

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À  
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE ET BIOLOGIE CELLULAIRES

PAR  
LYNE LAFONTAINE

IMPACT DU FACTEUR TRANSFORMANT  $\beta$  SUR LA PROLIFÉRATION ET  
L'INVASION DES CELLULES TROPHOBLASTIQUES

AVRIL 2011

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les étudiants du laboratoire; Isabelle St-Louis, Steve Turner, Marie-Claude Déry et Alexandre Rouette pour leur amitié, leur aide ainsi que leurs précieux conseils qui m'ont aidé à progresser dans mes travaux de recherche. Un merci spécial à Céline Van Themsche pour sa patience, son aide et sa contagieuse passion pour la recherche qui m'ont permis d'apprécier davantage les moments passés au laboratoire.

Je tiens également à remercier les professionnelles de recherche Sophie Parent et Valérie Leblanc pour tout le support, autant technique que moral, qu'elles m'ont offert tout au long de ma maîtrise.

Évidemment, je veux remercier mon directeur de recherche, Éric Asselin, de m'avoir donné ma chance au laboratoire et de m'avoir fait confiance afin de mener à terme mon projet de recherche.

Ce long processus n'aurait pu s'accomplir sans l'appui et les encouragements de ma famille. Merci à mes parents d'avoir cru en moi et de m'avoir donné les moyens de réussir. Merci à ma sœur d'être toujours là pour moi.

Finalement, je veux remercier mon conjoint, Gabriel, qui a su m'épauler jusqu'à la fin. Merci pour ta patience, tes encouragements et ta présence.

## RÉSUMÉ

Le développement du placenta est possible grâce à l'invasion des trophoblastes dans l'endomètre de la mère, ce processus étant lui-même étroitement régulé par des molécules pro et anti-invasives. Le *Transforming Growth Factor  $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) est une cytokine multifonctionnelle requise pour le développement embryonnaire et pour la régulation de l'invasion par les trophoblastes. Un ou plusieurs isoformes du TGF- $\beta$  sont produits par l'utérus lors de la grossesse, particulièrement au moment de l'implantation. Récemment, nous avons démontré qu'une exposition au TGF- $\beta$ 3 augmentait la capacité d'invasion des cellules endométriales. Le but de la présente étude est de déterminer si certains isoformes du TGF- $\beta$  peuvent également réguler l'invasivité des cellules trophoblastiques. Nous avons tout d'abord débuté notre étude en déterminant si les deux lignées cellulaires utilisées, soit les cellules HRP-1 et les cellules RCHO-1, possèdaient les récepteurs du TGF- $\beta$ . Pour ce faire, des analyses de RT-PCR ont été effectuées et les résultats obtenus nous ont permis de démontrer que les cellules exprimaient l'ARN des isoformes du TGF- $\beta$  et que les deux lignées cellulaires possèdent les deux types de récepteur. L'activation de différentes voies de signalisation pouvant être induite par le TGF- $\beta$ , et qui pourraient avoir un rôle à jouer dans la prolifération, la différentiation ou l'invasion des cellules trophoblastiques a par la suite été évaluée. Les résultats nous permettent de constater que les voies de Smad, p38 MAPK et p44/42 (ERK) sont activées par le TGF- $\beta$  chez les deux lignées cellulaires. Des tests de prolifération au MTT nous ont permis d'évaluer l'effet du TGF- $\beta$  sur la prolifération des cellules HRP-1 et RCHO-1. Le TGF- $\beta$  inhibe la prolifération des cellules HRP-1 alors que les cellules RCHO-1 ne sont nullement affectées par le traitement. L'analyse des noyaux cellulaires suite à la coloration avec le Hoechst, de même que l'analyse des niveaux protéiques de la caspase-3 clivée, nous a permis de vérifier que le TGF- $\beta$  n'induisait pas l'apoptose chez ces cellules. De plus, sachant que différentes voies de signalisation sont activées par le TGF- $\beta$ , nous avons voulu déterminer leur implication dans le contrôle de la prolifération des cellules trophoblastiques. Ainsi, les résultats obtenus nous permettent de penser que la voie de ERK pourrait être partiellement impliquée dans le contrôle de la

prolifération cellulaire, alors que la voie des Smads n'a aucun effet sur cette dernière. Finalement, des tests d'invasion sur Matrigel ont démontré que les différents isoformes du TGF- $\beta$  modulaient la capacité d'invasion des cellules HRP-1 et RCHO-1. Ces résultats suggèrent que le TGF- $\beta$  modulerait la prolifération ainsi que la capacité d'invasion des cellules trophoblastiques. De plus, les voies de signalisation qui sont activées par le TGF- $\beta$  semblent avoir un rôle à jouer dans ce processus.

