that both PROKR1 and PROKR2 antagonists significantly decreased rosiglitazone effects on CD31 protein expression. Altogether, these data suggest that EG-VEGF might mediate some of PPAR γ effects on the placental angiogenesis.

EG-VEGF mediates PPAR γ effect on trophoblast invasion

Previous studies have shown that PPAR γ controls trophoblast invasion using *in vitro* models [32], however a demonstration of this regulation in an *ex vivo* model such as the explant model has not been performed yet. Using our placental explant model, we examined the effect of rosiglitazone on trophoblast invasion. Figure 5A shows that rosiglitazone significantly inhibits invasion of EVT into the Matrigel. This effect was observed both at 48 and 96 h of culture. This result confirms the inhibition of the invasive process of trophoblast cells. Because trophoblast invasion plays a major role in the process that establishes the fetomaternal circulation, ie extra-villous angiogenesis, we hypothesized that this might also involve angiogenic factors such as EG-VEGF. To verify this hypothesis, we used HTR-8/SVneo cell. First, we determined the effect of rosiglitazone on PROKR2 expression, a receptor subtype that mediates EG-VEGF effects on trophoblast invasion [11]. Figure 5B shows that rosiglitazone significantly increased PROKR2 protein levels, confirming the effect observed in whole placental explants. To demonstrate whether EG-VEGF is involved in the PPAR γ effect on trophoblast invasion, we determined the percentage of invasion of pre-labeled HTR-8/SVneo cells through Matrigel using the BD FluoroBlok™ cell culture inserts. The effect of rosiglitazone was also tested in the presence of the PROKR2 antagonist. Figure 5C shows that rosiglitazone significantly decreased HTR-8/SVneo cell invasion and that this effect was reversed in the presence of the PROKR2 antagonist suggesting that a part of rosiglitazone effect on HTR-8/SVneo invasion might be mediated by EG-VEGF signaling pathway. Quantification of the number of invading cells in each condition, in three independent experiments is reported in Figure 5D.

EG-VEGF mediates PPAR γ effect on trophoblast migration but not proliferation

As we showed that EG-VEGF contributes to the rosiglitazone inhibitory effects on trophoblast invasion, we wondered whether it also mediates rosiglitazone effects on trophoblast migration. Hence, we examined EG-VEGF effect on the migration of HTR-8/SVneo cells. Figure 6A shows representative photographs of HTR-8/SVneo monolayers at 0 h and 9 h after wounding with a pipet tip and subsequent incubation in the absence or presence of rosiglitazone, PROKR2 antagonist or rosiglitazone plus PROKR2 antagonist. At 9 h of culture, the wound in the control condition was closed at 30%. Rosiglitazone inhibits this process that was reversed in the presence of PROKR2 antagonists. Quantification of three independent experiments is reported in the Figure 6B.

We then determined the effect of rosiglitazone on HTR-8/SVneo proliferation in the absence or the presence of PROKR1 and PROKR2 antagonists. Figure 6C reports the effect of rosiglitazone on HTR-8/SVneo cell proliferation at 24 and 48 h in the absence or the presence of PROKR1 and PROKR2 antagonists. At 24 h neither rosiglitazone, nor EG-VEGF receptors antagonists affected HTR-8/SVneo proliferation. At 48 h we observed an inhibitory effect of rosiglitazone on HTR-8/SVneo cells proliferation. This effect was not affected by EG-VEGF receptors antagonists suggesting that rosiglitazone inhibitory effect on the proliferation does not directly involve the EG-VEGF signalling pathway. We also observed an inhibitory effect of PROKR1 and PROKR2 antagonists on HTR-8/SVneo proliferation. The inhibitory effect of the antagonists on HTR-8/SVneo proliferation was expected as we have previously shown that EG-VEGF stimulates trophoblast proliferation [18].

EG-VEGF effect on PPAR γ expression

Because of the similarities of action between PPAR γ and EG-VEGF on placental development, we wondered whether a loop of regulation exists between PPAR γ and EG-VEGF, in a way that EG-VEGF could also regulate PPAR γ expression. Using our explant model, we tested this hypothesis using a large range of EG-VEGF concentrations (5, 10, 25, 50 and 100 ng/ml). There was no effect of EG-VEGF on PPAR γ expression at low concentrations, however a significant increase in PPAR γ protein levels could be observed at higher concentrations, 50 and 100 ng/ml (Figure S7). These data suggest that a feed forward loop of regulation exists between these two proteins in the human placenta.

EG-VEGF expression is increased in PPAR γ knockout mice

PPAR γ knockout mice (PPAR $\gamma^{-/-}$) die at 9.5dpc from failure in placental development and vascularization [6,9]. We compared the levels of expression of EG-VEGF and its receptors in placentas collected at 8.5dpc from WT (PPAR $\gamma^{+/+}$), PPAR $\gamma^{+/-}$ and PPAR $\gamma^{-/-}$ mice. Figures 7 A, D and G show representative photographs of placental section at 8.5 dpc stained with anti-EG-VEGF, PROKR1 and PROKR2 antibodies, respectively. We observed an increase in EG-VEGF and PROKR2 expression (A, G) and a decrease in PROKR1 protein expression (D). These data were confirmed by western blotting analysis and quantification of protein levels in WT, PPAR $\gamma^{-/-}$ and PPAR $\gamma^{+/-}$. There was a significant increase in EG-VEGF (Figures 7B, 7C) and PROKR2 (Figures 7H, 7I) protein levels in PPAR $\gamma^{-/-}$ placental. PROKR1 protein was significantly decreased in PPAR $\gamma^{-/-}$ and PPAR $\gamma^{+/-}$ placental (Figures 7E, 7F).

Discussion

The present work demonstrates a new physiological regulation of EG-VEGF and its receptors by the major nuclear receptor PPAR γ . A feed-forward loop of regulation between PPAR γ and EG-VEGF could also be observed at high EG-VEGF concentrations. These results were based on the following findings i) PPAR γ increased EG-VEGF secretion, mRNA and protein expression, as well as the expression of its receptor, PROKR2; these effects being observed in placental explants as well as in primary trophoblast cultures ii) both the intra- and extra-villous processes controlled by PPAR γ , are in part mediated by EG-VEGF via the activation of its receptors PROKR1 and/or PROKR2, iii) EG-VEGF increased PPAR γ protein expression in human placental explants, iv) a compensatory mechanism with an increase in the EG-VEGF/PROKR2 system was observed, *in vivo*, in the PPAR γ ^{-/-} placentas. These finding suggests that other regulators of EG-VEGF/PROKR2 system might be activated in the placenta to ensure that gestation progresses in the absence of PPAR γ .

In the present study, we demonstrated that PPAR γ activation was sufficient to regulate EG-VEGF expression. While RXR α occupies a central position in the nuclear receptor superfamily, its activation or inhibition by specific ligands did not affect EG-VEGF expression. Such a type of activation has been described as one of the four possible types of regulation by the PPAR γ /RXR α system [33]. These findings suggest that only endogenous PPAR γ ligands and not RXR ligands are potential activators of EG-VEGF in the placenta.

Studies from the literature have mainly been focused on the role of PPAR γ in the control of human trophoblast differentiation including trophoblast invasion and syncytiotrophoblast functions [7,34]. Only a brief statement on placental vascular system disorganization was reported in PPAR γ -null mice [6,9]. Here we demonstrated, that PPAR γ agonist significantly increased intra-villous angiogenesis by increasing the endothelial cell marker CD31 in the explants culture model. These data further support the hypothesis that PPAR γ ^{-/-} placental defects might well be due to deregulations in EG-VEGF/ PROKR2 functions. In this study, we have also demonstrated that PPAR γ activation inhibits trophoblast proliferation independently of the EG-VEGF/PROKR2 system. This result is in line with a recent study that demonstrates an increase in trophoblast cell proliferation by the PPAR γ antagonist, T0070907 [35].

Previous studies from our group have reported the role of EG-VEGF in human placentation and proposed the EG-VEGF/ PROKR2 as new key system that contributes to the success of

the pregnancy [16,11]. EG-VEGF acts as a placental growth factor during the first trimester, as it increases trophoblast proliferation and intra-villous angiogenesis [16-18]. More importantly, we demonstrated that EG-VEGF controls early invasion of trophoblast cells into the maternal spiral arteries, a process that has also been shown to be controlled by Rosiglitazone in the human placenta [32]. Here we demonstrate that PPAR γ effects are in part mediated by EG-VEGF and its receptor PROKR2. This finding is of great importance as trophoblast invasion constitutes a key aspect of the establishment of the fetomaternal circulation by the end of the first trimester of pregnancy. Hence we stress that this finding will help to advance the understanding of the mechanism of trophoblast invasion. Through these inhibitory effects, the PPAR γ /EG-VEGF regulatory system protects the conceptus from the oxidative stress that might occur in case of a precocious invasion.

Because PPAR γ null mice die from defects resembling those controlled by EG-VEGF and as we demonstrate that PPAR γ regulates EG-VEGF/PROKR2 system, we propose that PPAR γ ^{-/-} mouse placental defects are in part due to a deregulation in the EG-VEGF signaling. However, unexpectedly, we observed an increase rather than a decrease in EG-VEGF levels of PPAR γ ^{-/-} mouse placental. These observations strongly suggest that a compensatory mechanism might have occurred in PPAR γ -null mice. Interestingly, the expression of the EG-VEGF/PROKR system has also been reported to be increased in pathological human pregnancies such as PE and IUGR [18,11].

In relation to its protective and mitogenic effect on trophoblasts and endothelial placental cells, we demonstrate that EG-VEGF also activates PPAR γ expression, suggesting that under stressful conditions, such as PPAR γ deficiency, PE and/or IUGR, the placenta might produce more EG-VEGF to activate PPAR γ production and/or alternative pathways ensuring the progress of the pregnancy. In line with this hypothesis a recent study of McCarthy et al who demonstrated that rosiglitazone administration ameliorated hypertension, improved vascular function, and reduced the elevated microalbumin/creatinine ratio in the preeclamptic rat model “RUPP” (reduced uterine perfusion pressure) [36]. Hence, one can speculate that the rosiglitazone beneficial effects might well be mediated by the EG-VEGF/PROKR activation in this model and that increased EG-VEGF levels observed might in turn increase PPAR γ expression supporting the proposed new loop of regulation between EG-VEGF and PPAR γ .

Hence, we propose that under normal conditions EG-VEGF is a likely target of PPAR γ to ensure placental development and angiogenesis, and in pathological conditions, EG-VEGF/PROKR might obey to additional regulatory systems that further increase its activity to ensure pregnancy progression and embryo/fetus survival.

In conclusion, we have demonstrated a new loop of regulation between two key regulators of placentation and brought new insight into the regulation of intra- and extra-villous angiogenesis.

Acknowledgments

We acknowledge the following sources of fundings: INSERM (U1036), University Joseph Fourier, Commissariat à l'Energie Atomique (DSV/iRTSV/BCI), Groupement des Entreprises Françaises pour la Lutte contre le Cancer (Comité Dauphiné-Savoie).

Figures legend

Figure. 1. PPAR γ effect on EG-VEGF secretion. **A.** EG-VEGF secretion levels in placental explants after treatment with 1 and 10 μ M of rosiglitazone at 30 min, 3h, 8h and overnight (ON) incubation. EG-VEGF levels were measured by ELISA. **B.** Inactivation of PPAR γ by T0070907 leads to a decrease in EG-VEGF secretion **C.** EG-VEGF secretion levels in primary trophoblast cells after treatment with 1 μ M of rosiglitazone during 24 h. Data are presented as mean \pm SEM (* p <0.05). Values overwritten with different letters are significantly different from each other.

Figure. 2. PPAR γ effect on EG-VEGF placental expression. **A.** Quantification of EG-VEGF mRNA levels in placental explants in response to rosiglitazone 10 μ M. **B.** Representative photographs of EG-VEGF staining (in brown) in placental explant (8 wg) treated or not with 10 μ M of rosiglitazone. **C.** shows a representative Western Blot analysis of EG-VEGF expression after 24 h of treatment with 10 μ M of rosiglitazone. Standardization of protein signals was done with antibodies against β -actin. Quantification of the intensity of the bands is illustrated on the graph shown in **D.** Data represent the mean \pm SEM. VCT: villous cytotrophoblast, ST syncytiotrophoblast (* p <0.05; ** p <0.01).

Figure. 3. PPAR γ effect on PROKR1 and PROKR2 expression. **A.** reports photographs of placental explant (8 wg) sections immunostained with anti-PROKR1 antibody (a, b) or anti PROKR2 antibody (c, d) after 8 h of treatment in the absence or the presence of 10 μ M rosiglitazone. **B.** reports representative Western Blot analysis that compares PROKR1 expression between placental explants treated or not with 10 μ M rosiglitazone during 8 h. Quantification of the intensity of the bands is shown below. **C.** Representative Western Blot of PROKR2 expression after overnight of treatment with 10 μ M of rosiglitazone. Standardization of protein signals was done with antibodies against β -actin. Quantification of the intensity of the bands is illustrated below (* p <0.05). VCT: villous cytotrophoblast, ST: syncytiotrophoblast.

Figure. 4. EG-VEGF mediates PPAR γ effect on placental vascularization. **A.** Representative photographs of CD31 staining in placental explants treated or not with rosiglitazone (10 μ M) during 24 h. **B. C. and D.** report representative Western Blot analyses that compare CD31 expression in control placental explants versus explants treated with

10 μ M of rosiglitazone, in the absence or presence of PROKR1-antagonist (1 μ M), PROKR2-antagonist (1 μ M) or the both during 24 h. Quantification of the intensity of the bands is illustrated below. Standardization of protein signals was done with antibodies against β -actin protein (*p <0.05). Values overwritten with different letters are significantly different from each other

Figure. 5. EG-VEGF mediates PPAR γ effect on trophoblast invasion. **A.** shows rosiglitazone effect on EVCT invasion in culture of placental explants. **B.** Representative Western Blot of PROKR2 expression after 24 h of treatment with 10 μ M of rosiglitazone in HTR-8/SVneo cell. Standardization of protein signals was done with antibodies against β -actin. Quantification of the intensity of the bands is illustrated below (**p<0.01). **C.** reports representative photographs of HTR-8/SVneo invasion that have been treated or not with 10 μ M of rosiglitazone, in the absence or the presence of PROKR2-antagonist (1 μ M). Quantification of HTR-8/SVneo invasion is reported in D (*p<0.05). Values overwritten with different letters are significantly different from each other.

Figure. 6. EG-VEGF mediates PPAR γ effect on trophoblast migration but not proliferation. Panel **A** shows photographs of wounded HTR-8/SVneo monolayers, at 0, and 9 hours post-wounding. The plots in panel **B** show percentages of wound closure after 9 h of treatment with rosiglitazone in the absence or the presence of PROKR2-antagonist (1 μ M). Bars with different letters are significantly different from each other (*p<0.05). Panel **C** reports rosiglitazone (10 μ M) effect on HTR-8/SVneo cell proliferation at 24 and 48 h of incubation in the absence or the presence of PROKR1 (1 μ M) and PROKR2-antagonists (1 μ M) (*p<0.05; ***p<0.001).

Figure.7. EG-VEGF PROKR1 and PROKR2 expression in WT, PPAR γ ^{-/-} and PPAR γ ^{+/-}. Panels **A, D and G** show photographs that compares stainings of EG-VEGF, PROKR1 and PROKR2 in placental sections collected WT versus PPAR γ ^{-/-} placenta at 8.5 dpc. Panels **B, E and H** show representative Western blotting analysis that compares EG-VEGF, PROKR1 and PROKR2 protein, respectively, in placenta collected from WT, PPAR γ ^{-/-} and PPAR γ ^{+/-}. Panels **C, F and I** report the graphs of the quantification of EG-VEGF, PROKR1 and PROKR2 protein levels, respectively, in placenta collected from WT, PPAR γ ^{-/-} and PPAR γ ^{+/-} (*p<0.05; **p<0.01). **D:** decidua; **EC:** ectoplacental cone.

Figure. S1. PPAR γ effect on EG-VEGF expression is transcriptional. The graph reports EG-VEGF levels of secretion by placental explants treated or not with rosiglitazone 10 μ M, 50 μ g/mL DRB (inhibitor of transcription), or both. EG-VEGF levels were measured by ELISA (* p <0.05). Values overwritten with different letters are significantly different from each other.

Figure. S2. RXR activation does not affect EG-VEGF expression. **A.** reports representative photographs of EG-VEGF staining in placental explants treated or not with Ro25 (4 μ M), Ro26 (4 μ M) during 8 h. **B.** reports EG-VEGF secretion levels in placental explants after treatment with 4 μ M of Ro25, 4 μ M of Ro26 during 8 h. EG-VEGF levels were measured by ELISA. **C.** reports EG-VEGF secretion levels in placental explants after treatment with 10 μ M of Rosiglitazone, 4 μ M of Ro25 or both during 8 h. EG-VEGF levels were measured by ELISA (* p <0.05; ** p <0.001). Values overwritten with different letters are significantly different from each other.

Figure. S3 Characterization of PROKR1 inhibitory effect in BHK cells overexpressing PROKR1 receptor. Panel **A** shows photographs of wounded BHK-R1 monolayers, at 0, and 9 hours post-wounding. The plots in panel **B** show percentages of wound closure after 9h of treatment with EG-VEGF in the absence or the presence of PROKR1-antagonist (1 μ M). Bars with different letters are significantly different from each other (* p <0.05).

Figure. S4 Characterization of PROKR1 inhibitory effect in BHK cells overexpressing PROKR2 receptor. Panel **A** shows photographs of wounded BHK-R1 monolayers, at 0, and 9 hours post-wounding. The plots in panel **B** show percentages of wound closure after 9h of treatment with EG-VEGF in the absence or the presence of PROKR2-antagonist (1 μ M). Bars with different letters are significantly different from each other (* p <0.05).

Figure. S5 Characterization of PROKR2 inhibitory effect in BHK cells overexpressing PROKR2 receptor. Panel **A** shows photographs of wounded BHK-R1 monolayers, at 0, and 9 hours post-wounding. The plots in panel **B** show percentages of wound closure after 9h of treatment with EG-VEGF in the absence or the presence of PROKR2-antagonist (1 μ M). Bars with different letters are significantly different from each other (* p <0.05).

Figure. S6 Characterization of PROKR2 inhibitory effect in BHK cells overexpressing PROKR1 receptor. Panel **A** shows photographs of wounded BHK-R1 monolayers, at 0, and 9 hours post-wounding. The plots in panel **B** show percentages of wound closure after 9h of treatment with EG-VEGF in the absence or the presence of PROKR2-antagonist (1 μ M). Bars with different letters are significantly different from each other (* p <0.05).

Fig. S7: EG-VEGF effect on PPAR γ expression. Representative Western Blot analysis of PPAR γ expression after 24 h treatment with 5, 10, 25, 50 and 100 ng/mL of EG-VEGF. Two Western blotting analyses are shown in panels **A and B**. Standardization of protein signals was done with antibodies against β -actin. Quantification of the intensity of the bands is illustrated in panel **C** (* p <0.05).

References

1. Kaufmann P, Mayhew TM, Charnock-Jones DS (2004) Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. II. Changes during normal pregnancy. *Placenta* 25 (2-3):114-126. doi:10.1016/j.placenta.2003.10.009
2. Charnock-Jones DS, Kaufmann P, Mayhew TM (2004) Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. I. Molecular regulation. *Placenta* 25 (2-3):103-113. doi:10.1016/j.placenta.2003.10.004
3. Pijnenborg R, Robertson WB, Brosens I, Dixon G (1981) Review article: trophoblast invasion and the establishment of haemochorial placentation in man and laboratory animals. *Placenta* 2 (1):71-91
4. Sibai B, Dekker G, Kupferminc M (2005) Pre-eclampsia. *Lancet* 365 (9461):785-799. doi:10.1016/S0140-6736(05)17987-2
5. Desvergne B, Michalik L, Wahli W (2004) Be fit or be sick: peroxisome proliferator-activated receptors are down the road. *Mol Endocrinol* 18 (6):1321-1332. doi:10.1210/me.2004-0088
6. Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, Koder A, Evans RM (1999) PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell* 4 (4):585-595
7. Fournier T, Tsatsaris V, Handschuh K, Evain-Brion D (2007) PPARs and the placenta. *Placenta* 28 (2-3):65-76. doi:10.1016/j.placenta.2006.04.009
8. Sapin V, Ward SJ, Bronner S, Chambon P, Dolle P (1997) Differential expression of transcripts encoding retinoid binding proteins and retinoic acid receptors during placentation of the mouse. *Dev Dyn* 208 (2):199-210. doi:10.1002/(SICI)1097-0177(199702)208:2<199::AID-AJA7>3.0.CO;2-D
9. Kubota N, Terauchi Y, Miki H, Tamemoto H, Yamauchi T, Komeda K, Satoh S, Nakano R, Ishii C, Sugiyama T, Eto K, Tsubamoto Y, Okuno A, Murakami K, Sekihara H, Hasegawa G, Naito M, Toyoshima Y, Tanaka S, Shiota K, Kitamura T, Fujita T, Ezaki O, Aizawa S, Kadowaki T, et al. (1999) PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell* 4 (4):597-609
10. Nadra K, Quignodon L, Sardella C, Joye E, Mucciolo A, Chrast R, Desvergne B (2010) PPARgamma in placental angiogenesis. *Endocrinology* 151 (10):4969-4981. doi:10.1210/en.2010-0131
11. 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 (8B):2224-2235. doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00554.x
12. 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 (4):1675-1684. doi:10.1210/en.2005-0912
13. 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 (22):19276-19280. doi:10.1074/jbc.M202139200
14. 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 (1):396-402. doi:10.1016/S0006-291X(02)00239-5
15. 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 (2-3):173-179
16. 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 (16):2832-2843. doi:10.1091/mbc.E10-01-0059
17. Brouillet S, Hoffmann P, Feige JJ, Alfaidy N (2012) EG-VEGF: a key endocrine factor in placental development. *Trends Endocrinol Metab* 23 (10):501-508. doi:10.1016/j.tem.2012.05.006

18. Brouillet S, Murthi P, Hoffmann P, Salomon A, Sergent F, De Mazancourt P, Dakouane-Giudicelli M, Dieudonne MN, Rozenberg P, Vaiman D, Barbaux S, Benharouga M, Feige JJ, Alfaidy N (2013) EG-VEGF controls placental growth and survival in normal and pathological pregnancies: case of fetal growth restriction (FGR). *Cell Mol Life Sci* 70 (3):511-525. doi:10.1007/s00018-012-1141-z
19. Rieusset J, Seydoux J, Anghel SI, Escher P, Michalik L, Soon Tan N, Metzger D, Chambon P, Wahli W, Desvergne B (2004) Altered growth in male peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) heterozygous mice: involvement of PPARgamma in a negative feedback regulation of growth hormone action. *Mol Endocrinol* 18 (10):2363-2377. doi:10.1210/me.2003-0325
20. Handschuh K, Guibourdenche J, Guesnon M, Laurendeau I, Evain-Brion D, Fournier T (2006) Modulation of PAPP-A expression by PPARgamma in human first trimester trophoblast. *Placenta* 27 Suppl A:S127-134. doi:10.1016/j.placenta.2005.10.012
21. Kliman HJ, Nestler JE, Sermasi E, Sanger JM, Strauss JF, 3rd (1986) Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinology* 118 (4):1567-1582. doi:10.1210/endo-118-4-1567
22. Tarrade A, Lai Kuen R, Malassine A, Tricottet V, Blain P, Vidaud M, Evain-Brion D (2001) Characterization of human villous and extravillous trophoblasts isolated from first trimester placenta. *Lab Invest* 81 (9):1199-1211
23. Graham CH, Hawley TS, Hawley RG, MacDougall JR, Kerbel RS, Khoo N, Lala PK (1993) Establishment and characterization of first trimester human trophoblast cells with extended lifespan. *Exp Cell Res* 206 (2):204-211
24. 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 (10):4797-4805. doi:10.1210/jc.2002-020310
25. Alfaidy N, Li W, MacIntosh T, Yang K, Challis J (2003) Late gestation increase in 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 expression in human fetal membranes: a novel intrauterine source of cortisol. *J Clin Endocrinol Metab* 88 (10):5033-5038. doi:10.1210/jc.2002-021915
26. Congiu C, Onnis V, Deplano A, Salvadori S, Marconi V, Maftei D, Negri L, Lattanzi R, Balboni G (2014) A new convenient synthetic method and preliminary pharmacological characterization of triazinediones as prokineticin receptor antagonists. *European journal of medicinal chemistry* 81:334-340. doi:10.1016/j.ejmech.2014.05.030
27. Ralbovsky JL, Lisko JG, Palmer JM, Mabus J, Chevalier KM, Schulz MJ, Dyatkin AB, Miskowski TA, Coats SJ, Hornby P, He W (2009) Triazinediones as prokineticin 1 receptor antagonists. Part 1: SAR, synthesis and biological evaluation. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 19 (10):2661-2663. doi:10.1016/j.bmcl.2009.03.157
28. Curtis VF, Wang H, Yang PY, McLendon RE, Li XH, Zhou QY, Wang XF (2013) A PK2/Bv8/PROK2 Antagonist Suppresses Tumorigenic Processes by Inhibiting Angiogenesis in Glioma and Blocking Myeloid Cell Infiltration in Pancreatic Cancer. *PloS one* 8 (1). doi:ARTN e54916
DOI 10.1371/journal.pone.0054916
29. Ren P, Zhang H, Qiu F, Liu YQ, Gu H, O'Dowd DK, Zhou QY, Hu WP (2011) Prokineticin 2 regulates the electrical activity of rat suprachiasmatic nuclei neurons. *PloS one* 6 (6):e20263. doi:10.1371/journal.pone.0020263
30. Guilini C, Urayama K, Turkeri G, Dedeoglu DB, Kurose H, Messaddeq N, Nebigil CG (2010) Divergent roles of prokineticin receptors in the endothelial cells: angiogenesis and fenestration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298 (3):H844-852. doi:10.1152/ajpheart.00898.2009
31. Ngan ES, Shum CK, Poon HC, Sham MH, Garcia-Barcelo MM, Lui VC, Tam PK (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 (3):467-478. doi:10.1016/j.bbamcr.2007.09.005
32. Tarrade A, Schoonjans K, Pavan L, Auwerx J, Rochette-Egly C, Evain-Brion D, Fournier T (2001) PPARgamma/RXRalpha heterodimers control human trophoblast invasion. *J Clin Endocrinol Metab* 86 (10):5017-5024. doi:10.1210/jcem.86.10.7924

33. Aranda A, Pascual A (2001) Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev* 81 (3):1269-1304
34. Schaiff WT, Barak Y, Sadovsky Y (2006) The pleiotropic function of PPAR gamma in the placenta. *Molecular and cellular endocrinology* 249 (1-2):10-15. doi:10.1016/j.mce.2006.02.009
35. Levytska K, Drewlo S, Baczyk D, Kingdom J (2014) PPAR- gamma Regulates Trophoblast Differentiation in the BeWo Cell Model. *PPAR Res* 2014:637251. doi:10.1155/2014/637251
36. McCarthy FP, Drewlo S, Kingdom J, Johns EJ, Walsh SK, Kenny LC (2011) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma as a potential therapeutic target in the treatment of preeclampsia. *Hypertension* 58 (2):280-286. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.172627

Figure 1

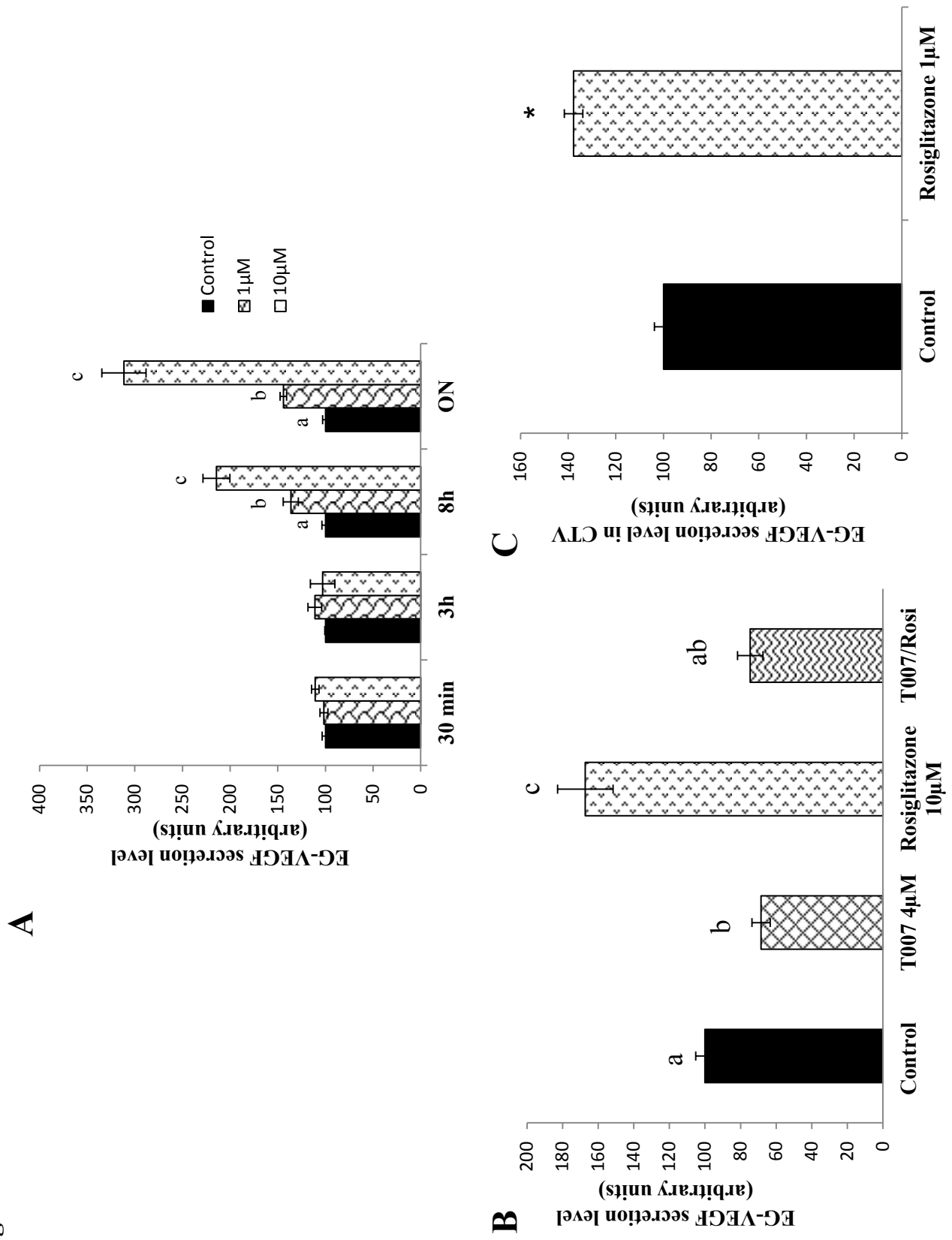


Figure 2

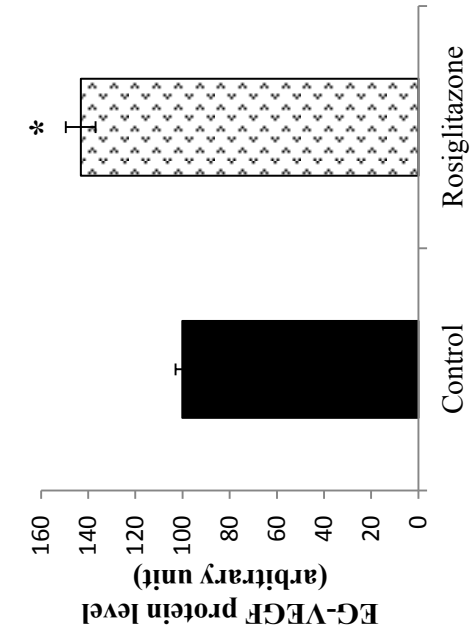
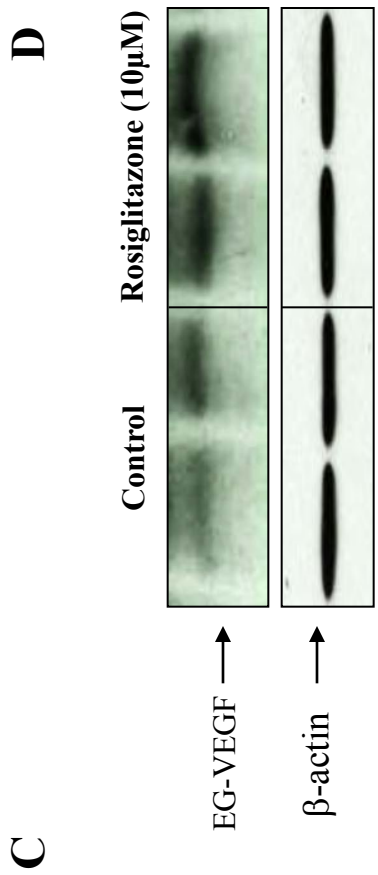
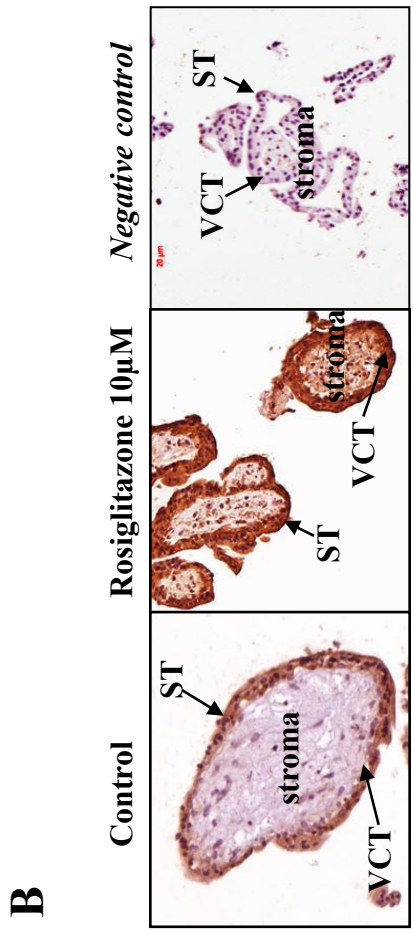
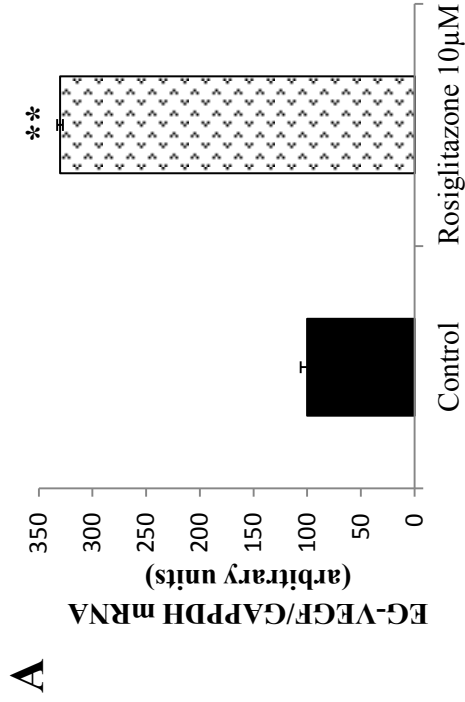


Figure 3

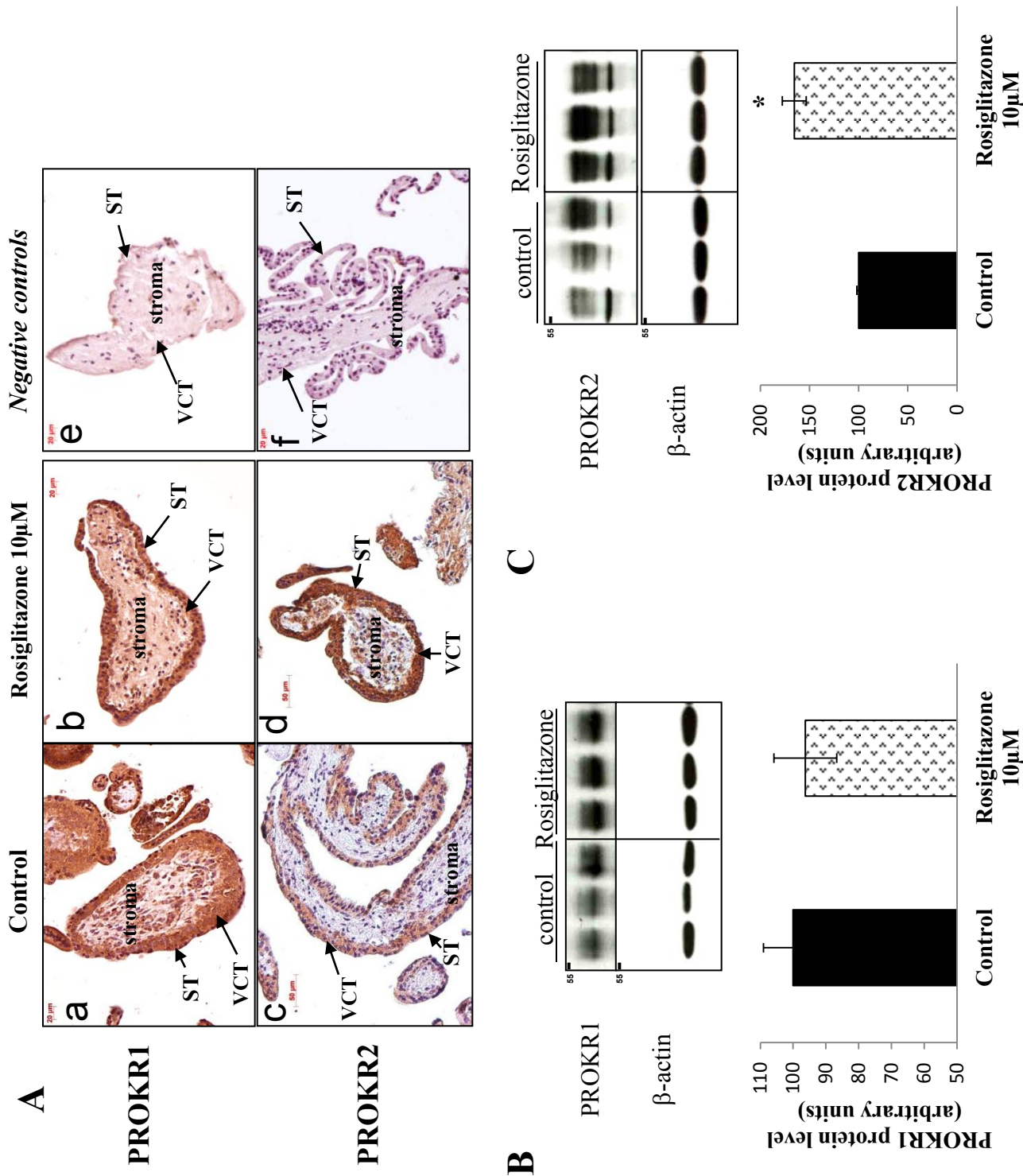


Figure 4

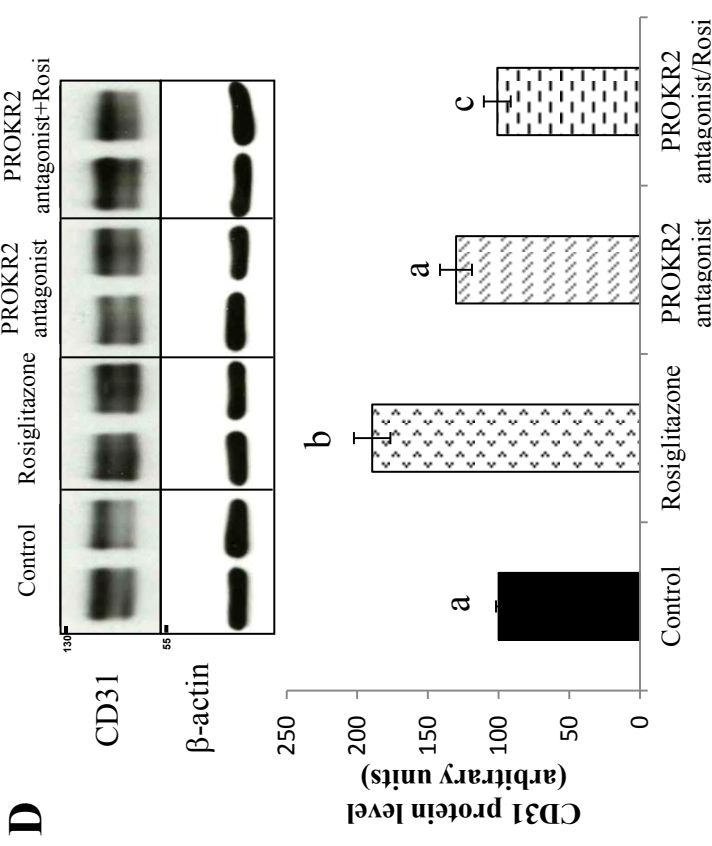
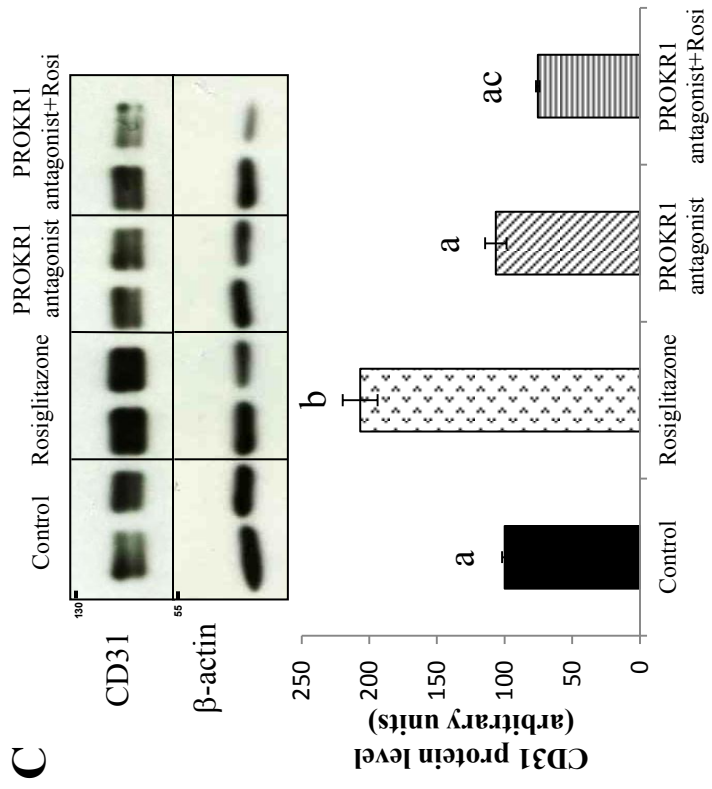
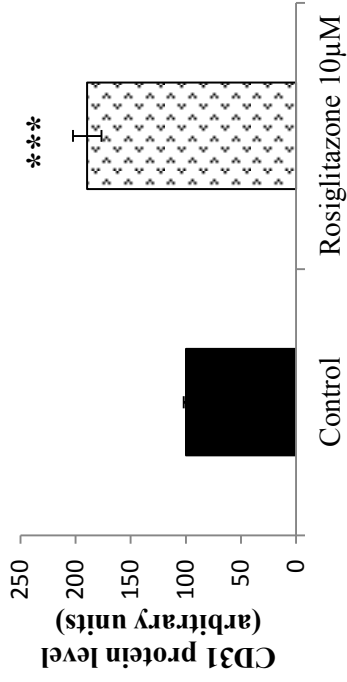
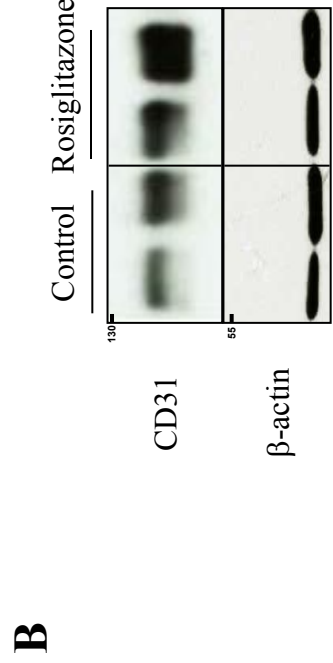
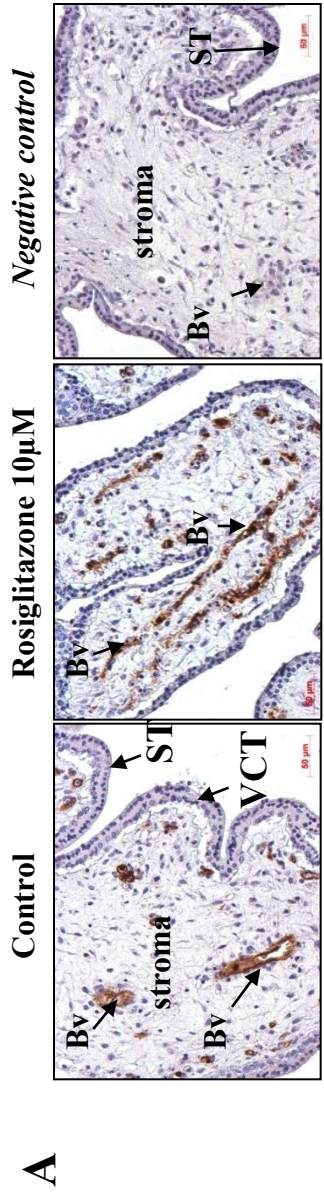
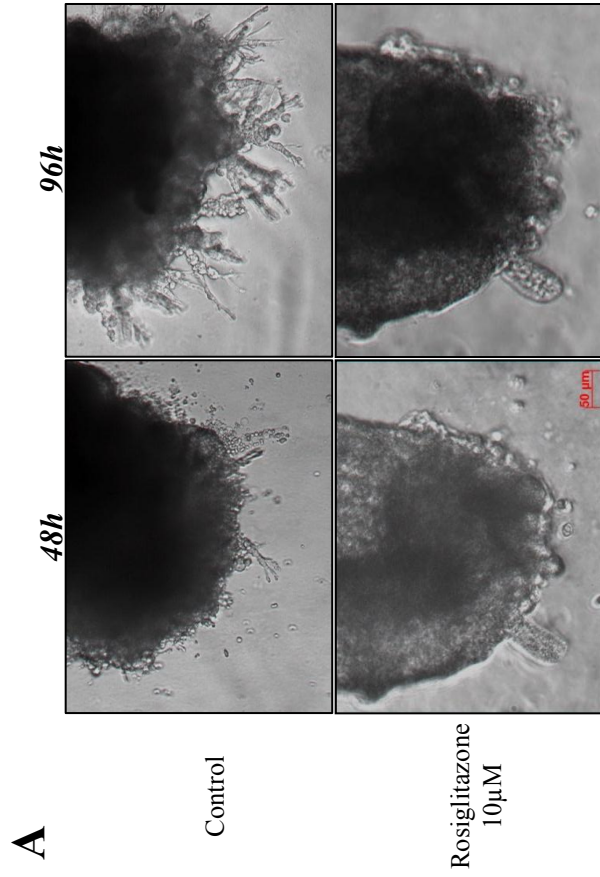
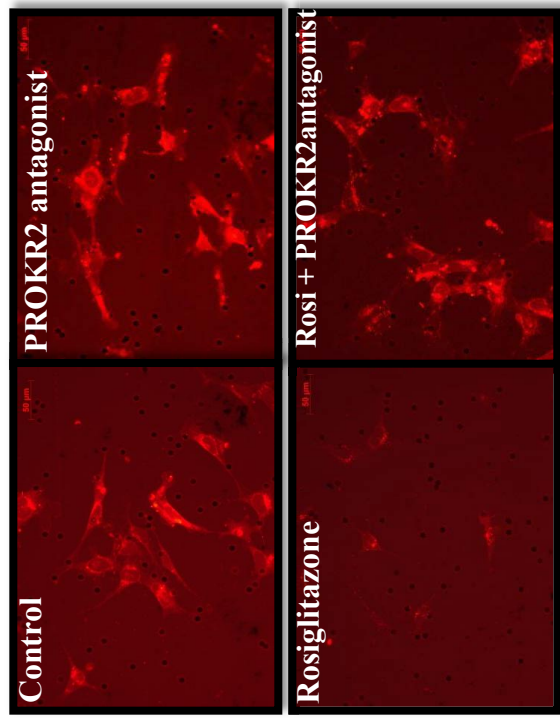