**Mots clés :** TGF- $\beta$ , trophoblaste, prolifération, apoptose, invasion, endomètre

## TABLE DES MATIÈRES

<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>ii</b>
<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>iii</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS .....</b>	<b>viii</b>
<b>CHAPITRE 1 INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
1.1    Problématique.....	1
1.2    Infertilité féminine.....	3
1.2.1    Causes.....	3
1.2.2    Traitements .....	4
1.3    Implantation du blastocyste.....	5
1.3.1    Formation du blastocyste.....	5
1.3.2    Sites d'implantation .....	6
1.3.3    Fenêtre d'implantation.....	9
1.3.4    Phases de l'implantation .....	10
1.4    Invasion de l'endomètre par les trophoblastes .....	13
1.4.1    Différenciation du trophoblaste .....	13
1.4.2    Invasion par le trophoblaste.....	14
1.4.3    Mécanismes de l'invasion de l'endomètre.....	14
1.4.4    Contrôle endocrinien.....	15
1.5    Facteur de croissance transformant bêta.....	16
1.5.1    Description et rôles .....	16
1.5.2    TGF- $\beta$ dans l'implantation et l'invasion.....	17
1.5.3    Structure .....	18
1.5.4    Récepteurs et signalisation.....	19
1.6    Signalisation cellulaire activée par le TGF- $\beta$ .....	21
1.6.1    Voie des SMADs .....	23

1.6.2	Voie des Mitogen Activated Protein Kinases (MAPK).....	25
1.6.3	Mort cellulaire induite par le TGF- $\beta$ .....	28
1.6.4	Pathologies associées au TGF- $\beta$ .....	29
1.7	Hypothèse .....	30
<b>CHAPITRE 2 ARTICLE.....</b>		<b>31</b>
2.1	Résumé .....	31
2.2	Contribution des auteurs.....	32
2.3	Article .....	33
<b>CHAPITRE 3 DISCUSSION ET CONCLUSION.....</b>		<b>61</b>
3.1	Discussion .....	61
3.2	Nouvelles perspectives de recherche.....	70
3.3	Conclusion.....	71
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>		<b>73</b>

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure</b>	<b>Page</b>
1.1 Schéma d'un blastocyste de 5-6 jours .....	5
1.2 Sites d'implantation chez la femme.....	8
1.3 Sites d'implantation chez le rat et la souris.....	9
1.4 Chronologie de la fenêtre d'implantation au cours du cycle menstruel chez la femme.....	10
1.5 Étapes menant à l'implantation de l'embryon dans l'endomètre.....	12
1.6 Liaison du TGF- $\beta$ sur son récepteur .....	20
1.7 Voies de signalisation cellulaire induites par le TGF- $\beta$ .....	22
1.8 Voie de signalisation des Smads .....	24
1.9 Représentation de la cascade d'activation des MAPK .....	27
3.1 Modulation de la phosphorylation d'Akt dans les cellules HRP-1 .....	67

## LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS

ALK5	activin receptor-like kinase 5
AP-1	activating protein-1
BMP	Bone Morphogenic proteins
Caspases	cystein aspartic acid-specific proteases
CEE	cellules épithéliales de l'endomètre
co-Smads	médiateurs communs à la famille du TGF- $\beta$
DAP	death-associated protein kinase
E2	estradiol
EGF	epidermal growth factor
ERK	extracellular signal-regulated kinase
et al.	plus d'un auteur
FAK	Focal adhesion kinase
GDP	guanosine diphosphate
GTP	guanosine triphosphate
hCG	hormone chorionique gonadotrophique
HIPEC65	human invasive, proliferative, extravillous cytotrophoblast
IGFBP-1	insulin like growth factor-1
I-Smads	Smads inhibiteurs
ITS	infections transmises sexuellement
Jnk	Jun kinase
LAP	Latency associated protein
LH	luteinizing hormone
LIF	leukemia inhibitory factor
LTGF- $\beta$	Latent TGF- $\beta$
MAPK	Mitogen activated protein kinases
MEC	matrice extracellulaire
MMP	Matrix metalloproteinases
NF $\kappa$ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
OMS	organisation mondiale de la santé

P4	progesterone
PAF	platelet activating factor
PAI-1	plasminogen activator inhibitor-1
PARP	poly(ADP-ribose) polymérase
PDK	phosphoinositide-dependent kinase
PGE2	prostaglandine E2
PGRA	progesterone receptor A
PGRB	progesterone receptor B
PI3-K	phosphatidylinositol 3-kinase
PIP <sub>2</sub>	phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate
PIP <sub>3</sub>	phosphatidylinositol 3, 4, 5 trisphosphate
R-Smads	Smads associés au récepteur
RTK	récepteur tyrosine kinase
TGC	trophoblast giant cell
TGF-β	Transforming growth factor beta
TIMPS	tissue inhibitors of metalloproteinases
TβRI	TGF-β receptor type I
TβRII	TGF-β receptor type II
TβRIII	betaglycane (TGF-β receptor type III)
uPA	urokinase-type plasminogen activator
VEGF	vascular endothelial growth factor
VPH	Virus du papillome humain
XIAP	X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein

## CHAPITRE 1

### INTRODUCTION

#### 1.1 Problématique

L'infertilité est définie comme étant l'incapacité d'un couple à procréer ou à mener une grossesse à terme au bout d'une année ou plus de rapports sexuels non protégés. Selon l'Organisation mondiale de la Santé (OMS), dans le monde, environ 15% des couples en âge de procréer consulteraient pour des problèmes d'infertilité. Chez 10% des couples, suite à plusieurs tests diagnostiques, l'infertilité demeure inexpliquée [9]. Les échecs d'implantation demeurent un problème non résolu dans l'étude de la reproduction et sont considérés comme la principale cause d'infertilité chez les femmes. Selon l'équipe de Webb et al., les défauts d'implantation seraient responsables, à un taux aussi haut que 78%, des échecs lors de la grossesse [10]. Par ailleurs, les deux tiers des échecs d'implantation sont dus à une réceptivité utérine inadéquate alors que l'autre tiers est dû à l'embryon lui-même [11;12].