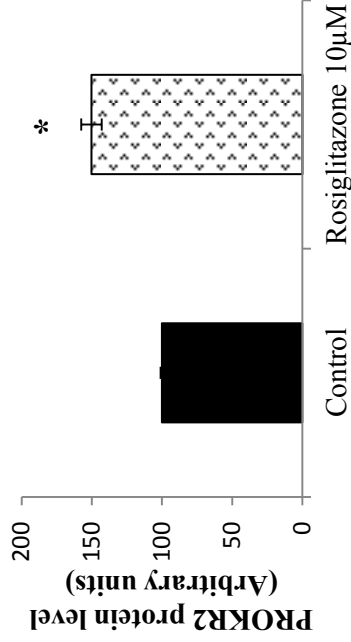
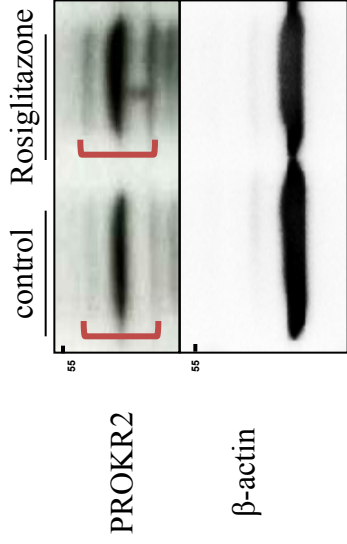
Figure 5



C



B



D

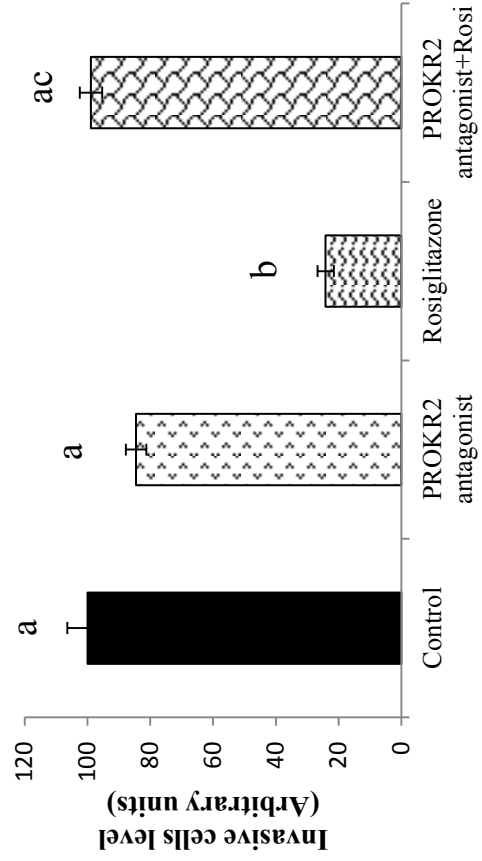


Figure 6

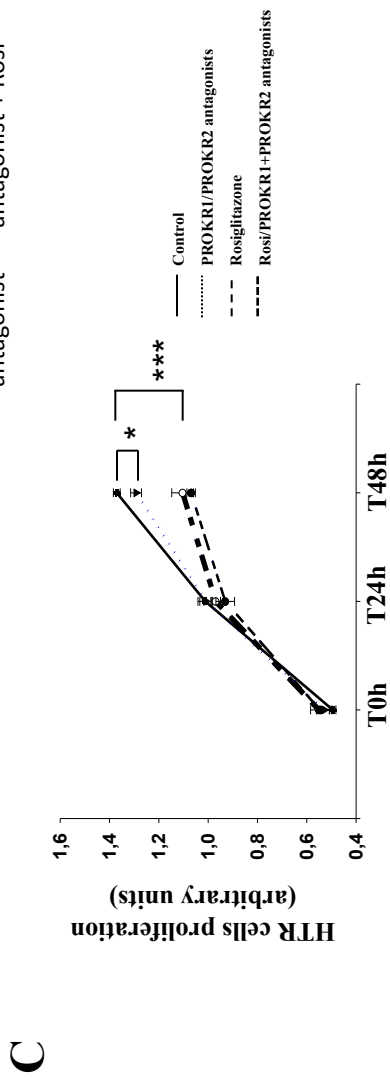
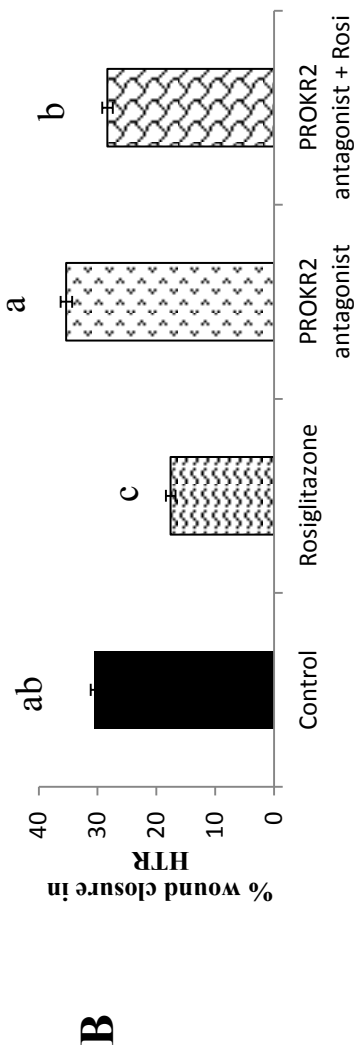
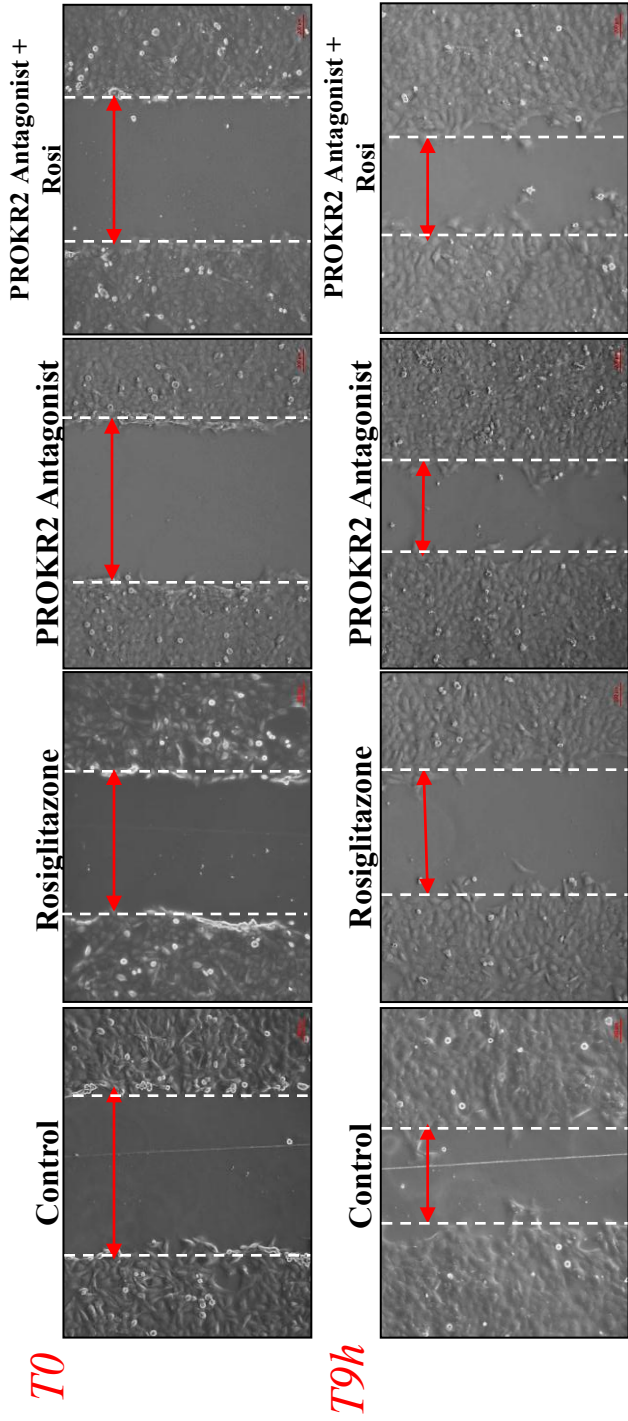


Figure 7

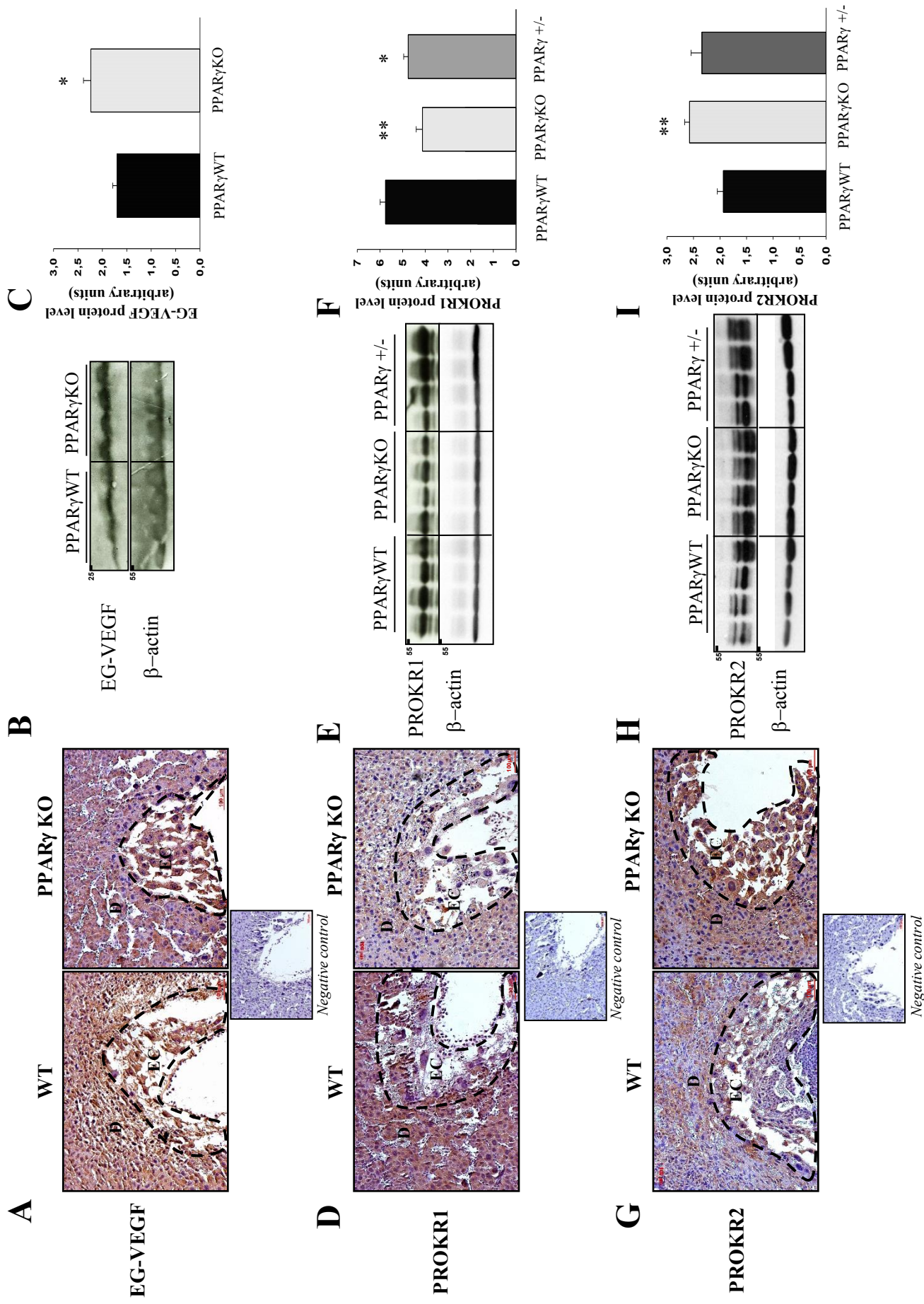


Figure S1

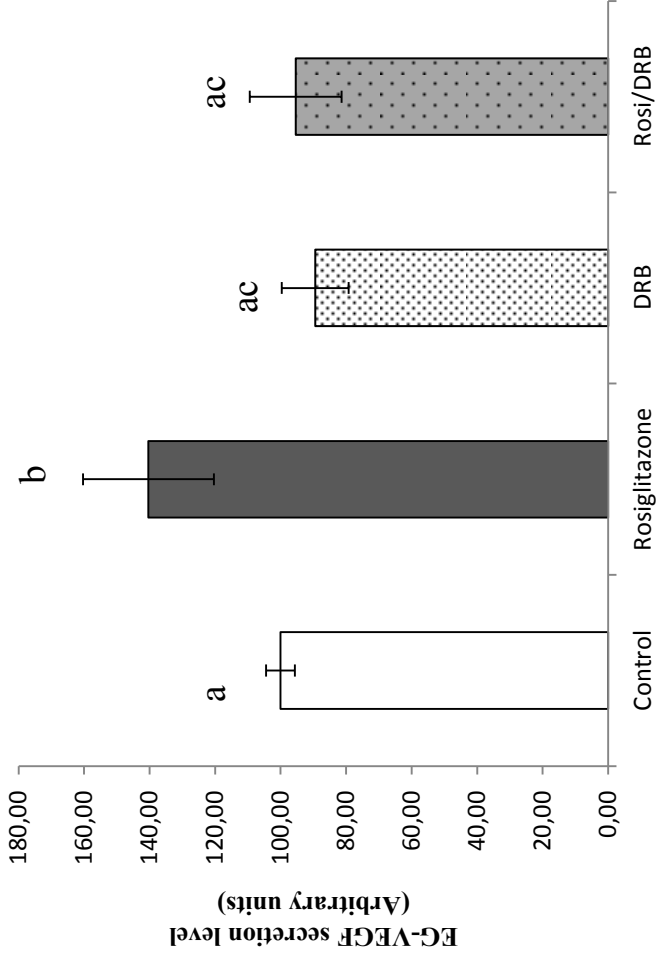
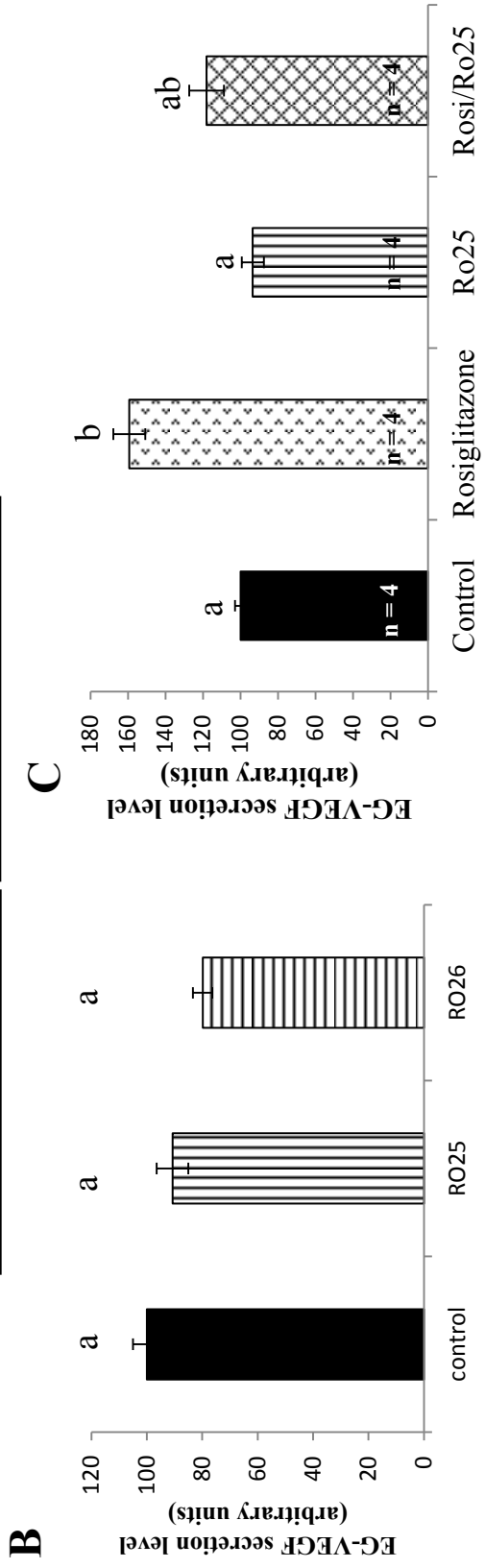
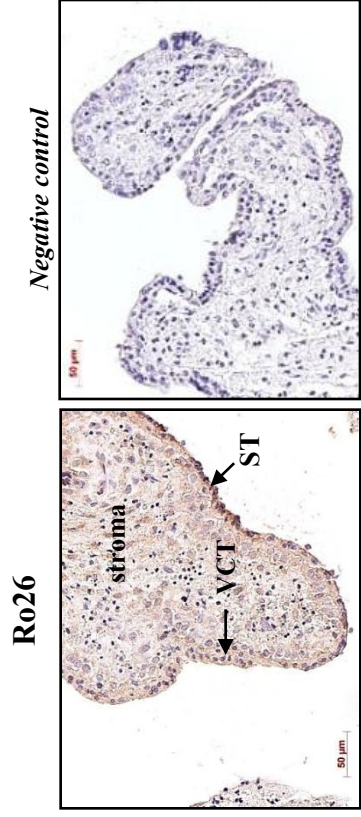
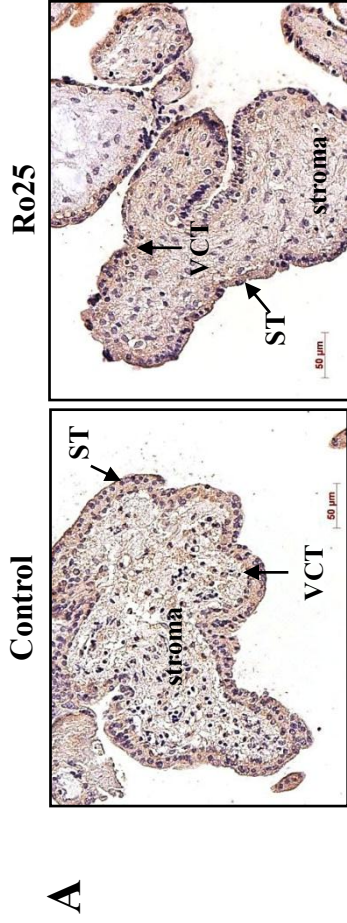
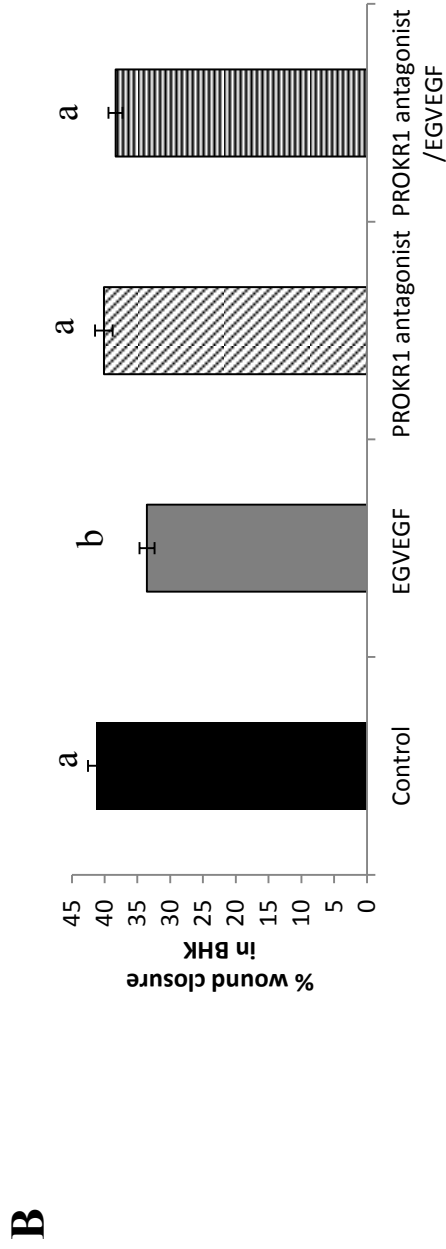
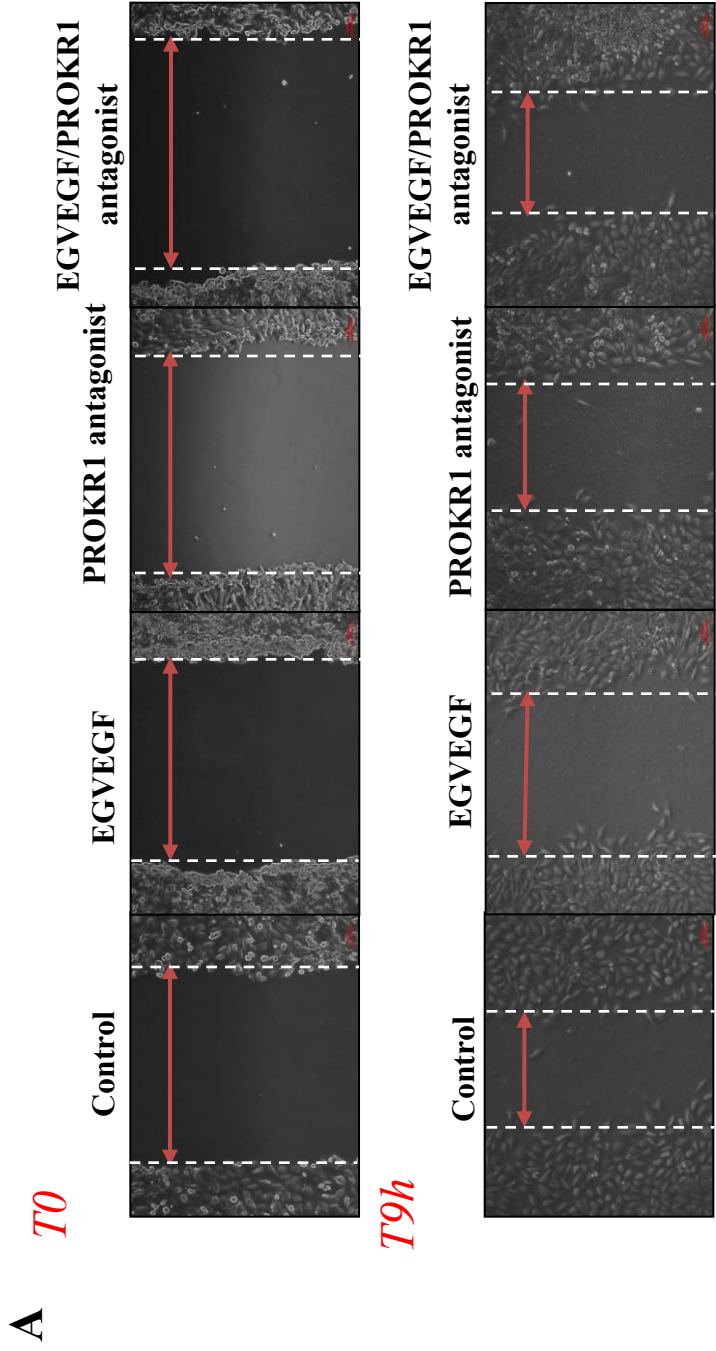
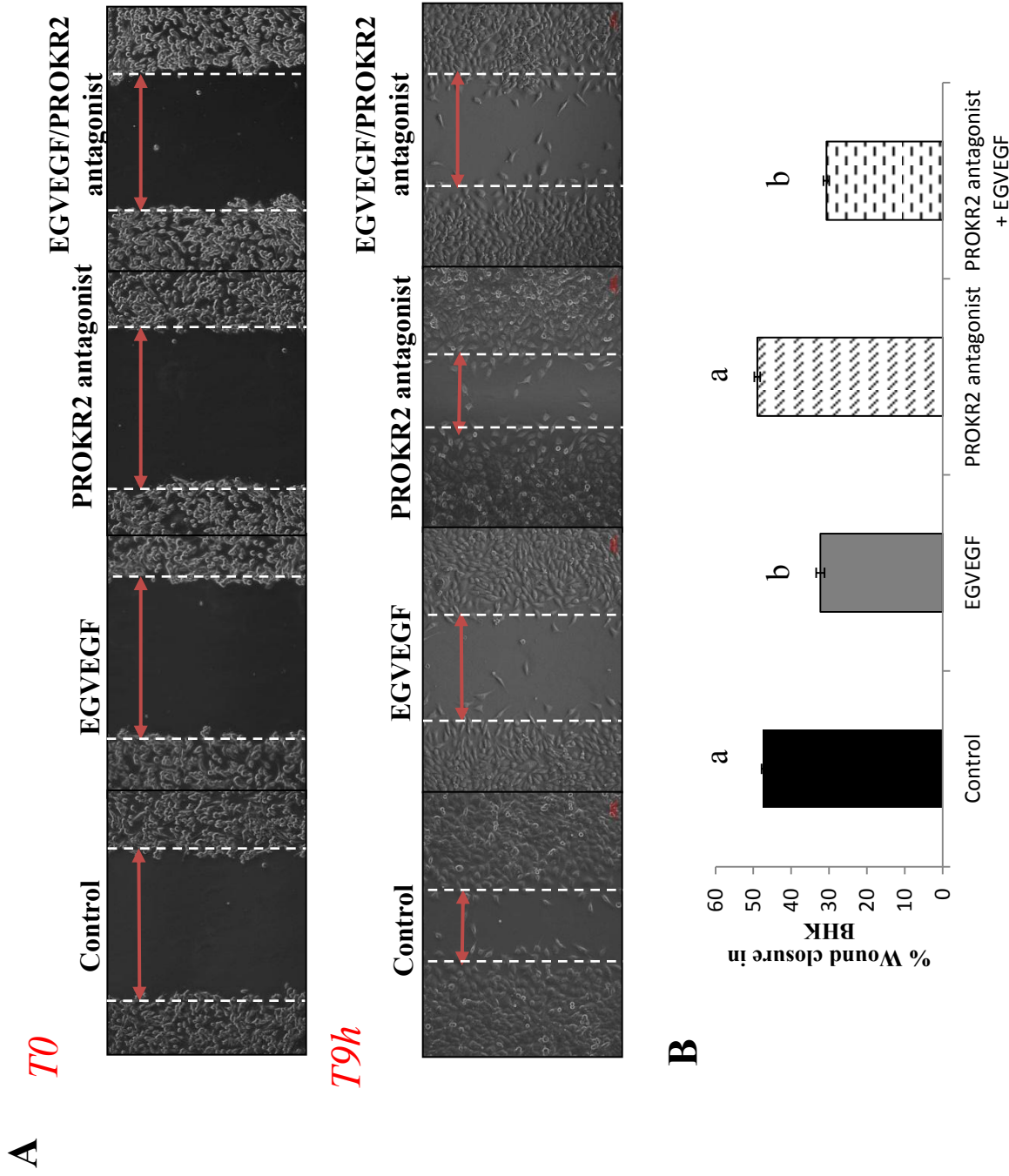
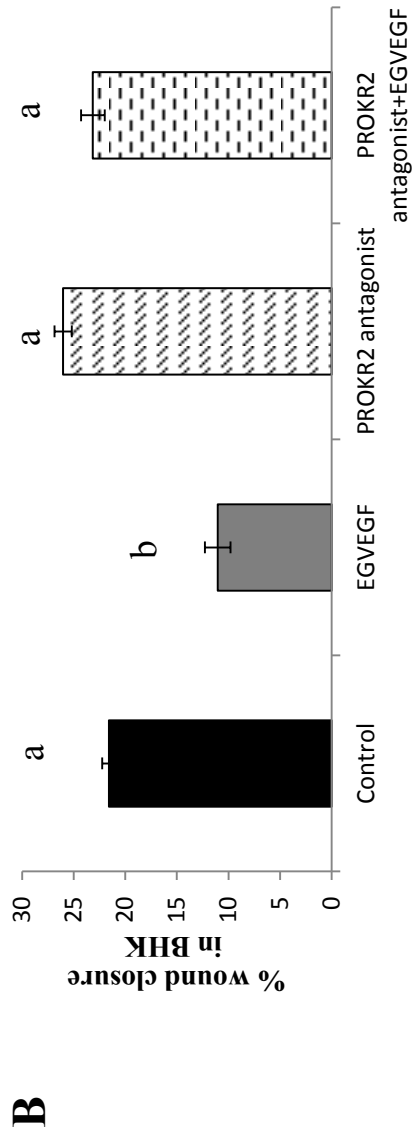
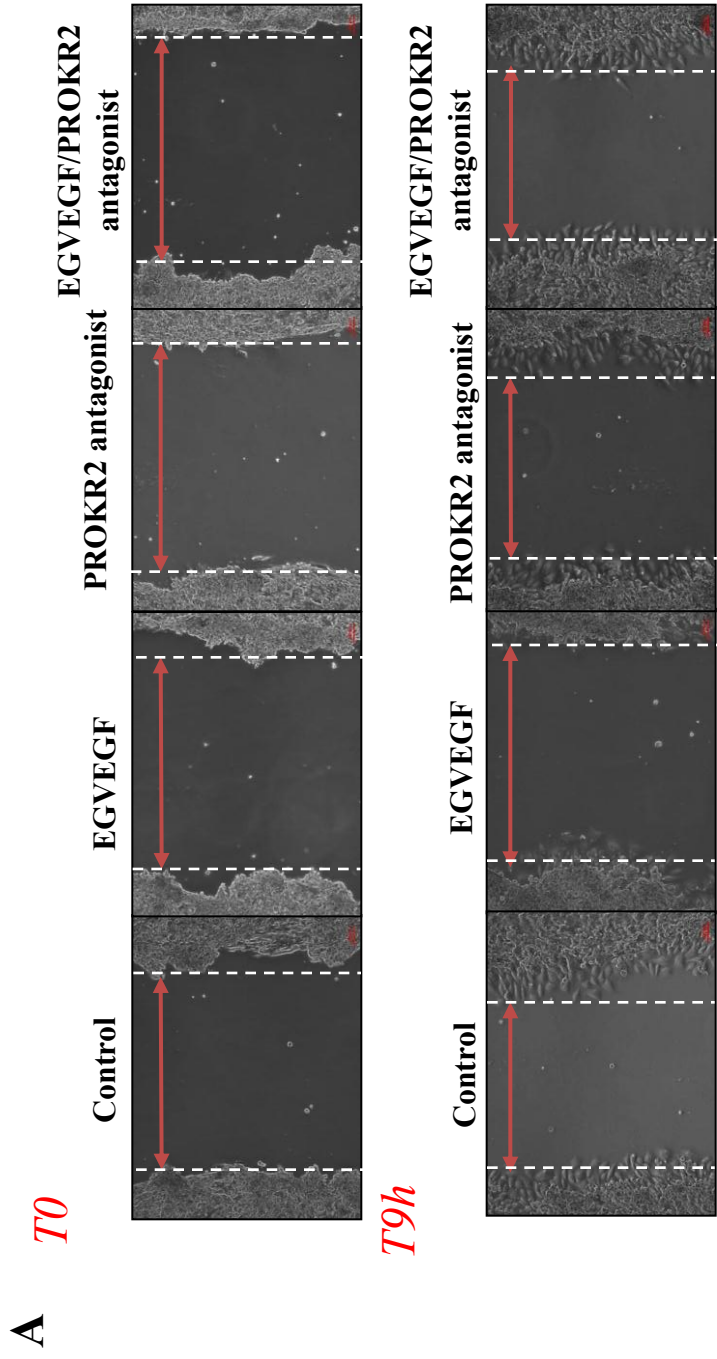


Figure S2









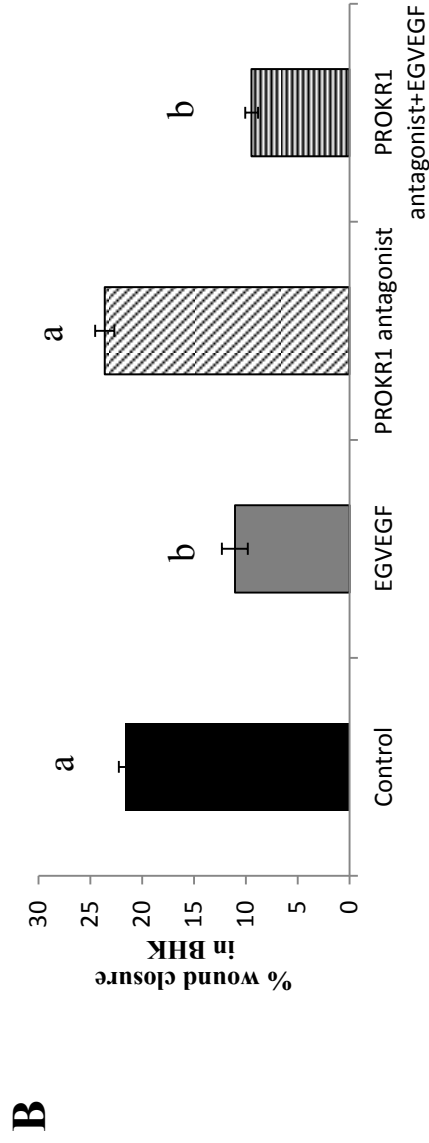
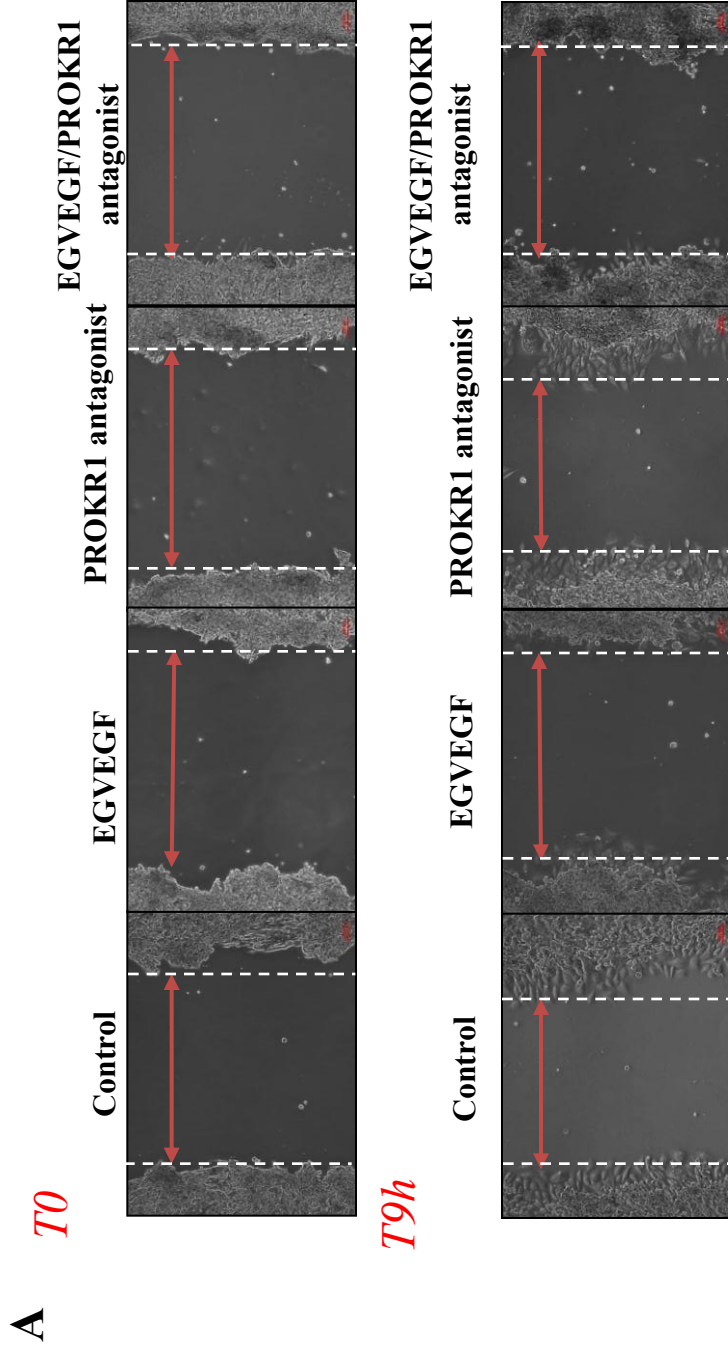
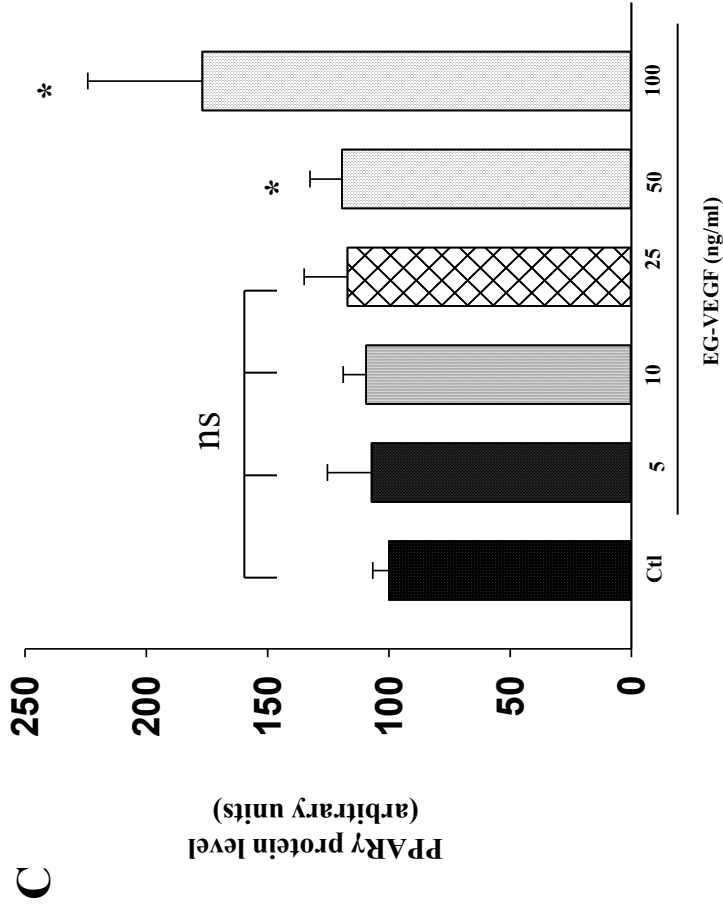
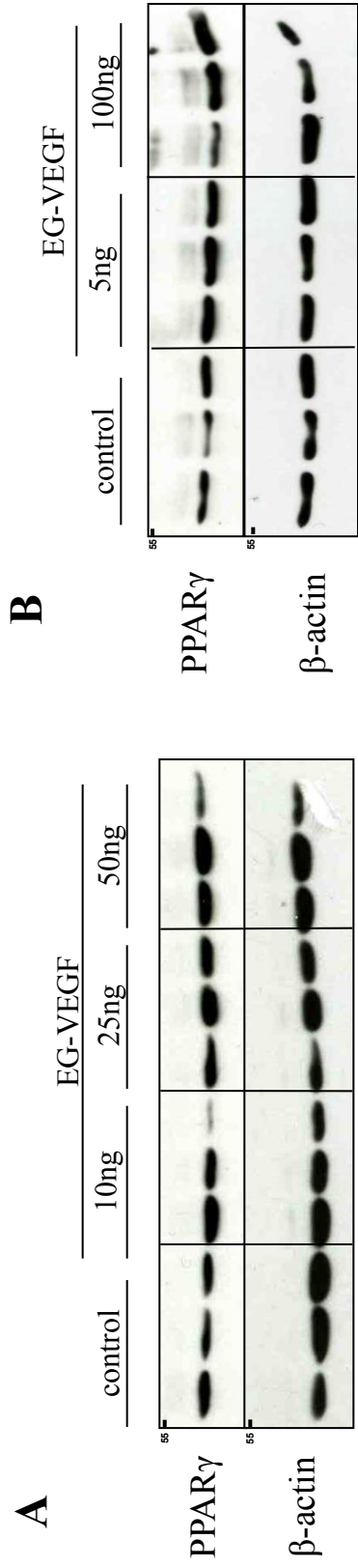


Figure S7



1.2 Discussion de la première publication

1.2.1. Résumé des résultats

A travers cet article, nous avons montré que PPAR γ régule à la fois la sécrétion et l'expression en ARNm et en protéine de l'EG-VEGF, ainsi que l'expression protéique de PROKR2. Par ailleurs, l'ensemble de ces résultats démontrent que les effets de PPAR γ sur la vascularisation intra-villositaire et sur l'invasion trophoblastiques seraient en partie orchestrés par l'EG-VEGF via PROKR1 et PROKR2 et via PROKR2, respectivement.

1.2.1.1. Effet de PPAR γ sur la sécrétion de l'EG-VEGF

Les résultats du dosage de la sécrétion de l'EG-VEGF par ELISA montrent que l'activation de l'hétérodimère PPAR γ /RXR α par la rosiglitazone, un agoniste de PPAR γ , induit une augmentation significative de la sécrétion de l'EG-VEGF à partir de 8 heures de traitement. De façon intéressante, le traitement des explants par le T0070907, un antagoniste de PPAR γ , induit une diminution significative de la sécrétion de l'EG-VEGF à la fois au niveau basal et stimulé par la rosiglitazone. Par ailleurs, l'EG-VEGF étant principalement exprimé dans le syncytiotrophoblaste, des cultures primaires de cytotrophoblastes villositaires différenciés en syncytium ont également été réalisées. Le traitement des cytotrophoblastes par de la rosiglitazone pendant 24 heures montre que l'activation de l'hétérodimère PPAR γ /RXR α induit également une élévation significative de la sécrétion de l'EG-VEGF.

1.2.1.2. Effet de PPAR γ sur l'expression placentaire de l'EG-VEGF et de ses récepteurs

Nous avons démontré par q-PCR, Western Blot et immunohistochimie que l'expression placentaire de l'EG-VEGF, aussi bien en ARNm que protéique, était aussi sous le contrôle de PPAR γ . Son activation par son agoniste synthétique induit une hausse de la synthèse de l'EG-VEGF. Par ailleurs, nous avons également montré que le traitement par la rosiglitazone augmente l'expression protéique de PROKR2. En revanche, l'expression de PROKR1 n'est pas modifiée.

1.2.1.3. Effet de RXR sur la sécrétion et l'expression de l'EG-VEGF

PPAR γ requiert obligatoirement son hétérodimérisation avec RXR α pour se lier à ses éléments de réponse, nous avons, par conséquent, vérifié si ce récepteur nucléaire pouvait jouer un rôle dans la régulation de l'expression de l'EG-VEGF. Le traitement des explants placentaires par le Ro25, un agoniste des pan-RXR et le Ro26, un antagoniste des pan-RXR n'a montré aucun effet significatif sur l'expression et la sécrétion de cette cytokine.

De plus, aucun effet synergique ou additif n'a été relevé lorsque nous traitions simultanément les explants placentaires par de la rosiglitazone et du Ro25.

1.2.1.4. Effet de l'EG-VEGF sur l'expression de PPAR γ

Afin de vérifier l'existence d'une éventuelle boucle de régulation entre l'EG-VEGF et PPAR γ , nous avons traité les explants placentaires par l'EG-VEGF (5, 10, 25, 50 et 100 ng/mL) et étudié l'expression protéique de PPAR γ . Les résultats de Western blot ont révélé qu'à 50 et 100 ng/mL, l'EG-VEGF induit une augmentation significative du niveau protéique de PPAR γ . Ces résultats suggèrent que lorsque l'EG-VEGF est présent à des taux élevés, une telle boucle de régulation se forme dans le placenta humain.

1.2.1.5. L'EG-VEGF contribue à l'effet de PPAR γ sur la vascularisation utéroplacentaire

Aussi bien par immunohistochimie que par Western Blot, nous avons démontré que l'activation de PPAR γ par la rosiglitazone augmente significativement l'expression du marqueur endothélial CD31. Cet effet est diminué en présence, soit de l'antagoniste PROKR1, soit de l'antagoniste PROKR2 suggérant, une implication directe de l'EG-VEGF dans le contrôle de la vascularisation régulé par le PPAR γ .

1.2.1.6. L'EG-VEGF contribue à l'effet de PPAR γ sur l'invasion trophoblastique

PPAR γ a été décrit comme un répresseur de l'invasion trophoblastique dans un modèle *in vitro* (Tarrade et al. 2001). Cependant, aucune expérience n'avait été réalisée sur un modèle *ex vivo*. Ainsi, nous confirmons, dans le modèle d'explants placentaires, le rôle inhibiteur de l'activation de PPAR γ dans l'invasion trophoblastique. En effet, la rosiglitazone inhibe significativement l'invasion des cytotrophoblastes extravilleux dans le matrigel. Par ailleurs, l'EG-VEGF a été décrit comme étant également un facteur contrôlant ce processus physiologique (Hoffmann et al. 2009). Nous avons donc recherché une implication potentielle de l'EG-VEGF dans l'effet de PPAR γ sur l'invasion trophoblastique. Pour ce faire, nous avons utilisé la lignée cellulaire de cytotrophoblastes extravilleux invasifs, les HTR-8/SVneo. Nous avons démontré que ces cellules exprimaient le PROKR2 et que le traitement par la rosiglitazone induisait une élévation de l'expression de ce récepteur. Par la technique des chambres de Transwell, nous avons montré que l'activation de PPAR γ par la rosiglitazone inhibe l'invasion ainsi que la migration des HTR-8/SVneo et que ces effets sont abolis lorsque

nous ajoutons l'antagoniste de PROKR2. En outre, nous avons mis en évidence que PPAR γ est impliqué dans l'inhibition de la prolifération après 48 heures de culture. Cependant, son action ne passerait ni par PROKR1 ni par PROKR2 et donc ne ferait donc pas intervenir l'EG-VEGF. Par ailleurs, nous avons démontré que le traitement simultané des antagonistes PROKR1 et PROKR2, induit également une diminution significative de la prolifération des HTR-8/SVneo à 48 heures, résultat en accord avec des travaux antérieurs (Brouillet et al. 2013).

1.2.1.7. Expression de l'EG-VEGF dans les placentas murins invalidés pour PPAR γ

Afin de valider nos observations *ex vivo* sur des cultures d'explants placentaires, nous avons comparé les niveaux d'expression de l'EG-VEGF et de ses récepteurs dans des placentas murins sauvages, hétérozygotes pour le gène PPAR γ (PPAR $\gamma^{+/-}$) et invalidés pour ce gène (PPAR $\gamma^{-/-}$) à E8,5. De manière inattendue, nous avons constaté qu'en absence de PPAR γ , le niveau d'expression de l'EG-VEGF et de PROKR2 est augmenté tandis que celui de PROKR1 est diminué par rapport à leurs niveaux d'expression dans les placentas sauvages. Une diminution significative du taux protéique de PROKR1 est également observée dans les placentas PPAR $\gamma^{+/-}$ en comparaison de celui constaté dans les placentas sauvages.

1.2.2. Conclusion

L'ensemble de ces données a permis de mettre en évidence une nouvelle voie de régulation de l'expression de l'EG-VEGF et de son récepteur PROKR2 par le récepteur nucléaire PPAR γ . En outre, cette étude apporte une meilleure caractérisation des défauts placentaires engendrés par l'inactivation de PPAR γ . Nous montrons l'implication directe de ce récepteur nucléaire dans la mise en place de la vascularisation placentaire avec la participation des deux récepteurs PROKR1 et PROKR2. De plus, l'inhibition de l'invasion trophoblastique par PPAR γ fait intervenir l'EG-VEGF via son récepteur PROKR2. Ces mêmes protagonistes participent également à l'inhibition de la migration trophoblastique. Enfin, l'étude de l'expression de l'EG-VEGF et de ses récepteurs dans des placentas invalidés pour le PPAR γ a révélé l'existence d'un mécanisme compensatoire : le système EG-VEGF/PROKR2 est augmenté dans les placentas PPAR γ ^{-/-}, suggérant que d'autres régulateurs pourraient être activés afin d'assurer la progression de la gestation en absence de PPAR γ .

1.2.3. Discussion des résultats

1.2.3.1. Expression de l'EG-VEGF dans le modèle murin invalidé pour PPAR γ

Afin de corroborer nos résultats obtenus dans les explants placentaires humains, nous avons étudié l'expression de l'EG-VEGF et de ses récepteurs PROKR1 et PROKR2 dans des placentas issus de souris invalidées pour le gène PPAR γ . Ces souris furent obtenues dans le cadre d'une collaboration avec le Pr. Béatrice Desvergne de l'université de Lausanne. En raison de la mortalité précoce des embryons vers E10,5, les placentas furent prélevés à E8,5. Ayant démontré que PPAR γ régule le système EG-VEGF/PROKR2, nous supposons que les défauts placentaires observés chez les embryons PPAR γ ^{-/-} seraient en partie liés à une dérégulation de la voie EG-VEGF. Or, nous avons constaté une élévation de l'expression de l'EG-VEGF ainsi que de PROKR2 suggérant l'établissement d'un mécanisme compensatoire. Une augmentation de ce système EG-VEGF/PROKR2 a déjà été décrite dans des pathologies de la grossesse telles que la PE et le RCIU (Hoffmann et al. 2009 ; Brouillet et al. 2013). Une autre interprétation possible afin d'expliquer ce phénomène serait l'induction d'autres voies de signalisation impliquées dans la régulation de l'expression de l'EG-VEGF. L'expression de cette cytokine est régulée dans le système reproducteur de la femme par les hormones stéroïdes (les œstrogènes et la progestérone), par l'hypoxie, et plus particulièrement par la molécule HIF-1, ou encore l'hormone chorionique gonadotrope, (hCG) (Battersby et al. 2004 ; Ngan et al. 2006 ; Hoffmann et al. 2006 ; Maldonado-Pérez et al. 2007 ; Brouillet et al. 2012). En outre, il a été rapporté que l'activation de PPAR γ par son agoniste, la rosiglitazone,

dans des cultures primaires de CTEV, induit une diminution significative du niveau de transcrit des sous unités α et β et de la sécrétion de l'hCG totale (Handsouch et al. 2009). Ainsi, nous pouvons supposer, qu'une diminution de l'expression de PPAR γ lèverait l'inhibition de la synthèse de l'hCG. Une élévation de l'expression de ce dernier pourrait ainsi entraîner une augmentation de l'expression de l'EG-VEGF. De la même manière, l'absence de l'expression de PPAR γ entraîne des défauts de la différenciation et de l'invasion trophoblastique responsable d'une hypoxie placentaire. Dans cet environnement pauvre en oxygène, l'expression de l'EG-VEGF pourrait alors croître.

1.2.3.2. Nouvelle boucle de régulation entre l'EG-VEGF et PPAR γ

Nous démontrons qu'à de fortes concentrations, l'EG-VEGF active également l'expression de PPAR γ . Ceci suggère que sous des conditions extrêmes, telles qu'une déficience de PPAR γ ou dans des cas de PE et/ou de RCIU, le placenta produit d'avantage d'EG-VEGF afin d'activer la production de PPAR γ ou bien d'activer des voies alternatives pour permettre la poursuite de la grossesse. Chez les femmes développant la PE et le RCIU, nous avons précédemment montré que le niveau d'EG-VEGF était augmenté par rapport à celui des femmes enceintes au même terme (Hoffmann et al. 2009 ; Brouillet et al. 2013). De façon intéressante, une étude récente, menée par McCarthy et al. a démontré que l'administration de la rosiglitazone améliorait les symptômes de la PE comme l'hypertension et l'élévation de la microalbumine/créatinine (McCarthy et al 2011). Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggère l'existence d'une nouvelle boucle de régulation entre l'EG-VEGF et PPAR γ .

1.2.3.3. PPAR γ et l'EG-VEGF sont impliqués dans l'inhibition de l'invasion trophoblastique

Notre étude nous a permis de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'inhibition de l'invasion trophoblastique, phénomène essentiel pour le bon déroulement de la grossesse et de la croissance intra-utérine du fœtus. L'étroite co-expression de PPAR γ et de son partenaire obligatoire RXR α au niveau des CTEV en prolifération à la base de la villosité crampon (Fournier et al. 2007) avait déjà inspiré l'implication de cet hétérodimère dans la régulation de l'invasion trophoblastique (Tarrade et al. 2001). Au sein de ces mêmes cellules, seul le récepteur PROKR2 est présent, suggérant que l'action inhibitrice de l'EG-VEGF, exprimé et sécrété au niveau des CTV et du ST, sur l'invasion trophoblastique, est orchestrée par l'activation de PROKR2 au niveau des CTEV (Hoffmann et al. 2009). Leurs effets communs dans la villosité chorale, nous ont conduit à explorer la possibilité de l'existence

d'une régulation de l'EG-VEGF par PPAR γ ou inversement. Cette notion fut renforcée après l'analyse *in silico* du promoteur de l'EG-VEGF qui mit en évidence la présence de sites potentiels de liaison à l'hétérodimère PPAR γ /RXR α . Nous avons donc débuté notre étude par l'effet de PPAR γ sur la sécrétion de l'EG-VEGF, puis sur son expression intra-villositaire. Les résultats confirmèrent notre hypothèse, et d'une manière intéressante, nous montrâmes également que PPAR γ régule positivement PROKR2. Ainsi nous pouvions supposer que l'effet de PPAR γ sur l'inhibition de l'invasion trophoblastique se manifeste non seulement par une élévation de l'expression et de la sécrétion de l'EG-VEGF au niveau des CTV et ST, mais aussi par une augmentation de l'expression de PROKR2 dans les CTEV. L'effet inhibiteur de l'EG-VEGF est, par conséquent, amplifié. Le traitement simultané par l'antagoniste PROKR2 et l'agoniste de PPAR γ , corrobora cet axiome, puisque que nous perdions en même temps l'inhibition de l'invasion et de la migration de cellules trophoblastiques invasives (HTR-8/SVneo). Ainsi, les effets inhibiteurs du système PPAR γ /EG-VEGF préviennent d'une invasion trophoblastique trop précoce et protègent l'embryon des dommages engendrés par un stress oxydatif.

1.2.3.4. PPAR γ et l'EG-VEGF sont impliqués dans la vascularisation utéro-placentaire

Chez la souris, la vascularisation placentaire est initiée autour de E8,5. D'une manière intéressante, l'apparition de ce processus coïncide avec la forte expression de PPAR γ dans le placenta (Barak et al. 1999). Cette concordance de temps suggère que ce récepteur nucléaire pourrait être impliqué dans la vascularisation intra-villositaire. L'hypothèse fut renforcée par le phénotype des placentas issus de souris invalidées pour le gène PPAR γ (Barak et al. 1999 ; Kubota et al. 1999). Ces derniers présentaient des défauts de différenciation trophoblastique, mais surtout un défaut de la vascularisation utéro-placentaire. A ce jour, aucune étude montrant l'effet direct de PPAR γ sur la vascularisation intra-villositaire n'a encore été réalisée. Par ailleurs, l'EG-VEGF fut décrit comme un nouveau facteur angiogénique (Brouillet al. 2010 ; LeCouter et al. 2001) et l'expression de ses récepteurs fut rapportée au niveau des cellules endothéliales placentaires micro-vasculaires (HPEC) (Brouillet al. 2010). Pour la première fois, nous montrons dans cette étude que PPAR γ induit une élévation du marqueur endothéliale CD31 dans le modèle d'explants placentaires. Cet effet est inhibé avec les traitements par l'antagoniste PROKR1 ou par l'antagoniste PROKR2, suggérant l'implication de l'EG-VEGF dans ce processus. Ainsi, ces données sont en accord avec l'hypothèse selon laquelle les défauts observés dans les placentas PPAR γ ^{-/-} seraient liés à des

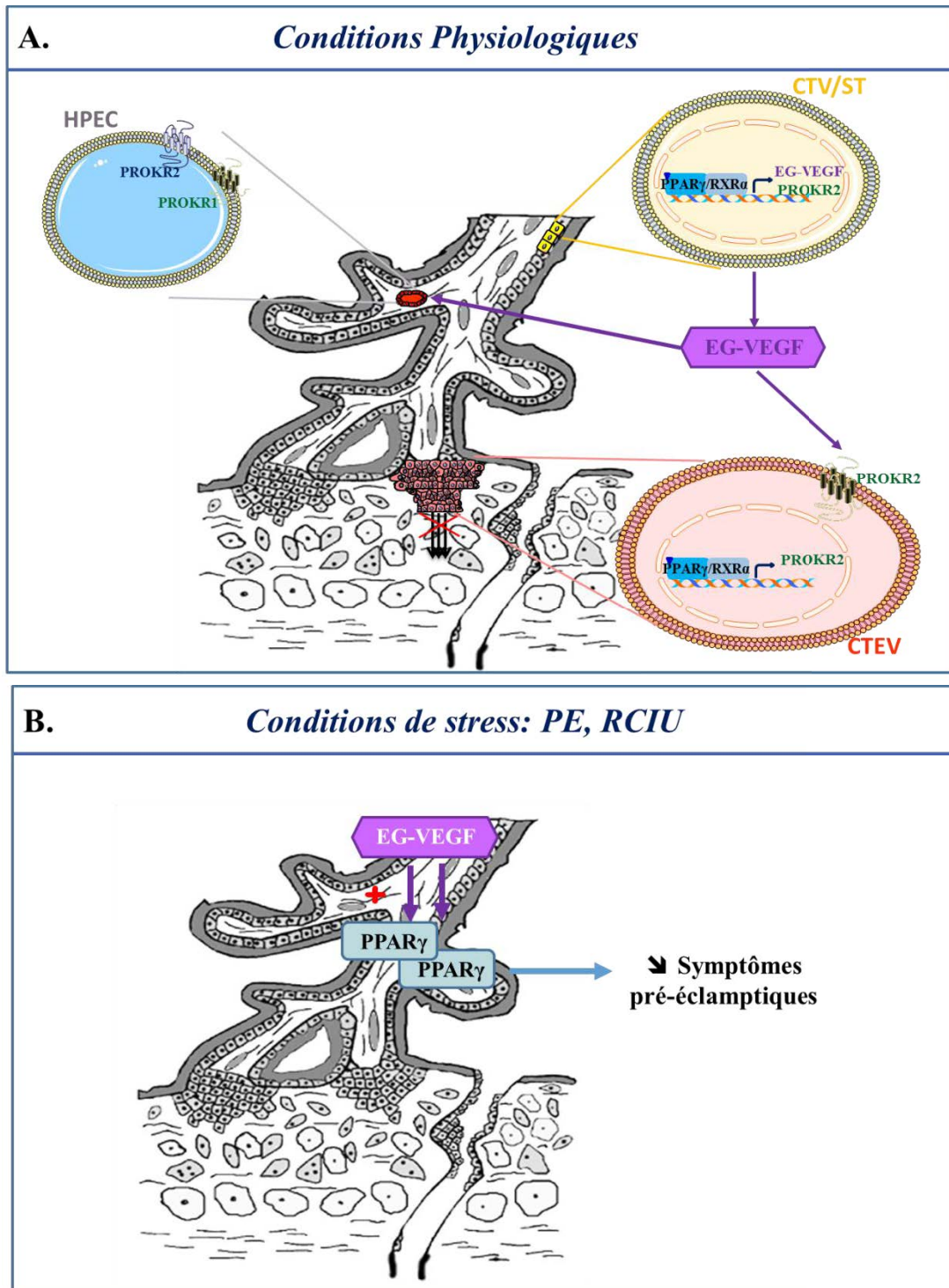


Figure 39: Mécanismes de régulation de PPAR γ sur l'invasion trophoblastique et la vascularisation placentaire

A. Dans des conditions normales, PPAR γ induit l'expression de l'EG-VEGF et de PROKR2. L'EG-VEGF favorise alors la vascularisation intra-villositaire, via ses deux récepteurs, PROKR1 et PROKR2, tandis qu'au niveau des CTEV, il inhibe l'invasion trophoblastique en passant par PROKR2. **B.** Dans des conditions de stress, l'EG-VEGF augmenterait l'expression de PPAR γ afin que ce dernier puisse diminuer les dérégulations et les défauts liés au développement de la PE et/ou le RCIU.

dérégulations des fonctions du système EG-VEGF/PROKR2. Afin d'affiner ces résultats des expérimentations sur les cellules endothéliales microvasculaires, les HPEC, sont en cours.

Par ailleurs, nous avons également démontré que l'activation de PPAR γ induit une inhibition de la prolifération des cellules trophoblastiques HTR-8/SVneo et que cet effet n'implique pas le système EG-VEGF/PROKRs. Ce résultat est en accord avec les travaux récents démontrant une augmentation de la prolifération des cellules trophoblastiques (Bewo) à la suite d'un traitement par l'antagoniste de PPAR γ , le T0070907 (Levyska et al. 2014).

En conclusion, nous avons démontré une nouvelle boucle de régulation entre deux régulateurs clés de la placentation et apporté de nouvelles données sur la régulation intra-angiogénique ainsi que sur l'invasion trophoblastique (Figure 39).

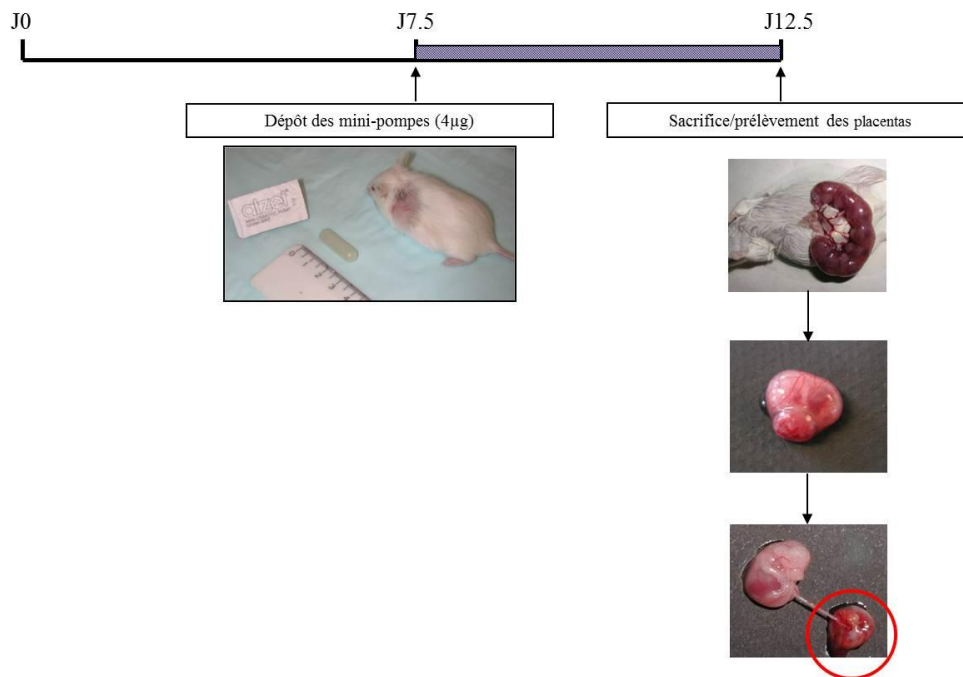


Figure 40 : Protocole expérimental de la surexpression de l'EG-VEGF

Une mini-pompe osmotique délivrant 4 µg d'EG-VEGF en 7 jours (0,5 µL/h) est déposée chez les souris gestantes à 7,5 jpc. A E12,5, les placentas sont prélevés avant d'être disséqués, digérés, immunomarqués par des anticorps spécifiques des marqueurs hématopoïétiques et/ou endothéliaux et analysés par cytométrie en flux.

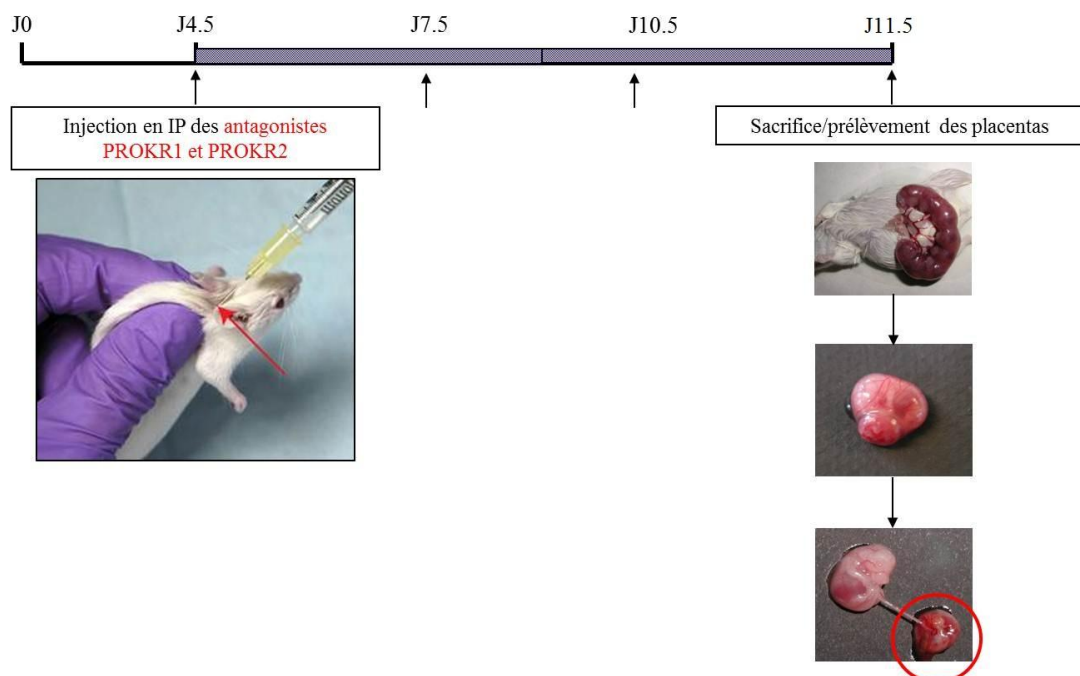


Figure 41 : Protocole expérimentale de l'antagonisation de l'EG-VEGF

Les souris gestantes sont injectées à 4,5 jpc, 7,5 jpc et 10,5 jpc en sous-cutané avec soit un antagoniste de PROKR1, soit un antagoniste de PROKR2 ou bien avec les deux. A E11,5 les cellules placentaires sont dissociées et immunomarquées par des anticorps spécifiques de marqueurs de cellules de lignages différents et analysés par cytométrie en flux.

II. Détermination du rôle de l'EG-VEGF dans la différenciation hématopoïétique placentaire

2.1 Contexte et présentation de la publication

Le deuxième projet s'articule autour de la recherche du rôle potentiel de l'EG-VEGF dans la différenciation hématopoïétique au début de la gestation. Cette dernière décennie, des études ont mis en évidence que les placentas humains et murins constituent des niches mais aussi des sites de génération des cellules souches hématopoïétiques. Par ailleurs, LeCouter et al. ont montré que les prokinétines (BV8 et EG-VEGF) jouent un rôle direct dans la différenciation hématopoïétique au niveau de la moelle osseuse (LeCouter et al. 2004). A ce jour, il existe très peu de données concernant les régulateurs potentiels d'une différenciation vers des cellules angioblastiques et/ou hématopoïétiques dans le placenta. En raison de l'expression importante de l'EG-VEGF au cours du premier trimestre chez l'humain, de son pic d'expression qui précède le pic de l'activité hématopoïétique chez la souris, de ses effets sur la différenciation des cellules hématopoïétiques au niveau de la moelle osseuse et de son rôle pro-angiogène au sein de la villosité placentaire, nous nous sommes intéressés à la détermination de son rôle dans les différenciations hématopoïétique et angiogénique placentaires humaine et murine.

L'étude *in vivo* vise à déterminer l'effet de l'EG-VEGF sur la différenciation hématopoïétique et endothéliale. Pour ce faire, deux approches sont menées, soit une surexpression de l'EG-VEGF par la pose d'une mini-pompe osmotique délivrant en continu de l'EG-VEGF, soit en antagonisant ce facteur pro-angiogène à l'aide de traitements par des antagonistes de ses récepteurs, PROKR1 et de PROKR2. Les souris gestantes sont traitées à 7,5 jpc et les placentas sont prélevés à 12,5 jpc, dans le cas de la surexpression de l'EG-VEGF (Figure 40), tandis que pour l'antagonisation de l'effet de EG-VEGF, les souris gestantes sont injectées à 4,5 jpc, 7,5 jpc et 10,5 jpc en sous-cutané avec, soit un antagoniste de PROKR1, soit un antagoniste de PROKR2 ou bien avec les deux (Figure 41). Les cellules placentaires sont ensuite dissociées et immunomarquées par des anticorps spécifiques de marqueurs de cellules de lignages différents pour être enfin analysées par cytométrie en flux. Nous avons comparé les niveaux d'expression de marqueurs de lignage hématopoïétique et angioblastique. Certains organes comme le rein et le foie ainsi que le sang circulant de ces souris seront également utilisés dans une étude en cours dans l'équipe qui s'intéresse à la détermination de l'effet d'un maintien d'une sécrétion de l'EG-VEGF au-delà de 10.5 jpc,

mais aussi de l'effet d'une antagonisation de son action sur l'invasion trophoblastique. En outre, l'implication de l'EG-VEGF au niveau de la différenciation hématopoïétique dans des placentas humains fut également examinée. Pour ce faire, des placentas entre 8 et 10 SA issus d'interruption volontaire de grossesse ont été prélevés, puis disséqués en explants placentaires. Ces derniers furent mis en culture pendant 24 h en présence ou non de l'EG-VEGF. Le même procédé expérimental fut par la suite réalisé : une dissociation des cellules ainsi qu'un immunomarquage par des anticorps spécifiques de marqueurs du lignage hématopoïétique suivi d'une cytométrie en flux.

EG-VEGF (Endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor) controls placental hematopoietic differentiation during early pregnancy

Garnier V^{1,2,3}, Sergent F^{1,3}, Souyri M⁴, Petit L⁴, Zhou QY⁵, Balboni G⁶, Hoffmann P^{1,3,4}, Feige JJ^{1,2,3}, and Alfaidy N^{1,2,3}

Running title: EG-VEGF contributes to hematopoietic differentiation

Keys words: EG-VEGF, hematopoiesis, angiogenesis, pregnancy

1. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité U1036, Grenoble. France
2. Univ.Grenoble Alpes, Grenoble, France
3. Commissariat à l’Energie Atomique (CEA), Laboratoire BCI, Grenoble, France
4. CNRS, UPMC, UMR7622, Bat C, 6^{ème} étage; Case 24; 75252 Paris Cedex 05; France
5. University of California. Department of Pharmacology. 363D Med Surge 2. Mail Code: 4625 Irvine, CA.
6. Department of Life and Environmental Sciences, Unit of Pharmaceutical, Pharmacological and Nutraceutical Sciences, University of Cagliari, 09124 Cagliari, Italy.
7. Department of Obstetrics and Gynaecology, Grenoble Hospital, France.

Grant support: INSERM U1036, Université Joseph-Fourier, Commissariat à l’Energie Atomique (iRTSV/BCI).

Conference presentation: SFA (French Society of Angiogenesis) 2014, and at Grenoble hospital clinical research conference.

Corresponding author: Nadia Alfaidy
Corresponding author: Nadia ALFAIDY, PhD. HDR
Unité INSERM U1036. Laboratoire BCI -iRTSV
CEA Grenoble 17, rue des Martyrs
38054 Grenoble cedex 9
Tel. 04 38 78 35 01
Fax 04 38 78 50 58
nadia.alfaidy-benharouga@cea.fr

Abstract

Recent studies have shown that human and mouse placentas are not only niches for hematopoietic stem cells, but constitute proper sites of their generation. Nevertheless, little is known about local regulators of these processes. EG-VEGF is a new angiogenic factor produced by the placenta, and reported to regulate multiple processes of placental development. EG-VEGF and its analog Bv8 have been reported to stimulate hematopoiesis and hematopoietic cell mobilization and we have shown that EG-VEGF peak of expression precedes the launch of placental hematopoiesis suggesting a regulation of placental hematopoietic differentiation by this factor. To verify this hypothesis, both human and mouse placentas were used. In the mouse, two approaches were employed, EG-VEGF was either over-expressed from day 7.5 dpc to 12.5 dpc using osmotic pumps, or antagonized upon injections of PROKR1 and PROKR2 antagonists from day 4.5 to day 11.5 dpc. Placentas were analyzed for the expression of hematopoietic and angiogenic markers, using flow cytometry, Western Blotting and immunofluorescence. Human placentas were collected from first trimester terminations of pregnancies. Placental explants were treated with EG-VEGF (1-100 ng/mL) for 24 hours. We showed that in the mouse, EG-VEGF does not affect hematopoietic cell function, however it decreases placental CD34/C-kit positive cells (hematopoietic progenitor cell marker). This effect was reversed by PROKR1 and PROKR2 antagonists. More importantly, we demonstrated that EG-VEGF significantly decreased endothelial and hemogenic endothelial cells markers, VE-cadherin/CD31 positive cells as well as CD34⁺/CD45⁻ cell population. These data demonstrate that EG-VEGF negatively controls hematopoietic differentiation. Nevertheless, the sites of its action as well as the physiological significance of this effect are still to be confirmed.

INTRODUCTION

During vertebrate development hematopoiesis is sequentially carried out by distinct organs, including yolk sac, aorta-gonad-mesonephros (AGM), embryonic liver and fetal bone marrow (BM). Hematopoietic Stem Cells (HSC), the central players in the activity of the hematopoietic system were assumed to have a common origin and the yolk sac was proposed as their unique source (Moore and Owen 1965). However, later investigations in different species including murine models (reviews in Dieterlen-Lièvre, Pardanaud et al. 2001; Turpen, 2001; Dzierzak and Oostendorp, 2001 (Dzierzak and Medvinsky 2008) showed that the yolk sac progenitors contribute mainly to the primitive hematopoiesis (Beaupain, Martin et al. 1979, Palis, Robertson et al. 1999) and that the definitive hematopoiesis was established by the hematopoietic stem cells (HSCs), presumably generated in the AGM. Recently, the theory that the AGM is the unique site for the definitive hematopoiesis was weakened by the observation that this region, which contains a limited number of HSCs, is active for only a very short period, in both humans and mice (Barcena, Muench et al. 2009). Possible explanations include either an extremely rapid and efficient migration of AGM-derived HSCs to the liver or the existence of another hematopoietic niche or source of these cells. Recently the placenta has been added to the list of organs which sustain hematopoietic activity during the development of the fetus as it was shown to contribute to the definitive hematopoiesis and to contain clonogenic progenitors (Alvarez-Silva, Belo-Diabangouaya et al. 2003, Gekas, Dieterlen-Lievre et al. 2005, Ottersbach and Dzierzak 2005). Other results further indicated that placental clonogenic progenitors become committed *in situ*, rather than colonize the placenta (Zeigler, Sugiyama et al. 2006, Corbel, Salaun et al. 2007). Moreover, it has been shown that the hematopoietic progenitor cells are present at different stages of the development and with the highest expression observed during the first trimester of pregnancy (Barcena, Muench et al. 2009) in the human placenta. Ontogeny studies in the gravid mouse showed that the hematopoiesis starts at 10.5 dpc before the establishment of the fetomaternal circulation that begins at 12.5 dpc (Gekas, Dieterlen-Lievre et al. 2005, Ottersbach and Dzierzak 2005). While, the presence of HSC in the placenta is well established, the mechanism of their differentiation from ancestral local cells and potential regulators of these processes remain unknown.

It is now well established that in the YS, HSC are originated from the hemangioblast, an ancestor cell type that gives rise to hematopoietic and angioblastic cells, a cell type that in turn gives rise to the endothelial cells (Choi, Kennedy et al. 1998, Kennedy, D'Souza et al.

2007). In the AGM, it is thought that HSC originate from endothelial cells that dedifferentiate into an endothelial-like cells called hemogenic endothelial cells (Jaffredo, Gautier et al. 1998, Zovein, Hofmann et al. 2008, Dieterlen-Lievre and Jaffredo 2009, Eilken, Nishikawa et al. 2009, Lancrin, Sroczynska et al. 2009) which in turn give rise to the hematopoietic cells. In the placenta, the existence of this type of differentiation is left to be determined as well as the identification of potential regulators of this process. Differentiation of hemangioblastic to angioblastic and hematopoietic cells has been shown to be regulated by angiogenic factors such as VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*). As in the placenta, hematopoietic cells are more likely to derive from endothelial cells, we investigated the effect of a recently described specific placental endothelial growth, the EG-VEGF (*Endocrine Gland Derived Endothelial Growth Factor*). EG-VEGF or 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, Bullock et al. 2002). In recent publications from our group, we have shown that **i)** EG-VEGF and its receptors, but not Bv8, are highly abundant in human placenta during the first trimester of pregnancy, **ii)** their expression is up-regulated by hypoxia, **iii)** EG-VEGF controls trophoblast invasion, **iiii)** its circulating levels were elevated in multiple placental pathologies (Hoffmann, Saoudi et al. 2009, Brouillet, Murthi et al. 2013) and **v)** Bv8 stimulates hematopoiesis and hematopoietic cell mobilization (LeCouter, Zlot et al. 2004), and **v)** the peak of EG-VEGF expression precedes that of the hematopoietic launch in the mouse placenta. Altogether these data suggest that EG-VEGF might control HSC production and differentiation in the placenta. Hence, we investigated the effect of EG-VEGF on hematopoietic cells production *in vivo* using the gravid mouse as a model. Challenges to use human placental explants to study EG-VEGF effect on this process were also experienced.

Materials and methods

Tissue collection

Human placentas were collected from the first-trimester of pregnancy (8-10 weeks of gestation (wg) n=10). The placentas were obtained from elective terminations of pregnancies from Grenoble Hospital. Collection and processing of human placentas were approved by the local hospital ethical committee and informed patient consent was obtained in all cases.

Animals from day 7.5 post coitum (dpc) to 12.5 dpc using osmotic

OF1 gravid mice (Charles River) were used. Two approaches were employed; EG-VEGF was either over expressed or antagonized using PROKR1 and PROKR2 antagonists. In the first case, animals had an intra-abdominal osmotic pump implanted to administer the buffer (control group) or EG-VEGF (treatment group). The pumps were purchased from Charles River (Mini-pomp Alzet 1007D 0.5 μ L/hour, Charles River). The treatment group mice (n=30) were implanted with ALZET pump filled with 100 μ L of EG-VEGF. These pumps are designed to deliver 0.5 μ L/h over 7 days. Similarly, the control group mice (n=28) were implanted with ALZET filled with 100 μ L of phosphate-buffered saline. At the end of 5 days treatment, blood samples were collected via cardiac puncture under anesthesia and sacrificed via exsanguination. In the second approach, mice were injected by either antagonist, anti-PROKR1, [(2-(5-(4-Fluorobenzyl)-1-(4-methoxybenzyl)-1,4,5,6-tetrahydro-4,6-dioxo-1,3,5-triazin-2-ylamino)ethyl)guanidine], (50 μ g/kg, n=6), either anti-PROKR2 (20mg/kg, n=6) or the both (n=10) at days 4,5; 7,5; 10,5 dpc (Ralbovsky, Lisko et al. 2009, Ren, Zhang et al. 2011, Curtis, Wang et al. 2013, Congiu, Onnis et al. 2014). Similarly, the control group mice were injected by either 10% DMSO and physiologic serum, for PROKR1 antagonist (n=3), either for an oil based matrix for PROKR2 antagonist (n=4), or the both vehicles (n=10). Specificity of PROKR1 and PROKR2 antagonists was previously tested in cell systems overexpressing either PROKR1 or PROKR2 receptors (Garnier et al. 2014). Mice were

sacrificed at E11,5, placentas were collected and analyzed for the expression of hematopoietic and angiogenic cells .

EG-VEGF ELISA

EG-VEGF secretion was measured by ELISA (PeproTech, France) in the collected supernatant of placental explants after 30 min, 3 h, 8 h, overnight and 24 h of treatment. 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

Placental explants culture, treatment and cell preparation: Villous explant cultures were established from the first trimester human placentas at 8-10 wg. Placental tissue was split into two villous explants of same weight and they were placed into 35 mm plastic culture dishes pre-coated with 2mL of diluted Matrigel (Matrigel/DMEM-F12) (Becton–Dickinson, Le Pont-de-Claix, France) and polymerized at 37°C for 30 min. Explants were cultured in DMEM-Ham's F-12 (DMEM/F12; Invitrogen, Cergy Pontoise, France) medium supplemented with 100 µg/mL streptomycin and 100 U/mL penicillin, pH 7.4. After 24 h of culture, the medium was changed, and the explants were incubated in the absence or presence of 25 ng/mL EG-VEGF for 24 h. Then, they were washed and incubated for 15 min with enzymatic dissociation solution (Stock solution: 200 mL IMDM containing 0,08 g collagenase [type I: Sigma Chemical Co., St. Louis, MO], 280mg hyaluronidase [type I-S; Sigma Chemical Co.], 1 g Trypsine, 80 mg HEPES, 1 g MgSO₄) at 37°C in 70mL. Upon digestion, 40 mL were removed in 2 mL FCS (solution I). We proceeded to second digestion for 8 min at 37°C in the presence of 25 mL enzymatic dissociation solution. As for the first step, a Solution II was obtained. The dissociated cells were washed and centrifuged for 15 min in IMDM in the presence of 100 µg/mL streptomycin and 100 U/mL penicillin. The cells were then resuspended in 3 mL of medium culture. Samples (Solutions I and II) were pooled and resuspended on a Percoll gradient made up in Hanks' balanced salt solution. The gradient was centrifuged (600 rcf) for 30 min at room temperature, after which a broad band in the middle of the tube, under red blood band, containing placental cell, was collected. The cells were washed several times and resuspended in PBS containing 2% BSA. The cells were then used for immunostainings followed by flow cytometry analysis. In another set of experiment

fragments of placental explant (15–20 mg wet weight) were teased apart cultured on Matrigel (Becton-Dickinson, Le Pont de Claix, France) and treated with EG-VEGF (25-100 ng/mL). Placental explants were collected and homogenized in RIPA lysis buffer and protease inhibitors as previously described (Alfaidy, Li et al. 2003).

Western-blot analysis

Placental explants were homogenized in RIPA lysis buffer and protease inhibitors as previously described (Alfaidy, Li et al. 2003). 30µg 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 CD31, Ve-cadherin, CD45, CD235A, Runx1 and GATA2. The intensities of immunoreactive bands were measured by scanning the photographic film and analyzing the images on a desktop computer using ImageJ Launcher software or using Chemidoc and analyzing the images with Image Lab (version 4.0.1). To standardize for sample loading, the blots were subsequently stripped using a commercially available kit following the manufacturer's instructions (Re-blot; Millipore) and re-probed with an anti-β-actin antibody (Sigma-Aldrich, France) as an internal control for protein loading.

Cell preparation from mouse placentas: Mouse placentas were collected after gravid mice after their sacrifice at indicated gestational ages. Placentas were dissected from their decidua. Tissues were kept on ice, washed in PBS, dissociated mechanically through 18G needles and then treated with 0.05% collagenase type I (Sigma) in PBS with 10% FCS for 20 min at 37°C. This step was followed by passages through 18–25G needles. A single cell suspension was filtered through 50 µm filters (Dako) and subjected to functional assays.

Flow cytometry

Placental cells were stained with the following primary antibodies (1/100): mouse anti-human CD34 (BD Pharmigen), mouse anti-human CD45 (BD Pharmigen), mouse anti-human CD235A (BD Pharmigen); rat anti-mouse CD34 (BD Pharmigen), rabbit anti-CD34 (Sigma-Aldrich), rat anti-mouse CD45 (BD Pharmigen), rat anti-mouse c-kit (BD Pharmigen), anti-mouse Ve-cadherin. In some experiments placental cells were directly labeled with fluorochrome-conjugated antibodies to hematopoietic and/or endothelial markers such as anti-mouse c-kit-PE (Miltenyi), anti-mouse-CD31-APC (Miltenyi), anti-mouse CD45-FITC

(Miltenyi). After 45 min of staining on ice, cells were washed and centrifuged after a second stain using the following secondary antibodies: Alexa 488-conjugated goat anti-mouse antibody, Alexa 488-conjugated goat anti-rat and PE-conjugated goat anti-rabbit. After 45 min of staining, cells were washed and stained with Propidium iodide for dead cell exclusion. Cell surface phenotypic analyses were performed using a FACSCalibur (BD Biosciences) for acquisition of samples and CellQuest (BD Biosciences) or FlowJo, version 9.2, (Tree Star, Inc., Ashland, OR) software for analysis.

Culture on MS-5 stromal cells for long-term culture initiating cell (LTC-IC): Freshly sorted mouse cells were cultured on pre-established monolayers of the MS-5 mouse bone marrow stromal cell line (Itoh, Tezuka et al. 1989), which supports long-term myeloid and B-lymphoid human hematopoiesis (Issaad, Croisille et al. 1993, Berardi, Meffre et al. 1997, Robin, Pflumio et al. 1999, Tavian, Robin et al. 2001). Co-cultures were performed as described previously (Tavian, Robin et al. 2001). The frequency of cells forming hematopoietic colonies was determined by means of Poisson statistics as described previously (Ploemacher, van der Sluijs et al. 1989, Moore, Ema et al. 1997) with slight modifications. Serial half-dilutions were performed from 1000 to 15 cells per well, with 10 replicate wells seeded per cell dilution. Colonies of hematopoietic cells developing on or underneath the MS-5 stromal cells were scored from week 1 to week 5 under an ICM-405 phase-contrast inverted microscope (Carl Zeiss, Le Pecq, France). The number of cells seeded per well was plotted against the logarithm of the percentage of negative wells. As calculated from the line of best fit, the cell number at log 37% negative wells is the frequency of blood-forming cells in the starting population.

Colony-forming cell assays in semi-solid medium: Freshly sorted mouse cells were plated in duplicate in 35 mm plastic culture dishes at $5 \cdot 10^4$ cells/mL in 1 mL semi-solid growth medium that consisted of 1% methylcellulose (Sigma-Aldrich) in IMDM (Gibco BRL), 30% heat-inactivated FCS (Hyclone Laboratories), 1% BSA, (Sigma-Aldrich), 10^{-4} M 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich), 2 U/mL erythropoietin (EPO-alpha, humain, Promocell), 10 ng/mL IL3 (mouse, Miltenyi), 20 ng/mL TPO (human, Miltenyi) and 20 ng/mL SCF (mouse, Miltenyi). Cultures were incubated for 14 days at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. Colonies (≥ 50 cells) were counted on an inverted microscope.

Statistical analysis

Statistical *comparisons* were made using Student's t test and one-way ANOVA (both parametric and nonparametric) followed by Dunn's, or Bonferroni tests. All data were checked for normality and equal variance. (SigmaPlot and SigmaStat, Jandel Scientific Software). All data are expressed as mean \pm SEM (**p<0.001; *p<0.01; *p<0.05).

Results

Overexpression of EG-VEGF decreases hematopoietic placental cells production.

We investigated the effect of EG-VEGF treatment on the hematopoietic cells number in the placenta of gravid mice. In order to cover the highest period of hematopoiesis during gestation, ie 7.5-12.5 dpc, the treatment started before the launch of the hematopoietic process and lasted for five days. Previous reports in the literature have shown that mouse hematopoietic cells express specific markers such as CD34, CD45 and C-kit. We first determined the effect of EG-VEGF on cell populations that express either CD34, CD45, or C-Kit. Figure 1A reports flow cytometry analysis of placental cells collected from three independent gravid mice at 12.5 dpc. Simple staining of placental cell population by either CD34, CD45 or C-kit antibodies did not show any significant difference between control and treated placenta (Figure 1A). A trend to decrease in the C-kit population was observed, however this did not reach any statistical significance. Because CD34⁺/c-kit⁺ population represents better the hematopoietic cell population, we performed analysis focusing on the double stained populations using CD34⁺ and c-kit⁺ antibodies. Figure 1C and 1D show that EG-VEGF treatment significantly decreased the number of double stained CD34⁺/c-kit⁺ population. These data demonstrate that EG-VEGF negatively regulates placental hematopoiesis during the first trimester of pregnancy (Figure 1B).

Treatment of gravid mice with PROKR1 and PROKR2 antagonists increase hematopoietic placental cell production.

In the placenta, EG-VEGF binds both to PROKR1 and to PROKR2 receptors. To better understand the endogenous role of EG-VEGF in the regulation of placental hematopoiesis, we treated the gravid mice by either PROKR1 or PROKR2 or both antagonists from day 4.5 dpc to day 12.5 of gestation. Figure S1 shows that PROKR1 or PROKR2 antagonist injected alone did not affect the number of CD34, CD45 and c-kit positive cells. Because EG-VEGF binds to its receptors with comparable affinity, we determined the effect of simultaneous injection of PROKR1 and PROKR2 antagonists. Figure2 shows that PROKR1 and PROKR2 antagonists treatment did not affect individual CD34, CD45 and c-kit positive cells, however it did significantly increase the number of double stained CD34⁺/c-kit⁺ population. These data

demonstrate that endogenous EG-VEGF negatively regulates placental hematopoiesis during the first trimester of pregnancy and that this effect involved both receptors (Figure 2B).

EG-VEGF effect on hemogenic endothelial cell population.

As the placenta is considered as a site of definitive hematopoiesis with budding hypothesis of endothelial cell differentiation into an hemogenic endothelial cell type that gives rise to hematopoietic stem cell, we determined the effect of EG-VEGF on the number of CD34⁺/CD45⁻, and CD144⁺/CD31⁺ two cell populations that were describe to represent hemogenic endothelial cell types. Figure 3A, 3B show that mice treatment by EG-VEGF significantly decreased the number of the hemogenic endothelial cells. These data suggest that EG-VEGF effect on hematopoietic differentiation might either occur at the level of their first step of differentiation from endothelial to hemogenic endothelial cells and/or at the step of hemogenic endothelial cell differentiation towards the hematopoietic stem cell.

EG-VEGF effect on the function of hematopoietic stem cells

To determine whether EG-VEGF has any effect on the ability of hematopoietic progenitor cells to proliferate and to differentiate to form hematopoietic colonies in a semisolid medium, we performed the colony forming cell (CFC) assay in the absence or the presence of EG-VEGF (4µg). Preliminary results did not show any difference with the treatment. A slight decrease in the CFU-MK and E-MK cells was observed (Figure 4.A). We have also performed the long-term culture initiating cell (LTC-IC) assay to determinate whether EG-VEGF influences the generation and proliferation of primitive hematopoietic stem cells from CD34⁺/c-kit⁺ population. Figures 4B and 4C show that EG-VEGF does not have any effect on this process, as the CD34⁺/c-kit⁺ populations produced the same frequency of cobblestone area forming cells (CAFC) and colonies of hematopoietic cells after 1 week to 5 weeks of co-culture in the non-treated and in the treated condition.

EG-VEGF effect on the hematopoietic stem cells differentiation and function of hematopoietic in fetal liver

To determine whether EG-VEGF treatment affects hematopoiesis in other sites of the fetus, we analyzed its effect on the production and function of the fetal liver CD34⁺/c-kit⁺ hematopoietic cell population. Figures 5A and 5B show that EG-VEGF is not involved in the production of the CD34⁺/c-kit⁺ population, nor in their function.

EG-VEGF effect on CD34, CD31 and VE-cadherin proteins expression in the placenta

We determined the effect of EG-VEGF on CD34, a protein specific to endothelial and hematopoietic cell, CD31 and VE-cadherin, markers of endothelial and hemogenic endothelial cells. Figure 5 shows that EG-VEGF treatment does not affect CD34 protein expression, however it did decrease and increase those of CD31 and Ve-cadherin expression, respectively.

EG-VEGF effect on hematopoietic markers in human placentas

In an attempt to determine whether EG-VEGF has any effect on human placental hematopoiesis, we tested its effect on placental explants incubated in the absence or the presence of EG-VEGF (25 ng/mL) and analyzed by flow cytometry for the expression of CD34, CD45 and CD235A. Because of the low levels of marked cells upon explant cultures, we could not detect a fare number of marked cells to be analyzed (Figure 6). Local analysis of placental protein expression upon EG-VEGF treatment showed an increase in CD34 protein expression by immunofluorescence of placental explant section (Figure 1.A) and by Western blotting analysis (Figure 7.B). No change in the CD45 protein and slight decrease in the CD235 A protein were observed (Figure 7.B).

EG-VEGF effect on the expression of hematopoietic transcription factors in the human placenta

We determined EG-VEGF effect on two transcriptional factors known to be involved in hematopoietic cell differentiation, ie: GATA2 and RUNX1. Figure 8 shows that EG-VEGF treatment does not affect the expression of key transcriptional factors of hematopoietic cell differentiation.