Les recherches effectuées au cours des dernières années ont mené à la découverte de molécules essentielles au processus d'implantation de l'embryon, menant les chercheurs à faire d'importantes avancées dans le domaine de la reproduction. Il a été démontré que le *Transforming Growth Factor-β* (TGF-β) peut moduler les propriétés invasives de certains types de cellules, telles les cellules cancéreuses [13;14]. Par contre, son rôle dans l'invasion de l'endomètre par le trophoblaste lors de l'implantation reste encore très peu étudié. De plus, la présence des isoformes du TGF-β dans l'utérus lors de la grossesse et jouant ainsi un rôle dans l'implantation embryonnaire et le développement placentaire a été démontrée [15;16]. C'est pourquoi l'étude de l'impact du TGF-β sur la signalisation, la prolifération et l'invasion des cellules trophoblastiques est importante. Une meilleure compréhension des mécanismes régulant l'implantation de l'embryon permettrait d'envisager des traitements pour les problèmes d'infertilité.

Notre étude fut réalisée avec des lignées cellulaires du rat, soit les cellules trophoblastiques HRP-1, provenant d'un extrait de placenta et les cellules RCHO-1, provenant d'un choriocarcinome.

Plus précisément, les cellules HRP-1 proviennent de la zone du labyrinthe du placenta du rat. Cette zone est responsable des échanges entre la mère et le fœtus. *In vitro*, il a été démontré que les cellules HRP-1 forment une monocouche de cellules confluentes et qu'elles possèdent la capacité de se différencier en cellules ressemblant aux trophoblastes ainsi qu'au sac vitellin [17].

Les cellules RCHO-1 sont aneuploïdes (cellules constituées d'un nombre anormal de chromosomes), elles sont faciles à mettre en culture et elles possèdent la capacité de se différencier, *in vitro* et *in vivo*, en cellules géantes du trophoblaste (*Trophoblast Giant Cells* : TGCs) [18]. Les TGCs constituent l'une des premières lignées des cellules trophoblastiques à se différencier [19;20]. Ces cellules sont situées à l'interface materno-placentaire et expriment les gènes des membres de la famille des prolactines placentaires [19-21]. Les cellules RCHO-1 ont entre autre été utilisées afin d'étudier la régulation du cycle cellulaire [22-25], de la différenciation [26-28], ainsi que la capacité d'invasion des trophoblastes [29;30]. Une des caractéristiques intéressante à propos de ces cellules est qu'elles peuvent être maintenues dans des conditions favorisant la prolifération, ou bien les conditions de culture peuvent être modifiées afin de promouvoir la différenciation cellulaire [30-32].

## 1.2 Infertilité féminine

### 1.2.1 Causes

Les causes de l'infertilité sont multiples et touchent la femme dans environ 35% des cas [33]. La fertilité chez la femme diminue lorsqu'elle atteint la trentaine et cette diminution s'accélère avec le temps. Le poids, s'il est insuffisant, peut nuire à la fertilité en nuisant aux cycles menstruels et à la fonction normale des ovaires. D'un autre côté, l'obésité peut jouer un rôle dans l'infertilité en influençant le métabolisme des estrogènes et des androgènes, l'accumulation des hormones stéroïdes dans le tissu adipeux et en engendrant l'hyperinsulinisme, lesquels ont un impact sur de nombreuses autres fonctions nécessaires à la reproduction [34;35]. De plus, l'exercice physique pratiqué en excès peut aussi jouer un rôle dans l'infertilité en entraînant des irrégularités au niveau du cycle menstruel [36]. Même si aucune étude n'a démontré clairement que le stress ou les facteurs psychologiques nuisent à la fertilité, il semble qu'ils pourraient contribuer à une baisse de la fertilité chez la femme, entre autre en dérégulant le cycle menstruel [37]. Le style de vie pourrait aussi nuire à la fertilité. Le tabac entraînerait une diminution précoce de la réserve ovarienne, en plus d'avoir un rôle à jouer dans un nombre accru de fausses couches suite à des anomalies chromosomiques [38;39]. L'utilisation abusive de drogues telles que la cocaïne, la marijuana, les amphétamines et les opiacés (héroïne et méthadone) pendant la grossesse peut entraîner des avortements spontanés, le décollement placentaire, des naissances prématurées ainsi que des anomalies congénitales. Les effets de l'alcool sur le système reproducteur féminin sont peu connus. Par contre, l'inhibition de l'ovulation ainsi qu'une réduction significative de l'estradiol et de la progestérone plasmatique ont été observé chez les rats après leur avoir administré de l'éthanol [40]. L'alcool est un tératogène, et ses effets sur la grossesse sont multiples : avortement spontané, retard de croissance, malformations congénitales et retard mental [39]. Les infections transmises sexuellement (ITS), telles que la chlamydia et la gonorrhée peuvent aussi être responsables de la diminution de la fertilité chez la femme [41;42].