Discussion

The present study aimed at determining the effect of EG-VEGF on placental hematopoiesis. Our preliminary results showed that this angiogenic factor decreased mouse placental hematopoiesis. This was observed in EG-VEGF-treated gravid mice and was confirmed when mice were injected with its receptors antagonists, suggesting that EG-VEGF controls the process of hematopoiesis in an endogenous manner. This is the first report to demonstrate that placental hematopoiesis is locally regulated by a specific placental factor. The demonstration that the placenta is a hematopoietic organ is too novel, as only few groups have reported the placenta as a source and not only a niche for HCS. Also the origin of HCS is still a debate as both endothelial and hemangioblastic origins are proposed. However, in the placenta it is more likely that HCS originate from endothelial/ hemogenic endothelial cells, as this organ was shown to contribute to the definitive hematopoiesis, a process more associated with differentiation of HCS from endothelial cells (Alvarez-Silva, Belo-Diabangouaya et al. 2003, Gekas, Dieterlen-Lievre et al. 2005, Ottersbach and Dzierzak 2005). In the present study, we showed that EG-VEGF also decreased the number of the likely hemogenic endothelial population (CD144⁺/CD31⁺). These finding suggest that EG-VEGF effect might either occur at the level of the first step of differentiation of endothelial to a hemogenic endothelial cell type and/or at the step of the hemogenic endothelial cell differentiation towards the hematopoietic stem cell. Further experiments are needed to decipher the mechanism of differentiation. Nevertheless, our data demonstrate that the key process of HCS placental cell differentiation is in part controlled of a local angiogenic factor that is produced by the trophoblast cells. Interestingly, the peak of expression of EG-VEGF in the placenta during mouse gestation declines at the time of the launch of placental hematopoiesis, suggesting that this factor controls precocious hematopoiesis.

In previous reports, we and other have reported that EG-VEGF is an angiogenic factor that increased multiples angiogenic processes of endothelial cells (Brouillet, Hoffmann et al. 2010). However, to date, no study has reported its effect on endothelial and/or hematopoietic cells differentiation. Because of its positive effect on endothelial cells engagement angiogenic processes, we expected a similar effect on their differentiation. However, both mouse and human data strongly suggest that during early pregnancy EG-VEGF acts as a negative regulator of endothelial/hematopoietic cell differentiation. An inhibitory effect of EG-VEGF on endothelial cell differentiation before the establishment of the fetomaternal circulation (FC) is probable, as this factor has been reported to exert the same effect on cytotrophoblast

differentiation towards an invasive phenotype before the establishment of the FC. Cytotrophoblast invasion of the uterus and remodeling of its vasculature allows oxygen tension to rise at the maternal-fetal interface from ~2 to 8% (Muench, Cupp et al. 1994). It has previously been shown (Barcena, Muench et al. 2009) that the relatively hypoxic environment of the chorionic villi during the embryonic period stimulates proliferation of trophoblast progenitors, (Muench, Cupp et al. 1994) which differentiate as oxygen levels rise. Placental hematopoietic progenitors and HSCs might undergo a similar process.

The demonstration of an inhibitory effect of EG-VEGF was more obvious in the mouse compared to the human explants model. This might be due to numerous reasons; first, mouse and human placental hematopoiesis occur differentially throughout gestation. In the mouse this process starts at 12.5 dpc (equivalent to the mid-gestation), whereas in human, hematopoiesis peaks early on during the first trimester of pregnancy, at even the 3rd week of gestation. Because we could only collect placenta, the earliest at 5 weeks of gestation, we might be distant from the time of hematopoietic cell differentiation; second, because former researchers who demonstrated that the placenta is a source of HSC, worked on tissues collected and analyzed the same day, we were challenged in our placental explants system, to use a tissue that had undergone a 24 h incubation in Matrigel with treatment with EG-VEGF before its analysis for hematopoietic cell epitopes. Hence, it is likely that the small percentage of hematopoietic cells observed in our placental preparations is due to a loss of hematopoietic cell epitopes. Further, troubleshooting of experimental protocols that aimed at assessing the regulation of human placental hematopoiesis, *in vitro*, is mandatory.

In conclusion, we demonstrated that EG-VEGF is a regulator of endothelial/hematopoietic cell differentiation in the placenta. Further experiments are needed to confirm and better understand the underlying mechanisms of these processes.

Figures legend

Figure 1: *Effect of EG-VEGF on hematopoietic cell differentiation*

A. Isolated placental cells, collected from control or treated mice, were dissociated and stained with either anti-CD34, anti-CD45 or anti-C-kit antibodies. Number of stained cells was determined by flow cytometry. There was no change between control and treated mice.

B. Isolated placental cells, collected from control or treated mice, were dissociated and double stained with anti-CD34 and anti-C-kit antibodies. There was a significant decrease in the number of CD34⁺/C-kit⁺ cells. The graph summarizes data obtained from three independent experiments. Data are expressed as percentage of cells \pm SEM (* p< 0.05).

Figure 2: *Effect of PROKR1 and PROKR2 antagonists on placental hematopoietic cell differentiation*

A. Isolated placental cells, collected from control or treated mice, were dissociated and stained with either anti-CD34, anti-CD45 or anti-C-kit antibodies. Number of stained cells was determined by flow cytometry. There was no change between control and treated mice.

B. Isolated placental cells, collected from control or treated mice, were dissociated and double stained with anti-CD34 and anti-C-kit antibodies. There was a significant increase in the number of CD34⁺/C-kit⁺ cells in the PROKR1 and PROKR2 antagonists treated mice. The graph summarizes data obtained from three independent experiments. Data are expressed as percentage of cells \pm SEM (* p< 0.05).

Figure 3: *EG-VEGF effect on endothelial/ endothelial-hemogenic cell differentiation*

A. Isolated placental cells, collected from control or treated mice, were dissociated and double stained with anti-CD34 and anti-CD45 antibodies. The number of stained cells was determined by flow cytometry. There was a significant decrease in the number of CD34⁺/CD45⁻ cells. The graph summarizes data obtained from this experiment. Data are expressed as percentage of cells \pm SEM (* p< 0.05).

B. Isolated placental cells, collected from control or treated mice, were dissociated and double stained with anti-CD144 and anti-CD31 antibodies. There was a decrease in the number of CD144⁺/CD31⁺ cells. The graph summarizes data obtained from this experiment. Data are expressed as percentage of cells \pm SEM (* p< 0.05).

Figure 4: *EG-VEGF effect on the function of hematopoietic stem cells*

A. Reports the result of Colony Forming Cell assay on treated or not with EG-VEGF placentas for 24 h. EG-VEGF did not affect the number of any type of colonies. **B.** This panel reports the Long-Term Culture Initiating Cell (LTC-IC) assay used to determine EG-VEGF effect on the generation of hematopoietic cells and on Cobblestone-Area-Forming Cells (CAFC, immature hematopoietic progenitors) from CD34⁺/c-kit⁺ mice placental cells at E11,5. There was no difference between cells treated or not with EG-VEGF from week 1 to week 5 of culture.

Figure 5: *Effect of EG-VEGF treatment on the liver hematopoietic stem cells differentiation and on their function*

A. Isolated fetal liver cells, collected from control or treated mice, were dissociated and double stained with anti-CD34 and anti-C-kit antibodies. The number of double CD34⁺/C-kit⁺ cells was determined by flow cytometry. The graph summarizes data obtained from this experiment. Data are expressed as percentage of cells \pm SEM (* p< 0.05). **B.** Reports the result of Colony Forming Cell assay on treated or not with EG-VEGF fetal liver for 24 h. EG-VEGF did not affect the number of any type of colonies.

Figure 6: *Effect of EG-VEGF on the placental expression of hematopoietic and endothelial markers*

A, B and **C** report representative Western blotting analysis of CD34, CD31 and VE-cadherin expression in placenta collected from control or EG-VEGF treated mice. Quantifications of the intensity of the corresponding bands of each protein are reported on the graphs, **D, E, F**, respectively. β -actin was used as an internal control to standardize for protein loading.

Figure 7: *Effect of EG-VEGF on hematopoietic cells production in placental explants collected at 8-10 wg*

A. Isolated placental cells, collected from control or treated placental explants, were dissociated and stained with either anti-CD34 and anti-CD45 or CD235 A antibodies. The number of stained cells was determined by flow cytometry. The graphs in **B** summarize data obtained from three independent experiments for each protein. Data are expressed as percentage of cells \pm SEM (* p< 0.05).

Figure 8: *Effect of EG-VEGF on hematopoietic or endothelial markers in placental explants collected at 8-10 wg*

A. Reports photographs of immunofluorescence of placental explant sections (8 wg) stained with anti-CD34 antibody after 24 h of treatment in the absence or the presence of 10 ng/mL; 25 ng/mL or 50 ng/mL EG-VEGF. **B.** Reports representative Western-blot analysis that compares CD34, CD45 and CD234A expressions in placental explants treated with EG-VEGF at 10 ng/mL; 25 ng/mL or 50 ng/mL. The graphs in **C** summarize data obtained from three independent experiments for each protein. Data are expressed as percentage protein expression in the control condition \pm SEM (* $p < 0.05$). β -actin was used as an internal control to standardize for protein loading.

Figure 9: *Effect of EG-VEGF on the expression of transcription factors involved in hematopoietic cell differentiation*

A. Reports representative Western-blot analysis that compares Runx1 and GATA2 expressions in human placentas treated or not with 10 ng/mL; 25 ng/mL or 50 ng/mL EG-VEGF for 24 h. **B.** shows the quantification of the intensity of the bands using Image j software. Data are expressed as percentage protein expression in the control condition \pm SEM (* $p < 0.05$). β -actin was used as an internal control to standardize for protein loading.

Figure S1

Isolated placental cells were collected from control, anti-PROKR1 (panel **A**) or anti-PROKR2 (panel **B**) treated mice, were dissociated and stained with either anti-CD34, anti-CD45 or anti-c-kit antibodies. The number of stained cells was determined by flow cytometry. There was no change between control and treated mice. The graphs in **C** and **D** summarize data obtained from three independent experiments treated with either PROKR1 or PROKR2 antagonists, respectively. Data are expressed as percentage of cells \pm SEM (* $p < 0.05$).

Figure S2: *Levels of circulating EG-VEGF in the gravid mice upon treatment by EG-VEGF using osmotic pumps.*

The graph reports EG-VEGF circulating levels in control (no osmotic pump) and treated mice with either PBS (control MP) or EG-VEGF after 5 days. Data are expressed as percentage of cells \pm SEM (* $p < 0.05$).

References

- Alfaidy, N., W. Li, T. MacIntosh, K. Yang and J. Challis (2003). "Late gestation increase in 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 expression in human fetal membranes: a novel intrauterine source of cortisol." *J Clin Endocrinol Metab* **88**(10): 5033-5038.
- Alvarez-Silva, M., P. Belo-Diabangouaya, J. Salaun and F. Dieterlen-Lievre (2003). "Mouse placenta is a major hematopoietic organ." *Development* **130**(22): 5437-5444.
- Barcena, A., M. O. Muench, M. Kapidzic and S. J. Fisher (2009). "A new role for the human placenta as a hematopoietic site throughout gestation." *Reprod Sci* **16**(2): 178-187.
- Beaupain, D., C. Martin and F. Dieterlen-Lievre (1979). "Are developmental hemoglobin changes related to the origin of stem cells and site of erythropoiesis?" *Blood* **53**(2): 212-225.
- Berardi, A. C., E. Meffre, F. Pflumio, A. Katz, W. Vainchenker, C. Schiff and L. Coulombel (1997). "Individual CD34+CD38lowCD19-CD10- progenitor cells from human cord blood generate B lymphocytes and granulocytes." *Blood* **89**(10): 3554-3564.
- Brouillet, S., P. Hoffmann, M. Benharouga, A. Salomon, J. P. Schaal, J. J. Feige and N. Alfaidy (2010). "Molecular characterization of EG-VEGF-mediated angiogenesis: differential effects on microvascular and macrovascular endothelial cells." *Mol Biol Cell* **21**(16): 2832-2843.
- Brouillet, S., P. Murthi, P. Hoffmann, A. Salomon, F. Sergent, P. De Mazancourt, M. Dakouane-Giudicelli, M. N. Dieudonne, P. Rozenberg, D. Vaiman, S. Barbaux, M. Benharouga, J. J. Feige and N. Alfaidy (2013). "EG-VEGF controls placental growth and survival in normal and pathological pregnancies: case of fetal growth restriction (FGR)." *Cell Mol Life Sci* **70**(3): 511-525.
- Choi, K., M. Kennedy, A. Kazarov, J. C. Papadimitriou and G. Keller (1998). "A common precursor for hematopoietic and endothelial cells." *Development* **125**(4): 725-732.
- Congiu, C., V. Onnis, A. Deplano, S. Salvadori, V. Marconi, D. Maftai, L. Negri, R. Lattanzi and G. Balboni (2014). "A new convenient synthetic method and preliminary pharmacological characterization of triazinediones as prokineticin receptor antagonists." *Eur J Med Chem* **81**: 334-340.
- Corbel, C., J. Salaun, P. Belo-Diabangouaya and F. Dieterlen-Lievre (2007). "Hematopoietic potential of the pre-fusion allantois." *Dev Biol* **301**(2): 478-488.
- Curtis, V. F., H. Wang, P. Yang, R. E. McLendon, X. Li, Q. Y. Zhou and X. F. Wang (2013). "A PK2/Bv8/PROK2 antagonist suppresses tumorigenic processes by inhibiting angiogenesis in glioma and blocking myeloid cell infiltration in pancreatic cancer." *PLoS One* **8**(1): e54916.
- Dieterlen-Lievre, F. and T. Jaffredo (2009). "Decoding the hemogenic endothelium in mammals." *Cell Stem Cell* **4**(3): 189-190.
- Dzierzak, E. and A. Medvinsky (2008). "The discovery of a source of adult hematopoietic cells in the embryo." *Development* **135**(14): 2343-2346.
- Eilken, H. M., S. Nishikawa and T. Schroeder (2009). "Continuous single-cell imaging of blood generation from haemogenic endothelium." *Nature* **457**(7231): 896-900.
- Gekas, C., F. Dieterlen-Lievre, S. H. Orkin and H. K. Mikkola (2005). "The placenta is a niche for hematopoietic stem cells." *Dev Cell* **8**(3): 365-375.
- Hoffmann, P., Y. Saoudi, M. Benharouga, C. H. Graham, J. P. Schaal, C. Mazouni, J. J. Feige and N. Alfaidy (2009). "Role of EG-VEGF in human placentation: Physiological and pathological implications." *J Cell Mol Med* **13**(8B): 2224-2235.
- Issaad, C., L. Croisille, A. Katz, W. Vainchenker and L. Coulombel (1993). "A murine stromal cell line allows the proliferation of very primitive human CD34+/CD38- progenitor cells in long-term cultures and semisolid assays." *Blood* **81**(11): 2916-2924.
- Itoh, K., H. Tezuka, H. Sakoda, M. Konno, K. Nagata, T. Uchiyama, H. Uchino and K. J. Mori (1989). "Reproducible establishment of hemopoietic supportive stromal cell lines from murine bone marrow." *Exp Hematol* **17**(2): 145-153.
- Jaffredo, T., R. Gautier, A. Eichmann and F. Dieterlen-Lievre (1998). "Intraaortic hemopoietic cells are derived from endothelial cells during ontogeny." *Development* **125**(22): 4575-4583.

Kennedy, M., S. L. D'Souza, M. Lynch-Kattman, S. Schwantz and G. Keller (2007). "Development of the hemangioblast defines the onset of hematopoiesis in human ES cell differentiation cultures." Blood **109**(7): 2679-2687.

Lancrin, C., P. Sroczynska, C. Stephenson, T. Allen, V. Kouskoff and G. Lacaud (2009). "The haemangioblast generates haematopoietic cells through a haemogenic endothelium stage." Nature **457**(7231): 892-895.

LeCouter, J., C. Zlot, M. Tejada, F. Peale and N. Ferrara (2004). "Bv8 and endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor stimulate hematopoiesis and hematopoietic cell mobilization." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(48): 16813-16818.

Lin, D. C., C. M. Bullock, F. J. Ehlert, J. L. Chen, H. Tian and Q. Y. Zhou (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**(22): 19276-19280.

Moore, K. A., H. Ema and I. R. Lemischka (1997). "In vitro maintenance of highly purified, transplantable hematopoietic stem cells." Blood **89**(12): 4337-4347.

Moore, M. A. and J. J. Owen (1965). "Chromosome marker studies on the development of the haemopoietic system in the chick embryo." Nature **208**(5014): 956 passim.

Muench, M. O., J. Cupp, J. Polakoff and M. G. Roncarolo (1994). "Expression of CD33, CD38, and HLA-DR on CD34+ human fetal liver progenitors with a high proliferative potential." Blood **83**(11): 3170-3181.

Ottersbach, K. and E. Dzierzak (2005). "The murine placenta contains hematopoietic stem cells within the vascular labyrinth region." Dev Cell **8**(3): 377-387.

Palis, J., S. Robertson, M. Kennedy, C. Wall and G. Keller (1999). "Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse." Development **126**(22): 5073-5084.

Ploemacher, R. E., J. P. van der Sluijs, J. S. Voerman and N. H. Brons (1989). "An in vitro limiting-dilution assay of long-term repopulating hematopoietic stem cells in the mouse." Blood **74**(8): 2755-2763.

Ralbovsky, J. L., J. G. Lisko, J. M. Palmer, J. Mabus, K. M. Chevalier, M. J. Schulz, A. B. Dyatkin, T. A. Miskowski, S. J. Coats, P. Hornby and W. He (2009). "Triazinediones as prokineticin 1 receptor antagonists. Part 1: SAR, synthesis and biological evaluation." Bioorg Med Chem Lett **19**(10): 2661-2663.

Ren, P., H. Zhang, F. Qiu, Y. Q. Liu, H. Gu, D. K. O'Dowd, Q. Y. Zhou and W. P. Hu (2011). "Prokineticin 2 regulates the electrical activity of rat suprachiasmatic nuclei neurons." PLoS One **6**(6): e20263.

Robin, C., F. Pflumio, W. Vainchenker and L. Coulombel (1999). "Identification of lymphomyeloid primitive progenitor cells in fresh human cord blood and in the marrow of nonobese diabetic-severe combined immunodeficient (NOD-SCID) mice transplanted with human CD34(+) cord blood cells." J Exp Med **189**(10): 1601-1610.

Tavian, M., C. Robin, L. Coulombel and B. Peault (2001). "The human embryo, but not its yolk sac, generates lympho-myeloid stem cells: mapping multipotent hematopoietic cell fate in intraembryonic mesoderm." Immunity **15**(3): 487-495.

Zeigler, B. M., D. Sugiyama, M. Chen, Y. Guo, K. M. Downs and N. A. Speck (2006). "The allantois and chorion, when isolated before circulation or chorio-allantoic fusion, have hematopoietic potential." Development **133**(21): 4183-4192.

Zovein, A. C., J. J. Hofmann, M. Lynch, W. J. French, K. A. Turlo, Y. Yang, M. S. Becker, L. Zanetta, E. Dejana, J. C. Gasson, M. D. Tallquist and M. L. Iruela-Arispe (2008). "Fate tracing reveals the endothelial origin of hematopoietic stem cells." Cell Stem Cell **3**(6): 625-636.

Figure 1

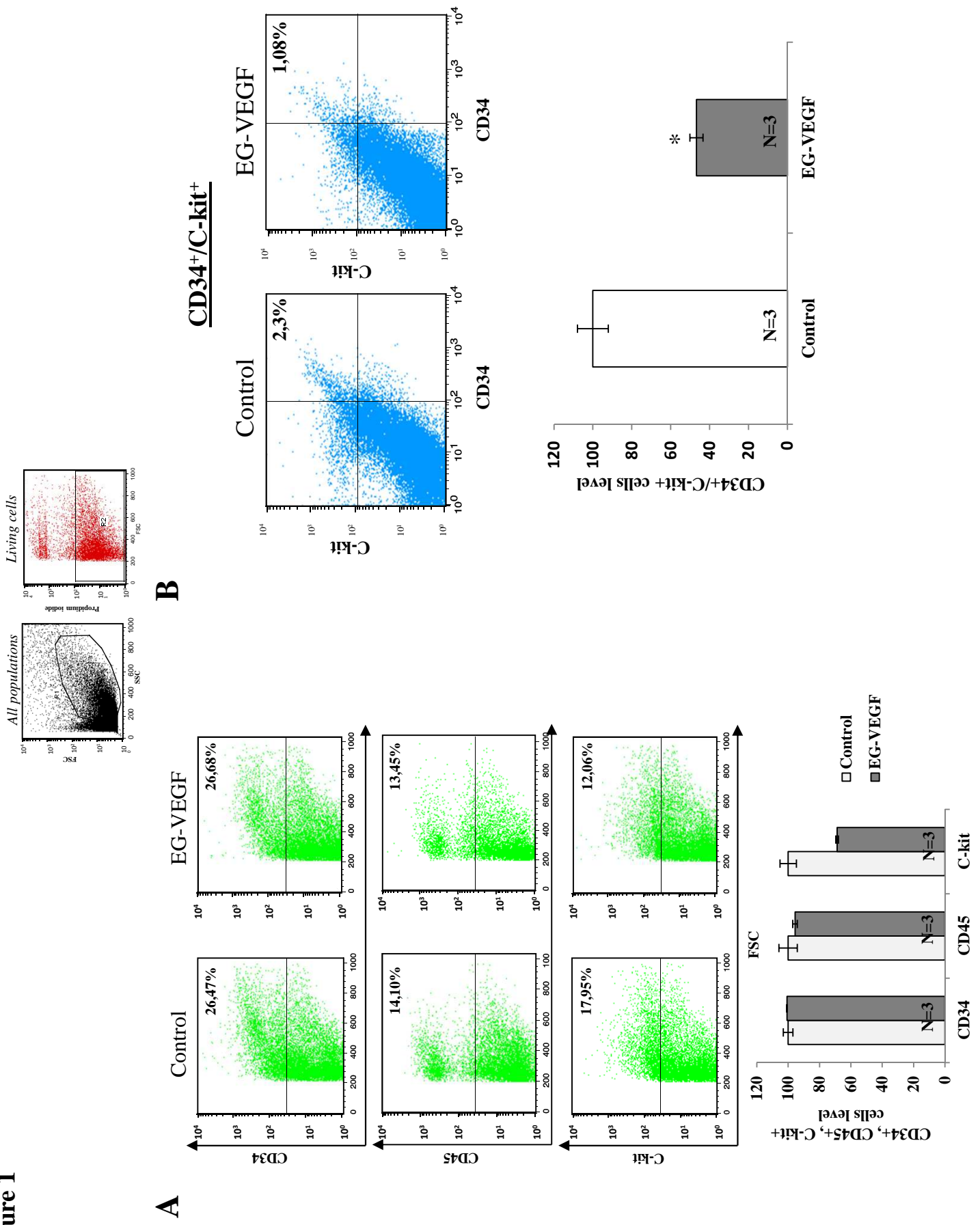
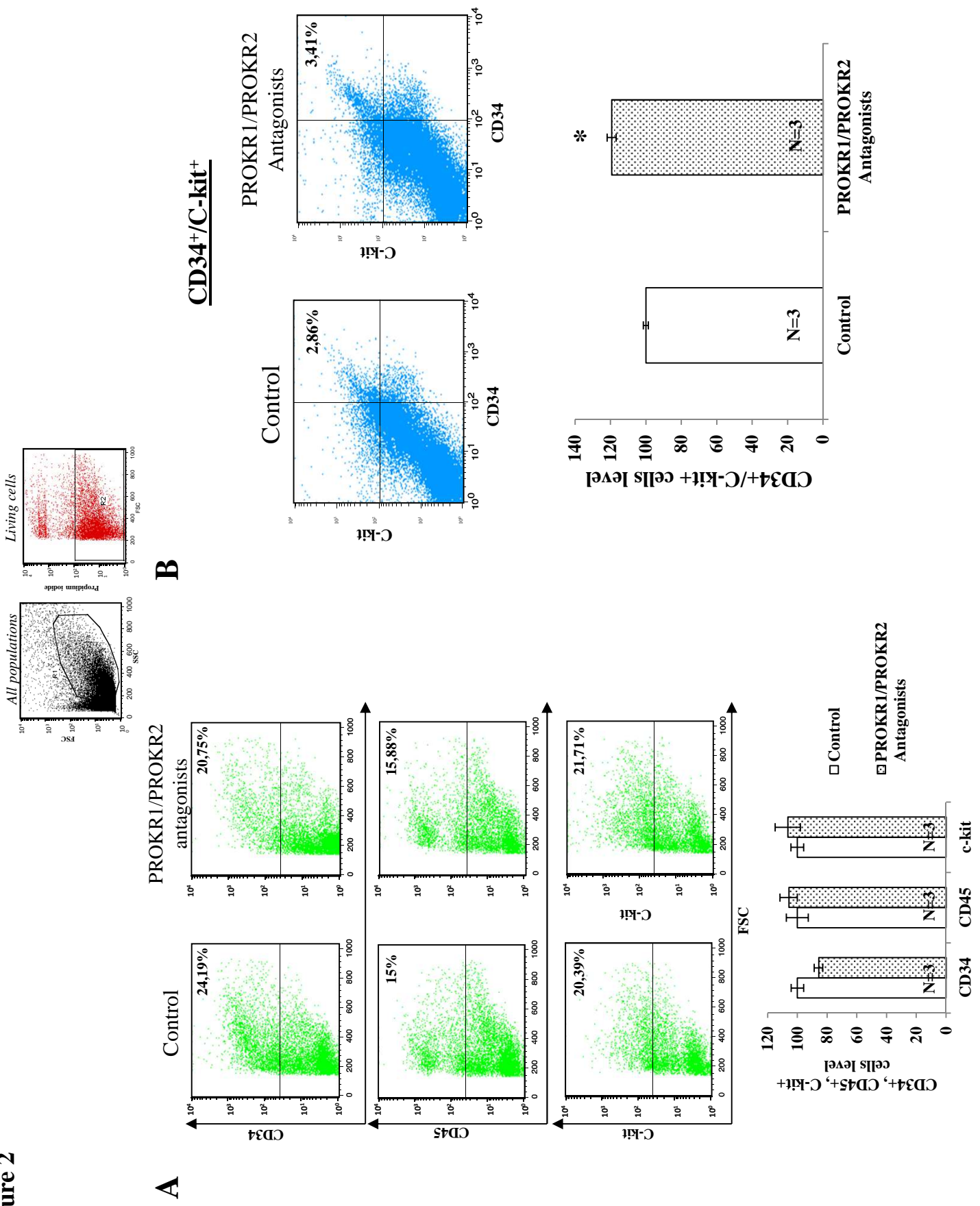


Figure 2



B

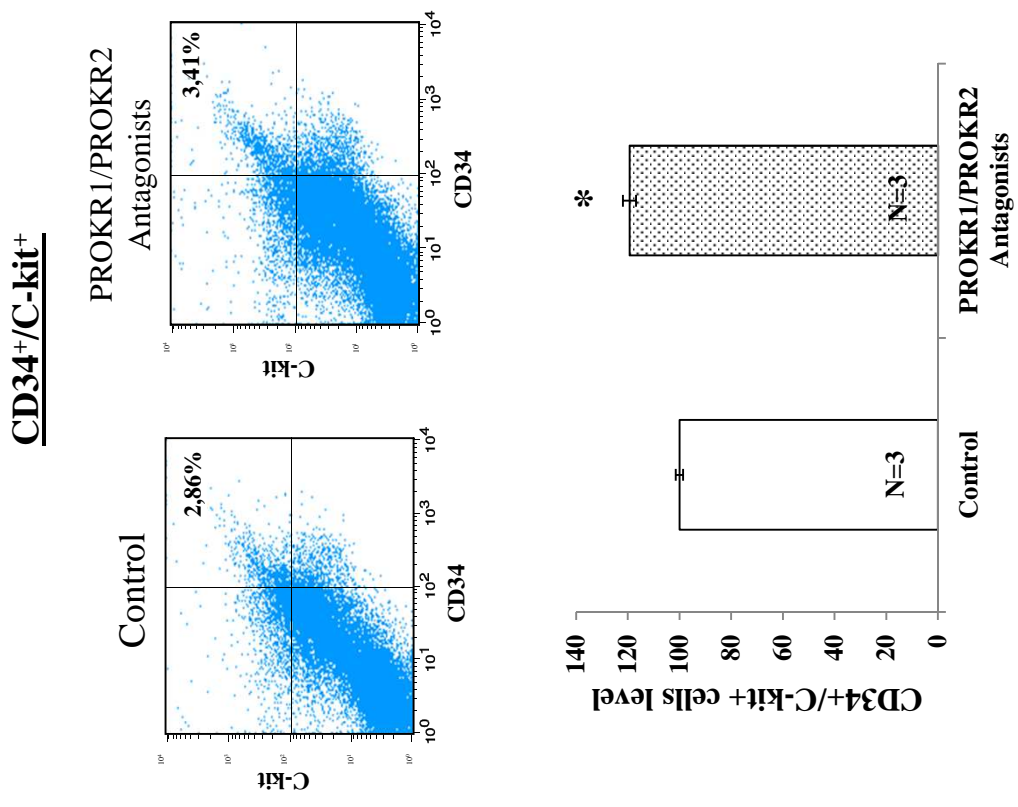


Figure 3

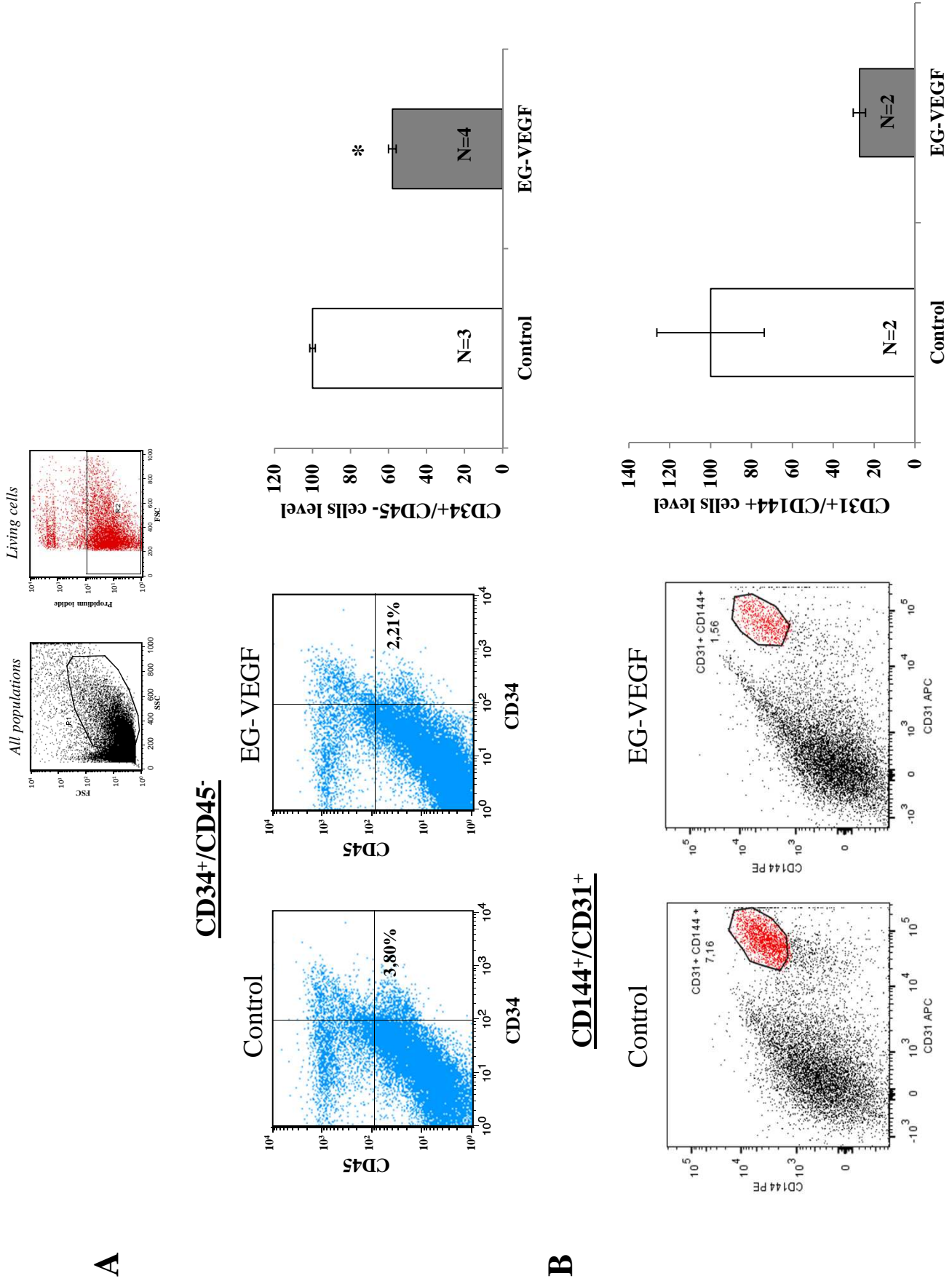


Figure 4

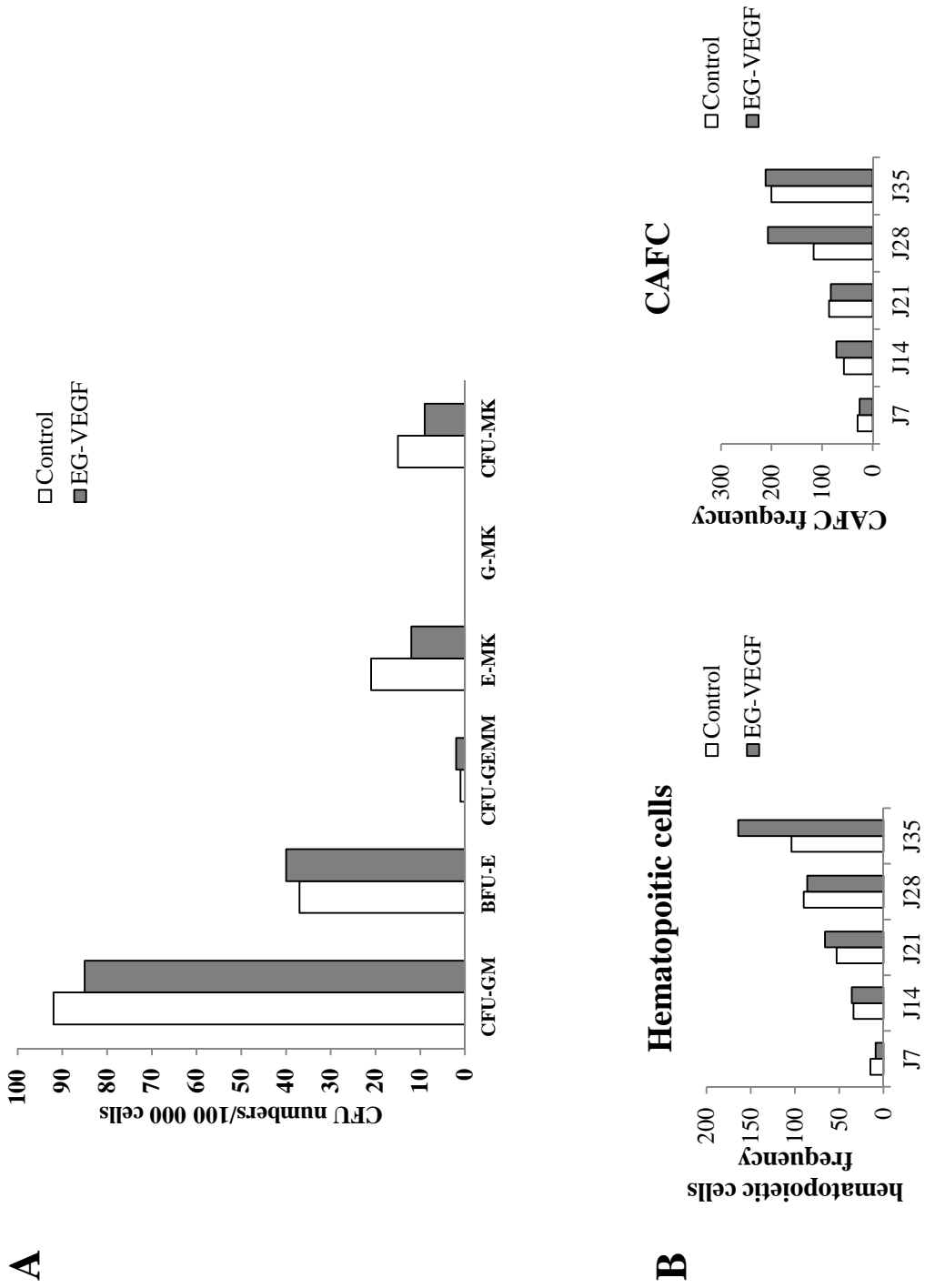


Figure 5

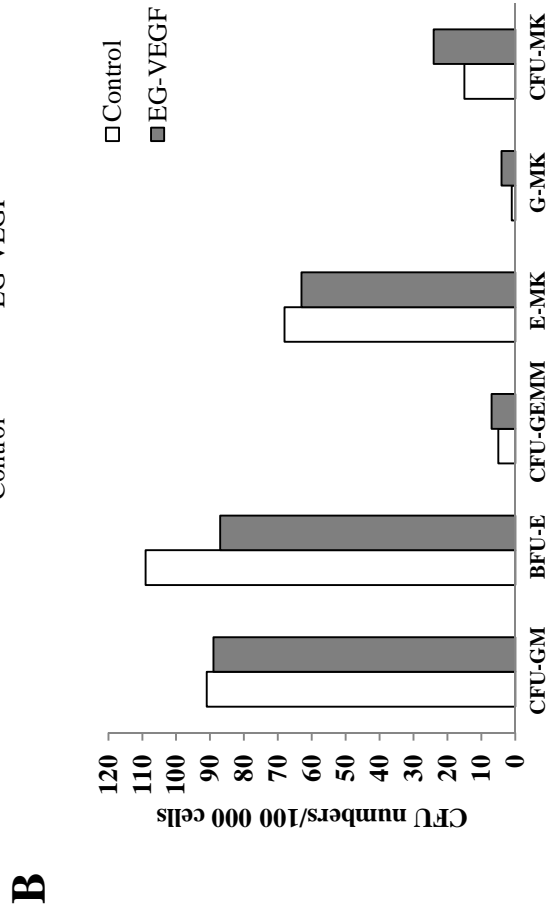
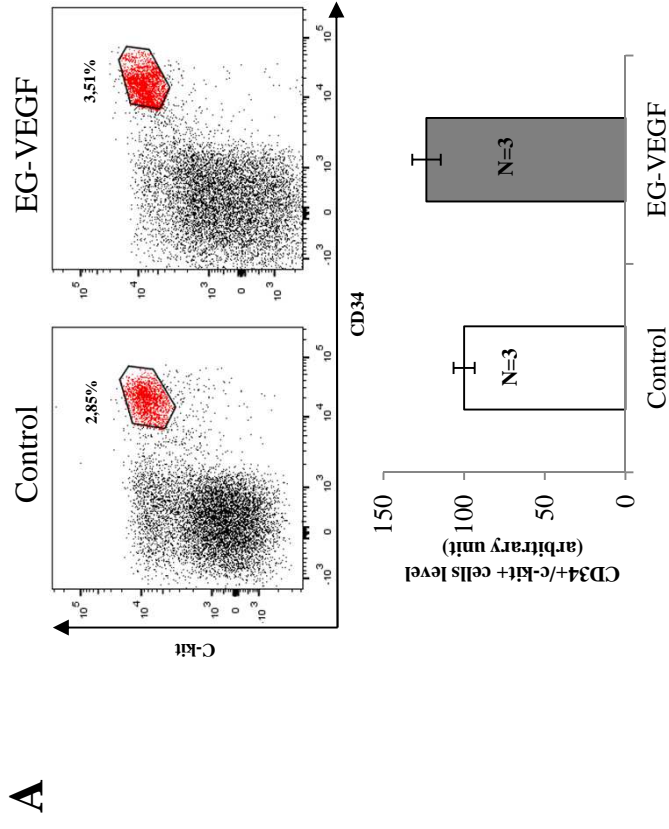


Figure 6

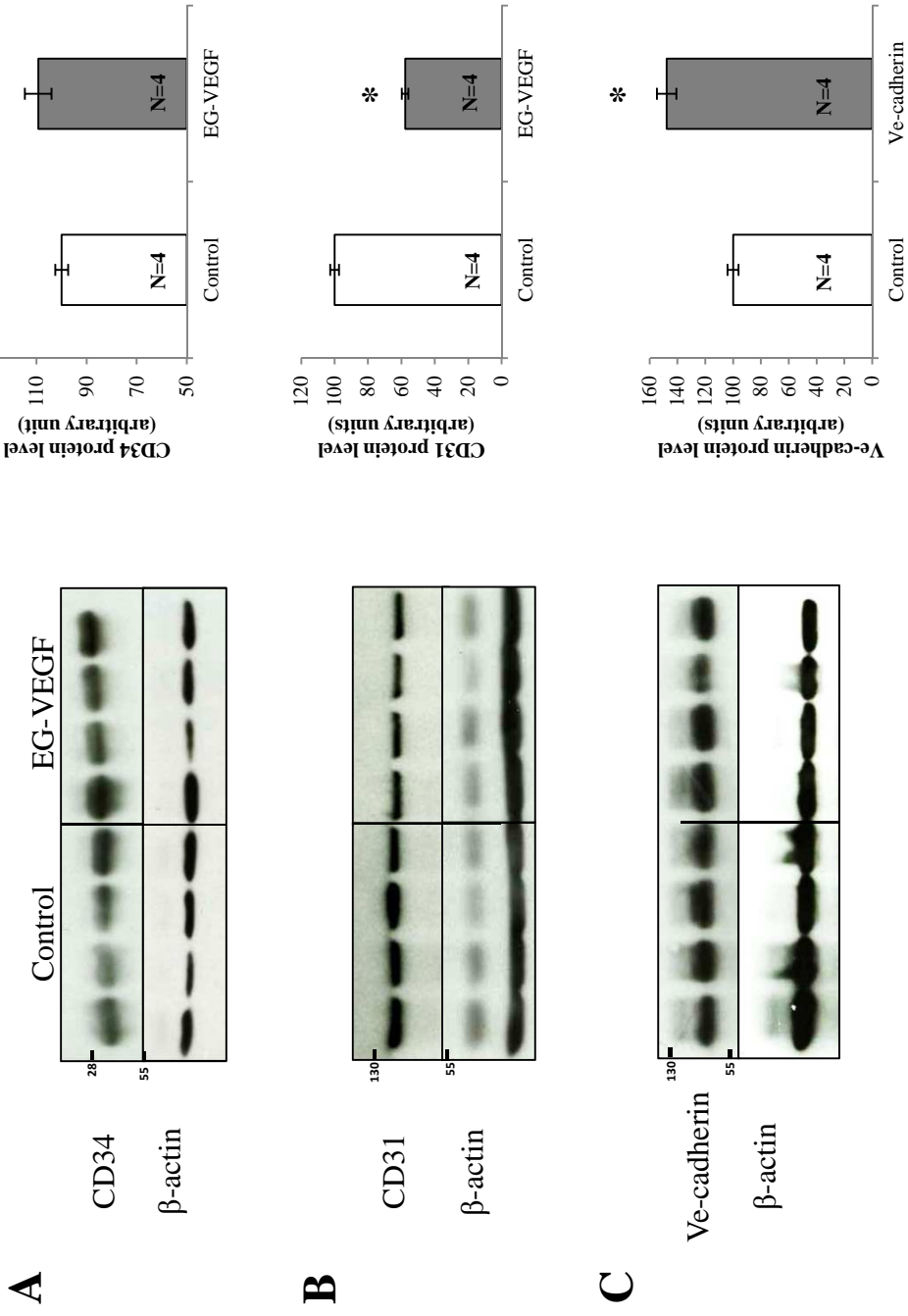


Figure 7

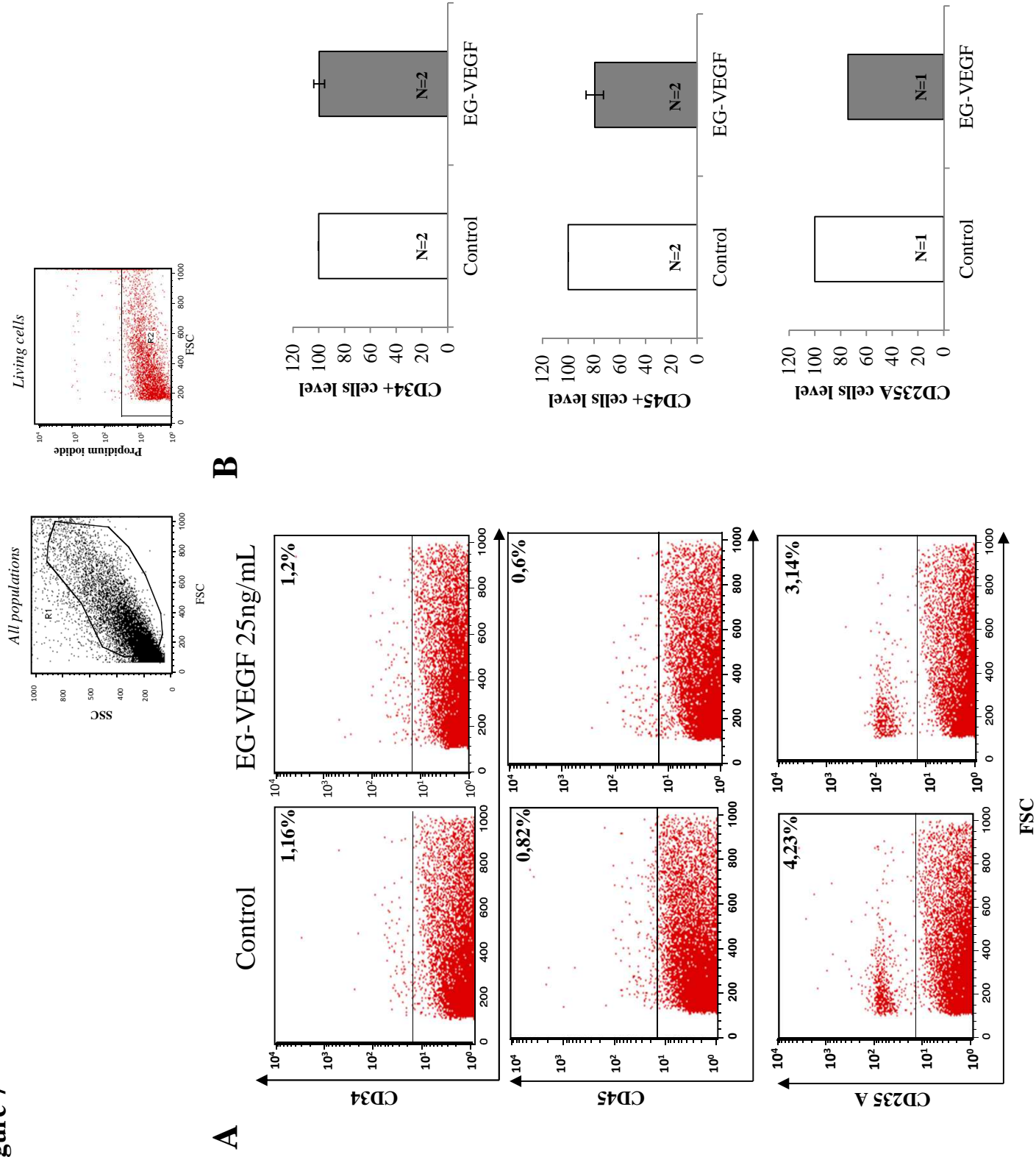
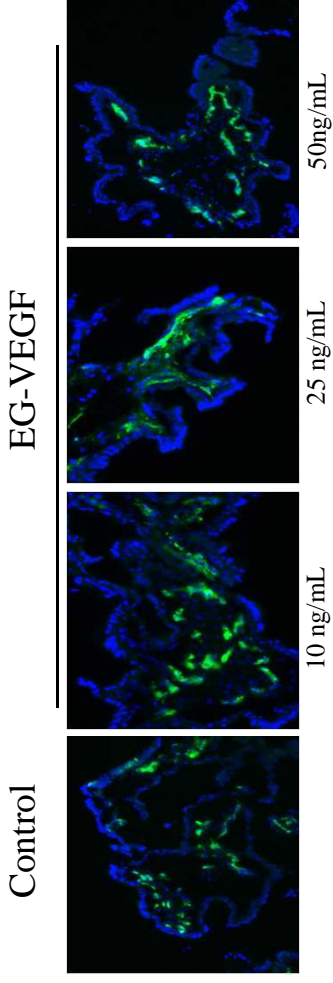
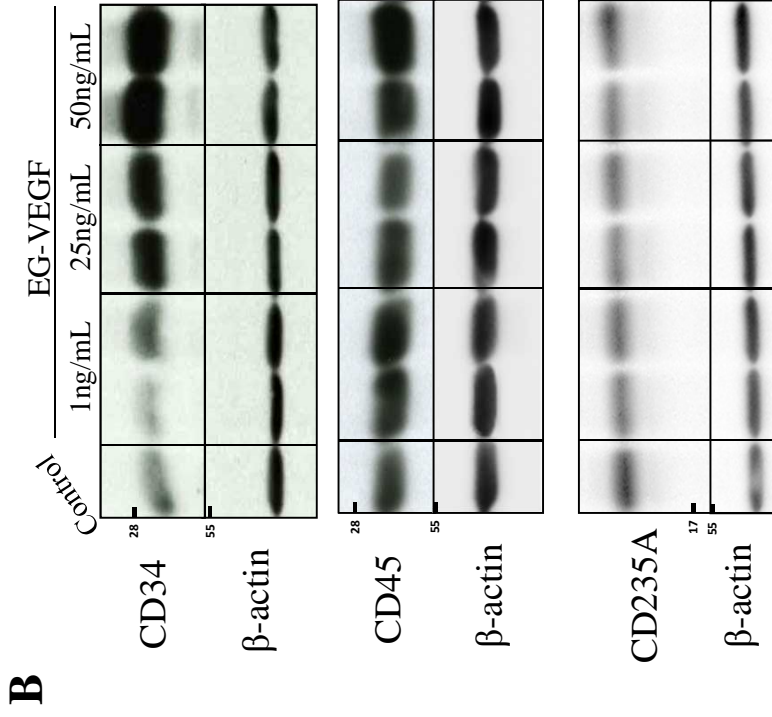