Parmi les facteurs mentionnés précédemment, seul l'âge est considéré comme étant un problème irréversible. Les autres facteurs peuvent être contrôlés par la femme. Les troubles de l'ovulation, le syndrome des ovaires polykystiques et autres problèmes de nature hormonale sont quelques exemples d'affectations touchant la femme et pouvant diminuer la fertilité. Ces facteurs sont plus difficiles ou parfois même impossibles à traiter. L'endométriose, qui est la présence de tissu endométrial en dehors de l'utérus, peut aussi amener une diminution de la fertilité en obstruant les trompes ou par la formation de kystes qui perturbent la maturation des ovules, rendant ainsi impossible une ovulation normale. Certains facteurs environnementaux tels l'exposition aux produits chimiques ou aux radiations peuvent aussi constituer un danger pour la conception ou la gestation. Les solvants organiques qui entrent dans le processus de fabrication de divers produits de consommation tels que la colle, le plastique, le caoutchouc, la teinture, les cosmétiques et bien d'autres libèrent des substances volatiles, qui ont des répercussions sur la fertilité de la femme entre autre en augmentant les risques de fausses couches ainsi que d'anomalies chromosomiques au niveau de l'ovule [43-45]. Les pesticides et les insecticides, ainsi que les radiations ionisantes, telles que les rayons X, ainsi que les radiations non ionisantes, comme les rayons UV peuvent aussi augmenter les risques de fausses couches [46-48].

### 1.2.2 Traitements

Les traitements proposés pour régler les problèmes d'infertilité chez la femme sont multiples, allant du simple traitement hormonal à la chirurgie qui est parfois nécessaire chez les femmes ayant les trompes obstruées ou endommagées, entre autre par l'endométriose. Deux types de traitements hormonaux sont utilisés : les traitements de l'hyperprolactinémie (excès de production de prolactine par l'hypophyse), ainsi que les inducteurs de l'ovulation [49]. Si l'infertilité est due à une infection, un traitement antibiotique est indiqué. Dans certains cas, des procédures plus complexes telles que l'insémination artificielle ou la fécondation *in vitro* devront être pratiquées afin de permettre au couple de concevoir.

## 1.3 Implantation du blastocyste

### 1.3.1 Formation du blastocyste

Suite à la fécondation, plusieurs événements se succèdent, entraînant la reprise de la méiose. Ainsi, l'ovule fécondé subira des divisions cellulaires successives, passant d'un stade de cellule mère à deux cellules au début de la première semaine de fécondation, à la formation du blastocyste (figure 1.1) vers la fin de la 1<sup>ère</sup> semaine. Le blastocyste est un stade du développement embryonnaire précoce chez les mammifères et l'homme. Il est issu d'un phénomène appelé blastulation qui consiste en la division par mitose du zygote en blastomères, qui se divisent à leur tour pour former la morula. Les cellules externes de la morula forment le trophoblaste qui constituera le placenta. Les cellules internes, quant à elles, s'amassent à un pôle de la morula et forment l'embryoblaste ou bouton embryonnaire.

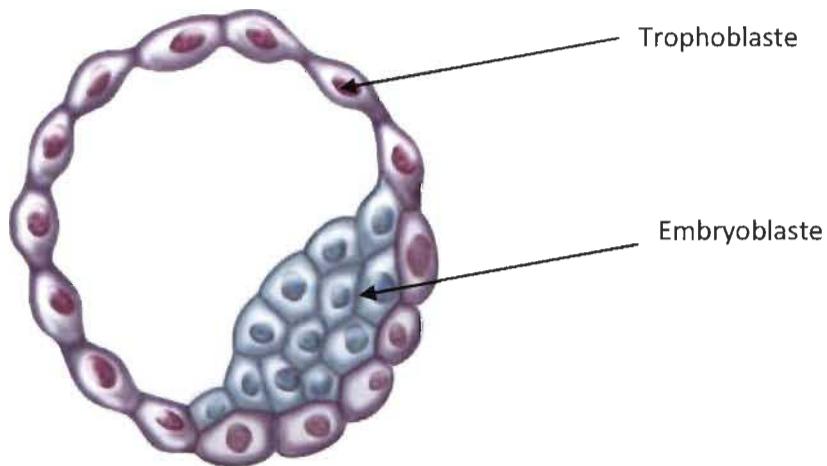


Figure 1.1 Schéma d'un blastocyste de 5-6 jours

À ce stade, le blastocyste est formé de deux types de cellules : les cellules du trophoblaste, qui formeront les annexes de l'embryon (dont le placenta), ainsi que les cellules de la masse cellulaire interne (embryoblaste) qui formeront l'embryon.

Tiré et adapté de *Understanding Stem Cells : An Overview of the Science and Issues* du National Academies [5]

### 1.3.2 Sites d'implantation

Chez la plupart des espèces, l'implantation s'avère une étape critique pour la reproduction. Pour que l'implantation soit un succès, l'endomètre doit être réceptif, le blastocyste doit être normal et une communication efficace doit pouvoir avoir lieu entre les tissus maternels et embryonnaires [50;51]. L'établissement d'échanges directs entre la mère et l'embryon a lieu grâce à des facteurs de croissance, des hormones, la matrice extracellulaire (MEC) ainsi que par des molécules d'adhésion [52].

Parmi les facteurs de croissance impliqués, le facteur de croissance épidermique (*Epidermal Growth Factor* : EGF) et le TGF- $\beta$ . L'EGF est exprimé chez les cellules déciduaires, de même que chez les cellules trophoblastiques [53]. L'EGF induit l'invasion [54;55], la différenciation [56;57] et la prolifération [58] des trophoblastes. Il a été démontré que l'EGF induisait l'augmentation des niveaux de métalloprotéases matricielles (MMP) MMP-2 et MMP-9 dans les cellules trophoblastiques [55;59;60], molécules reconnues comme ayant un rôle à jouer dans le processus d'implantation. Le TGF- $\beta$  est exprimé autant au niveau des cellules endométriales que des cellules trophoblastiques [61]. Les effets du TGF- $\beta$  sur la prolifération et l'invasion du trophoblaste seront discutés un peu plus loin.

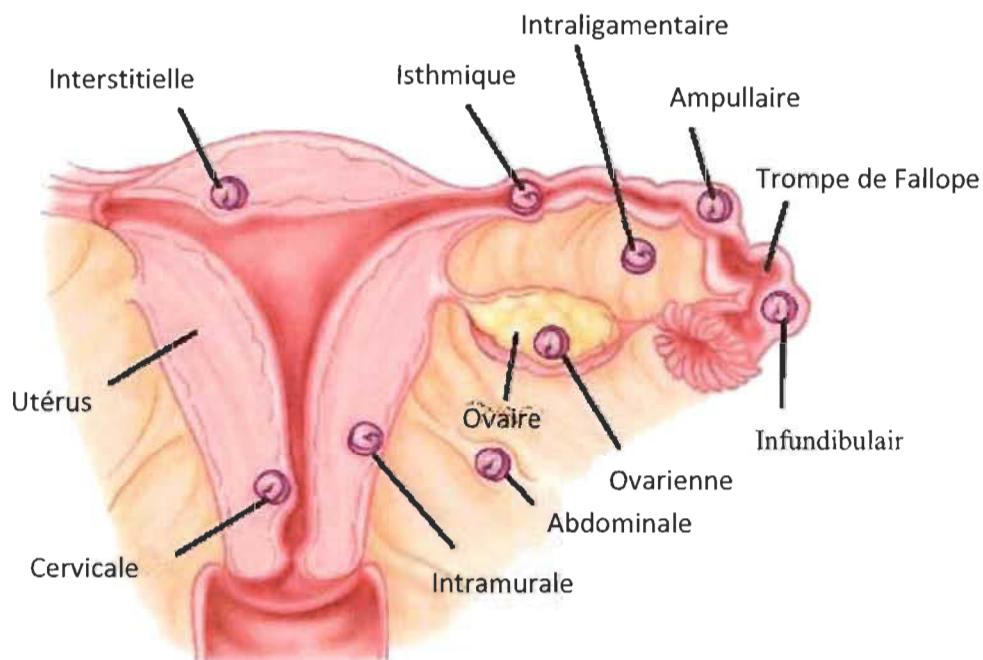
Les syncytiotrophoblastes, dont nous verrons la provenance à la section 1.4.1, sécrètent des hormones incluant la progestérone ainsi que l'hormone chorionique gonadotrophique humaine (hCG), lesquelles jouent un rôle important dans l'implantation. Autre le maintien du corps jaune, l'hCG affecte aussi la croissance et la différenciation cellulaire. Jusqu'à la neuvième semaine de grossesse, les trophoblastes expriment un récepteur à l'hCG tronqué et inactif. Par la suite, le récepteur passe sous sa forme pleine longueur, permettant une régulation autocrine de l'hCG sur la différenciation cellulaire [62]. De plus, l'hCG est reconnue pour augmenter les niveaux de MMP-9, un facteur clé dans l'invasion des trophoblastes [62]. La progestérone, qui est essentielle à la préparation de l'utérus en vue d'accueillir l'embryon, est aussi nécessaire au maintien de la grossesse. La progestérone agit via l'activation de ces récepteurs : *progesterone receptor A* (PGRA) et *progesterone receptor B* (PGRB) [63].

Ces deux récepteurs peuvent être considérés comme étant des récepteurs indépendants, et ayant des activités transcriptionnelles différentes [64;65]. Le PGRB serait prédominant chez le trophoblaste jeune, alors que le PGRA le serait chez le trophoblaste à terme [63].

Les composantes de la matrice extracellulaire, incluant le collagène, la fibronectine, la laminine, la vitronectine et la trophinine influencent les fonctions cellulaires en se liant aux intégrines, permettant l'adhésion, la migration et la différenciation cellulaire [66]. Chez l'humain, la trophinine est présente autant dans les cellules du trophoblaste que dans les cellules épithéliales du placenta, et pourrait être impliqué dans l'implantation du blastocyste en formant un complexe moléculaire d'adhésion entre les cellules [67;68]. Par contre, chez la souris, la trophinine ne joue pas un rôle essentiel dans l'implantation de l'embryon puisque des souris dont le gène de la trophinine a été inactivé sont tout de même capables de se reproduire [69].

Les molécules d'adhésion cellulaires, telles que les intégrines et la mucine MUC1 ont aussi un rôle à jouer dans le processus d'implantation. Chez la femme pendant la phase d'adhésion, le blastocyste induit par voie paracrine un clivage de la MUC1 au niveau du site d'implantation [70]. La présence de MUC1 à la surface des cellules utérines empêcherait l'adhérence du blastocyste en dehors de la phase de réceptivité utérine, puis le blastocyste arrêterait localement l'expression du gène de la MUC1 [67]. Les intégrines sont des molécules présentes à la surface des cellules étant à la fois impliquées dans l'adhésion cellulaire via des composantes spécifiques de la MEC et agissant comme des récepteurs capables de transduire un signal dans les deux sens. Elles sont constituées d'une sous-unité alpha et d'une sous-unité bêta [71]. L'expression spécifique des intégrines  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 1$  et  $\alpha v\beta 3$  augmente dans l'endomètre humain dans la période du cycle correspondant à l'implantation, alors que l'absence des deux dernières est associée à des problèmes d'infertilité [72]. Chez la souris, lors du début de l'implantation, on observe une augmentation de l'expression des sous-unités  $\alpha 2$ ,  $\alpha 6\alpha$  et  $\alpha 7$  [73]. Comme chez la femme, une dérégulation de ces expressions entraîne des défauts d'implantation.