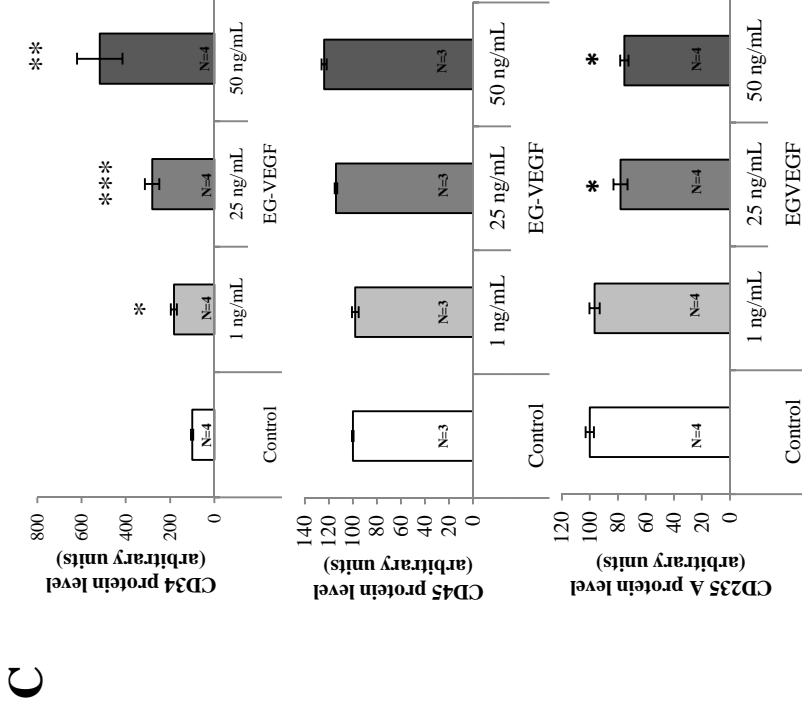
Figure 8



A



B



C

Figure 9

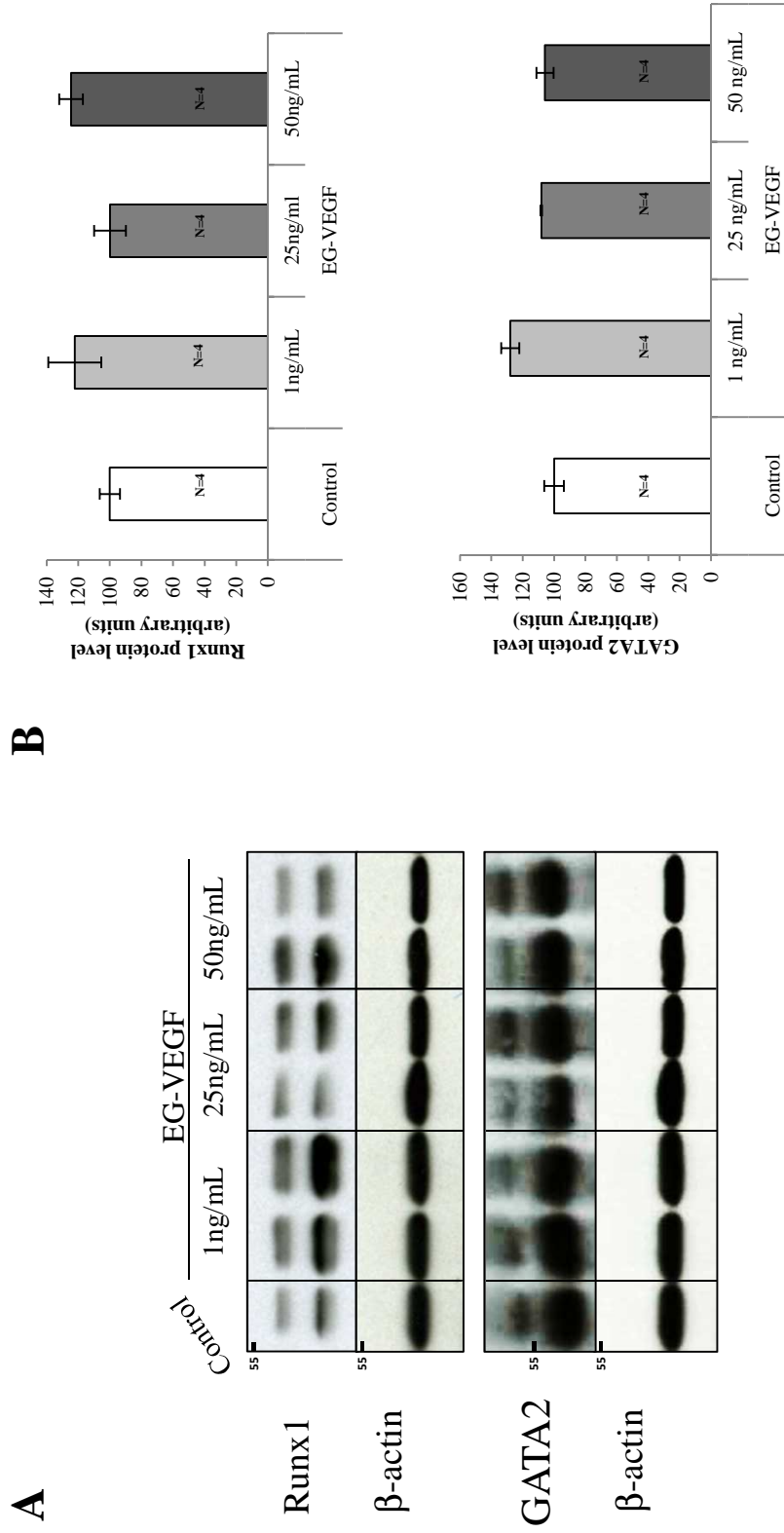


Figure S1

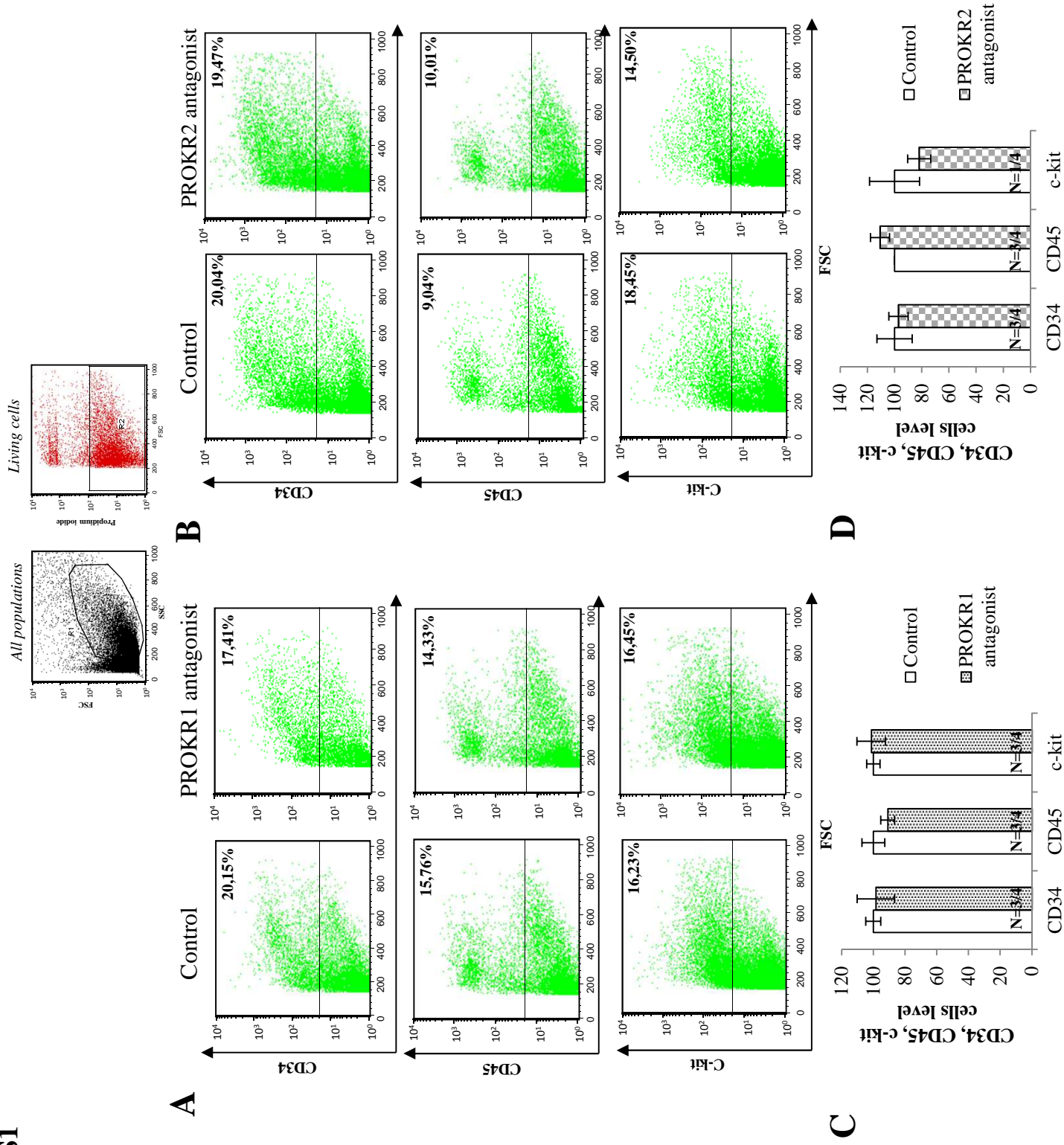
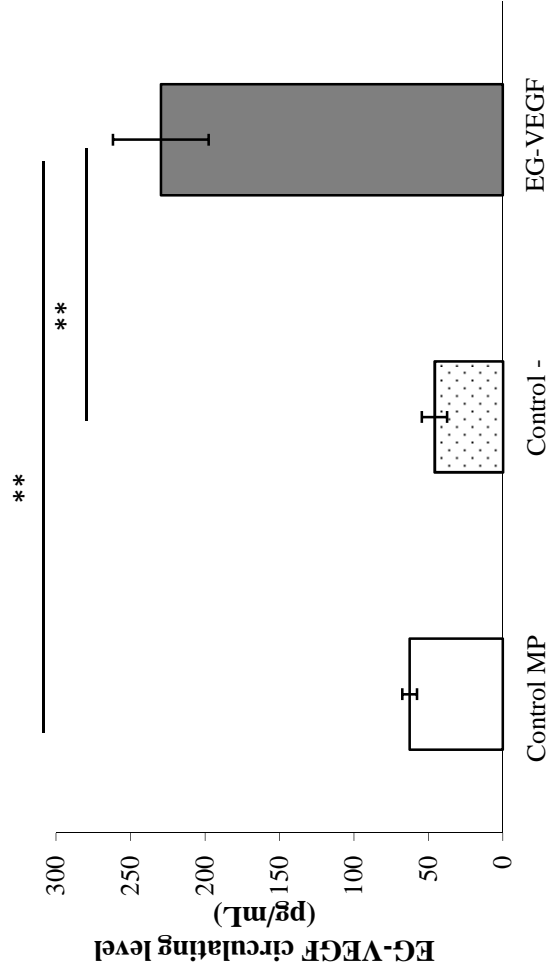


Figure S2



2.2 Discussion de la deuxième publication

2.2.1. Résumé des résultats

2.2.1.1. *La surexpression de l'EG-VEGF induit une diminution du nombre de cellules hématopoïétiques dans le placenta murin*

Dans un premier temps, nous avons cherché à déterminer par cytométrie en flux l'effet de la surexpression de l'EG-VEGF dans les placentas murins, sur le nombre de cellules exprimant soit des marqueurs hématopoïétiques, le récepteur c-kit et la glycoprotéine pan-leucocytaire CD45, soit un marqueur à la fois du lignage hématopoïétique et du lignage endothélial, la glycoprotéine CD34. Quel que soit le traitement, il ne semble pas y avoir d'effet significatif quant au nombre de cellules positives pour ces marqueurs. En revanche, lorsque nous nous intéressons aux cellules hématopoïétiques doublement immunomarquées CD34⁺/c-kit⁺, nous constatons une diminution du nombre de ces cellules à la suite de la surexpression de l'EG-VEGF.

2.2.1.2. *Le traitement simultané par les antagonistes PROKR1 et PROKR2 induit une élévation du nombre de cellules hématopoïétiques dans le placenta murin*

L'analyse par cytométrie en flux de l'effet de l'antagonisation de l'EG-VEGF sur le nombre de cellules exprimant soit CD34, soit CD45 ou bien c-kit, n'a révélé aucune différence significative. L'antagonisation d'un seul des deux récepteurs PROKR1 et PROKR2 a montré le même résultat (Figure S1). Cependant, l'injection simultanée des antagonistes PROKR1 et PROKR2 induit une augmentation significative du nombre de cellules hématopoïétiques CD34⁺/c-kit⁺. Ces données démontrent que l'EG-VEGF régule négativement la différenciation hématopoïétique placentaire et que son action fait intervenir ses deux récepteurs.

2.2.1.3. *Effet d'une surexpression de l'EG-VEGF sur les cellules endothéliales dans le placenta murin*

L'EG-VEGF étant connu comme un facteur pro-angiogène, son effet sur la différenciation endothéliale fut examiné. Nous montrons de manière inattendue que l'EG-VEGF diminue significativement le nombre de cellules VE-cadherine/CD31 positives et le nombre de cellules CD34⁺/CD45⁻. Ainsi, il semblerait que l'EG-VEGF ne favoriserait pas la différenciation endothéliale ou agirait sur la population endothéliale hémogénique.

2.2.1.4. Tests fonctionnels et voie de signalisation

Ayant montré que l'EG-VEGF agirait sur la régulation de la différenciation hématopoïétique, par le test clonogénique ou Colony-Forming Cell (CFC) assay, nous avons également étudié son effet sur l'habilité des précurseurs/progéniteurs hématopoïétiques du placenta murin à former différentes colonies hématopoïétiques sur un milieu semi-solide de méthylcellulose. Les résultats préliminaires ne semblent montrer aucune différence significative. Une tendance à la diminution des érythro-mégacaryocytes ou des mégacaryocytes a été observée, mais reste à être confirmée. Ce test ne permettant pas de détecter les cellules hématopoïétiques plus immatures, nous avons également eu recours au test LTC-IC (*Long-Term Culture Initiating Cell*) afin de déterminer l'influence potentielle de l'EG-VEGF sur la génération et la prolifération de cellules hématopoïétiques et des CAFC (*Cobblestone Area-Forming Cells*) à partir d'une population cellulaire placentaire CD34⁺/c-kit⁺. Les résultats préliminaires ne semblent pas être en faveur d'une action de l'EG-VEGF sur les progéniteurs hématopoïétiques dans la population d'étude. De la semaine 1 à la semaine 5, aucune différence significative n'a été répertoriée. Ces résultats suggèrent que l'EG-VEGF agirait seulement à des étapes précoces de la différenciation hématopoïétique.

Nous avons aussi analysé l'effet de l'EG-VEGF au niveau du foie fœtal. Il semblerait que celui-ci n'ait aucune incidence sur le nombre de cellules hématopoïétiques CD34/c-kit positives, ni sur la fonction hématopoïétique dans cet organe, comme en témoigne le test clonogénique préliminaire.

2.2.1.5. Effet de l'EG-VEGF sur l'expression des marqueurs hématopoïétiques et/ou endothélial dans le placenta murin

Nous nous sommes également intéressés à l'effet de la surexpression ainsi que de l'antagonisation de l'EG-VEGF sur l'expression du marqueur CD34 et de deux marqueurs endothéliaux, l'immunoglobuline CD31 (PECAM-1) et la glycoprotéine, VE-cadhérine (CD144). L'analyse de l'expression par Western Blot de CD34 à la suite de la surexpression de l'EG-VEGF n'a révélé aucune différence significative. En revanche, ce même traitement conduit à une diminution de l'expression de CD31. Quant à la VE-cadhérine, il semblerait que l'EG-VEGF induise une augmentation significative de son expression.

**2.2.1.6. Effet de l'EG-VEGF sur les cellules exprimant des marqueurs
hématopoïétiques dans le placenta humain**

Bien que dans le placenta humain aucune variation de l'activité hématopoïétique n'ait été répertoriée suite au pic de l'expression de l'EG-VEGF, nous avons étudié son effet sur le nombre de cellules positives pour les marqueurs CD34, CD45 et CD235A (ou glycophorine A, un marqueur érythroïde). Les études préliminaires par cytométrie en flux montrent que l'EG-VEGF à 25 ng/mL ne semble pas influencer sur le nombre de cellules positives pour CD34 ou CD45. En revanche, il pourrait y avoir une tendance à la baisse de cellules CD235A positives.

**2.2.1.7. Effet de l'EG-VEGF sur les niveaux d'expression des marqueurs CD34, CD45 et
CD235A ainsi que des facteurs de transcription Runx1 et GATA-2 chez l'humain**

L'EG-VEGF induirait une augmentation de l'expression de CD34. Cet effet fut observé par immunofluorescence et par Western Blot. En revanche, il induirait à 25 ng/mL et 50 ng/mL une diminution significative de l'expression de CD235A et ne semble pas avoir d'effet sur l'expression de CD45. Aussi, avons-nous déterminé l'effet de cette cytokine sur l'expression de deux facteurs de transcription connus pour être impliqués dans la différenciation hématopoïétique : Runx1 et GATA2. Les travaux ont montré l'absence d'effet significatif quelle que soit la concentration de l'EG-VEGF utilisée. Ces résultats suggèrent que l'EG-VEGF ne serait pas impliqué dans la différenciation avancée de l'hématopoïèse chez l'humain.

2.2.2. Conclusion

Ces résultats préliminaires semblent montrer que l'EG-VEGF aurait un effet inhibiteur sur la différenciation des cellules hématopoïétique, mais aussi sur celle des cellules endothéliales. Ces données sont en faveur de l'hypothèse selon laquelle les cellules souches hématopoïétiques (CSHs) auraient pour origine un intermédiaire endothéliale avec un potentiel hématopoïétique, l'endothélium hémogénique. Une notion renforcée par le fait que les tests fonctionnels : le test clonogénique et LTC-IC, n'ont montré aucun effet significatif de l'EG-VEGF.

2.2.3. Discussion des résultats

2.2.3.1. Chez la souris

L'analyse de l'expression de cette cytokine chez la souris a montré qu'elle était fortement exprimée au début de la gestation mais surtout que son pic d'expression précède celui de l'activité hématopoïétique (Hoffmann et al. 2007). En outre, des travaux du laboratoire ont démontré qu'au-delà de son rôle pro-angiogène, l'EG-VEGF pourrait agir comme un facteur de contrôle de plusieurs processus au cours du premier trimestre de grossesse. En effet, il inhibe le déclenchement trop précoce de l'invasion trophoblastique et indirectement le remodelage des artères spiralées utérines par les CTEV (Hoffmann et al. 2009). A la lumière de ces nouvelles données, nous émettons l'hypothèse selon laquelle l'EG-VEGF inhiberait la différenciation hématopoïétique dans le placenta murin. Pour y répondre, la surexpression de l'EG-VEGF, et l'antagonisation par l'injection simultanée de deux antagonistes pour ces récepteurs, PROKR1 et PROKR2 ou de l'un ou l'autre de ses récepteurs ont été utilisées. La première approche fut réalisée dans des conditions où les doses administrées de l'EG-VEGF étaient dans des proportions pharmacologiques, puisque nous délivrions 4 µg d'EG-VEGF en 7 jours. Nous risquions donc d'observer et d'interpréter des résultats qui pouvaient s'avérer différents de l'action réelle de l'EG-VEGF. Ainsi pour valider nos effets, nous nous sommes placés également dans des conditions plus physiologiques en antagonisant les récepteurs PROKR1 et PROKR2. Au moment du pic de l'activité hématopoïétique placentaire vers E12,5, les CSHs du placenta présentent un phénotype CD34⁺/c-kit^{hi} (Gekas et al. 2005). Ainsi afin d'étudier l'effet de l'EG-VEGF sur la différenciation hématopoïétique, nous avons réalisé des doubles immunomarquages à l'aide d'anticorps dirigés contre ces deux marqueurs.

En raison du caractère pro-angiogène de l'EG-VEGF préalablement décrit dans la littérature (Brouillet et al. 2010), nous nous attendions à une élévation du nombre de cellules

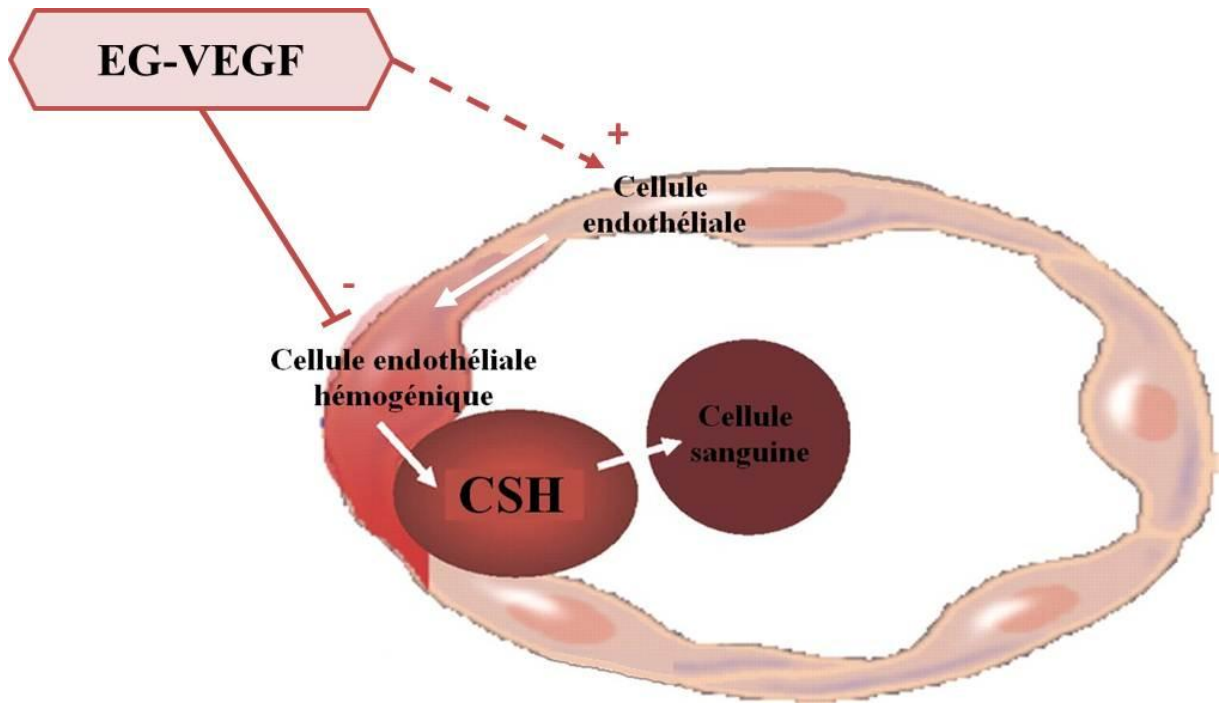


Figure 42 : Action potentielle de l'EG-VEGF sur les cellules endothéliales hémogéniques

L'EG-VEGF inhiberait la différenciation hématopoïétique en agissant sur les cellules endothéliales hémogéniques ainsi que la différenciation endothéliale à des stades précoces. En revanche, il favoriserait l'angiogenèse des vaisseaux préexistants. (Adaptée de Hirschi et al. 2012)

endothéliales qui témoignerait d'une favorisation vers une différenciation angiogénique. Or, nous avons constaté une diminution du nombre de cellules exprimant Ve-cadhérine et CD31 ou bien positives pour CD34 et négatives pour CD45. Par ailleurs, les résultats préliminaires du test clonogénique et du test LTC-IC n'ont révélé aucune différence suggérant que l'EG-VEGF ne serait pas impliqué dans la fonction hématopoïétique mais interviendrait plus précocement dans leur différenciation. L'ensemble de ces résultats laisse à penser que l'EG-VEGF pourrait agir sur un intermédiaire endothélial avec un potentiel hématopoïétique, la cellule endothéliale hémogénique (Figure 42). L'origine anatomique ainsi que la nature exacte des précurseurs directs des CSHs dans l'embryon sont encore débattues. Deux grandes théories principales sont énoncées, soit, il existerait un précurseur commun aux deux lignées, l'hémangioblaste (Murray 1932 ; Choi et al. 1998 ; Kennedy et al. 2007), ou bien, les CSHs dériveraient d'une cellule endothéliale hémogénique ayant toutes les caractéristiques morphologiques et phénotypiques des cellules endothéliales mais possédant en plus, la capacité à produire des CH (Jaffredo et al. 2005 ; Sabin et al. 2002 ; Goldi et al. 2008 ; Kissa et al. 2010 ; Boisset et al. 2010). Des expériences supplémentaires sont à envisager afin de mieux caractériser l'endothélium hémogénique et, par conséquent, de mieux comprendre le mécanisme de différenciation des cellules hématopoïétiques placentaires.

2.2.3.2. Chez l'humain

Le profil d'expression de l'EG-VEGF est similaire à celui de la souris, en revanche celui de son activité hématopoïétique au sein du placenta diffère. Aucun pic d'activité n'a été répertorié chez l'humain et les progéniteurs hématopoïétiques sont présents tout au long de la grossesse et jusqu'au terme (Robin et al. 2009). Il nous est donc plus difficile de transposer notre hypothèse au placenta humain. En outre, les placentas ont été collectés entre 8 et 10 SA. Or, bien que la circulation sanguine ne puisse être détectée dans les espaces intervilleux avant 12 SA (Hustin and Schaaps, 1987 ; Jaffé et al, 1997), les premiers vaisseaux fœtaux apparaissent vers 18 jpc (Hamilton and Bay, 1960) et les progéniteurs hématopoïétiques ont été détectés dans le placenta humain dès 6 semaines de grossesse (Robin et al. 2009). Nous nous situons, par conséquent, bien en aval des premières étapes de la différenciation hématopoïétiques et endothéliales. Néanmoins, nous avons tout de même cherché à déterminer l'effet de l'EG-VEGF sur différents marqueurs hématopoïétiques. L'analyse des résultats obtenus par cytométrie en flux s'est révélée complexe en raison du faible pourcentage des marqueurs et de la grande hétérogénéité entre les résultats. Nous pensons que

nous avons perdu certains épitopes suite au passage des explants placentaires en culture sur matrigel suivi des étapes de dissociation des cellules.

En outre, la glycoprotéine CD34 étant à la fois un marqueur endothélial et un marqueur hématopoïétique, le fait que nous ayons observé chez l'humain une augmentation significative de son expression à la suite d'un traitement par l'EG-VEGF pourrait témoigner du rôle pro-angiogène de cette cytokine au cours du premier trimestre de la grossesse. Nous pouvons en effet supposer que l'EG-VEGF induit une élévation du nombre de cellules endothéliales déjà engagées dans un processus angiogénique. L'étude d'autres marqueurs endothéliaux tels que CD31 ou Ve-cadhérine, par des expériences de cytométrie en flux seront nécessaires afin de confirmer cette hypothèse.

Ainsi, l'ensemble de cette étude suggère que l'EG-VEGF joue un rôle dans la différenciation hématopoïétique murine en agissant sur la cellule endothéliale hémogénique. En revanche compte tenu du stade de développement des placentas humains utilisés, nous ne pouvons pas conclure à un effet quelconque de cette cytokine au niveau de l'endothélium hémogénique.

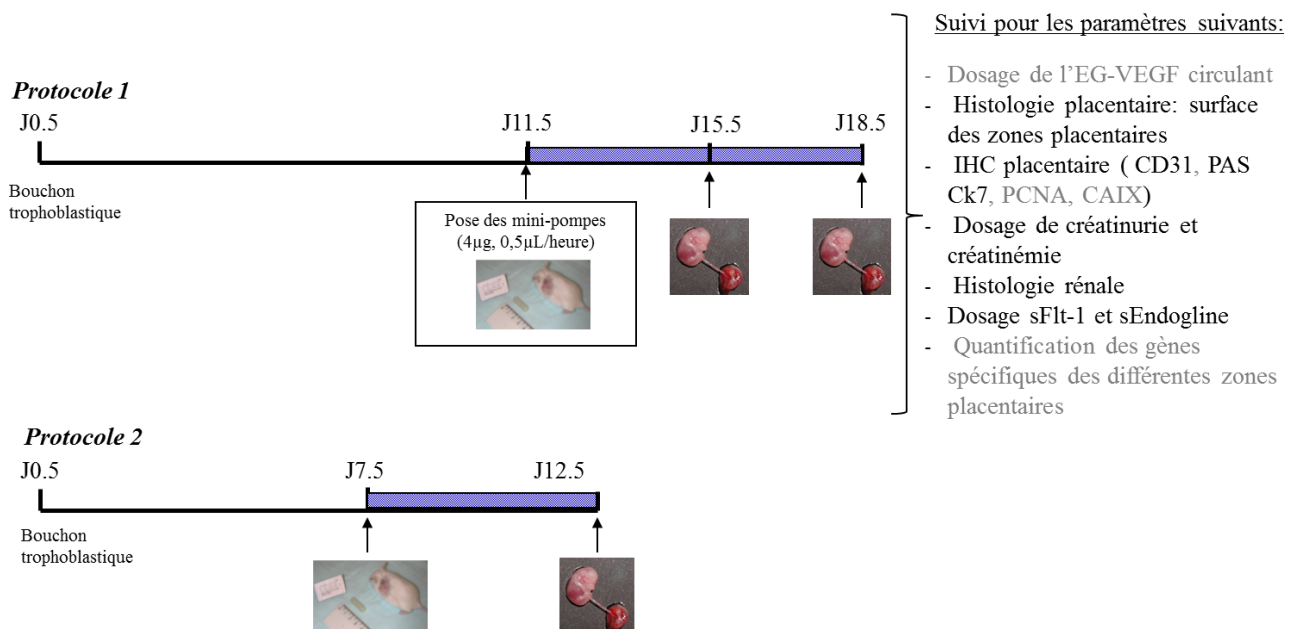


Figure 43: Développement d'un modèle murin de la Pré-éclampsie.

Deux approches ont été utilisées afin de générer des souris gestantes présentant des symptômes de la Pré-éclampsie. *Protocole 1* : des mini-pompes osmotiques délivrant en continu de l'EG-VEGF (4 µg ; 0,5 µL/h) sont posées chez des souris gestantes à 11,5 jpc, les placentas sont prélevés à 15,5 jpc ou à 18,5 jpc. *Protocole 2* : des mini-pompes osmotiques délivrant en continu de l'EG-VEGF (4 µg ; 0,5 µL/h) sont posées chez des souris gestantes à 7,5 jpc, les placentas sont prélevés à 12,5 jpc. Les souris issues du *Protocole 1* ont été suivies pour les paramètres suivants : dosage de l'EG-VEGF circulant, immunohistochie de différents marqueurs placentaires, dosage de la créatinurie et de la créatinémie, histologie placentaire et rénale, dosage de sFlt-1 et sEndogline ainsi que la quantification de gènes spécifiques des différentes zones placentaires. Seuls les paramètres en gras seront explicités. Quant aux souris issues du *Protocole 2*, elles ont été utilisées pour compléter les données sur le dosage de sFlt-1 et sEndogline.

III. Contribution au développement d'un modèle animal de la Pré-éclampsie

3.1 Contexte et présentation de l'étude

La Pré-éclampsie (PE) est une pathologie multifactorielle de la grossesse, spécifique de la gestation humaine, qui survient classiquement à partir du 2^{ème} trimestre. Elle est une cause majeure de mortalité et de morbidité maternelles et périnatales. Bien que des études récentes ont montré qu'elle soit associée à une dysfonction placentaire, responsable de la libération dans la circulation maternelle de diverses molécules, entraînant l'apparition des symptômes pathologiques suivant : hypertension artérielle, néphropathie glomérulaire (protéinurie) et augmentation de la perméabilité vasculaire ; cette complication reste imparfaitement comprise. Ainsi, de nombreux modèles murins ont été développés afin d'apporter une meilleure compréhension et de nouvelles pistes thérapeutiques pour cette pathologie de la PE (Doridot et al. 2012). La génération de tels modèles était basée sur l'altération de paramètres clés de la physiopathologie de la placentation et de la PE tels que l'hypertension artérielle, le système rénine angiotensine, l'immunité et l'auto-immunité, l'hypoxie ou encore les gènes soumis à empreinte parentale (Davisson et al. 2002 ; Takimoto et al. 1996 ; Bergmann et al. 2010 ; Zhou et al. 2008 ; van Dijk et al. 2005). Cependant, aucun de ces modèles ne récapitulait tous les symptômes de cette pathologie. Dans la PE, il est bien établi que l'invasion trophoblastique est altérée. Ainsi, un nombre grandissant de recherches est axé sur les facteurs régulateurs de ce processus. Notre laboratoire a montré récemment, que le facteur EG-VEGF était responsable de l'inhibition de l'invasion trophoblastique (Hoffmann et al. 2009). Or, un défaut de ce processus physiologique contribuerait à un mauvais remodelage vasculaire utérin engendrant une hypoperfusion de la chambre intervillieuse, cause princeps du développement de la PE. A partir de ce constat, nous avons émis l'hypothèse qu'une expression soutenue de l'EG-VEGF au-delà de sa période normale d'expression pourrait contribuer au développement de la PE. Afin de la vérifier, nous avons utilisé le modèle souris. Le laboratoire a précédemment montré que la souris présente un profil d'expression de l'EG-VEGF comparable à celui observé chez l'humain au cours de la gestation et que l'EG-VEGF et ses récepteurs sont localisés dans des types cellulaires similaires (Hoffmann et al. 2007). Chez la souris, l'expression maximale de l'EG-VEGF se situe autour du 10,5 jpc, correspondant au premier trimestre chez la femme.

	E15.5	E18.5
Taille des portées	—	—
Poids du fœtus	—	—
Poids du placenta	—	↘
Efficacité placentaire	—	↗
Zones placentaires		
• Décidue	↘	↘
• Spongiotrophoblaste	↗	↗
• Labyrinthe	—	⋯↘

Figure 44: Tableau récapitulatif des effets macroscopiques du maintien de l'expression de l'EG-VEGF sur la gestation de la souris

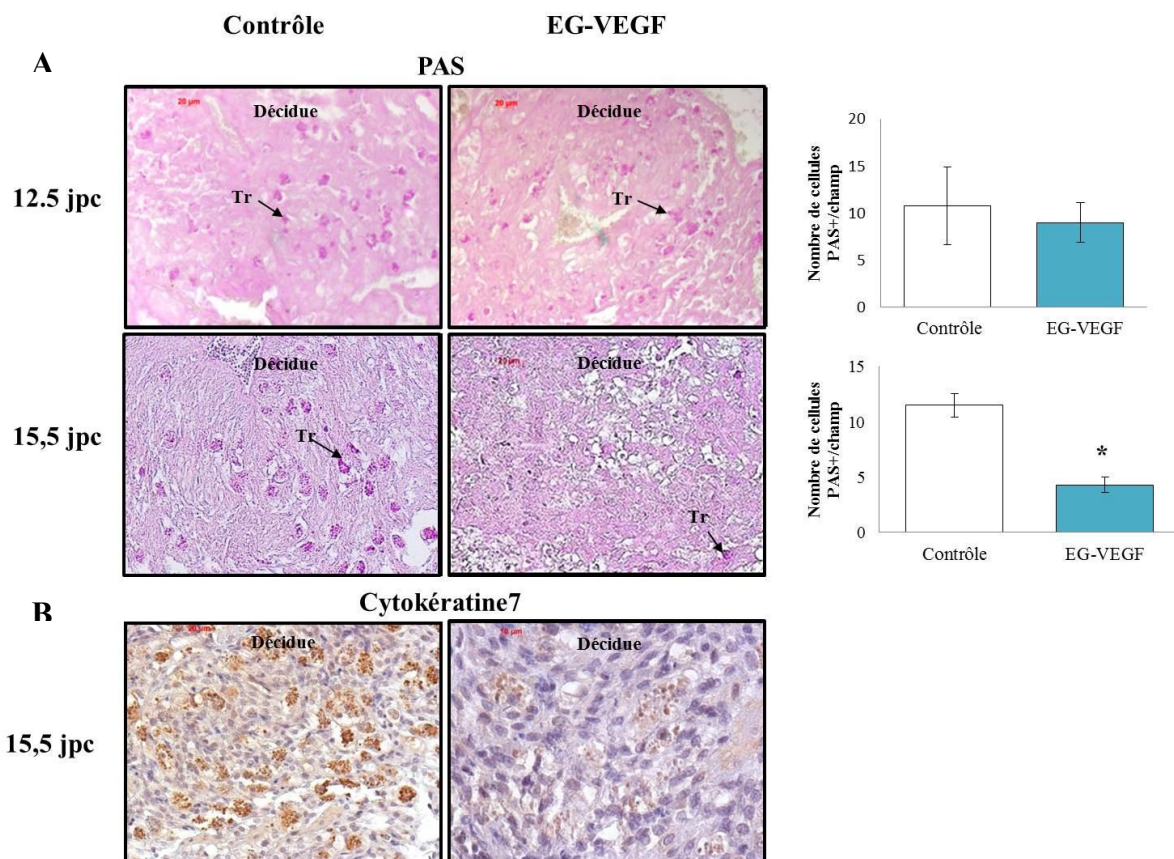


Figure 45 : L'EG-VEGF altère l'invasion trophoblastique à 15,5 jpc

A. Coloration PAS (Periodic Acid Schiff) des placentas de souris traitées ou non par l'EG-VEGF, à 12,5 jpc et 15,5 jpc. **B.** Marquage de la cytokératine 7 par immunohistochimie sur des placentas de souris traitées ou non par l'EG-VEGF, à 15,5 jpc. Tr = cellule Trophoblastique. ± SEM, *p<0.05.

Ainsi, dans notre modèle murin, nous avons examiné l'effet d'une prolongation artificielle, au-delà de 10,5 jpc, de l'EG-VEGF dans la circulation de la souris gravide. Trois protocoles ont été mis en place, le premier consista à déposer des mini-pompes osmotiques délivrant en continu de l'EG-VEGF à 7,5 jpc et à prélever les placentas à 12,5 jpc. L'ensemble des placentas et des sérums utilisés dans cette condition, provient des expériences menées pour l'étude de l'effet de l'EG-VEGF sur la différenciation hématopoïétique placentaire. Dans les deux autres protocoles, les mini-pompes furent déposées à 11,5 jpc et les placentas furent récupérés soit à 15,5 jpc, soit à 18,5 jpc (Figure 43). Le choix des jours d'arrêt des expériences, a été motivé par le fait que E12,5 correspond à la fin du premier trimestre de la grossesse chez la femme, tandis que E15,5 correspond à l'apparition des symptômes de la PE. Quant à E18, 5, il nous permet de déterminer si les souris ont développé des systèmes compensatoires.

3.2 Discussion de la troisième étude

3.2.1. Résumé des résultats

Dans cette partie, ne seront rapportés que les résultats majeurs trouvés par l'équipe ainsi que ceux que j'ai démontrés pour le développement de ce modèle.

3.2.1.1. Effets du maintien de l'EG-VEGF sur le poids placentaire et fœtal et sur l'efficacité placentaire à 15,5 et 18,5 jpc

Dans un premier temps, des analyses anatomiques ont été réalisées afin de déterminer si le maintien de l'expression de l'EG-VEGF au-delà de 10,5 jpc, était responsable de variations du poids des fœtus et des placentas, ainsi que d'altérations histologiques placentaires. A 15,5 jpc, ni le poids des fœtus, ni celui des placentas ne sont affectés. L'efficacité placentaire mesurée par le rapport entre le poids du fœtus et le poids du placenta n'est donc pas modifiée. En revanche, la surface de la décidue était réduite dans le groupe traité par l'EG-VEGF, témoignant d'un défaut de l'invasion trophoblastique, tandis que celle de la zone jonctionnelle était élargie. A 18,5 jpc, le poids des placentas diminue engendrant une augmentation de l'efficacité placentaire. Les surfaces de la décidue et de la zone jonctionnelle gardent le même profil qu'à 15,5 jpc (Figure 44).

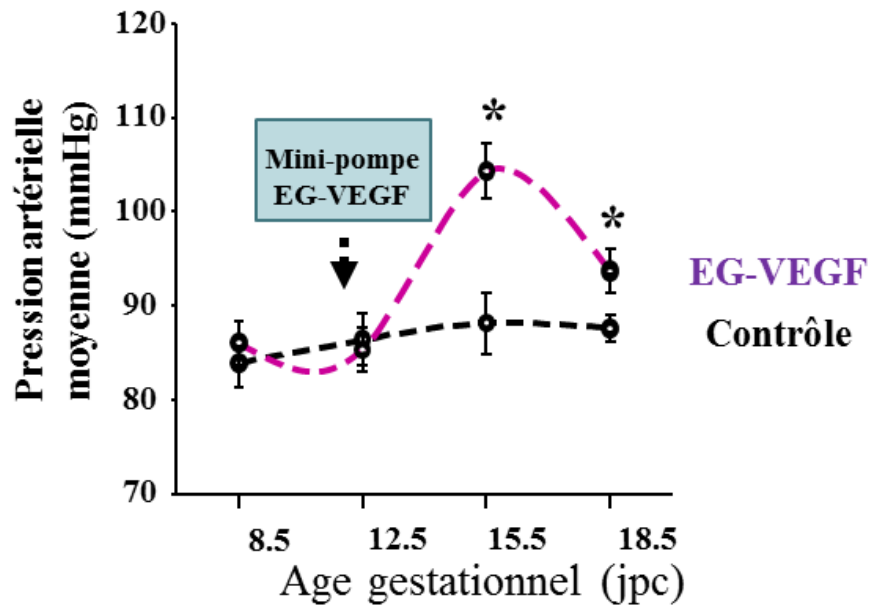


Figure 46: Effet du traitement par l'EG-VEGF sur la pression artérielle moyenne chez les souris gestantes

La pose d'une mini-pompe délivrant de l'EG-VEGF à 11,5 jpc induit une augmentation significative de la pression artérielle maternelle à 15,5 jpc. Celle-ci tout en restant significativement élevée décroît à 18,5 jpc.

3.2.1.2. Effet du maintien de l'EG-VEGF sur l'invasion trophoblastique murine

Afin de confirmer que le maintien de l'expression de l'EG-VEGF induit une altération de l'invasion trophoblastique à 15,5 jpc, nous avons réalisé une coloration PAS (*Periodic Acid Schiff*), qui permet de mettre en évidence les polysaccharides présents au niveau des cellules trophoblastiques à glycogène. Nous constatons qu'à 12,5 jpc, le nombre de cellules trophoblastiques à glycogène est similaire entre les placentas contrôles et ceux traités par l'EG-VEGF. En revanche à 15,5 jpc, le nombre de ces cellules est significativement diminué dans les placentas traités par l'EG-VEGF (Figure 45. A). Nous avons également réalisé un marquage de la cytokératine 7, un marqueur spécifique de cellules trophoblastiques, à 15,5 jpc. Ce marquage confirme les résultats obtenus avec celui du PAS à 15,5 jpc. L'ensemble de ces résultats corrobore l'existence d'un défaut de l'invasion trophoblastique visible à 15,5 jpc, causé par le maintien de l'expression de l'EG-VEGF (Figure 45. B).

3.2.1.3. Le maintien de l'expression de l'EG-VEGF induit une hypertension artérielle

La PE se définit par l'apparition *de novo* d'une hypertension après la 20^{ème} SA (140/90 mmHg pour la systole et la diastole respectivement et 160/110 dans les PE sévères). Afin de mettre en évidence le développement potentiel d'un des symptômes clés de la PE dans ce modèle *in vivo*, nous avons mesuré la pression artérielle au niveau de la queue des souris. Le traitement par l'EG-VEGF à 11,5 jpc, entraîne l'apparition d'une hypertension artérielle maternelle à 15,5 jpc. Celle-ci tout en restant significativement élevée par rapport au contrôle décroît progressivement à 18,5 jpc (Figure 46).

3.2.1.4. Le maintien de l'expression de l'EG-VEGF induit un dysfonctionnement rénal

Le développement d'une protéinurie est également un indicateur de la survenue de la PE. Ainsi, l'analyse du rapport entre l'albumine et la créatinine urinaire montre que le maintien de l'expression de l'EG-VEGF induit une élévation significative de la protéinurie à 15,5 jpc ainsi qu'à 18,5 jpc (Figure 47). Une augmentation du nombre de glomérules anormaux est également constatée à ces mêmes âges gestationnels (Figure 48). Ces données suggèrent une atteinte de la fonction rénale.