L'embryon peut s'implanter dans tous les tissus du système reproducteur de la femme. De plus, dans la majorité des espèces, la totalité de la surface endométriale est compétente pour l'implantation [74]. Cependant, lorsque l'implantation se situe dans tout autre site que l'utérus (on parle alors de grossesse ectopique), des complications peuvent se produire, entraînant même parfois l'arrêt de la gestation. La figure 1.2 montre les sites possibles d'implantation chez la femme.

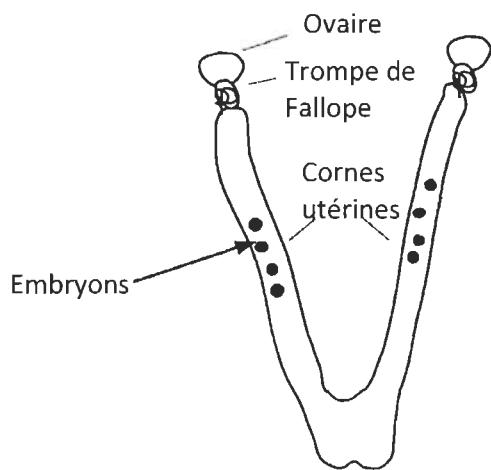


**Figure 1.2 Sites d'implantation chez la femme**

Représentation du système reproducteur féminin et des différents types de grossesse selon le lieu d'implantation. Tiré et adapté de *Magazine Health* [1]

Chez la souris et le rat, les sites d'implantations sont situés au niveau des cornes utérines, tel qu'illustré sur la figure 1.3 ci-dessous. Chez le rat [75] et la souris [76], l'induction de l'implantation requiert la présence de progestérone et d'œstrogène afin d'augmenter le développement pré-implantatoire dans le tractus reproducteur. Par contre, chez la femme, l'implantation peut se dérouler même en absence d'estradiol, qui est le principal œstrogène de l'organisme[74]. Les œstrogènes ont pour but de stimuler

les cellules afin de les préparer à l'action de la progestérone [77]. La progestérone, quant à elle, pourrait participer au maintien de la semi-allogreffe, car elle possède une activité anti-inflammatoire locale, et est aussi capable d'inhiber la phagocytose de même que la prolifération lymphocytaire au niveau de l'utérus [77].



**Figure 1.3 Sites d'implantation chez le rat et la souris**

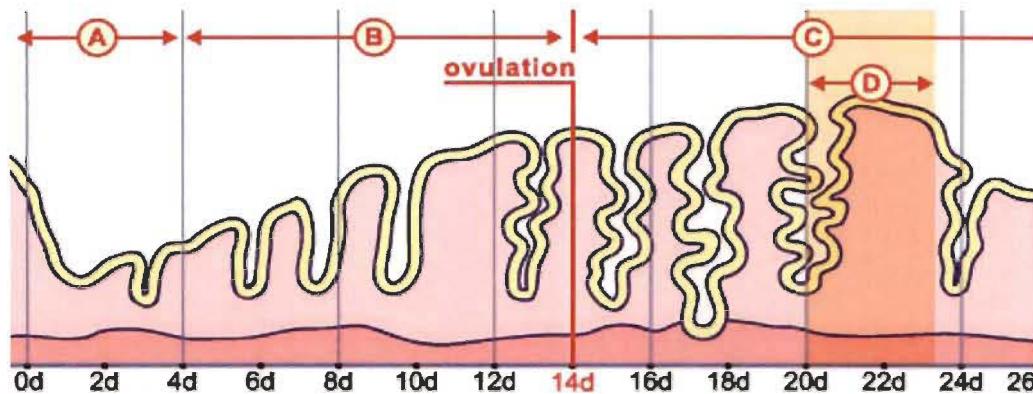
Représentation de l'anatomie de l'appareil reproducteur de la rate et la souris. Les sites d'implantation se situent au niveau des cornes utérines.

Tiré et adapté de Ertzeid G , Storeng R Hum. Reprod. 2001 [7]

### 1.3.3 Fenêtre d'implantation

L'endomètre est un tissu unique dans lequel l'embryon ne peut s'implanter qu'au cours d'une période bien précise où l'endomètre est dans une phase dite réceptive, la fenêtre implantatoire ou fenêtre d'implantation. La fenêtre d'implantation diffère entre les espèces. Ainsi, chez les humains, tel que l'illustre la figure 1.4, cette période de réceptivité s'étend du jour 20 au jour 24 d'un cycle menstruel normal [78]. Chez les

rongeurs, tels que le rat ou la souris, cette période se situe entre les jours 4 et 5 de la gestation [52;79].



**Figure 1.4 Fenêtre d'implantation au cours du cycle menstruel chez la femme**

L'implantation de l'embryon a lieu à un moment bien précis du cycle menstruel, soit la fenêtre d'implantation, comprise entre les jours 20 et 24 (zone ombragée). Les différentes phases du cycle menstruel sont : A) menstruation, B) prolifération, C) sécrétion et D) fenêtre d'implantation.

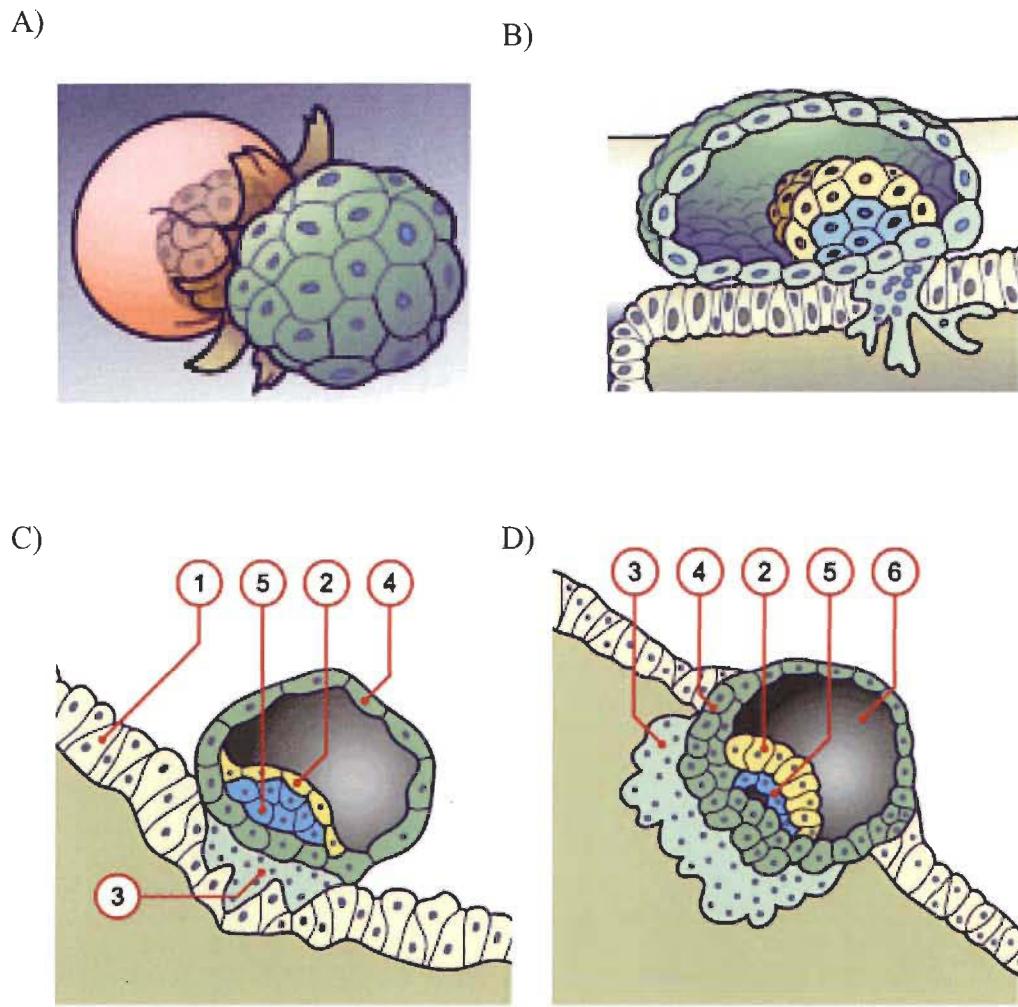
Tiré et adapté de <http://www.embryology.ch/> [4]

### 1.3.4 Phases de l'implantation

L'implantation est un processus qui se déroule selon une succession bien précise d'étapes caractérisées par le degré de contacts entre les cellules épithéliales utérines et trophoblastiques [80]. Quelques jours suivant la fécondation, la membrane pellucide entourant l'œuf fécondé se rompt, entraînant l'éclosion du blastocyste (figure 1.5). Les trophoblastes, les cellules qui sont à la surface du blastocyste, entrent alors en contact avec l'endomètre. Seules les cellules trophoblastiques ont la capacité d'adhérer à l'épithélium utérin [81].

Afin que l'implantation puisse se produire, des remaniements profonds de l'endomètre et du trophoblaste doivent avoir lieu. Parmi les modifications que doit subir l'endomètre, on retrouve : l'augmentation de la perméabilité des capillaires, un œdème de la muqueuse et des remaniements des constituants de sa MEC (fibronectine, collagènes et laminine). De plus, chez les espèces à implantation invasive, la réaction déciduale du stroma endométrial fait partie des changements majeurs observées lors de l'implantation [74]. Suite à ces changements, les deux tissus sont en mesure d'adhérer, mais seulement au site d'implantation.