3.2.1.5. Expression de l'EG-VEGF chez des mâles

Les résultats obtenus sur l'effet de l'EG-VEGF au niveau du rein suggéraient que, soit l'EG-VEGF agirait directement sur ce tissu, soit, que cet effet n'est que secondaire à un effet

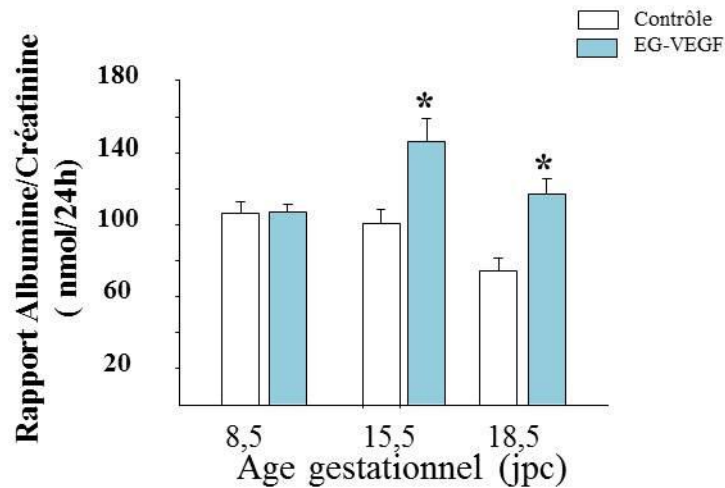


Figure 47: Le maintien de l'expression de l'EG-VEGF au-delà de 10,5 jpc induit une augmentation de la protéinurie chez la souris gestante à E15,5 et à E18,5

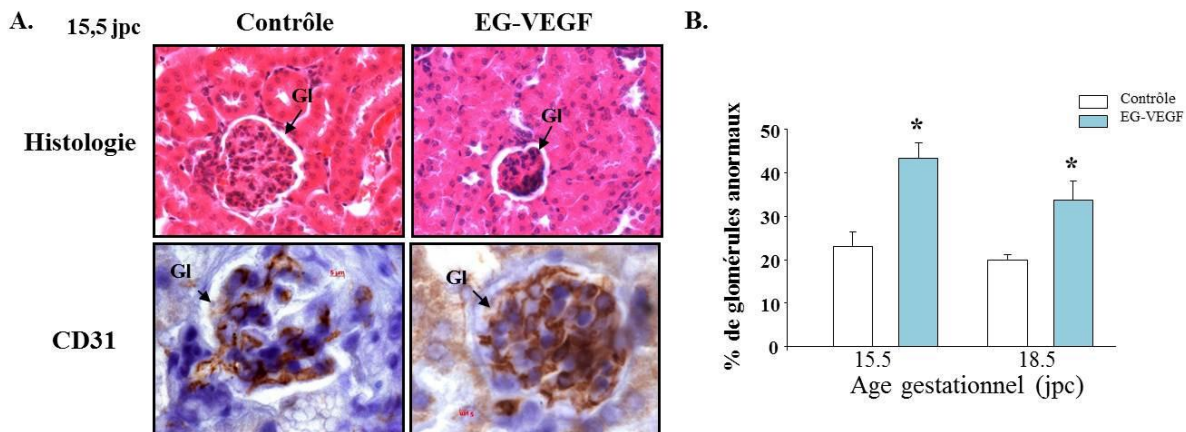


Figure 48: Le maintien de l'expression de l'EG-VEGF au-delà de E10,5 entraîne un développement glomérulaire anormal

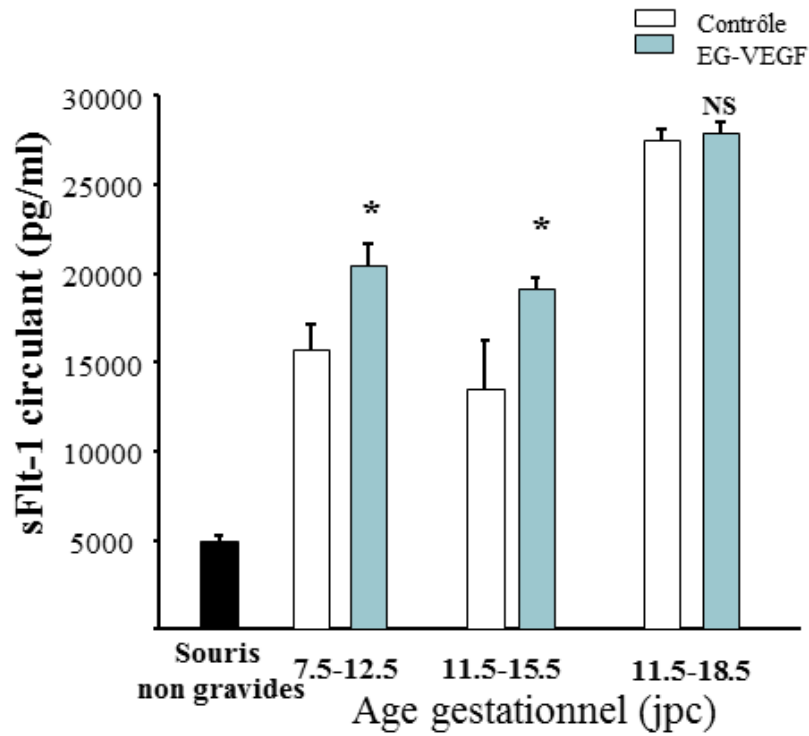
A. L'analyse histologique des reins à 15,5 jpc de souris traitées par l'EG-VEGF. Coloration hématoxyline et marquage de CD31. **B.** Représentation graphique du pourcentage de glomérules anormaux à 15,5 jpc et 18,5 jpc chez les souris traitées ou non par l'EG-VEGF. Gl = Glomérule. \pm SEM, * $p < 0.05$

premier sur le placenta. Afin de déterminer si les défauts rénaux étaient dus à une action directe de l'EG-VEGF sur le rein, les mêmes expériences ont été réalisées chez des mâles. Des mini-pompes délivrant de l'EG-VEGF ont été déposées, au bout de 5 jours de traitement, la tension artérielle, la protéinurie ainsi que la morphologie des glomérules ont été étudiées. Aucune perturbation rénale, ni développement d'une hypertension artérielle n'ont été répertoriés. Ces résultats suggèrent que le dysfonctionnement rénal est secondaire au dysfonctionnement placentaire.

3.2.1.6. Le maintien de l'expression de l'EG-VEGF induit une élévation de l'expression de sFlt-1 et sEndogline

Il est bien établi qu'un dysfonctionnement placentaire est associé à la sécrétion, par ce dernier, de facteurs anti-angiogènes tels que le sFlt-1 (*soluble Fms-like tyrosine 1*) et l'endogline soluble, molécules largement décrites comme étant la cause des défauts rénaux associés à la PE. Afin de déterminer si l'EG-VEGF induit une dérégulation de la sécrétion de ces facteurs, nous avons dosé dans le sang maternel murin, le sFlt-1 et l'endogline soluble à 12,5 ; 15,5 et 18,5 jpc. Les résultats montrent une élévation significative de la sécrétion de sFlt-1 à 12,5 jpc et 15,5 jpc. Quant à l'endogline soluble, sa sécrétion n'est significativement augmentée qu'à partir de 15,5 jpc et se maintient à 18,5 jpc (Figure 49). Ces résultats suggèrent que le dysfonctionnement placentaire causé par le maintien de l'expression de l'EG-VEGF, est responsable du relargage dans la circulation maternelle de sFlt-1 et de l'endogline soluble par le placenta. Ces derniers seraient responsables de l'altération de la fonction rénale.

A



B

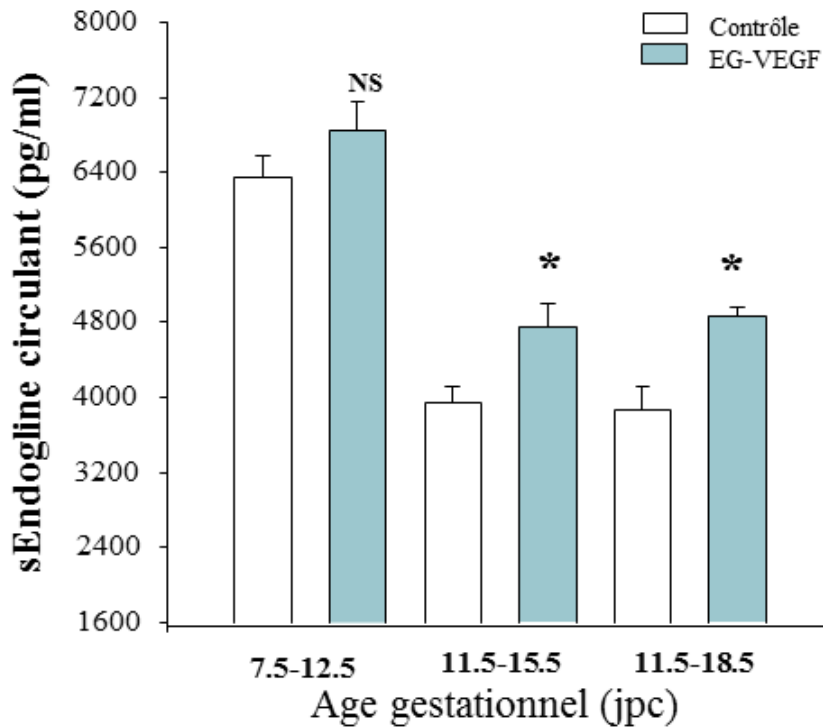


Figure 49: Le maintien de l'expression de l'EG-VEGF au-delà de 10,5 jpc induit une élévation de la sécrétion de sFlt-1 et de sEndogline à partir de 12,5 et 15,5 jpc, respectivement

A. Dosage de sFlt-1 dans le sang maternel par ELISA. La concentration de sFlt-1 circulant est significativement augmentée à 12,5 jpc et 15,5 jpc avec le traitement par l'EG-VEGF. \pm SEM, * $p < 0.05$

B. Dosage de l'endogline soluble dans le sang maternel par ELISA. La concentration de l'endogline soluble circulant est significativement augmentée à 15,5 jpc et 18,5 jpc avec le traitement par l'EG-VEGF. \pm SEM, * $p < 0.05$.

3.2.2. Conclusion

Ma contribution dans le développement de ce modèle *in vivo* de la PE a permis de déterminer que le maintien de l'expression de l'EG-VEGF au-delà de 10,5 jpc, période où l'expression de cette cytokine est maximale, entraîne un défaut de l'invasion trophoblastique se manifestant par une réduction de la surface de la décidue. Le placenta se retrouve alors en souffrance et libère dans la circulation maternelle, deux molécules jouant un rôle essentiel dans la physiopathologie de la PE, le sFlt-1 et l'endogline soluble. Ces dernières vont alors entraîner une augmentation de la pression artérielle ainsi qu'un dysfonctionnement rénal (Figure 50). Il semblerait que la sécrétion de sFlt-1 soit dérégulée plus précocement que la dérégulation de l'endogline soluble, qui apparaît seulement à partir de 15,5 jpc.

3.2.3. Discussion

Dans ce travail, nous avons montré qu'un maintien de la production de l'EG-VEGF au-delà de son expression maximale à 10,5 jpc, est associé au développement de la PE. En effet, Les souris traitées développèrent des symptômes de la PE tels que l'hypertension artérielle, la protéinurie et un dysfonctionnement rénal. Dans un travail antérieur, l'équipe a montré que les niveaux circulants de l'EG-VEGF étaient élevés au cours du 2^{ème} et 3^{ème} trimestre de grossesse chez les femmes présentant une PE ou un RCIU. De cette observation, deux hypothèses peuvent être énoncées, soit que les taux élevés de l'EG-VEGF sont maintenus après le 1^{er} trimestre et constituent la cause du développement de la PE, soit que l'expression de l'EG-VEGF augmente plus tardivement et intègre un mécanisme compensatoire en réponse à un stress placentaire, l'EG-VEGF étant un facteur de survie placentaire et un activateur de l'angiogenèse intra-villositaire. Nos résultats généraux montrent que ces deux options sont envisageables. Nous pensons que, si l'EG-VEGF augmente au-delà du premier trimestre, en raison du maintien de l'hypoxie, ou encore d'une forte concentration de l'hCG, de PPAR γ ou bien d'autres régulateurs inconnus à ce jour, l'invasion trophoblastique, ainsi que le remodelage des artères spiralées utérines seront altérés, entraînant le développement de la PE. En revanche, si la cause l'établissement de la PE est autre, par exemple l'existence d'une hypertension établie avant la grossesse, l'expression de l'EG-VEGF est augmentée de nouveau au cours du 2^{ème} et 3^{ème} trimestre, en raison de l'existence d'un stress placentaire et l'hypothèse de la compensation s'appliquerait, correspondant ainsi aux mécanismes compensatoires souvent observés dans la PE. En conclusion, nous avons développé un modèle de la PE par la dérégulation du processus d'invasion trophoblastique et confirmé que l'EG-VEGF est un facteur clé de la régulation de ce processus.

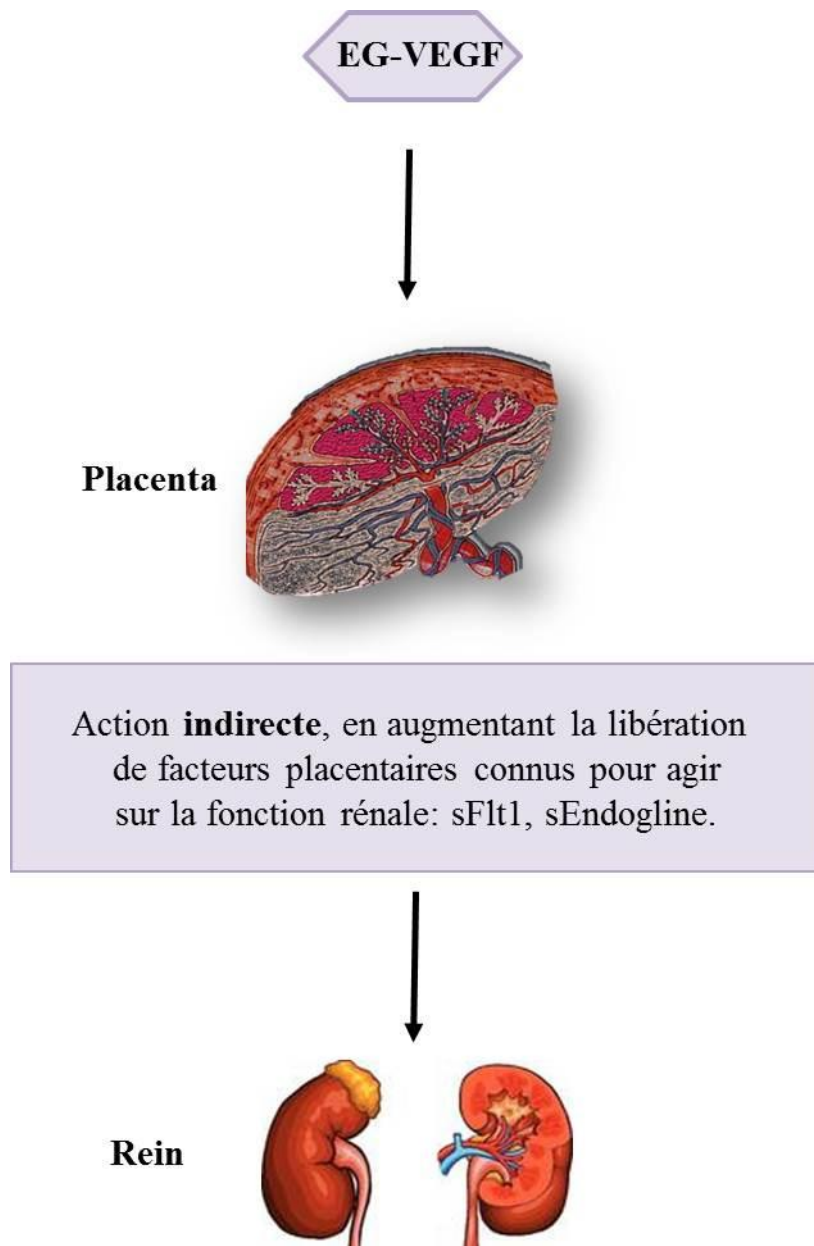


Figure 50: Hypothèse du mode d'action de l'EG-VEGF sur la fonction rénale chez la souris gravide

L'EG-VEGF agirait de manière indirecte sur la fonction rénale, en participant à l'augmentation de la libération de facteurs décrits pour induire un dysfonctionnement rénal, sFlt1 et sEndogline.

CONCLUSION ET DISCUSSION

L'ensemble de ces trois projets entre dans le cadre d'une meilleure compréhension des mécanismes physiologiques du développement placentaire afin de pouvoir mieux appréhender les causes de l'établissement des pathologies de la grossesse comme la pré-éclampsie et le retard de croissance intra-utérin. Nous avons ainsi pu montrer que l'EG-VEGF intervient dans un grand nombre de processus physiologique et qu'il joue un rôle essentiel dans la placentation. Nous avons également mis en évidence l'existence d'une nouvelle boucle de régulation entre l'EG-VEGF et le récepteur nucléaire PPAR γ et apporté de nouvelles données sur la régulation intra-villositaire du développement vasculaire ainsi que sur l'invasion trophoblastique. En outre, nous avons déterminé un nouvel aspect du rôle de l'EG-VEGF au cours du premier trimestre de grossesse. Ce facteur semblerait intervenir dans la différenciation hématopoïétique murine en agissant sur la cellule endothéliale hémogénique. Enfin, le maintien de son expression, chez la souris, au-delà de E10,5, entraîne un défaut de l'invasion trophoblastique qui s'accompagne par la libération de sFlt-1 ainsi que de l'endogline soluble. Ces deux molécules vont induire un dysfonctionnement rénal et une hypertension artérielle. Ainsi, l'ensemble de ces résultats et le développement d'un modèle *in vivo* de la PE suggèrent qu'une dérégulation précoce de l'expression de l'EG-VEGF pourrait conduire à de graves altérations de la placentation, et ainsi être la cause du développement de pathologies de la grossesse comme le RCIU ou la PE.

EG-VEGF et PPAR γ au-delà du 1^{er} trimestre de grossesse

Outre leurs rôles à des stades précoces du développement placentaire, PPAR γ et EG-VEGF ont également été décrits comme intervenant à des stades plus tardifs de la gestation, lors de la parturition. Le déclenchement du travail à terme est associé à une augmentation des protéines pro-inflammatoires ainsi que de cytokines telles que Il1 β , Il6, Il8, Il10 et TNF- α , entraînant des réactions inflammatoires en chaîne dans l'unité utéro-placentaire. Par ailleurs, la production de prostaglandines par l'endomètre, le myomètre et les membranes fœtales via l'activation de l'enzyme prostaglandin-endoperoxydase synthase type 2/cyclooxygenase type 2 (Cox-2), induit la contraction utérine pendant le travail. De plus, il a été rapporté que les niveaux d'expression de PPAR γ sont relativement stables tout au long de la gestation, à l'exception de la période du travail, où son expression au niveau des membranes fœtales décline. Cette réduction coïncide avec l'augmentation progressive de l'expression de COX-2.

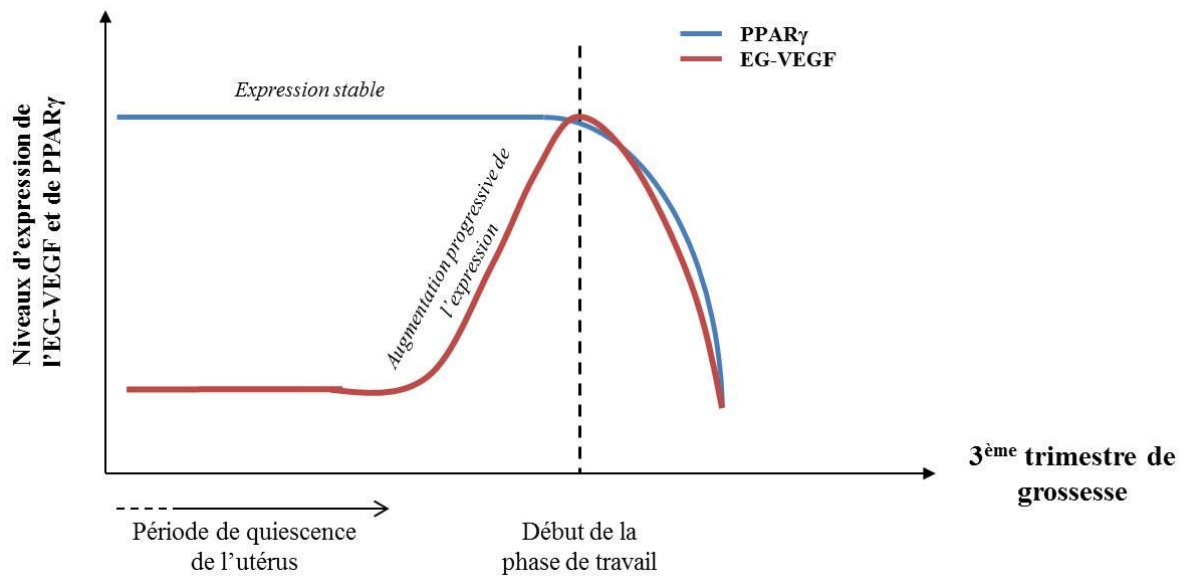


Figure 51 : Niveaux d'expression de PPAR γ et de l'EG-VEGF dans les membranes fœtales au cours du 3^{ème} trimestre de grossesse chez la femme.

L'EG-VEGF et PPAR γ promeuvent la quiescence de l'utérus pendant la grossesse. Le déclenchement de la phase de travail coïncide avec le déclin de leur expression dans les membranes fœtales, suggérant une régulation potentielle de ces deux facteurs et un rôle de contrôle dans les menaces d'accouchement.

(Dunn-Albanese et al. 2004). Des études plus approfondies proposent PPAR γ comme facteur associé à la quiescence de l'utérus pendant la gestation. Il inhiberait la production par les membranes fœtales de COX-2 ainsi que de sPLA-2 (phospholipase A2-IIA) (Ackerman et al. 2005). De manière intéressante, notre équipe a récemment démontré que l'EG-VEGF serait également un facteur de quiescence tout au long de la gestation, et que son niveau d'expression ainsi que celui de ses récepteurs décroissent dans les membranes fœtales, au moment du processus de travail chez la femme (Dunand et al. 2014, Figure 51). L'ensemble de ces résultats suggère l'existence d'une régulation de ces facteurs au-delà du premier trimestre. Une régulation en boucle physiologique est proposée par notre laboratoire et est en cours de vérification pendant le troisième trimestre de grossesse.

L'EG-VEGF dans l'hématopoïèse placentaire

A ce jour, l'origine anatomique et la nature exacte des précurseurs directs des CSHs n'est pas établie. Bien que deux théories soient débattues, de nombreuses données seraient en faveur de l'existence d'un hémangioblaste au niveau du sac vitellin lors de l'hématopoïèse primitive (Murray 1932 ; Choi et al. 1998, Kennedy et al. 2007), tandis que des travaux grandissants s'orienteraient vers l'existence d'un endothélium hémogénique au niveau de l'aorte, pendant l'hématopoïèse définitive (Jaffredo et al. 2005 ; Sabin et al. 2002, Goldi et al. 2008 ; Kissa et al. 2010 ; Boisset et al. 2010). Cependant, aucune étude n'a été réalisée dans le placenta afin de déterminer l'origine d'un tel précurseur ou bien de caractériser un régulateur de la différenciation hématopoïétique. Dans mon deuxième projet, nous décrivons un nouvel aspect du rôle de l'EG-VEGF. Au-delà de son action locale dans l'angiogenèse, il apparaît qu'il serait un régulateur de la différenciation hématopoïétique et endothéliale. En outre, nos résultats pencheraient vers l'existence de l'endothélium hémogénique qui serait sous le contrôle de l'EG-VEGF. L'action de ce facteur placentaire dans ce processus serait uniquement axée sur le placenta et n'interviendrait pas dans la différenciation hématopoïétique du foie fœtal. Néanmoins, ces données doivent être confirmées et affinées.

PPAR γ et l'hématopoïèse

Outre le rôle essentiel de PPAR γ dans la différenciation des adipocytes, du métabolisme des lipides et dans le développement placentaire, il a été montré qu'il régulerait également l'hématopoïèse. En effet, il a été rapporté qu'il est exprimé dans les cellules stromales de la moelle osseuse et dans de nombreuses cellules hématopoïétiques telles que, les cellules progénitrices CD34⁺, les monocytes et les macrophages, les lymphocytes ainsi que les

neutrophiles (Greene et al. 1995 ; Greene et al. 2000). Il a également été montré que les agonistes de PPAR γ moduleraient la prolifération et la différenciation des lignées cellulaires leucémiques humaines (Konopleva et al. 2002 ; Zang et al. 2004). Plus particulièrement, il a été décrit que les ligands de la famille des Thiazolidinédiones (trozglitazone et pioglitazone) inhibent la prolifération cellulaire, sans induire l'apoptose, et retardent la maturation des cellules progénitrices érythroïdes (Nagasawa et al. 2005). Par ailleurs, chez les patients atteints d'anémie aplasique, une pathologie entraînant une réduction du nombre de cellules souches hématopoïétiques, l'expression de GATA-2, un marqueur précoce des cellules spécifiées vers le lignage hématopoïétique (Mouthon et al. 1993 ; Labbaye et al. 1995), est significativement réduit, tandis que PPAR γ est surexprimé dans les cellules souches mésenchymateuses (Xu et al. 2009). Ainsi l'ensemble de ces données tendent à envisager que PPAR γ ne favoriserait pas la différenciation hématopoïétique, à l'image des résultats que nous avons montré pour l'EG-VEGF. Il serait par conséquent intéressant de mieux caractériser le rôle de PPAR γ dans la différenciation hématopoïétique et d'analyser les conséquences de son invalidation dans ce processus physiologique au niveau des placentas des souris PPAR $\gamma^{-/-}$.

L'EG-VEGF et PPAR γ dans les pathologies de la grossesse

PPAR γ est un facteur essentiel dans le développement placentaire (Froment et al. 2005), toute anomalie de son expression ou de son activité peut entraîner le développement de maladies gestationnelles. Il a ainsi été décrit que PPAR γ serait impliqué dans la survenue de môles hydatiformes et de choriocarcinomes (Capparuccia et al. 2002 ; Toth et al. 2008). Parallèlement, des expériences préliminaires (non encore publiées) comparant les niveaux de l'EG-VEGF dans le sérum de femmes enceintes normales et de patientes développant des môles hydatiformes du même âge gestationnel ont montré, que les niveaux circulants de l'EG-VEGF étaient plus élevés chez les patientes ayant une môle hydatiforme (Boufettal et al. 2013). Concernant la plus grande pathologie de la grossesse, la PE, nous avons montré que les niveaux circulants de l'EG-VEGF étaient significativement augmentés chez les femmes pré-éclampsiques par rapport à ceux des femmes enceintes saines, aux mêmes termes de grossesse (Hoffmann et al. 2009). Cette même dérégulation de l'expression de ce facteur et de ses récepteurs fut décrite chez les femmes présentant un RCIU (Brouillet et al. 2013). En outre, bien qu'une étude ait montré que lorsque la PE est associée à un RCIU, le niveau d'ARNm et de protéines de PPAR γ et RXR α est augmenté ainsi que l'activité de liaison à l'ADN de PPAR γ (Holdsworth-Carson et al. 2010), Waite et al. démontrèrent que la concentration d'agonistes endogènes de PPAR γ dans le sérum de femmes présentant une PE

était significativement réduite par rapport à celle des femmes enceintes saines (Waite et al. 2005). De ce constat, de nombreuses études ont été réalisées afin de pouvoir déterminer, si PPAR γ pourrait servir de cible thérapeutique. Les traitements par des agonistes pourraient inverser les défauts liés à une différenciation anormale des trophoblastes (Tache et al. 2013). En effet, il a été montré que la rosiglitazone induit la différenciation trophoblastique en agissant sur Gcm1, facteur clé du développement placentaire (Parast et al. 2009). L'administration à des rates gestantes de T0070907, un antagoniste de PPAR γ conduit au développement des syndromes associés à la PE (McCarthy et al. 2011), alors que l'activation de PPAR γ par la rosiglitazone améliore les symptômes pathologiques des rates pré-éclamptiques, en agissant sur HO-1 (Heme oxygenase-1), une enzyme qui produit du monoxyde de carbone, et le bilirubin, un antioxydant (McCarthy et al. 2011). Par ailleurs, les données mises en évidence par mes travaux de thèse nous laissent supposer, qu'étant donné que l'expression de PPAR γ est abaissée dans la PE, alors que celle de l'EG-VEGF croit, par un effet compensatoire dont les mécanismes restent à être déterminés, l'expression de l'EG-VEGF est augmentée dans cette pathologie afin d'élever le niveau d'expression de PPAR γ . Ainsi, ce dernier pourra réduire les symptômes pré-éclamptiques.

L'ensemble de ces données suggèrent encore une fois, l'existence d'une régulation potentielle entre l'EG-VEGF et PPAR γ et apporte des pistes prédictives de la survenue de ces pathologies gestationnelles ainsi que des cibles thérapeutiques.

Antagonisation des récepteurs PROKR1 et PROKR2 chez la souris

Nous avons généré un modèle *in vivo* de la PE en maintenant l'expression de l'EG-VEGF au-delà de son pic d'expression. Cela a eu pour effet d'entraîner une inhibition de l'invasion trophoblastique, responsable du développement de symptômes pré-éclamptiques. Il serait à présent intéressant d'étudier l'effet d'une inhibition de l'EG-VEGF en antagonisant ses deux récepteurs. Or, les récepteurs de l'EG-VEGF présentent une distribution cellulaire distincte. En effet, il a été décrit que PROKR1 est principalement présent dans les CTV ainsi que les cellules endothéliales macro-vasculaires de la veine ombilicale, les HUVEC, tandis que PROKR2 est localisé dans le ST, les CTEV mais aussi dans les HPEC et les HUVEC (Hoffmann et al. 2006 et 2009 ; Brouillet et al. 2010). Ce profil d'expression suggère des actions différentielles via ces deux récepteurs. Des travaux du laboratoire ont, dans ce sens, montré que seul PROKR2 interviendrait dans la régulation de l'invasion trophoblastique (Hoffmann et al. 2009). Mes travaux ont confirmé ce résultat. En effet, l'antagonisation de

PROKR2 favorise l'invasion trophoblastique ainsi que la migration des cellules trophoblastiques invasives, HTR-8/SVneo. En outre, Brouillet et al. ont montré que PROKR1 induit la prolifération et la migration des HPEC alors que PROKR2 stimule leur perméabilité (Brouillet et al. 2010). Des effets différentiels et similaires à ceux observés dans le placenta ont également été relevés au niveau des cellules cardiaques (Urayama et al. 2007 et 2008). En raison de ces différents effets et afin d'affiner la fonction de l'EG-VEGF, nous pouvons envisager, tout comme dans l'étude du rôle de l'EG-VEGF dans la différenciation hématopoïétique, de traiter des souris gravides soit par l'antagoniste PROKR1, soit par l'antagoniste PROKR2, ou bien par les deux. Les souris seront alors analysées au niveau de leur développement placentaire mais essentiellement au niveau de l'invasion trophoblastique. Ce procédé expérimental nous permettra d'obtenir des informations supplémentaires quant aux rôles exacts des deux récepteurs PROKR1 et PROKR2. Il nous renseignera notamment sur l'implication directe de PROKR2 dans l'invasion trophoblastique. Obtiendrons-nous une invasion excessive seulement en présence d'un antagoniste de PROKR2, ou bien l'antagonisation des deux récepteurs est-elle nécessaire pour observer un tel phénomène ?

PERSPECTIVES

Les perspectives émanant de mes travaux sont multiples. Elles constitueraient la suite logique de mon travail de thèse. Ainsi, quatre grands axes seront poursuivis, d'une part, une étude de l'effet de PPAR γ au niveau du promoteur de l'EG-VEGF, d'autre part, une meilleure connaissance de l'action de PPAR γ sur la vascularisation intra-villositaire, mais aussi une meilleure caractérisation de l'implication de l'EG-VEGF sur l'endothélium hémogénique, et enfin, une meilleure définition du rôle exact de l'EG-VEGF dans le développement placentaire.

Perspective n°1 : Etude du promoteur de l'EG-VEGF

L'analyse *in silico* par Genomatix du promoteur de l'EG-VEGF a mis en évidence la présence de sites potentiels de liaison de l'hétérodimère PPAR γ /RXR α . Afin de vérifier si cet hétérodimère contrôle l'expression de l'EG-VEGF, de manière transcriptionnelle, en se fixant sur son promoteur, nous envisageons d'exprimer PPAR γ et RXR α dans la lignée Cos7, en transfectant des plasmides pourvus de ces deux récepteurs nucléaires et également de transférer un plasmide contenant le gène de la luciférase sous le contrôle du promoteur de l'EG-VEGF (pGL3-pEG-luc, Brouillet et al. 2010). La lignée Cos7, ressemblant aux fibroblastes humains, est une lignée issue de reins du singe vert d'Afrique, couramment utilisée en biologie moléculaire pour sa capacité à être facilement transfectée. Par ailleurs, une cinétique de l'expression de PPAR γ ainsi que de RXR α aura été préalablement réalisée, afin de définir le profil d'expression de ces deux molécules, et ainsi de déterminer le temps idéal pour lequel il sera judicieux de traiter les cellules par de la rosiglitazone. Les effets potentiels observés sur l'activité luciférase, reflétant l'expression de l'EG-VEGF, pourront donc être fortement attribués à l'activation de PPAR γ . Dans le but de pousser plus loin notre étude, nous pouvons aussi envisager de réaliser des mutagénèses dirigées contre ces sites potentiels de liaison à l'hétérodimère PPAR γ /RXR α sur le promoteur de l'EG-VEGF et ainsi vérifier si à la suite du traitement par la rosiglitazone, nous perdons l'activité luciférase et par conséquent l'expression de l'EG-VEGF.

Perspective n°2 : Implication de PPAR γ dans la vascularisation intra-villositaire : utilisation des cellules HPEC

Le laboratoire a mis au point des techniques expérimentales pour isoler les cellules endothéliales micro-vasculaires placentaires, les HPEC. Leurs données publiées en 2010 avaient montré que l'EG-VEGF stimule la prolifération, la migration, la formation d'un réseau pseudo-vasculaire et la survie des HPEC (Brouillet et al. 2010). Le même procédé expérimental sera réalisé afin d'étudier l'implication de PPAR γ dans ces processus physiologiques. Dans le cas, où les effets angiogènes de PPAR γ seraient confirmés, nous pouvons également envisager de vérifier si l'EG-VEGF est aussi impliqué dans la médiation de ses effets. La démonstration d'une action directe de PPAR γ sur la cellule endothéliale micro-vasculaire, contribuerait à expliquer le phénotype placentaire, des défauts vasculaires intra-villositaires, des souris invalidées pour le gène PPAR γ .

Perspective n°3 : Caractérisation du rôle de l'EG-VEGF dans la différenciation hématopoïétique, études *in vitro*

Mes travaux ont montré que l'EG-VEGF régule négativement la différenciation hématopoïétique et endothéliale. Or, comme nous l'avons énoncé précédemment, des données du laboratoire ont caractérisé l'EG-VEGF en tant que nouveau facteur angiogène (Brouillet et al. 2010). L'EG-VEGF ainsi que ses récepteurs sont impliqués dans l'angiogenèse placentaire en agissant directement sur les HPEC. La découverte de son rôle inhibiteur dans la différenciation endothéliale, par mes expériences, laisse à penser que l'EG-VEGF pourrait agir négativement sur la différenciation angiogénique précoce mais positivement lorsque les vaisseaux sont déjà préexistants, ie. dans l'angiogenèse. La caractérisation de la cellule endothéliale qui va subir une trans-différenciation, afin de former la cellule endothéliale hémogénique, n'est pas encore connue. Cependant, nous pouvons envisager d'utiliser un plus grand nombre de marqueurs, décrits dans la littérature, pour discriminer la cellule endothéliale de la cellule endothéliale hémogénique. En outre, nous pouvons développer un modèle *in vitro*, consistant à isoler des cellules progénitrices endothéliales, de les mettre en culture en présence de l'EG-VEGF et d'analyser l'effet de ce traitement sur la différenciation hématopoïétique. Enfin, une autre alternative pour vérifier l'hypothèse selon laquelle l'EG-VEGF agirait en tant qu'inhibiteur de la différenciation hématopoïétique, via les cellules endothéliales hémogéniques, serait de traiter des souris gestantes par les antagonistes PROKR1 et PROKR2, simultanément, et d'analyser la proportion de cellules exprimant des marqueurs hématopoïétiques, avant le pic de l'activité hématopoïétique, situé autour de

E10,5-E12,5. Ainsi, si à 8,5 jpc, le nombre de cellules hématopoïétiques est plus élevé dans les souris traitées par rapport à celui des souris contrôles, nous confirmerons que l'EG-VEGF contrôle la différenciation hématopoïétique au sein du placenta.

Perspective n°4 : Détermination du rôle exact de l'EG-VEGF dans le développement placentaire

L'obtention de souris invalidées pour l'EG-VEGF n'a pas encore été publiée, mais les effets d'une telle déficience pourraient ne pas être observables en raison de l'existence de l'analogue de l'EG-VEGF, Bv8. Ce dernier pourrait être surexprimé et pourrait compenser les défauts liés à l'absence de l'EG-VEGF. Ainsi, afin d'avoir une meilleure perception du rôle de l'EG-VEGF, il serait plus judicieux de générer des souris doublement invalidées pour l'EG-VEGF et Bv8. En collaboration avec le Dr Vilotte de l'INRA à Jouy-en-Josas, notre équipe est en cours de développement de ce modèle. Ces souris serviront à mettre en évidence le rôle exact de la famille des prokinétines. Dans le cas où les souris ne seraient pas viables, nous pourrions conclure sur le rôle majeur de la signalisation des prokinétines dans la placentation ou dans un autre processus vital. En revanche, si elles sont viables, les souris seront suivies afin d'étudier le développement potentiel de pathologies de la grossesse lors de leurs gestations.

Liste de publications et de communications

Publications :

Holloway AC, Salomon A, Soares MJ, **Garnier V**, Raha S, Sergent F, Nicholson CJ, Feige JJ, Benharouga M, Alfaidy N.

Characterization of the adverse effects of nicotine on placental development: in vivo and in vitro studies.

Am J Physiol Endocrinol Metab. 2014 Feb 15

En collaboration avec l'équipe du Dr A. Holloway (Mc Master University, Hamilton, Canada), nous avons démontré dans le modèle de la rate gestante, que l'exposition de la nicotine altère le développement embryonnaire en agissant directement sur le développement et la vascularisation placentaire. Ce phénomène a pour conséquence la dérégulation de l'établissement de la circulation fœto-maternelle au début de la grossesse.

Les expériences *in vivo* montrent que la nicotine inhibe l'invasion trophoblastique interstitielle, augmente l'hypoxie placentaire et diminue la vascularisation de la zone d'échange fœto-maternelle. Ces effets sont accompagnés de dérégulations de facteurs de transcription clés de la différenciation cellulaire, comme Hand1 et GCM1 et une diminution du facteur angiogène placentaire EG-VEGF. Les expériences *in vitro* ont confirmé les effets inhibiteurs de la nicotine sur la migration, l'invasion et la différenciation trophoblastique. Aussi, nous avons montré que ces effets passent par une inhibition des métallo-protéinases, MMP2 et MMP9, et une dérégulation de l'expression des récepteurs de la nicotine. L'ensemble de ces données suggère que les effets néfastes du tabagisme maternel sur l'issue de la grossesse seraient en partie dus aux effets directs de la nicotine sur les principaux processus du développement placentaire et de l'établissement de la circulation foeto-maternelle.

Ma contribution dans cet article s'est traduite par le dosage de l'EG-VEGF dans le sérum des rates gestantes exposées ou non à la nicotine.

Communications :

- Communication **orale** au congrès de la Société Française d'Endocrinologie (SFE), le 2 au 5 octobre 2013 à Paris.

Garnier V, Fournier T, Salomon A, Sergent F, Hoffmann P, Feige JJ, Alfaidy, N

Contribution à la compréhension du mécanisme de régulation de l'invasion trophoblastique par PPAR γ : Implication de l'EG-VEGF

- Communication **orale** au congrès de l'IFPA (International Federation of Placenta Associations), le 9 au 12 septembre 2014 à Paris.

Garnier V, Traboulsi W, Brouillet S, Fournier T, Winkler C, Desvergne B, Zhou QY, Balboni G, Hoffmann P, Feige JJ, Alfaidy N

New insights into the mechanism of PPAR γ regulation of trophoblast invasion and placental vascularization

Posters :

- Communication sous forme d'affiche au congrès d'endocrinologie organisé par l'association G2L2 (Genève, Grenoble, Lyon, Lausanne) le 12 avril 2014 à Genève, Suisse.

Garnier V, Fournier T, Salomon A, Sergent F, Hoffmann P, Feige JJ, Alfaidy, N

EG-VEGF (Endocrine Gland-Derived Vascular Endothelial Growth Factor) est régulée par PPAR γ : meilleure compréhension du mécanisme de l'invasion trophoblastique.

- Communication sous forme d'affiche au congrès de la Société Française d'Angiogenèse (SFA), le 2 au 4 avril 2014 à Chamonix.

Garnier V, Sergent F, Souyri M, Petit L, Zhou QY, Balboni G, Hoffmann P, Feige JJ, and Alfaidy N.

EG-VEGF (Endocrine Gland-Derived Vascular Endothelial Growth Factor) controls placental hematopoietic differentiation during early pregnancy

- Communication sous forme d'affiche au congrès d'endocrinologie organisé par l'association G2L2 (Genève, Grenoble, Lyon, Lausanne) le 23 mai 2014 à La Tronche, Grenoble.

Garnier V, Traboulsi W, Brouillet S, Fournier T, Sergent F, Zhou QY, Balboni G, Hoffmann P, Feige JJ, Alfaidy N

New insights into the mechanism of PPAR γ regulation of trophoblast invasion and placental

- Communication sous forme d'affiche à la Journée de la Recherche Médicale (JRM), sélectionnée à la session « Posters walk », le 13 juin à La Tronche, Grenoble.

Garnier V, Sergent F, Souyri M, Petit L, Zhou QY, Balboni G, Hoffmann P, Feige JJ, and Alfaidy N.

EG-VEGF (Endocrine Gland-Derived Vascular Endothelial Growth Factor) controls placental hematopoietic differentiation during early pregnancy

- Communication au congrès de l'IFPA (International Federation of Placenta Associations, le 9 au 12 septembre 2014 à Paris.

Mouchet T, Traboulsi W, Dunand C, Garnier V, Brouillet S, Guibourdenche J, Hoffmann P, Benharouga M, Feige JJ, Alfaidy N.

Role of EG-VEGF (Endocrine Gland-Derived Endothelial Growth Factor) in the human fetal membranes

REFERENCES

- Abalos, Edgardo, Cristina Cuesta, Ana L. Grosso, Doris Chou, et Lale Say. « Global and Regional Estimates of Preeclampsia and Eclampsia: A Systematic Review ». *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology* 170, n° 1 (septembre 2013): 1-7. doi:10.1016/j.ejogrb.2013.05.005.
- Ackerman, William E., Xiaolan L. Zhang, Brad H. Rovin, et Douglas A. Kniss. « Modulation of Cytokine-Induced Cyclooxygenase 2 Expression by PPAR γ Ligands Through NF κ B Signal Disruption in Human WISH and Amnion Cells ». *Biology of reproduction* 73, n° 3 (septembre 2005): 527-535. doi:10.1095/biolreprod.104.039032.
- Ahmad, Shakil, et Asif Ahmed. « Antiangiogenic Effect of Soluble Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 in Placental Angiogenesis ». *Endothelium: Journal of Endothelial Cell Research* 12, n° 1-2 (avril 2005): 89-95. doi:10.1080/10623320590933888.
- Alva, Jackelyn A, Ann C Zovein, Arnaud Monvoisin, Thomas Murphy, Anthony Salazar, Natasha L Harvey, Peter Carmeliet, et M Luisa Iruela-Arispe. « VE-Cadherin-Cre-Recombinase Transgenic Mouse: A Tool for Lineage Analysis and Gene Deletion in Endothelial Cells ». *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 235, n° 3 (mars 2006): 759-767. doi:10.1002/dvdy.20643.
- Alvarez-Silva, Marcio, Patricia Belo-Diabangouaya, Josselyne Salaün, et Françoise Dieterlen-Lièvre. « Mouse Placenta Is a Major Hematopoietic Organ ». *Development (Cambridge, England)* 130, n° 22 (novembre 2003): 5437-5444. doi:10.1242/dev.00755.
- Aplin, J D. « Implantation, Trophoblast Differentiation and Haemochorial Placentation: Mechanistic Evidence in Vivo and in Vitro ». *Journal of Cell Science* 99 (Pt 4) (août 1991): 681-692.
- Aplin, John D. « Hypoxia and human placental development ». *Journal of Clinical Investigation* 105, n° 5 (1 mars 2000): 559-560.
- Asami-Miyagishi, Reiko, Sachiko Iseki, Mayumi Usui, Koji Uchida, Harumi Kubo, et Ikuo Morita. « Expression and Function of PPAR γ in Rat Placental Development ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 315, n° 2 (5 mars 2004): 497-501. doi:10.1016/j.bbrc.2004.01.074.
- Barak, Y, M C Nelson, E S Ong, Y Z Jones, P Ruiz-Lozano, K R Chien, A Koder, et R M Evans. « PPAR Gamma Is Required for Placental, Cardiac, and Adipose Tissue Development ». *Molecular Cell* 4, n° 4 (octobre 1999): 585-595.
- Bárcena, Alicia, Mirhan Kapidzic, Marcus O Muench, Matthew Gormley, Marvin A Scott, Jingly F Weier, Christy Ferlatte, et Susan J Fisher. « The Human Placenta Is a Hematopoietic Organ during the Embryonic and Fetal Periods of Development ». *Developmental Biology* 327, n° 1 (1 mars 2009): 24-33. doi:10.1016/j.ydbio.2008.11.017.
- Bárcena, Alicia, Marcus O Muench, Mirhan Kapidzic, et Susan J Fisher. « A New Role for the Human Placenta as a Hematopoietic Site throughout Gestation ». *Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)* 16, n° 2 (février 2009): 178-187. doi:10.1177/1933719108327621.
- Baron, Margaret H, Joan Isern, et Stuart T Fraser. « The Embryonic Origins of Erythropoiesis

- in Mammals ». *Blood* 119, n° 21 (24 mai 2012): 4828-4837. doi:10.1182/blood-2012-01-153486.
- Battaglia, F C, et L O Lubchenco. « A Practical Classification of Newborn Infants by Weight and Gestational Age ». *The Journal of Pediatrics* 71, n° 2 (août 1967): 159-163.
- Battersby, S, H O D Critchley, K Morgan, R P Millar, et H N Jabbour. « 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 ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 89, n° 5 (mai 2004): 2463-2469. doi:10.1210/jc.2003-032012.
- Benirschke, Kurt. « The Human Placenta. J. D. Boyd and W. J. Hamilton. Heffer, Cambridge, 365 Pp. 1970 ». *Teratology* 8, n° 1 (1 août 1973): 77-78. doi:10.1002/tera.1420080118.
- Bergmann, Astrid, Shakil Ahmad, Melissa Cudmore, Achim D. Gruber, Petra Wittschen, Werner Lindenmaier, Gerhard Christofori, et al. « Reduction of Circulating Soluble Flt-1 Alleviates Preeclampsia-like Symptoms in a Mouse Model ». *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 14, n° 6B (juin 2010): 1857-1867. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00820.x.
- Bertrand, Julien Y, Neil C Chi, Buyung Santoso, Shutian Teng, Didier Y R Stainier, et David Traver. « Haematopoietic Stem Cells Derive Directly from Aortic Endothelium during Development ». *Nature* 464, n° 7285 (4 mars 2010): 108-111. doi:10.1038/nature08738.
- Bischof, P, A Meisser, A Campana, et L Tseng. « Effects of Decidua-Conditioned Medium and Insulin-like Growth Factor Binding Protein-1 on Trophoblastic Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors ». *Placenta* 19, n° 7 (septembre 1998): 457-464.
- Bishop-Bailey, D, et T Hla. « Endothelial Cell Apoptosis Induced by the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) Ligand 15-Deoxy-Delta12, 14-Prostaglandin J2 ». *The Journal of Biological Chemistry* 274, n° 24 (11 juin 1999): 17042-17048.
- Boisbouvier, J, J P Albrand, M Blackledge, M Jaquinod, H Schweitz, M Lazdunski, et D Marion. « A Structural Homologue of Colipase in Black Mamba Venom Revealed by NMR Floating Disulphide Bridge Analysis ». *Journal of Molecular Biology* 283, n° 1 (1998): 205-219. doi:10.1006/jmbi.1998.2057.
- Boisset, Jean-Charles, Wiggert van Cappellen, Charlotte Andrieu-Soler, Niels Galjart, Elaine Dzierzak, et Catherine Robin. « In Vivo Imaging of Haematopoietic Cells Emerging from the Mouse Aortic Endothelium ». *Nature* 464, n° 7285 (4 mars 2010): 116-120. doi:10.1038/nature08764.
- Boufettal, H., J.-J. Feige, M. Benharouga, T. Aboussaouira, S. Nadifi, S. Mahdaoui, N. Samouh, et N. Alfaidy. « [Potential role of the angiogenic factor “EG-VEGF” in gestational trophoblastic diseases] ». *Pathologie-Biologie* 61, n° 5 (octobre 2013): 178-183. doi:10.1016/j.patbio.2013.02.001.
- Brosens, I A, W B Robertson, et H G Dixon. « The Role of the Spiral Arteries in the Pathogenesis of Pre-Eclampsia ». *The Journal of Pathology* 101, n° 4 (août 1970): Pvi.
- Brouillet, S, P Hoffmann, S Chauvet, A Salomon, S Chamboredon, F Sergent, M Benharouga, J J Feige, et N Alfaidy. « Revisiting the Role of hCG: New Regulation of the Angiogenic Factor EG-VEGF and Its Receptors ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 69, n° 9 (mai 2012): 1537-1550. doi:10.1007/s00018-011-0889-x.
- Brouillet, S, P Murthi, P Hoffmann, A Salomon, F Sergent, P De Mazancourt, M Dakouane-Giudicelli, et al. « EG-VEGF Controls Placental Growth and Survival in Normal and Pathological Pregnancies: Case of Fetal Growth Restriction (FGR) ». *Cellular and*

- Molecular Life Sciences: CMLS* 70, n° 3 (février 2013): 511-525. doi:10.1007/s00018-012-1141-z.
- Brouillet, Sophie, Pascale Hoffmann, Mohamed Benharouga, Aude Salomon, Jean-Patrick Schaal, Jean-Jacques Feige, et Nadia Alfaidy. « Molecular Characterization of EG-VEGF-Mediated Angiogenesis: Differential Effects on Microvascular and Macrovascular Endothelial Cells ». *Molecular Biology of the Cell* 21, n° 16 (15 août 2010): 2832-2843. doi:10.1091/mbc.E10-01-0059.
- Brouillet, Sophie, Pascale Hoffmann, Jean-Jacques Feige, et Nadia Alfaidy. « EG-VEGF: A Key Endocrine Factor in Placental Development ». *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 23, n° 10 (octobre 2012): 501-508. doi:10.1016/j.tem.2012.05.006.
- Bullock, Clayton M, Jia-Da Li, et Qun-Yong Zhou. « Structural Determinants Required for the Bioactivities of Prokineticins and Identification of Prokineticin Receptor Antagonists ». *Molecular Pharmacology* 65, n° 3 (mars 2004): 582-588. doi:10.1124/mol.65.3.582.
- Burton, G J, et E Jauniaux. « Sonographic, Stereological and Doppler Flow Velocimetric Assessments of Placental Maturity ». *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 102, n° 10 (octobre 1995): 818-825.
- Burton, G J, J N Skepper, J Hempstock, T Cindrova, C J P Jones, et E Jauniaux. « A Reappraisal of the Contrasting Morphological Appearances of Villous Cytotrophoblast Cells during Early Human Pregnancy; Evidence for Both Apoptosis and Primary Necrosis ». *Placenta* 24, n° 4 (avril 2003): 297-305.
- Camp, H S, S R Tafuri, et T Leff. « C-Jun N-Terminal Kinase Phosphorylates Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma1 and Negatively Regulates Its Transcriptional Activity ». *Endocrinology* 140, n° 1 (janvier 1999): 392-397. doi:10.1210/endo.140.1.6457.
- Campbell, S, et A Thoms. « Ultrasound Measurement of the Fetal Head to Abdomen Circumference Ratio in the Assessment of Growth Retardation ». *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 84, n° 3 (mars 1977): 165-174.
- Capparuccia, L., D. Marzioni, A. Giordano, F. Fazioli, M. De Nictolis, N. Busso, T. Todros, et M. Castellucci. « PPARgamma Expression in Normal Human Placenta, Hydatidiform Mole and Choriocarcinoma ». *Molecular Human Reproduction* 8, n° 6 (juin 2002): 574-579.
- Caprioli, A, T Jaffredo, R Gautier, C Dubourg, et F Dieterlen-Lièvre. « Blood-Borne Seeding by Hematopoietic and Endothelial Precursors from the Allantois ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, n° 4 (17 février 1998): 1641-1646.
- Caprioli, A, K Minko, C Drevon, A Eichmann, F Dieterlen-Lièvre, et T Jaffredo. « Hemangioblast Commitment in the Avian Allantois: Cellular and Molecular Aspects ». *Developmental Biology* 238, n° 1 (1 octobre 2001): 64-78. doi:10.1006/dbio.2001.0362.
- Carmeliet, P, et D Collen. « Role of Vascular Endothelial Growth Factor and Vascular Endothelial Growth Factor Receptors in Vascular Development ». *Current Topics in Microbiology and Immunology* 237 (1999): 133-158.
- Cetin, I, et G Alvino. « Intrauterine Growth Restriction: Implications for Placental Metabolism and Transport. A Review ». *Placenta* 30 Suppl A (mars 2009): S77-82. doi:10.1016/j.placenta.2008.12.006.
- Chen, Jingcai, Chester Kuei, Steven Sutton, Sandy Wilson, Jingxue Yu, Fredrik Kamme, Curt Mazur, Timothy Lovenberg, et Changlu Liu. « Identification and Pharmacological Characterization of Prokineticin 2 Beta as a Selective Ligand for Prokineticin

- Receptor 1 ». *Molecular Pharmacology* 67, n° 6 (juin 2005): 2070-2076.
doi:10.1124/mol.105.011619.
- Cheng, Michelle Y, Clayton M Bullock, Chuanyu Li, Alex G Lee, Jason C Bermak, James Belluzzi, David R Weaver, Frances M Leslie, et Qun-Yong Zhou. « Prokineticin 2 Transmits the Behavioural Circadian Rhythm of the Suprachiasmatic Nucleus ». *Nature* 417, n° 6887 (23 mai 2002): 405-410. doi:10.1038/417405a.
- Chinetti, G, S Griglio, M Antonucci, I P Torra, P Delerive, Z Majd, J C Fruchart, J Chapman, J Najib, et B Staels. « Activation of Proliferator-Activated Receptors Alpha and Gamma Induces Apoptosis of Human Monocyte-Derived Macrophages ». *The Journal of Biological Chemistry* 273, n° 40 (2 octobre 1998): 25573-25580.
- Chinetti-Gbaguidi, Giulia, Jean Charles Fruchart, et Bart Staels. « Pleiotropic Effects of Fibrates ». *Current Atherosclerosis Reports* 7, n° 5 (septembre 2005): 396-401.
- Choi, K, M Kennedy, A Kazarov, J C Papadimitriou, et G Keller. « A Common Precursor for Hematopoietic and Endothelial Cells ». *Development (Cambridge, England)* 125, n° 4 (février 1998): 725-732.
- Chong, Han Chung, Ming Jie Tan, Virginie Philippe, Siew Hwey Tan, Chek Kun Tan, Chee Wai Ku, Yan Yih Goh, Walter Wahli, Liliane Michalik, et Nguan Soon Tan. « Regulation of Epithelial-Mesenchymal IL-1 Signaling by PPARbeta/delta Is Essential for Skin Homeostasis and Wound Healing ». *The Journal of Cell Biology* 184, n° 6 (23 mars 2009): 817-831. doi:10.1083/jcb.200809028.
- Chung, Jin-Young, Yang Song, Yuping Wang, Ronald R Magness, et Jing Zheng. « Differential Expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Endocrine Gland Derived-VEGF, and VEGF Receptors in Human Placentas from Normal and Preeclamptic Pregnancies ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 89, n° 5 (mai 2004): 2484-2490. doi:10.1210/jc.2003-031580.
- Ciau-Uitz, A, M Walmsley, et R Patient. « Distinct Origins of Adult and Embryonic Blood in Xenopus ». *Cell* 102, n° 6 (15 septembre 2000): 787-796.
- Clark, D E, S K Smith, D Licence, A L Evans, et D S Charnock-Jones. « Comparison of Expression Patterns for Placenta Growth Factor, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), VEGF-B and VEGF-C in the Human Placenta throughout Gestation ». *The Journal of Endocrinology* 159, n° 3 (décembre 1998): 459-467.
- Corbel, Catherine, Josselyne Salaün, Patricia Belo-Diabangouaya, et Françoise Dieterlen-Lièvre. « Hematopoietic Potential of the Pre-Fusion Allantois ». *Developmental Biology* 301, n° 2 (15 janvier 2007): 478-488. doi:10.1016/j.ydbio.2006.08.069.
- Craven, C M, T Morgan, et K Ward. « Decidual Spiral Artery Remodelling Begins before Cellular Interaction with Cytotrophoblasts ». *Placenta* 19, n° 4 (mai 1998): 241-252.
- Cronier, L., P. Bois, J. C. Hervé, et A. Malassiné. « Effect of Human Chorionic Gonadotrophin on Chloride Current in Human Syncytiotrophoblasts in Culture ». *Placenta* 16, n° 7 (octobre 1995): 599-609.
- Cross, J C. « Genetic Insights into Trophoblast Differentiation and Placental Morphogenesis ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 11, n° 2 (avril 2000): 105-113. doi:10.1006/scdb.2000.0156.
- Cross, J C, Z Werb, et S J Fisher. « Implantation and the Placenta: Key Pieces of the Development Puzzle ». *Science (New York, N.Y.)* 266, n° 5190 (2 décembre 1994): 1508-1518.
- Cross, James C, Haruo Nakano, David R C Natale, David G Simmons, et Erica D Watson. « Branching Morphogenesis during Development of Placental Villi ». *Differentiation; Research in Biological Diversity* 74, n° 7 (septembre 2006): 393-401.

- doi:10.1111/j.1432-0436.2006.00103.x.
- Cumano, A, F Dieterlen-Lievre, et I Godin. « Lymphoid Potential, Probed before Circulation in Mouse, Is Restricted to Caudal Intraembryonic Splanchnopleura ». *Cell* 86, n° 6 (20 septembre 1996): 907-916.
- Cumano, A, et I Godin. « Pluripotent Hematopoietic Stem Cell Development during Embryogenesis ». *Current Opinion in Immunology* 13, n° 2 (avril 2001): 166-171.
- Dancis, J. « The Placenta. A Multicategorical, Interdisciplinary Phenomenon. (Borden Award Address) ». *Pediatrics* 38, n° 2 (août 1966): 167-172.
- Dancis, J, G W Douglas, et J Fierer. « Immunologic Competence of Mouse Placental Cells in Irradiated Hosts ». *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 94, n° 1 (1 janvier 1966): 50-56.
- Dancis, J, V Jansen, F Gorstein, et G W Douglas. « Hematopoietic Cells in Mouse Placenta ». *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 100, n° 8 (15 avril 1968): 1110-1121.
- DANCIS, J, B D SAMUELS, et G W DOUGLAS. « Immunological Competence of Placenta ». *Science (New York, N.Y.)* 136, n° 3514 (4 mai 1962): 382-383.
- Daoud, Georges, Lucie Simoneau, André Masse, Eric Rassart, et Julie Lafond. « Expression of cFABP and PPAR in Trophoblast Cells: Effect of PPAR Ligands on Linoleic Acid Uptake and Differentiation ». *Biochimica et Biophysica Acta* 1687, n° 1-3 (21 février 2005): 181-194. doi:10.1016/j.bbali.2004.11.017.
- Davison, Robin L., Darren S. Hoffmann, Genelle M. Butz, Gilbert Aldape, Gunther Schlager, David C. Merrill, Sanjeev Sethi, Robert M. Weiss, et James N. Bates. « Discovery of a Spontaneous Genetic Mouse Model of Preeclampsia ». *Hypertension* 39, n° 2 Pt 2 (février 2002): 337-342.
- De Bruijn, Marella F T R, Xiaoqian Ma, Catherine Robin, Katrin Ottersbach, Maria-Jose Sanchez, et Elaine Dzierzak. « Hematopoietic Stem Cells Localize to the Endothelial Cell Layer in the Midgestation Mouse Aorta ». *Immunity* 16, n° 5 (mai 2002): 673-683.
- Demir, R, P Kaufmann, M Castellucci, T Erbenji, et A Kotowski. « Fetal Vasculogenesis and Angiogenesis in Human Placental Villi ». *Acta Anatomica* 136, n° 3 (1989): 190-203.
- Denison, Fiona C, Sharon Battersby, Anne E King, Michael Szuber, et Henry N Jabbour. « Prokineticin-1: A Novel Mediator of the Inflammatory Response in Third-Trimester Human Placenta ». *Endocrinology* 149, n° 7 (juillet 2008): 3470-3477. doi:10.1210/en.2007-1695.
- Dieterlen-Lievre, F. « On the Origin of Haemopoietic Stem Cells in the Avian Embryo: An Experimental Approach ». *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 33, n° 3 (juin 1975): 607-619.
- Dieterlen-Lièvre, Françoise, Claire Pouget, Karine Bollérot, et Thierry Jaffredo. « Are Intra-Aortic Hemopoietic Cells Derived from Endothelial Cells during Ontogeny? » *Trends in Cardiovascular Medicine* 16, n° 4 (mai 2006): 128-139. doi:10.1016/j.tcm.2006.02.005.
- Doridot, L., C. Méhats, et D. Vaiman. « [Comparative analysis of mice models for preeclampsia] ». *Annales De Cardiologie Et D'angéiologie* 61, n° 3 (juin 2012): 234-238. doi:10.1016/j.ancard.2012.04.006.
- Dorsch, Marion, Yubin Qiu, Dulce Soler, Nita Frank, Thao Duong, Andrew Goodearl, Steve O'Neil, Jose Lora, et Christopher C Fraser. « PK1/EG-VEGF Induces Monocyte Differentiation and Activation ». *Journal of Leukocyte Biology* 78, n° 2 (août 2005): 426-434. doi:10.1189/jlb.0205061.
- Dumont, D J, G H Fong, M C Puri, G Gradwohl, K Alitalo, et M L Breitman.

- « Vascularization of the Mouse Embryo: A Study of Flk-1, Tek, Tie, and Vascular Endothelial Growth Factor Expression during Development ». *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 203, n° 1 (mai 1995): 80-92. doi:10.1002/aja.1002030109.
- Dunand, C., P. Hoffmann, V. Sapin, L. Blanchon, A. Salomon, F. Sergent, M. Benharouga, et al. « Endocrine Gland-Derived Endothelial Growth Factor (EG-VEGF) Is a Potential Novel Regulator of Human Parturition ». *Biology of Reproduction*, 13 août 2014. doi:10.1095/biolreprod.114.119990.
- Dunn-Albanese, Lisa R., William E. Ackerman, Yubing Xie, Jay D. Iams, et Douglas A. Kniss. « Reciprocal Expression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma and Cyclooxygenase-2 in Human Term Parturition ». *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 190, n° 3 (mars 2004): 809-816. doi:10.1016/j.ajog.2003.09.052.
- Dzierzak, Elaine, et Alexander Medvinsky. « The Discovery of a Source of Adult Hematopoietic Cells in the Embryo ». *Development (Cambridge, England)* 135, n° 14 (août 2008): 2343-2346. doi:10.1242/dev.021279.
- Eichmann, A, C Corbel, V Nataf, P Vaigot, C Bréant, et N M Le Douarin. « Ligand-Dependent Development of the Endothelial and Hemopoietic Lineages from Embryonic Mesodermal Cells Expressing Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, n° 10 (13 mai 1997): 5141-5146.
- Eilken, Hanna M, Shin-Ichi Nishikawa, et Timm Schroeder. « Continuous Single-Cell Imaging of Blood Generation from Haemogenic Endothelium ». *Nature* 457, n° 7231 (12 février 2009): 896-900. doi:10.1038/nature07760.
- Ema, Masatsugu, Patrick Faloon, Wen Jie Zhang, Masanori Hirashima, Tammy Reid, William L Stanford, Stuart Orkin, Kyunghye Choi, et Janet Rossant. « Combinatorial Effects of Flk1 and Tal1 on Vascular and Hematopoietic Development in the Mouse ». *Genes & Development* 17, n° 3 (1 février 2003): 380-393. doi:10.1101/gad.1049803.
- Emmel V. The cell clusters in the dorsal aorta of mammalian embryos. *American Journal of Anatomy* (1916): 401-21
- Eremina, Vera, Manish Sood, Jody Haigh, András Nagy, Ginette Lajoie, Napoleone Ferrara, Hans-Peter Gerber, Yamato Kikkawa, Jeffrey H Miner, et Susan E Quaggin. « Glomerular-Specific Alterations of VEGF-A Expression Lead to Distinct Congenital and Acquired Renal Diseases ». *The Journal of Clinical Investigation* 111, n° 5 (mars 2003): 707-716. doi:10.1172/JCI17423.
- Evans, Jemma, Rob D Catalano, Pamela Brown, Rob Sherwin, Hilary O D Critchley, Asgerally T Fazleabas, et Henry N Jabbour. « Prokineticin 1 Mediates Fetal-Maternal Dialogue Regulating Endometrial Leukemia Inhibitory Factor ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23, n° 7 (juillet 2009): 2165-2175. doi:10.1096/fj.08-124495.
- Fajas, L, D Auboeuf, E Raspé, K Schoonjans, A M Lefebvre, R Saladin, J Najib, et al. « The Organization, Promoter Analysis, and Expression of the Human PPARgamma Gene ». *The Journal of Biological Chemistry* 272, n° 30 (25 juillet 1997): 18779-18789.
- Ferrara, N, et T Davis-Smyth. « The Biology of Vascular Endothelial Growth Factor ». *Endocrine Reviews* 18, n° 1 (février 1997): 4-25. doi:10.1210/edrv.18.1.0287.
- Fisher, S J, M S Leitch, M S Kantor, C B Basbaum, et R H Kramer. « Degradation of Extracellular Matrix by the Trophoblastic Cells of First-Trimester Human Placentas ». *Journal of Cellular Biochemistry* 27, n° 1 (1985): 31-41. doi:10.1002/jcb.240270105.
- Forman, B M, P Tontonoz, J Chen, R P Brun, B M Spiegelman, et R M Evans. « 15-Deoxy-

- Delta 12, 14-Prostaglandin J2 Is a Ligand for the Adipocyte Determination Factor PPAR Gamma ». *Cell* 83, n° 5 (1 décembre 1995): 803-812.
- Fournier, T, K Handschuh, V Tsatsaris, et D Evain-Brion. « Involvement of PPARgamma in Human Trophoblast Invasion ». *Placenta* 28 Suppl A (avril 2007): S76-81. doi:10.1016/j.placenta.2006.12.006.
- Fournier, T et V Tsatsaris. [Human placental development and pathology of preeclampsia]. *Métabolisme Hormones Diabète et nutrition (XII)*, n°4 (juillet-août 2008), n°5 (septembre-octobre 2008)
- Fournier, T, V Tsatsaris, K Handschuh, et D Evain-Brion. « PPARs and the Placenta ». *Placenta* 28, n° 2-3 (mars 2007): 65-76. doi:10.1016/j.placenta.2006.04.009.
- Fournier, Thierry, Karen Handschuh, Vassilis Tsatsaris, Jean Guibourdenche, et Danièle Evain-Brion. « Role of Nuclear Receptors and Their Ligands in Human Trophoblast Invasion ». *Journal of Reproductive Immunology* 77, n° 2 (avril 2008): 161-170. doi:10.1016/j.jri.2007.05.004.
- Fraser, Hamish M, Julie Bell, Helen Wilson, Paul D Taylor, Kevin Morgan, Richard A Anderson, et W Colin Duncan. « Localization and Quantification of Cyclic Changes in the Expression of Endocrine Gland Vascular Endothelial Growth Factor in the Human Corpus Luteum ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 90, n° 1 (janvier 2005): 427-434. doi:10.1210/jc.2004-0843.
- Fraser, Stuart T, Minetaro Ogawa, Tomomasa Yokomizo, Yoshiaki Ito, Satomi Nishikawa, et Shin-Ichi Nishikawa. « Putative Intermediate Precursor between Hematogenic Endothelial Cells and Blood Cells in the Developing Embryo ». *Development, Growth & Differentiation* 45, n° 1 (février 2003): 63-75.
- Froment, Pascal, Florence Gizard, Bart Staels, Joëlle Dupont, et Philippe Monget. « [A role of PPARgamma in reproduction?] ». *Médecine Sciences: M/S* 21, n° 5 (mai 2005): 507-511. doi:10.1051/medsci/2005215507.
- Garcia-Porrero, J A, A Manaia, J Jimeno, L L Lasky, F Dieterlen-Lièvre, et I E Godin. « Antigenic Profiles of Endothelial and Hemopoietic Lineages in Murine Intraembryonic Hemogenic Sites ». *Developmental and Comparative Immunology* 22, n° 3 (juin 1998): 303-319.
- Gearing, K L, A Crickmore, et J A Gustafsson. « Structure of the Mouse Peroxisome Proliferator Activated Receptor Alpha Gene ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 199, n° 1 (28 février 1994): 255-263. doi:10.1006/bbrc.1994.1222.
- Gekas, Christos, Françoise Dieterlen-Lièvre, Stuart H Orkin, et Hanna K A Mikkola. « The Placenta Is a Niche for Hematopoietic Stem Cells ». *Developmental Cell* 8, n° 3 (mars 2005): 365-375. doi:10.1016/j.devcel.2004.12.016.
- Gervois, P, I P Torra, G Chinetti, T Grötzing, G Dubois, J C Fruchart, J Fruchart-Najib, E Leitersdorf, et B Staels. « A Truncated Human Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha Splice Variant with Dominant Negative Activity ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 13, n° 9 (septembre 1999): 1535-1549. doi:10.1210/mend.13.9.0341.
- Goldie, Lauren C., Jennifer L. Lucitti, Mary E. Dickinson, et Karen K. Hirschi. « Cell signaling directing the formation and function of hemogenic endothelium during murine embryogenesis ». *Blood* 112, n° 8 (15 octobre 2008): 3194-3204. doi:10.1182/blood-2008-02-139055.
- Gougos, A, S St Jacques, A Greaves, P J O'Connell, A J d' Apice, H J Bühring, C Bernabeu, J A van Mourik, et M Letarte. « Identification of Distinct Epitopes of Endoglin, an RGD-Containing Glycoprotein of Endothelial Cells, Leukemic Cells, and Syncytiotrophoblasts ». *International Immunology* 4, n° 1 (janvier 1992): 83-92.

- Graham, C H, T S Hawley, R G Hawley, J R MacDougall, R S Kerbel, N Khoo, et P K Lala. « Establishment and Characterization of First Trimester Human Trophoblast Cells with Extended Lifespan ». *Experimental Cell Research* 206, n° 2 (juin 1993): 204-211.
- Graves, J. A. « Genomic Imprinting, Development and Disease--Is Pre-Eclampsia Caused by a Maternally Imprinted Gene? » *Reproduction, Fertility, and Development* 10, n° 1 (1998): 23-29.
- Gray, Joshua P, Katherine A Burns, Tara L Leas, Gary H Perdew, et John P Vanden Heuvel. « Regulation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha by Protein Kinase C ». *Biochemistry* 44, n° 30 (2 août 2005): 10313-10321. doi:10.1021/bi050721g.
- Gray, Joshua P., John W. Davis, Lakshmi Gopinathan, Tara L. Leas, Courtney A. Nugent, et John P. Vanden Heuvel. « The Ribosomal Protein rpL11 Associates with and Inhibits the Transcriptional Activity of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Alpha ». *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 89, n° 2 (février 2006): 535-546. doi:10.1093/toxsci/kfj040.
- Greene, M. E., B. Blumberg, O. W. McBride, H. F. Yi, K. Kronquist, K. Kwan, L. Hsieh, G. Greene, et S. D. Nimer. « Isolation of the Human Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma cDNA: Expression in Hematopoietic Cells and Chromosomal Mapping ». *Gene Expression* 4, n° 4-5 (1995): 281-299.
- Greene, M. E., J. Pitts, M. A. McCarville, X. S. Wang, J. A. Newport, C. Edelstein, F. Lee, S. Ghosh, et S. Chu. « PPARgamma: Observations in the Hematopoietic System ». *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 62, n° 1 (juin 2000): 45-73.
- Guilini, Célia, Kyoji Urayama, Gulen Turkeri, Deniz B Dedeoglu, Hitoshi Kurose, Nadia Messaddeq, et Canan G Nebigil. « Divergent Roles of Prokineticin Receptors in the Endothelial Cells: Angiogenesis and Fenestration ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 298, n° 3 (mars 2010): H844-852. doi:10.1152/ajpheart.00898.2009.
- Guimond, M J, J A Luross, B Wang, C Terhorst, S Danial, et B A Croy. « Absence of Natural Killer Cells during Murine Pregnancy Is Associated with Reproductive Compromise in TgE26 Mice ». *Biology of Reproduction* 56, n° 1 (janvier 1997): 169-179.
- Guimond, M J, B Wang, et B A Croy. « Engraftment of Bone Marrow from Severe Combined Immunodeficient (SCID) Mice Reverses the Reproductive Deficits in Natural Killer Cell-Deficient Tg Epsilon 26 Mice ». *The Journal of Experimental Medicine* 187, n° 2 (19 janvier 1998): 217-223.
- Guimond, M J, B Wang, J Fujita, C Terhorst, et B A Croy. « Pregnancy-Associated Uterine Granulated Metrial Gland Cells in Mutant and Transgenic Mice ». *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)* 35, n° 6 (juin 1996): 501-509.
- Gupta, R A, J Tan, W F Krause, M W Geraci, T M Willson, S K Dey, et R N DuBois. « Prostacyclin-Mediated Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Delta in Colorectal Cancer ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, n° 24 (21 novembre 2000): 13275-13280. doi:10.1073/pnas.97.24.13275.
- Hamilton, W. J., et J. D. Boyd. « Development of the human placenta in the first three months of gestation ». *Journal of Anatomy* 94, n° Pt 3 (juillet 1960): 297-328.
- Handschuh, K., J. Guibourdenche, M. Cocquebert, V. Tsatsaris, M. Vidaud, D. Evain-Brion, et T. Fournier. « Expression and Regulation by PPARgamma of hCG Alpha- and Beta-Subunits: Comparison between Villous and Invasive Extravillous Trophoblastic Cells ». *Placenta* 30, n° 12 (décembre 2009): 1016-1022. doi:10.1016/j.placenta.2009.09.006.

- Handschuh, Karen, Jean Guibourdenche, Vassilis Tsatsaris, Mickaël Guesnon, Ingrid Laurendeau, Danièle Evain-Brion, et Thierry Fournier. « 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, n° 10 (octobre 2007): 5011-5019. doi:10.1210/en.2007-0286.
- Haouzi, D, K Mahmoud, M Fourar, K Bendhaou, H Dechaud, J De Vos, T Rème, D Dewailly, et S Hamamah. « Identification of New Biomarkers of Human Endometrial Receptivity in the Natural Cycle ». *Human Reproduction (Oxford, England)* 24, n° 1 (janvier 2009): 198-205. doi:10.1093/humrep/den360.
- Harris, L. K. « Review: Trophoblast-Vascular Cell Interactions in Early Pregnancy: How to Remodel a Vessel ». *Placenta* 31 Suppl (mars 2010): S93-98. doi:10.1016/j.placenta.2009.12.012.
- Harris, Lynda K, et John D Aplin. « Vascular Remodeling and Extracellular Matrix Breakdown in the Uterine Spiral Arteries during Pregnancy ». *Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)* 14, n° 8 Suppl (décembre 2007): 28-34. doi:10.1177/1933719107309588.
- Hoffmann, P, J-J Feige, et N Alfaidy. « Placental Expression of EG-VEGF and Its Receptors PKR1 (prokineticin Receptor-1) and PKR2 throughout Mouse Gestation ». *Placenta* 28, n° 10 (octobre 2007): 1049-1058. doi:10.1016/j.placenta.2007.03.008.
- Hoffmann, Pascale, Jean-Jacques Feige, et Nadia Alfaidy. « 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, n° 4 (avril 2006): 1675-1684. doi:10.1210/en.2005-0912.
- Hoffmann, Pascale, Yasmina Saoudi, Mohamed Benharouga, Charles H Graham, Jean-Patrick Schaal, Chafika Mazouni, Jean-Jacques Feige, et Nadia Alfaidy. « Role of EG-VEGF in Human Placentation: Physiological and Pathological Implications ». *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 13, n° 8B (août 2009): 2224-2235. doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00554.x.
- Holdsworth-Carson, S. J., R. Lim, A. Mitton, C. Whitehead, G. E. Rice, M. Permezel, et M. Lappas. « Peroxisome Proliferator-Activated Receptors Are Altered in Pathologies of the Human Placenta: Gestational Diabetes Mellitus, Intrauterine Growth Restriction and Preeclampsia ». *Placenta* 31, n° 3 (mars 2010): 222-229. doi:10.1016/j.placenta.2009.12.009.
- Hu, Wang-Ping, Chengkang Zhang, Jia-Da Li, Z David Luo, Silvia Amadesi, Nigel Bunnett, et Qun-Yong Zhou. « Impaired Pain Sensation in Mice Lacking Prokineticin 2 ». *Molecular Pain* 2 (2006): 35. doi:10.1186/1744-8069-2-35.
- Huber, Tara L, Valerie Kouskoff, H Joerg Fehling, James Palis, et Gordon Keller. « Haemangioblast Commitment Is Initiated in the Primitive Streak of the Mouse Embryo ». *Nature* 432, n° 7017 (2 décembre 2004): 625-630. doi:10.1038/nature03122.
- Huppertz, B, H G Frank, F Reister, J Kingdom, H Korr, et P Kaufmann. « Apoptosis Cascade Progresses during Turnover of Human Trophoblast: Analysis of Villous Cytotrophoblast and Syncytial Fragments in Vitro ». *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 79, n° 12 (décembre 1999): 1687-1702.
- Hustin, J, et J P Schaaps. « Echographic [corrected] and Anatomic Studies of the Maternotrophoblastic Border during the First Trimester of Pregnancy ». *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 157, n° 1 (juillet 1987): 162-168.
- IJpenberg, A, E Jeannin, W Wahli, et B Desvergne. « Polarity and Specific Sequence

- Requirements of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR)/retinoid X Receptor Heterodimer Binding to DNA. A Functional Analysis of the Malic Enzyme Gene PPAR Response Element ». *The Journal of Biological Chemistry* 272, n° 32 (8 août 1997): 20108-20117.
- Islami, D, P Bischof, et D Chardonnens. « Modulation of Placental Vascular Endothelial Growth Factor by Leptin and hCG ». *Molecular Human Reproduction* 9, n° 7 (juillet 2003): 395-398.
- Issemann, I, et S Green. « Activation of a Member of the Steroid Hormone Receptor Superfamily by Peroxisome Proliferators ». *Nature* 347, n° 6294 (18 octobre 1990): 645-650. doi:10.1038/347645a0.
- Ivanovs, Andrejs, Stanislav Rybtsov, Lindsey Welch, Richard A Anderson, Marc L Turner, et Alexander Medvinsky. « Highly Potent Human Hematopoietic Stem Cells First Emerge in the Intraembryonic Aorta-Gonad-Mesonephros Region ». *The Journal of Experimental Medicine* 208, n° 12 (21 novembre 2011): 2417-2427. doi:10.1084/jem.20111688.
- Jaffe, R, E Jauniaux, et J Hustin. « Maternal Circulation in the First-Trimester Human Placenta--Myth or Reality? ». *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 176, n° 3 (mars 1997): 695-705.
- Jaffredo, T, R Gautier, V Brajeul, et F Dieterlen-Lièvre. « Tracing the Progeny of the Aortic Hemangioblast in the Avian Embryo ». *Developmental Biology* 224, n° 2 (15 août 2000): 204-214. doi:10.1006/dbio.2000.9799.
- Jaffredo, T, R Gautier, A Eichmann, et F Dieterlen-Lièvre. « Intraaortic Hemopoietic Cells Are Derived from Endothelial Cells during Ontogeny ». *Development (Cambridge, England)* 125, n° 22 (novembre 1998): 4575-4583.
- Jaffredo, Thierry, Karine Bollerot, Daisuke Sugiyama, Rodolphe Gautier, et Cécile Drevon. « Tracing the Hemangioblast during Embryogenesis: Developmental Relationships between Endothelial and Hematopoietic Cells ». *The International Journal of Developmental Biology* 49, n° 2-3 (2005): 269-277. doi:10.1387/ijdb.041948tj.
- Jauniaux, E, G J Burton, G J Moscoso, et J Hustin. « Development of the Early Human Placenta: A Morphometric Study ». *Placenta* 12, n° 3 (juin 1991): 269-276.
- Jauniaux, E, D Jurkovic, et S Campbell. « In Vivo Investigations of the Anatomy and the Physiology of Early Human Placental Circulations ». *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 1, n° 6 (1 novembre 1991): 435-445. doi:10.1046/j.1469-0705.1991.01060435.x.
- Jauniaux, E, A Watson, et G Burton. « Evaluation of Respiratory Gases and Acid-Base Gradients in Human Fetal Fluids and Uteroplacental Tissue between 7 and 16 Weeks' Gestation ». *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 184, n° 5 (avril 2001): 998-1003. doi:10.1067/mob.2001.111935.
- Jauniaux, E, A L Watson, J Hempstock, Y P Bao, J N Skepper, et G J Burton. « Onset of Maternal Arterial Blood Flow and Placental Oxidative Stress. A Possible Factor in Human Early Pregnancy Failure ». *The American Journal of Pathology* 157, n° 6 (décembre 2000): 2111-2122. doi:10.1016/S0002-9440(10)64849-3.
- Joubert, F J, et N Taljaard. « Snake Venoms. The Amino Acid Sequences of Two Proteinase Inhibitor Homologues from Dendroaspis Angusticeps Venom ». *Hoppe-Seyler's Zeitschrift Für Physiologische Chemie* 361, n° 5 (mai 1980): 661-674.
- Kam, E P, L Gardner, Y W Loke, et A King. « The Role of Trophoblast in the Physiological Change in Decidual Spiral Arteries ». *Human Reproduction (Oxford, England)* 14, n°

- 8 (août 1999): 2131-2138.
- Kanasaki, Keizo, Kristin Palmsten, Hikaru Sugimoto, Shakil Ahmad, Yuki Hamano, Liang Xie, Samuel Parry, et al. « Deficiency in Catechol-O-Methyltransferase and 2-Methoxyoestradiol Is Associated with Pre-Eclampsia ». *Nature* 453, n° 7198 (19 juin 2008): 1117-1121. doi:10.1038/nature06951.
- Karumanchi, S Ananth, et Isaac E Stillman. « In Vivo Rat Model of Preeclampsia ». *Methods in Molecular Medicine* 122 (2006): 393-399.
- Kaser, Alexandra, Martina Winklmayr, Günther Lepperdinger, et Günther Kreil. « The AVIT Protein Family. Secreted Cysteine-Rich Vertebrate Proteins with Diverse Functions ». *EMBO Reports* 4, n° 5 (mai 2003): 469-473. doi:10.1038/sj.embor.embor830.
- Kaufmann P., et Castellucci M. « Extravillous trophoblast in the human placenta » 65 (1997): 10:21.
- Kaufmann, Peter, Simon Black, et Berthold Huppertz. « Endovascular Trophoblast Invasion: Implications for the Pathogenesis of Intrauterine Growth Retardation and Preeclampsia ». *Biology of Reproduction* 69, n° 1 (juillet 2003): 1-7. doi:10.1095/biolreprod.102.014977.
- Keller, G M. « In Vitro Differentiation of Embryonic Stem Cells ». *Current Opinion in Cell Biology* 7, n° 6 (décembre 1995): 862-869.
- Kennedy, Marion, Sunita L D'Souza, Macarena Lynch-Kattman, Staci Schwantz, et Gordon Keller. « Development of the Hemangioblast Defines the Onset of Hematopoiesis in Human ES Cell Differentiation Cultures ». *Blood* 109, n° 7 (1 avril 2007): 2679-2687. doi:10.1182/blood-2006-09-047704.
- Kissa, Karima, et Philippe Herbomel. « Blood Stem Cells Emerge from Aortic Endothelium by a Novel Type of Cell Transition ». *Nature* 464, n° 7285 (4 mars 2010): 112-115. doi:10.1038/nature08761.
- Kliwer, S A, S S Sundseth, S A Jones, P J Brown, G B Wisely, C S Koble, P Devchand, et al. « Fatty Acids and Eicosanoids Regulate Gene Expression through Direct Interactions with Peroxisome Proliferator-Activated Receptors Alpha and Gamma ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, n° 9 (29 avril 1997): 4318-4323.
- Kliwer, S A, K Umesono, D J Mangelsdorf, et R M Evans. « Retinoid X Receptor Interacts with Nuclear Receptors in Retinoic Acid, Thyroid Hormone and Vitamin D3 Signalling ». *Nature* 355, n° 6359 (30 janvier 1992): 446-449. doi:10.1038/355446a0.
- Koga, Kaori, Yutaka Osuga, Osamu Yoshino, Yasushi Hirota, Xie Ruimeng, Tetsuya Hirata, Satoru Takeda, Tetsu Yano, Osamu Tsutsumi, et Yuji Taketani. « Elevated Serum Soluble Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 (sVEGFR-1) Levels in Women with Preeclampsia ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 88, n° 5 (mai 2003): 2348-2351. doi:10.1210/jc.2002-021942.
- Komar, C M, O Braissant, W Wahli, et T E Curry Jr. « Expression and Localization of PPARs in the Rat Ovary during Follicular Development and the Perioovulatory Period ». *Endocrinology* 142, n° 11 (novembre 2001): 4831-4838. doi:10.1210/endo.142.11.8429.
- Konopleva, Marina, et Michael Andreeff. « Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma in Hematologic Malignancies ». *Current Opinion in Hematology* 9, n° 4 (juillet 2002): 294-302.
- Krebs, C, L M Macara, R Leiser, A W Bowman, I A Greer, et J C Kingdom. « Intrauterine Growth Restriction with Absent End-Diastolic Flow Velocity in the Umbilical Artery Is Associated with Maldevelopment of the Placental Terminal Villous Tree ».

- American Journal of Obstetrics and Gynecology* 175, n° 6 (décembre 1996): 1534-1542.
- Krey, G, H Keller, A Mahfoudi, J Medin, K Ozato, C Dreyer, et W Wahli. « Xenopus Peroxisome Proliferator Activated Receptors: Genomic Organization, Response Element Recognition, Heterodimer Formation with Retinoid X Receptor and Activation by Fatty Acids ». *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 47, n° 1-6 (décembre 1993): 65-73.
- Kubota, N, Y Terauchi, H Miki, H Tamemoto, T Yamauchi, K Komeda, S Satoh, et al. « PPAR Gamma Mediates High-Fat Diet-Induced Adipocyte Hypertrophy and Insulin Resistance ». *Molecular Cell* 4, n° 4 (octobre 1999): 597-609.
- Kumasawa, Keiichi, Masahito Ikawa, Hiroyasu Kidoya, Hidetoshi Hasuwa, Tomoko Saito-Fujita, Yuka Morioka, Nobuyuki Takakura, Tadashi Kimura, et Masaru Okabe. « Pravastatin Induces Placental Growth Factor (PGF) and Ameliorates Preeclampsia in a Mouse Model ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, n° 4 (25 janvier 2011): 1451-1455. doi:10.1073/pnas.1011293108.
- Labbaye, C., M. Valtieri, T. Barberi, E. Meccia, B. Masella, E. Pelosi, G. L. Condorelli, U. Testa, et C. Peschle. « Differential Expression and Functional Role of GATA-2, NF-E2, and GATA-1 in Normal Adult Hematopoiesis ». *The Journal of Clinical Investigation* 95, n° 5 (mai 1995): 2346-2358. doi:10.1172/JCI117927.
- Lam, Enid Yi Ni, Christopher J Hall, Philip S Crosier, Kathryn E Crosier, et Maria Vega Flores. « Live Imaging of Runx1 Expression in the Dorsal Aorta Tracks the Emergence of Blood Progenitors from Endothelial Cells ». *Blood* 116, n° 6 (12 août 2010): 909-914. doi:10.1182/blood-2010-01-264382.
- Laudet, V, C Hänni, J Coll, F Catzeflis, et D Stéhelin. « Evolution of the Nuclear Receptor Gene Superfamily ». *The EMBO Journal* 11, n° 3 (mars 1992): 1003-1013.
- Le Bouteiller, P, et V Mallet. « HLA-G and Pregnancy ». *Reviews of Reproduction* 2, n° 1 (janvier 1997): 7-13.
- LeCouter, J, J Kowalski, J Foster, P Hass, Z Zhang, L Dillard-Telm, G Frantz, et al. « Identification of an Angiogenic Mitogen Selective for Endocrine Gland Endothelium ». *Nature* 412, n° 6850 (30 août 2001): 877-884. doi:10.1038/35091000.
- LeCouter, Jennifer, Rui Lin, Gretchen Frantz, Zemin Zhang, Kenneth Hillan, et Napoleone Ferrara. « 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, n° 6 (juin 2003): 2606-2616. doi:10.1210/en.2002-0146.
- LeCouter, Jennifer, Rui Lin, Max Tejada, Gretchen Frantz, Franklin Peale, Kenneth J Hillan, et Napoleone Ferrara. « The Endocrine-Gland-Derived VEGF Homologue Bv8 Promotes Angiogenesis in the Testis: Localization of Bv8 Receptors to Endothelial Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, n° 5 (4 mars 2003): 2685-2690. doi:10.1073/pnas.0337667100.
- LeCouter, Jennifer, Constance Zlot, Max Tejada, Franklin Peale, et Napoleone Ferrara. « Bv8 and Endocrine Gland-Derived Vascular Endothelial Growth Factor Stimulate Hematopoiesis and Hematopoietic Cell Mobilization ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, n° 48 (30 novembre 2004): 16813-16818. doi:10.1073/pnas.0407697101.
- Lee, Yin-Lau, Yuk-Ling Chan, Wan-Ngai Chow, Ernest Hung-Yu Ng, Kai-Fai Lee, William S B Yeung, et Pak-Chung Ho. « 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 ». *Fertility and Sterility* 91, n° 5 Suppl (mai 2009): 2163-2171. doi:10.1016/j.fertnstert.2008.03.076.
- Lehmann, J M, L B Moore, T A Smith-Oliver, W O Wilkison, T M Willson, et S A Kliewer. « An Antidiabetic Thiazolidinedione Is a High Affinity Ligand for Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPAR Gamma) ». *The Journal of Biological Chemistry* 270, n° 22 (2 juin 1995): 12953-12956.
- Levine, Richard J, Chun Lam, Cong Qian, Kai F Yu, Sharon E Maynard, Benjamin P Sachs, Baha M Sibai, et al. « Soluble Endoglin and Other Circulating Antiangiogenic Factors in Preeclampsia ». *The New England Journal of Medicine* 355, n° 10 (7 septembre 2006): 992-1005. doi:10.1056/NEJMoa055352.
- Levine, Richard J, Sharon E Maynard, Cong Qian, Kee-Hak Lim, Lucinda J England, Kai F Yu, Enrique F Schisterman, et al. « Circulating Angiogenic Factors and the Risk of Preeclampsia ». *The New England Journal of Medicine* 350, n° 7 (12 février 2004): 672-683. doi:10.1056/NEJMoa031884.
- Levytska, Khrystyna, Sascha Drewlo, Dora Baczyk, et John Kingdom. « PPAR- Γ Regulates Trophoblast Differentiation in the BeWo Cell Model ». *PPAR Research* 2014 (2014): 637251. doi:10.1155/2014/637251.
- Li, Jia-Da, Wang-Ping Hu, Lisa Boehmer, Michelle Y Cheng, Alex G Lee, Alexander Jilek, Jerome M Siegel, et Qun-Yong Zhou. « Attenuated Circadian Rhythms in Mice Lacking the Prokineticin 2 Gene ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 26, n° 45 (8 novembre 2006): 11615-11623. doi:10.1523/JNEUROSCI.3679-06.2006.
- Li, M, C M Bullock, D J Knauer, F J Ehlert, et Q Y Zhou. « Identification of Two Prokineticin cDNAs: Recombinant Proteins Potently Contract Gastrointestinal Smooth Muscle ». *Molecular Pharmacology* 59, n° 4 (avril 2001): 692-698.
- Liao, W, B W Bisgrove, H Sawyer, B Hug, B Bell, K Peters, D J Grunwald, et D Y Stainier. « The Zebrafish Gene *Cloche* Acts Upstream of a Flk-1 Homologue to Regulate Endothelial Cell Differentiation ». *Development (Cambridge, England)* 124, n° 2 (janvier 1997): 381-389.
- Lim, Soo, Cheng Ji Jin, Min Kim, Sung Soo Chung, Ho Seon Park, In Kyu Lee, Choon Taek Lee, Young Min Cho, Hong Kyu Lee, et Kyong Soo Park. « PPARgamma Gene Transfer Sustains Apoptosis, Inhibits Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation, and Reduces Neointima Formation after Balloon Injury in Rats ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 26, n° 4 (avril 2006): 808-813. doi:10.1161/01.ATV.0000204634.26163.a7.
- Lin, Daniel Chi-Hong, Clayton M Bullock, Frederick J Ehlert, Jin-Long Chen, Hui Tian, et Qun-Yong Zhou. « Identification and Molecular Characterization of Two Closely Related G Protein-Coupled Receptors Activated by Prokineticins/endocrine Gland Vascular Endothelial Growth Factor ». *The Journal of Biological Chemistry* 277, n° 22 (31 mai 2002): 19276-19280. doi:10.1074/jbc.M202139200.
- Lucitti, Jennifer L, Elizabeth A V Jones, Chengqun Huang, Ju Chen, Scott E Fraser, et Mary E Dickinson. « Vascular Remodeling of the Mouse Yolk Sac Requires Hemodynamic Force ». *Development (Cambridge, England)* 134, n° 18 (septembre 2007): 3317-3326. doi:10.1242/dev.02883.
- Luttun, Aernout, et Peter Carmeliet. « Soluble VEGF Receptor Flt1: The Elusive Preeclampsia Factor Discovered? » *The Journal of Clinical Investigation* 111, n° 5 (mars 2003): 600-602. doi:10.1172/JCI18015.
- Maldonado-Pérez, David, Jemma Evans, Fiona Denison, Robert P Millar, et Henry N

- Jabbour. « Potential Roles of the Prokineticins in Reproduction ». *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 18, n° 2 (mars 2007): 66-72.
doi:10.1016/j.tem.2006.12.002.
- Mangelsdorf, D. J., et R. M. Evans. « The RXR Heterodimers and Orphan Receptors ». *Cell* 83, n° 6 (15 décembre 1995): 841-850.
- Marshall, C J, R L Moore, P Thorogood, P M Brickell, C Kinnon, et A J Thrasher. « Detailed Characterization of the Human Aorta-Gonad-Mesonephros Region Reveals Morphological Polarity Resembling a Hematopoietic Stromal Layer ». *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 215, n° 2 (juin 1999): 139-147. doi:10.1002/(SICI)1097-0177(199906)215:2<139::AID-DVDY6>3.0.CO;2-#.
- Martucci, Cataldo, Silvia Franchi, Elisa Giannini, Hui Tian, Pietro Melchiorri, Lucia Negri, et Paola Sacerdote. « Bv8, the Amphibian Homologue of the Mammalian Prokineticins, Induces a Proinflammatory Phenotype of Mouse Macrophages ». *British Journal of Pharmacology* 147, n° 2 (janvier 2006): 225-234. doi:10.1038/sj.bjp.0706467.
- Masuda, Yasushi, Yoshihiro Takatsu, Yasuko Terao, Satoshi Kumano, Yoshihiro Ishibashi, Masato Suenaga, Michiko Abe, et al. « Isolation and Identification of EG-VEGF/prokineticins as Cognate Ligands for Two Orphan G-Protein-Coupled Receptors ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 293, n° 1 (26 avril 2002): 396-402. doi:10.1016/S0006-291X(02)00239-5.
- Matsumoto, Shun-Ichiro, Chihiro Yamazaki, Koh-Hei Masumoto, Mamoru Nagano, Masanori Naito, Takatoshi Soga, Hideki Hiyama, et al. « Abnormal Development of the Olfactory Bulb and Reproductive System in Mice Lacking Prokineticin Receptor PKR2 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, n° 11 (14 mars 2006): 4140-4145. doi:10.1073/pnas.0508881103.
- Matsuo, H, et J F Strauss 3rd. « Peroxisome Proliferators and Retinoids Affect JEG-3 Choriocarcinoma Cell Function ». *Endocrinology* 135, n° 3 (septembre 1994): 1135-1145. doi:10.1210/endo.135.3.8070357.
- Maynard, Sharon E, Jiang-Yong Min, Jaime Merchan, Kee-Hak Lim, Jianyi Li, Susanta Mondal, Towia A Libermann, et al. « Excess Placental Soluble Fms-like Tyrosine Kinase 1 (sFlt1) May Contribute to Endothelial Dysfunction, Hypertension, and Proteinuria in Preeclampsia ». *The Journal of Clinical Investigation* 111, n° 5 (mars 2003): 649-658. doi:10.1172/JCI17189.
- McCarthy, Fergus P., Sascha Drewlo, Fred A. English, John Kingdom, Edward J. Johns, Louise C. Kenny, et Sarah K. Walsh. « Evidence Implicating Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- Γ in the Pathogenesis of Preeclampsia ». *Hypertension* 58, n° 5 (novembre 2011): 882-887. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.179440.
- McCarthy, Fergus P., Sascha Drewlo, John Kingdom, Edward J. Johns, Sarah K. Walsh, et Louise C. Kenny. « Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- Γ as a Potential Therapeutic Target in the Treatment of Preeclampsia ». *Hypertension* 58, n° 2 (août 2011): 280-286. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.172627.
- Medvinsky, A, et E Dzierzak. « Definitive Hematopoiesis Is Autonomously Initiated by the AGM Region ». *Cell* 86, n° 6 (20 septembre 1996): 897-906.
- Meekins, J W, P J McLaughlin, D C West, I R McFadyen, et P M Johnson. « Endothelial cell activation by tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and the development of pre-eclampsia. » *Clinical and Experimental Immunology* 98, n° 1 (octobre 1994): 110-114.
- Melchers, F. « Murine Embryonic B Lymphocyte Development in the Placenta ». *Nature* 277, n° 5693 (18 janvier 1979): 219-221.

- Melchiorri, D, V Bruno, G Besong, R T Ngomba, L Cuomo, A De Blasi, A Copani, et al. « 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 ». *The European Journal of Neuroscience* 13, n° 9 (mai 2001): 1694-1702.
- Mihu, Carmen Mihaela, S Suşman, D Rus Ciucă, D Mihu, et N Costin. « Aspects of Placental Morphogenesis and Angiogenesis ». *Romanian Journal of Morphology and Embryology = Revue Roumaine de Morphologie et Embryologie* 50, n° 4 (2009): 549-557.
- Minegishi, N, J Ohta, H Yamagiwa, N Suzuki, S Kawauchi, Y Zhou, S Takahashi, N Hayashi, J D Engel, et M Yamamoto. « The Mouse GATA-2 Gene Is Expressed in the Para-Aortic Splanchnopleura and Aorta-Gonads and Mesonephros Region ». *Blood* 93, n° 12 (15 juin 1999): 4196-4207.
- Mollay, C, C Wechselberger, G Mignogna, L Negri, P Melchiorri, D Barra, et G Kreil. « Bv8, a Small Protein from Frog Skin and Its Homologue from Snake Venom Induce Hyperalgesia in Rats ». *European Journal of Pharmacology* 374, n° 2 (18 juin 1999): 189-196.
- Monvoisin, Arnaud, Jackelyn A Alva, Jennifer J Hofmann, Ann C Zovein, Timothy F Lane, et M Luisa Iruela-Arispe. « VE-Cadherin-CreERT2 Transgenic Mouse: A Model for Inducible Recombination in the Endothelium ». *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 235, n° 12 (décembre 2006): 3413-3422. doi:10.1002/dvdy.20982.
- Moore, M A, et J J Owen. « Chromosome Marker Studies on the Development of the Haemopoietic System in the Chick Embryo ». *Nature* 208, n° 5014 (4 décembre 1965): 956 passim.
- Mouthon, M. A., O. Bernard, M. T. Mitjavila, P. H. Romeo, W. Vainchenker, et D. Mathieu-Mahul. « Expression of Tal-1 and GATA-Binding Proteins during Human Hematopoiesis ». *Blood* 81, n° 3 (1 février 1993): 647-655.
- Müller, A M, A Medvinsky, J Strouboulis, F Grosveld, et E Dzierzak. « Development of Hematopoietic Stem Cell Activity in the Mouse Embryo ». *Immunity* 1, n° 4 (juillet 1994): 291-301.
- Murphy, Shawn P, Jason C Choi, et Renae Holtz. « Regulation of Major Histocompatibility Complex Class II Gene Expression in Trophoblast Cells ». *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E* 2 (5 juillet 2004): 52. doi:10.1186/1477-7827-2-52.
- Murray, P. D. F. « The Development in Vitro of the Blood of the Early Chick Embryo ». *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character* 111, n° 773 (10 janvier 1932): 497-521. doi:10.1098/rspb.1932.0070.
- Nadra, Karim, Laure Quignodon, Chiara Sardella, Elisabeth Joye, Antonio Mucciolo, Roman Chrast, et Béatrice Desvergne. « PPARgamma in Placental Angiogenesis ». *Endocrinology* 151, n° 10 (octobre 2010): 4969-4981. doi:10.1210/en.2010-0131.
- Nagamatsu, Takeshi, Tomoyuki Fujii, Maki Kusumi, Li Zou, Takahiro Yamashita, Yutaka Osuga, Mikio Momoeda, Shirou Kozuma, et Yuji Taketani. « Cytotrophoblasts up-Regulate Soluble Fms-like Tyrosine Kinase-1 Expression under Reduced Oxygen: An Implication for the Placental Vascular Development and the Pathophysiology of Preeclampsia ». *Endocrinology* 145, n° 11 (novembre 2004): 4838-4845. doi:10.1210/en.2004-0533.
- Nagasawa, Eriko, Yasunobu Abe, Junji Nishimura, Toshihiko Yanase, Hajime Nawata, et Koichiro Muta. « Pivotal Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPARgamma) in Regulation of Erythroid Progenitor Cell Proliferation and

- Differentiation ». *Experimental Hematology* 33, n° 8 (août 2005): 857-864.
doi:10.1016/j.exphem.2005.05.003.
- Nagy, L, P Tontonoz, J G Alvarez, H Chen, et R M Evans. « Oxidized LDL Regulates Macrophage Gene Expression through Ligand Activation of PPARgamma ». *Cell* 93, n° 2 (17 avril 1998): 229-240.
- Negri, Lucia, Roberta Lattanzi, Elisa Giannini, Maria Antonella Colucci, Giuseppina Mignogna, Donatella Barra, Fabio Grohovaz, et al. « Biological Activities of Bv8 Analogues ». *British Journal of Pharmacology* 146, n° 5 (novembre 2005): 625-632.
doi:10.1038/sj.bjp.0706376.
- Negri, Lucia, Roberta Lattanzi, Elisa Giannini, Mariantonella Colucci, Federica Margheriti, Pietro Melchiorri, Vittorio Vellani, Hui Tian, Milena De Felice, et Frank Porreca. « 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 ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 26, n° 25 (21 juin 2006): 6716-6727.
doi:10.1523/JNEUROSCI.5403-05.2006.
- Negri, Lucia, Roberta Lattanzi, Elisa Giannini, et Pietro Melchiorri. « Bv8/Prokineticin Proteins and Their Receptors ». *Life Sciences* 81, n° 14 (15 septembre 2007): 1103-1116. doi:10.1016/j.lfs.2007.08.011.
- Negri, Lucia, Roberta Lattanzi, Elisa Giannini, Alessio Metere, Mariantonella Colucci, Donatella Barra, Günther Kreil, et Pietro Melchiorri. « Nociceptive Sensitization by the Secretory Protein Bv8 ». *British Journal of Pharmacology* 137, n° 8 (décembre 2002): 1147-1154. doi:10.1038/sj.bjp.0704995.
- Ng, Kwan L, Jia-Da Li, Michelle Y Cheng, Frances M Leslie, Alex G Lee, et Qun-Yong Zhou. « Dependence of Olfactory Bulb Neurogenesis on Prokineticin 2 Signaling ». *Science (New York, N.Y.)* 308, n° 5730 (24 juin 2005): 1923-1927.
doi:10.1126/science.1112103.
- Ngan, Elly S W, K Y Lee, William S B Yeung, Hextan Y S Ngan, Ernest H Y Ng, et P C Ho. « Endocrine Gland-Derived Vascular Endothelial Growth Factor Is Expressed in Human Peri-Implantation Endometrium, but Not in Endometrial Carcinoma ». *Endocrinology* 147, n° 1 (janvier 2006): 88-95. doi:10.1210/en.2005-0543.
- Nishikawa, S I, S Nishikawa, M Hirashima, N Matsuyoshi, et H Kodama. « Progressive Lineage Analysis by Cell Sorting and Culture Identifies FLK1+VE-Cadherin+ Cells at a Diverging Point of Endothelial and Hemopoietic Lineages ». *Development (Cambridge, England)* 125, n° 9 (mai 1998): 1747-1757.
- Nishikawa, S I, S Nishikawa, H Kawamoto, H Yoshida, M Kizumoto, H Kataoka, et Y Katsura. « In Vitro Generation of Lymphohematopoietic Cells from Endothelial Cells Purified from Murine Embryos ». *Immunity* 8, n° 6 (juin 1998): 761-769.
- North, T, T L Gu, T Stacy, Q Wang, L Howard, M Binder, M Marin-Padilla, et N A Speck. « Cbfa2 Is Required for the Formation of Intra-Aortic Hematopoietic Clusters ». *Development (Cambridge, England)* 126, n° 11 (juin 1999): 2563-2575.
- Oberlin, Estelle, Maud Fleury, Denis Clay, Laurence Petit-Cocault, Jean-Jacques Candelier, Benoît Mennesson, Thierry Jaffredo, et Michèle Souyri. « VE-Cadherin Expression Allows Identification of a New Class of Hematopoietic Stem Cells within Human Embryonic Liver ». *Blood* 116, n° 22 (25 novembre 2010): 4444-4455.
doi:10.1182/blood-2010-03-272625.
- Oberlin, Estelle, Manuela Tavian, István Blazsek, et Bruno Péault. « Blood-Forming Potential of Vascular Endothelium in the Human Embryo ». *Development (Cambridge, England)* 129, n° 17 (septembre 2002): 4147-4157.

- Orkin, Stuart H, et Leonard I Zon. « Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology ». *Cell* 132, n° 4 (22 février 2008): 631-644. doi:10.1016/j.cell.2008.01.025.
- Ottersbach, Katrin, et Elaine Dzierzak. « The Murine Placenta Contains Hematopoietic Stem Cells within the Vascular Labyrinth Region ». *Developmental Cell* 8, n° 3 (mars 2005): 377-387. doi:10.1016/j.devcel.2005.02.001.
- Owen, J J, M A Moore, et G A Harrison. « Chromosome Marker Studies in the Graft-versus-Host Reaction in the Chick Embryo ». *Nature* 207, n° 994 (17 juillet 1965): 313-315.
- Palis, J, R J Chan, A Koniski, R Patel, M Starr, et M C Yoder. « Spatial and Temporal Emergence of High Proliferative Potential Hematopoietic Precursors during Murine Embryogenesis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, n° 8 (10 avril 2001): 4528-4533. doi:10.1073/pnas.071002398.
- Palis, J, S Robertson, M Kennedy, C Wall, et G Keller. « Development of Erythroid and Myeloid Progenitors in the Yolk Sac and Embryo Proper of the Mouse ». *Development (Cambridge, England)* 126, n° 22 (novembre 1999): 5073-5084.
- Parast, Mana M., Heather Yu, Aleksandar Ciric, Mark W. Salata, Vanessa Davis, et David S. Milstone. « PPARgamma Regulates Trophoblast Proliferation and Promotes Labyrinthine Trilineage Differentiation ». *PloS One* 4, n° 11 (2009): e8055. doi:10.1371/journal.pone.0008055.
- Parker, R M, N G Copeland, H J Eyre, M Liu, D J Gilbert, J Crawford, M Couzens, G R Sutherland, N A Jenkins, et H Herzog. « Molecular Cloning and Characterisation of GPR74 a Novel G-Protein Coupled Receptor Closest Related to the Y-Receptor Family ». *Brain Research. Molecular Brain Research* 77, n° 2 (5 mai 2000): 199-208.
- Pavan, Laëtitia, Anne Tarrade, Axelle Hermouet, Claude Delouis, Mattias Titeux, Michel Vidaud, Patrice Théron, Daniele Evain-Brion, et Thierry Fournier. « Human Invasive Trophoblasts Transformed with Simian Virus 40 Provide a New Tool to Study the Role of PPARgamma in Cell Invasion Process ». *Carcinogenesis* 24, n° 8 (août 2003): 1325-1336. doi:10.1093/carcin/bgg074.
- Peault, B. M., J. P. Thiery, et N. M. Le Douarin. « Surface Marker for Hemopoietic and Endothelial Cell Lineages in Quail That Is Defined by a Monoclonal Antibody ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80, n° 10 (mai 1983): 2976-2980.
- Peschle, C, A R Migliaccio, G Migliaccio, M Petrini, M Calandrini, G Russo, G Mastroberardino, M Presta, A M Gianni, et P Comi. « Embryonic----Fetal Hb Switch in Humans: Studies on Erythroid Bursts Generated by Embryonic Progenitors from Yolk Sac and Liver ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81, n° 8 (avril 1984): 2416-2420.
- Peschle, C., F. Mavilio, A. Carè, G. Migliaccio, A. R. Migliaccio, G. Salvo, P. Samoggia, S. Petti, R. Guerriero, et M. Marinucci. « Haemoglobin Switching in Human Embryos: Asynchrony of Zeta----Alpha and Epsilon----Gamma-Globin Switches in Primitive and Definite Erythropoietic Lineage ». *Nature* 313, n° 5999 (17 janvier 1985): 235-238.
- Peschle, C., G. Migliaccio, D. Lazzaro, S. Petti, G. Mancini, A. Carè, G. Russo, G. Mastroberardino, A. R. Migliaccio, et U. Testa. « Hemopoietic Development in Human Embryos ». *Blood Cells* 10, n° 2-3 (1984): 427-441.
- Pierce, J. G., et T. F. Parsons. « Glycoprotein Hormones: Structure and Function ». *Annual Review of Biochemistry* 50 (1981): 465-495. doi:10.1146/annurev.bi.50.070181.002341.
- Pijnenborg R. « The human decidua as a passage-way for trophoblast invasion » 11 (1998): 229-41.

- Pijnenborg, R, J M Bland, W B Robertson, et I Brosens. « Uteroplacental Arterial Changes Related to Interstitial Trophoblast Migration in Early Human Pregnancy ». *Placenta* 4, n° 4 (décembre 1983): 397-413.
- Polliotti, Bruno M, A Gordon Fry, Devereux N Saller, Robert A Mooney, Christopher Cox, et Richard K Miller. « Second-Trimester Maternal Serum Placental Growth Factor and Vascular Endothelial Growth Factor for Predicting Severe, Early-Onset Preeclampsia ». *Obstetrics and Gynecology* 101, n° 6 (juin 2003): 1266-1274.
- Prosser, Haydn M, Allan Bradley, Johanna E Chesham, Francis J P Ebling, Michael H Hastings, et Elizabeth S Maywood. « Prokineticin Receptor 2 (Prokr2) Is Essential for the Regulation of Circadian Behavior by the Suprachiasmatic Nuclei ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, n° 2 (9 janvier 2007): 648-653. doi:10.1073/pnas.0606884104.
- Red-Horse, K, J Rivera, A Schanz, Y Zhou, V Winn, M Kapidzic, E Maltepe, et al. « Literature Watch. Cytotrophoblast Induction of Arterial Apoptosis and Lymphangiogenesis in an in Vivo Model of Human Placentation ». *Lymphatic Research and Biology* 4, n° 4 (2006): 229-242. doi:10.1089/lrb.2006.4407.
- Redman, C W, et I L Sargent. « The Pathogenesis of Pre-Eclampsia ». *Gynécologie, Obstétrique & Fertilité* 29, n° 7-8 (août 2001): 518-522.
- Regnault, T R H, H L Galan, T A Parker, et R V Anthony. « Placental Development in Normal and Compromised Pregnancies-- a Review ». *Placenta* 23 Suppl A (avril 2002): S119-129. doi:10.1053/plac.2002.0792.
- Rhodes, Katrin E, Christos Gekas, Yanling Wang, Christopher T Lux, Cameron S Francis, David N Chan, Simon Conway, Stuart H Orkin, Mervin C Yoder, et Hanna K A Mikkola. « The Emergence of Hematopoietic Stem Cells Is Initiated in the Placental Vasculature in the Absence of Circulation ». *Cell Stem Cell* 2, n° 3 (6 mars 2008): 252-263. doi:10.1016/j.stem.2008.01.001.
- Ricote, Mercedes, et Christopher K. Glass. « PPARs and Molecular Mechanisms of Transrepression ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1771, n° 8 (août 2007): 926-935. doi:10.1016/j.bbali.2007.02.013.
- Risau, W, H Sariola, H G Zerwes, J Sasse, P Ekblom, R Kemler, et T Doetschman. « Vasculogenesis and Angiogenesis in Embryonic-Stem-Cell-Derived Embryoid Bodies ». *Development (Cambridge, England)* 102, n° 3 (mars 1988): 471-478.
- Robin, Catherine, Karine Bollerot, Sandra Mendes, Esther Haak, Mihaela Crisan, Francesco Cerisoli, Ivoune Lauw, et al. « Human Placenta Is a Potent Hematopoietic Niche Containing Hematopoietic Stem and Progenitor Cells throughout Development ». *Cell Stem Cell* 5, n° 4 (2 octobre 2009): 385-395. doi:10.1016/j.stem.2009.08.020.
- Rossant, J, et J C Cross. « Placental Development: Lessons from Mouse Mutants ». *Nature Reviews. Genetics* 2, n° 7 (juillet 2001): 538-548. doi:10.1038/35080570.
- Rugh, R. « Normal development of the mouse. In *The mouse: its reproduction and development*». Oxford: Oxford University Press, 1994, pp. 7-43.
- Rybtsov, Stanislav, Malgorzata Sobiesiak, Samir Taoudi, Céline Souilhol, Jordi Senserrich, Anna Liakhovitskaia, Andrejs Ivanovs, Jon Frampton, Suling Zhao, et Alexander Medvinsky. « Hierarchical Organization and Early Hematopoietic Specification of the Developing HSC Lineage in the AGM Region ». *The Journal of Experimental Medicine* 208, n° 6 (6 juin 2011): 1305-1315. doi:10.1084/jem.20102419.
- Sabin, Florence R. « Preliminary Note on the Differentiation of Angioblasts and the Method by Which They Produce Blood-Vessels, Blood-Plasma and Red Blood-Cells As Seen in the Living Chick ». *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research* 11, n° 1 (1 février 2002): 5-7. doi:10.1089/152581602753448496.

- Saleh, L, J Prast, P Haslinger, P Husslein, H Helmer, et M Knöfler. « Effects of Different Human Chorionic Gonadotrophin Preparations on Trophoblast Differentiation ». *Placenta* 28, n° 2-3 (mars 2007): 199-203. doi:10.1016/j.placenta.2006.02.008.
- Sánchez, M J, A Holmes, C Miles, et E Dzierzak. « Characterization of the First Definitive Hematopoietic Stem Cells in the AGM and Liver of the Mouse Embryo ». *Immunity* 5, n° 6 (décembre 1996): 513-525.
- Schaiff, W T, M G Carlson, S D Smith, R Levy, D M Nelson, et Y Sadovsky. « Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma Modulates Differentiation of Human Trophoblast in a Ligand-Specific Manner ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 85, n° 10 (octobre 2000): 3874-3881. doi:10.1210/jcem.85.10.6885.
- Schaiff, W Timothy, Ibrahim Bildirici, Monica Cheong, Peggy L Chern, D Michael Nelson, et Yoel Sadovsky. « Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma and Retinoid X Receptor Signaling Regulate Fatty Acid Uptake by Primary Human Placental Trophoblasts ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 90, n° 7 (juillet 2005): 4267-4275. doi:10.1210/jc.2004-2265.
- Schaiff, W. Timothy, F. F. Russ Knapp, Yaacov Barak, Tal Biron-Shental, D. Michael Nelson, et Yoel Sadovsky. « Ligand-Activated Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma Alters Placental Morphology and Placental Fatty Acid Uptake in Mice ». *Endocrinology* 148, n° 8 (août 2007): 3625-3634. doi:10.1210/en.2007-0211.
- Scher, Jose U., et Michael H. Pillinger. « 15d-PGJ2: The Anti-Inflammatory Prostaglandin? ». *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)* 114, n° 2 (février 2005): 100-109. doi:10.1016/j.clim.2004.09.008.
- Schuh, A C, P Faloon, Q L Hu, M Bhimani, et K Choi. « In Vitro Hematopoietic and Endothelial Potential of Flk-1(-/-) Embryonic Stem Cells and Embryos ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, n° 5 (2 mars 1999): 2159-2164.
- Schweitz, H, J N Bidard, et M Lazdunski. « Purification and Pharmacological Characterization of Peptide Toxins from the Black Mamba (*Dendroaspis Polylepis*) Venom ». *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology* 28, n° 7 (1990): 847-856.
- Schweitz, H, P Pacaud, S Diochot, D Moinier, et M Lazdunski. « MIT(1), a Black Mamba Toxin with a New and Highly Potent Activity on Intestinal Contraction ». *FEBS Letters* 461, n° 3 (19 novembre 1999): 183-188.
- Shalaby, F, J Ho, W L Stanford, K D Fischer, A C Schuh, L Schwartz, A Bernstein, et J Rossant. « A Requirement for Flk1 in Primitive and Definitive Hematopoiesis and Vasculogenesis ». *Cell* 89, n° 6 (13 juin 1997): 981-990.
- Shalaby, F, J Rossant, T P Yamaguchi, M Gertsenstein, X F Wu, M L Breitman, et A C Schuh. « Failure of Blood-Island Formation and Vasculogenesis in Flk-1-Deficient Mice ». *Nature* 376, n° 6535 (6 juillet 1995): 62-66. doi:10.1038/376062a0.
- Sher, Daniel, Alin Knebel, Tamar Bsor, Nir Neshet, Tzachy Tal, David Morgenstern, Eran Cohen, Yelena Fishman, et Eliahu Zlotkin. « Toxic Polypeptides of the Hydra--a Bioinformatic Approach to Cnidarian Allomones ». *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology* 45, n° 7 (1 juin 2005): 865-879. doi:10.1016/j.toxicon.2005.02.004.
- Shi, Q. J., Z. M. Lei, C. V. Rao, et J. Lin. « Novel Role of Human Chorionic Gonadotropin in Differentiation of Human Cytotrophoblasts ». *Endocrinology* 132, n° 3 (mars 1993): 1387-1395. doi:10.1210/endo.132.3.7679981.
- Sibai, Baha, Gus Dekker, et Michael Kupferminc. « Pre-Eclampsia ». *Lancet* 365, n° 9461 (26

- mars 2005): 785-799. doi:10.1016/S0140-6736(05)17987-2.
- Sibley, Colin P, Mark A Turner, Irene Cetin, Paul Ayuk, C A Richard Boyd, Stephen W D'Souza, Jocelyn D Glazier, Susan L Greenwood, Thomas Jansson, et Theresa Powell. « Placental Phenotypes of Intrauterine Growth ». *Pediatric Research* 58, n° 5 (novembre 2005): 827-832. doi:10.1203/01.PDR.0000181381.82856.23.
- Silver, L, et J Palis. « Initiation of Murine Embryonic Erythropoiesis: A Spatial Analysis ». *Blood* 89, n° 4 (15 février 1997): 1154-1164.
- Smith, R A, et C A Glomski. « "Hemogenic Endothelium" of the Embryonic Aorta: Does It Exist? » *Developmental and Comparative Immunology* 6, n° 2 (1982): 359-368.
- Söderhäll, Irene, Young-A Kim, Pikul Jiravanichpaisal, So-Young Lee, et Kenneth Söderhäll. « An Ancient Role for a Prokineticin Domain in Invertebrate Hematopoiesis ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 174, n° 10 (15 mai 2005): 6153-6160.
- Soga, Takatoshi, Shun ichiro Matsumoto, Tamaki Oda, Tetsu Saito, Hideki Hiyama, Jun Takasaki, Masazumi Kamohara, Takahide Ohishi, Hitoshi Matsushime, et Kiyoshi Furuichi. « Molecular Cloning and Characterization of Prokineticin Receptors ». *Biochimica et Biophysica Acta* 1579, n° 2-3 (12 décembre 2002): 173-179.
- Stainier, D Y, B M Weinstein, H W Detrich 3rd, L I Zon, et M C Fishman. « Cloche, an Early Acting Zebrafish Gene, Is Required by Both the Endothelial and Hematopoietic Lineages ». *Development (Cambridge, England)* 121, n° 10 (octobre 1995): 3141-3150.
- Sugiyama, Daisuke, Ken-Ichi Arai, et Kohichiro Tsuji. « Definitive Hematopoiesis from Acetyl LDL Incorporating Endothelial Cells in the Mouse Embryo ». *Stem Cells and Development* 14, n° 6 (décembre 2005): 687-696. doi:10.1089/scd.2005.14.687.
- Sugiyama, Daisuke, Minetaro Ogawa, Imiko Hirose, Thierry Jaffredo, Ken-ichi Arai, et Kohichiro Tsuji. « Erythropoiesis from Acetyl LDL Incorporating Endothelial Cells at the Pre-liver Stage ». *Blood* 101, n° 12 (15 juin 2003): 4733-4738. doi:10.1182/blood-2002-09-2799.
- Szeto, T H, X H Wang, R Smith, M Connor, M J Christie, G M Nicholson, et G F King. « Isolation of a Funnel-Web Spider Polypeptide with Homology to Mamba Intestinal Toxin 1 and the Embryonic Head Inducer Dickkopf-1 ». *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology* 38, n° 3 (mars 2000): 429-442.
- Takimoto, E., J. Ishida, F. Sugiyama, H. Horiguchi, K. Murakami, et A. Fukamizu. « Hypertension Induced in Pregnant Mice by Placental Renin and Maternal Angiotensinogen ». *Science (New York, N.Y.)* 274, n° 5289 (8 novembre 1996): 995-998.
- Taoudi, Samir, Christèle Gonneau, Kate Moore, Julie M Sheridan, C Clare Blackburn, Erin Taylor, et Alexander Medvinsky. « Extensive Hematopoietic Stem Cell Generation in the AGM Region via Maturation of VE-cadherin+CD45+ Pre-Definitive HSCs ». *Cell Stem Cell* 3, n° 1 (3 juillet 2008): 99-108. doi:10.1016/j.stem.2008.06.004.
- Taoudi, Samir, Aline M Morrison, Hirofumi Inoue, Ruby Gribi, Janice Ure, et Alexander Medvinsky. « Progressive Divergence of Definitive Haematopoietic Stem Cells from the Endothelial Compartment Does Not Depend on Contact with the Foetal Liver ». *Development (Cambridge, England)* 132, no 18 (septembre 2005): 4179-4191. doi:10.1242/dev.01974.
- Tarrade, A, R Lai Kuen, A Malassiné, V Tricottet, P Blain, M Vidaud, et D Evain-Brion. « Characterization of Human Villous and Extravillous Trophoblasts Isolated from First Trimester Placenta ». *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 81, n° 9 (septembre 2001): 1199-1211.

- Tarrade, A, K Schoonjans, J Guibourdenche, J M Bidart, M Vidaud, J Auwerx, C Rochette-Egly, et D Evain-Brion. « PPAR gamma/RXR Alpha Heterodimers Are Involved in Human CG Beta Synthesis and Human Trophoblast Differentiation ». *Endocrinology* 142, n° 10 (octobre 2001): 4504-4514. doi:10.1210/endo.142.10.8448.
- Tarrade, A, K Schoonjans, L Pavan, J Auwerx, C Rochette-Egly, D Evain-Brion, et T Fournier. « PPARgamma/RXRalpha Heterodimers Control Human Trophoblast Invasion ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 86, n° 10 (octobre 2001): 5017-5024. doi:10.1210/jcem.86.10.7924.
- Tavian, M, L Coulombel, D Luton, H S Clemente, F Dieterlen-Lièvre, et B Péault. « Aorta-Associated CD34+ Hematopoietic Cells in the Early Human Embryo ». *Blood* 87, n° 1 (1 janvier 1996): 67-72.
- Tavian, M, M F Hallais, et B Péault. « Emergence of Intraembryonic Hematopoietic Precursors in the Pre-Liver Human Embryo ». *Development (Cambridge, England)* 126, n° 4 (février 1999): 793-803.
- Tavian, M, C Robin, L Coulombel, et B Péault. « The Human Embryo, but Not Its Yolk Sac, Generates Lympho-Myeloid Stem Cells: Mapping Multipotent Hematopoietic Cell Fate in Intraembryonic Mesoderm ». *Immunity* 15, n° 3 (septembre 2001): 487-495.
- Tavian, Manuela, et Bruno Péault. « Embryonic Development of the Human Hematopoietic System ». *The International Journal of Developmental Biology* 49, n° 2-3 (2005): 243-250. doi:10.1387/ijdb.041957mt.
- Taylor, Robert N, Jane Grimwood, Rennae S Taylor, Michael T McMaster, Susan J Fisher, et Robyn A North. « Longitudinal Serum Concentrations of Placental Growth Factor: Evidence for Abnormal Placental Angiogenesis in Pathologic Pregnancies ». *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 188, n° 1 (janvier 2003): 177-182.
- Till, J E, et E A McCulloch. « A Direct Measurement of the Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells. 1961 ». *Radiation Research* 175, n° 2 (février 2011): 145-149.
- Tontonoz, P, E Hu, et B M Spiegelman. « Stimulation of Adipogenesis in Fibroblasts by PPAR Gamma 2, a Lipid-Activated Transcription Factor ». *Cell* 79, n° 7 (30 décembre 1994): 1147-1156.
- Toth, Bettina, Mehmet Bastug, Christoph Scholz, Petra Arck, Sandra Schulze, Susanne Kunze, Klaus Friese, et Udo Jeschke. « Leptin and Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Impact on Normal and Disturbed First Trimester Human Pregnancy ». *Histology and Histopathology* 23, n° 12 (décembre 2008): 1465-1475.
- Tsatsaris, V, A Malassiné, T Fournier, K Handschuchuh, J P Schaaps, J M Foidart, et D Evain-Brion. « Placenta humain ». *Elsevier SAS, Paris, Gynécologie/Obstétrique* (2006): 5-005-A-10.
- Tsatsaris, V, T Fournier, et N Winer. « [Pathophysiology of preeclampsia] ». *Journal de gynécologie, obstétrique et biologie de la reproduction* 37, n° 1 (février 2008): 16-23. doi:10.1016/j.jgyn.2007.08.003.
- Tsatsaris, Vassilis, Frederic Goffin, Carine Munaut, Jean-François Brichant, Marie-Rose Pignon, Agnes Noel, Jean-Pierre Schaaps, Dominique Cabrol, Francis Frankenne, et Jean-Michel Foidart. « Overexpression of the Soluble Vascular Endothelial Growth Factor Receptor in Preeclamptic Patients: Pathophysiological Consequences ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 88, n° 11 (novembre 2003): 5555-5563. doi:10.1210/jc.2003-030528.
- Urayama, Kyoji, Célia Guilini, Nadia Messaddeq, Kai Hu, Marja Steenman, Hitoshi Kurose, Georg Ert, et Canan G Nebigil. « The Prokineticin Receptor-1 (GPR73) Promotes Cardiomyocyte Survival and Angiogenesis ». *FASEB Journal: Official Publication of*

- the Federation of American Societies for Experimental Biology* 21, n° 11 (septembre 2007): 2980-2993. doi:10.1096/fj.07-8116com.
- Urayama, Kyoji, Célia Guilini, Gulen Turkeri, Selcuk Takir, Hitoshi Kurose, Nadia Messaddeq, Andrée Dierich, et Canan G Nebigil. « Prokineticin Receptor-1 Induces Neovascularization and Epicardial-Derived Progenitor Cell Differentiation ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 28, n° 5 (mai 2008): 841-849. doi:10.1161/ATVBAHA.108.162404.
- Usher, R, et F McLean. « 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 ». *The Journal of Pediatrics* 74, n° 6 (juin 1969): 901-910.
- Van Dijk, Marie, Joyce Mulders, Ankie Poutsma, Andrea A. M. Könst, Augusta M. A. Lachmeijer, Gustaaf A. Dekker, Marinus A. Blankenstein, et Cees B. M. Oudejans. « Maternal Segregation of the Dutch Preeclampsia Locus at 10q22 with a New Member of the Winged Helix Gene Family ». *Nature Genetics* 37, n° 5 (mai 2005): 514-519. doi:10.1038/ng1541.
- Van Dijk, Marie, Jan van Bezu, Daan van Abel, Caroline Dunk, Marinus A. Blankenstein, Cees B. M. Oudejans, et Stephen J. Lye. « The STOX1 Genotype Associated with Preeclampsia Leads to a Reduction of Trophoblast Invasion by Alpha-T-Catenin Upregulation ». *Human Molecular Genetics* 19, n° 13 (1 juillet 2010): 2658-2667. doi:10.1093/hmg/ddq152.
- Venkatesha, Shivalingappa, Mourad Toporsian, Chun Lam, Jun-ichi Hanai, Tadanori Mammoto, Yeon M Kim, Yuval Bdolah, et al. « Soluble Endoglin Contributes to the Pathogenesis of Preeclampsia ». *Nature Medicine* 12, n° 6 (juin 2006): 642-649. doi:10.1038/nm1429.
- Wagner, Kay-Dietrich, et Nicole Wagner. « Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Beta/delta (PPARbeta/delta) Acts as Regulator of Metabolism Linked to Multiple Cellular Functions ». *Pharmacology & Therapeutics* 125, n° 3 (mars 2010): 423-435. doi:10.1016/j.pharmthera.2009.12.001.
- Waite, L L, E C Person, Y Zhou, K H Lim, T S Scanlan, et R N Taylor. « Placental Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma Is up-Regulated by Pregnancy Serum ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 85, n° 10 (octobre 2000): 3808-3814. doi:10.1210/jcem.85.10.6847.
- Waite, Leslie L., Rachel E. Louie, et Robert N. Taylor. « Circulating Activators of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors Are Reduced in Preeclamptic Pregnancy ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 90, n° 2 (février 2005): 620-626. doi:10.1210/jc.2004-0849.
- Wang, Q, H Fujii, et G T Knipp. « Expression of PPAR and RXR Isoforms in the Developing Rat and Human Term Placentas ». *Placenta* 23, n° 8-9 (octobre 2002): 661-671.
- Watson, Erica D, et James C Cross. « Development of Structures and Transport Functions in the Mouse Placenta ». *Physiology (Bethesda, Md.)* 20 (juin 2005): 180-193. doi:10.1152/physiol.00001.2005.
- Wen, Suping, David T R Wilson, Sanjaya Kuruppu, Michael L J Korsinczky, Joseph Hedrick, Ling Pang, Tim Szeto, Wayne C Hodgson, Paul F Alewood, et Graham M Nicholson. « Discovery of an MIT-like Atracotoxin Family: Spider Venom Peptides That Share Sequence Homology but Not Pharmacological Properties with AVIT Family Proteins ». *Peptides* 26, n° 12 (décembre 2005): 2412-2426. doi:10.1016/j.peptides.2005.05.012.
- Wendling, O, P Chambon, et M Mark. « Retinoid X Receptors Are Essential for Early Mouse Development and Placentogenesis ». *Proceedings of the National Academy of*

- Sciences of the United States of America* 96, n° 2 (19 janvier 1999): 547-551.
- Wiles, M V, et G Keller. « Multiple Hematopoietic Lineages Develop from Embryonic Stem (ES) Cells in Culture ». *Development (Cambridge, England)* 111, n° 2 (février 1991): 259-267.
- Wollmann, H A. « Intrauterine Growth Restriction: Definition and Etiology ». *Hormone Research* 49 Suppl 2 (1998): 1-6.
- Xu, Yinyan, Yoshiyuki Takahashi, Yue Wang, Asahito Hama, Nobuhiro Nishio, Hideki Muramatsu, Makito Tanaka, et al. « Downregulation of GATA-2 and Overexpression of Adipogenic Gene-PPARGamma in Mesenchymal Stem Cells from Patients with Aplastic Anemia ». *Experimental Hematology* 37, n° 12 (décembre 2009): 1393-1399. doi:10.1016/j.exphem.2009.09.005.
- Yessoufou, A, et W Wahli. « Multifaceted Roles of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) at the Cellular and Whole Organism Levels ». *Swiss Medical Weekly* 140 (2010): w13071. doi:10.4414/smw.2010.13071.
- Young, P E, S Baumhueter, et L A Lasky. « The Sialomucin CD34 Is Expressed on Hematopoietic Cells and Blood Vessels during Murine Development ». *Blood* 85, n° 1 (1 janvier 1995): 96-105.
- Zambidis, Elias T, Estelle Oberlin, Manuela Tavian, et Bruno Péault. « Blood-Forming Endothelium in Human Ontogeny: Lessons from in Utero Development and Embryonic Stem Cell Culture ». *Trends in Cardiovascular Medicine* 16, n° 3 (avril 2006): 95-101. doi:10.1016/j.tcm.2006.01.005.
- Zang, Chuanbing, Hongyu Liu, Maximilian G. Posch, Maries Waechter, Margit Facklam, Martin H. Fenner, Martin Ruthardt, Kurt Possinger, H. Phillip Koeffler, et Elena Elstner. « Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Ligands Induce Growth Inhibition and Apoptosis of Human B Lymphocytic Leukemia ». *Leukemia Research* 28, n° 4 (avril 2004): 387-397. doi:10.1016/j.leukres.2003.07.005.
- Zeigler, Brandon M, Daisuke Sugiyama, Michael Chen, Yalin Guo, Karen M Downs, et Nancy A Speck. « The Allantois and Chorion, When Isolated before Circulation or Chorio-Allantoic Fusion, Have Hematopoietic Potential ». *Development (Cambridge, England)* 133, n° 21 (novembre 2006): 4183-4192. doi:10.1242/dev.02596.
- Zhou, Cissy C., Yujin Zhang, Roxanna A. Irani, Hong Zhang, Tiejuan Mi, Edwina J. Popek, M. John Hicks, Susan M. Ramin, Rodney E. Kellems, et Yang Xia. « Angiotensin Receptor Agonistic Autoantibodies Induce Pre-Eclampsia in Pregnant Mice ». *Nature Medicine* 14, n° 8 (août 2008): 855-862. doi:10.1038/nm.1856.
- Zhu, Y, C Qi, J R Korenberg, X N Chen, D Noya, M S Rao, et J K Reddy. « Structural Organization of Mouse Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (mPPAR Gamma) Gene: Alternative Promoter Use and Different Splicing Yield Two mPPAR Gamma Isoforms ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, n° 17 (15 août 1995): 7921-7925.
- Zovein, Ann C, Jennifer J Hofmann, Maureen Lynch, Wendy J French, Kirsten A Turlo, Yanan Yang, Michael S Becker, et al. « Fate Tracing Reveals the Endothelial Origin of Hematopoietic Stem Cells ». *Cell Stem Cell* 3, n° 6 (4 décembre 2008): 625-636. doi:10.1016/j.stem.2008.09.018.

Le développement placentaire est un processus finement contrôlé dans le temps et dans l'espace. Il est caractérisé par une invasion précoce et profonde, de l'endomètre et du premier tiers du myomètre, par les cytotrophoblastes extravilloux, cellules responsables du remodelage des artères spiralées utérines et de l'établissement de la circulation fœto-maternelle. Tout déficit dans ces processus physiologiques conduit à des complications de la grossesse, telles que la Pré-Eclampsie (PE), ou le Retard de Croissance Intra-Utérin (RCIU). Les travaux récents de l'équipe suggèrent l'implication d'un nouveau facteur angiogène, nommé EG-VEGF (Endocrine Gland Derived Vascular Endothelial Growth Factor), dans le développement de la PE. L'objectif de ma thèse fut de mieux caractériser le rôle de l'EG-VEGF dans le développement placentaire normal au cours du premier trimestre de la grossesse. Pour cela trois axes ont été explorés : i) l'étude de la régulation de l'EG-VEGF par le récepteur nucléaire PPAR γ (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma), ii) la détermination de son rôle dans les différenciations hématopoïétique et angiogénique placentaires et iii) la contribution au développement d'un modèle murin de la PE. A l'issue de cette thèse, mes travaux ont montré que non seulement l'expression de l'EG-VEGF et de son récepteur PROKR2 étaient régulées positivement par PPAR γ , mais aussi, que ce récepteur nucléaire est directement impliqué dans la mise en place de la vascularisation intra-placentaire, avec la participation des deux récepteurs PROKR1 et PROKR2, et que l'inhibition de l'invasion trophoblastique par PPAR γ , seraient en partie contrôlée par l'EG-VEGF, via PROKR2. Mon travail a également mis en évidence que l'EG-VEGF serait impliqué dans le contrôle de la différenciation hématopoïétique et endothéliale placentaire. Il aurait un effet inhibiteur sur la différenciation des cellules hématopoïétiques et endothéliales, mais plus particulièrement sur les cellules endothéliales hémogéniques. Enfin, ma contribution au développement d'un modèle *in vivo* de la PE a permis de montrer qu'un maintien de la libération de l'EG-VEGF, au-delà de sa période normale de production, serait responsable du développement de la PE, suite à un défaut de l'invasion trophoblastique, entraînant la libération par le placenta, de sFlt-1 et de sEndogline. Ces derniers vont induire un dysfonctionnement rénal et une hypertension artérielle. L'ensemble de ces trois projets a contribué à l'avancée de nos connaissances actuelles sur les mécanismes physiologiques du développement placentaire, ainsi que sur un facteur clé de la placentation, l'EG-VEGF, et a également permis de mieux appréhender les causes de l'établissement des pathologies de la grossesse, comme la PE et le RCIU.

Mots clés : placenta, EG-VEGF, PPAR γ , invasion trophoblastique, hématopoïèse, angiogénèse, modèle murin, pré-éclampsie

Placental development is a process that is finely controlled. It is characterized by early and deep invasion of the endometrium and the first third of the myometrium by extravillous cytotrophoblasts that participate to the remodeling of the spiral arteries and to the establishment of the fetomaternal circulation. Poor remodeling of spiral arteries by trophoblastic cells, leads to the development pregnancy pathologies such as, Preeclampsia (PE) and Intra-Uterine Growth Restriction (IUGR). During the last decade, our team has gathered interesting data that propose the new factor, EG-VEGF (Endocrine Gland Derived Vascular Endothelial Growth Factor) as a potential marker for PE. My thesis project aimed at further characterizing the role of EG-VEGF during pregnancy. Three main axis were addressed, i) The study of the regulation of EG-VEGF by PPAR γ (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma), ii) The study of the role in hematopoietic and angiogenic placental cells differentiations and iii) The development of an *in vivo* model of PE. My thesis showed that 1) EG-VEGF and PROKR2 expression are upregulated by PPAR γ , 2) that the regulation of intra-placental vascularization and trophoblastic invasion by PPAR γ is mediated by EG-VEGF through PROKR1 and PROKR2 and through PROKR2 receptors, respectively, 3) that EG-VEGF controls hematopoietic and endothelial cell differentiation and 4) that maintenance of EG-VEGF production beyond its normal period of secretion during pregnancy leads to the development of PE in a gravid mouse model. Altogether, these projects contributed to have a better knowledge about physiological mechanisms of placental development and about a key factor of placentation EG-VEGF. Moreover they improved our understanding of the origins of pregnancy diseases establishment such as PE and RCIU.

Key words: placenta, EG-VEGF, PPAR γ , trophoblastic invasion, hematopoiesis, angiogenesis, model mice, pre-eclampsia