La première étape de l'implantation consiste en l'orientation du blastocyste, de façon à présenter son bouton embryonnaire face à l'endomètre. L'embryon lui-même est en mesure de favoriser son implantation en émettant des signaux précoce tels que la libération d'histamine et du facteur activateur des plaquettes (PAF) [82]. La libération d'histamine par l'embryon permet de modifier la perméabilité capillaire et la réponse immunitaire [83] alors que le PAF d'origine embryonnaire serait responsable de l'œdème et de l'augmentation de la perméabilité vasculaire observés au site d'implantation, soit directement, soit par l'intermédiaire de la prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) [77]. Les premiers contacts entre les cellules trophoblastiques et utérines surviennent lorsque le blastocyste est plaqué sur l'épithélium utérin. La prochaine étape consiste en une adhésion stable, empêchant l'œuf d'être éliminé par simple lavage. Comme tout autre épithélium, celui de l'endomètre est non adhésif, car il est recouvert de glycoprotéines formant le glycocalyx. Au cours de la période de réceptivité utérine, on observe chez plusieurs espèces une modification de l'épaisseur et de la composition du glycocalyx, permettant à l'implantation d'avoir lieu. Ainsi, chez la souris, un amincissement du glycocalyx sur l'ensemble de la muqueuse utérine peut être observé lors de la phase pré-implantatoire, alors que chez la femme, on note une augmentation de son épaisseur [84]. Un système d'interpénétration permet aux microvillosités à la surface des trophoblastes de se faufiler au travers des cellules épithéliales utérines, permettant l'établissement de complexes jonctionnels, rendant l'adhésion plus solide. La dernière étape du processus d'implantation, l'invasion, permet au blastocyste de pénétrer plus ou moins profondément dans l'endomètre selon les espèces.



**Figure 1.5 Étapes menant à l'implantation de l'embryon dans l'endomètre.**

A) Éclosion du blastocyste. B) Adhésion à l'endomètre. C) Adhésion stable du blastocyste. D) Invasion de l'endomètre. (1. Épithélium de la muqueuse utérine 2. Hypoblaste 3. Syncytiotrophoblaste 4. Cytotrophoblaste 5. Épiblaste 6. Blastocèle)

Tiré de <http://www.embryology.ch/> [4]

## 1.4 Invasion de l'endomètre par les trophoblastes

### 1.4.1 Différenciation du trophoblaste

Présent dès le tout début du développement embryonnaire, le trophoblaste constitue la couche périphérique du blastocyste. Plus tard dans le développement, il se différenciera en deux couches : la couche interne, cytотrophoblaste et la couche externe, syncytiotrophoblaste, qui formera le placenta. Les cytотrophoblastes sont des cellules bien individualisées et elles sont les seules capables de proliférer et d'assurer le renouvellement des cellules trophoblastiques. Les syncytiotrophoblastes forment quant à elles un tissu multinucléé sans limites cellulaires distinctes [85]. Ces dernières sécrètent des enzymes protéolytiques, comprenant plusieurs métalloprotéinases, qui lui permettent de traverser la lame basale et de pénétrer dans le stroma sous-jacent au contact des vaisseaux sanguins utérins. Chez la femme, le syncytiotrophoblaste se développe rapidement, et lorsque la pénétration du blastocyste dans l'endomètre est achevée, il va entourer complètement l'embryon [85].

*In vitro*, la stimulation de la différenciation des cellules du cytотrophoblaste en syncytiotrophoblaste est assurée par l'hCG [86;87]. Cette hormone, qui permet de confirmer la grossesse chez la femme, est synthétisée sous la forme de deux sous-unités,  $\alpha$  et  $\beta$ , par le syncytiotrophoblaste et est libérée dans la circulation maternelle sous forme de dimère  $\alpha/\beta$  constituant l'hCG [88]. L'hCG peut être détectée aussi tôt que 6 à 9 jours suivant la conception, soit au moment de l'implantation du blastocyste [89].

La différenciation du trophoblaste s'effectue selon deux grandes voies [90]: le trophoblaste villeux, qui baigne dans le sang maternel de la chambre intervilleuse et qui est impliqué dans tous les échanges fœto-maternels de même que la fonction endocrine du placenta, ainsi que le trophoblaste extravilleux, qui participe au remaniement des artères spiralées utérines et à l'ancrage du placenta au niveau de l'utérus.

### 1.4.2 Invasion par le trophoblaste

Au moment de l'implantation, les cellules du trophoblaste prolifèrent au site même de l'implantation. Puis, afin de favoriser l'implantation profonde de l'embryon, les cellules trophoblastiques entrent en contact avec les cellules épithéliales de l'endomètre et ces dernières entrent en apoptose [91]. Ce processus de migration et d'invasion des trophoblastes dans l'endomètre utérin est influencé entre autres par les protéines de la MEC, telles que les intégrines et les cadhérines. Il existe 3 modes d'invasion, selon le type de pénétration de l'épithélium utérin par les trophoblastes : l'invasion par déplacement (chez le rat ou la souris), l'invasion par fusion (chez le lapin) ou l'invasion par intrusion (chez l'humain) [92]. Chez la femme, le syncytiotrophoblaste s'insère entre les cellules épithéliales utérines avant de les phagocytter. Chez le rat, une fois au contact de la membrane basale, les cellules trophoblastiques émettent des prolongements cytoplasmiques facilitant ainsi le décollement des cellules épithéliales qui entrent alors en apoptose, avant d'être phagocytées.

### 1.4.3 Mécanismes de l'invasion de l'endomètre

L'invasion est un processus qui se décompose en 3 étapes [74], dont la première constitue la liaison des cellules trophoblastiques aux constituants de la membrane basale de la MEC par des récepteurs spécifiques, les intégrines.

La deuxième étape de l'invasion consiste en l'activation des protéases. Afin que le trophoblaste puisse progresser dans le stroma utérin, des composants de la MEC et de la membrane basale se doivent d'être clivées. Ce rôle revient à la plasmine ainsi qu'à des enzymes appartenant à la famille des MMPs. Les cellules trophoblastiques humaines sécrètent la MMP-2 et la MMP-9 [93], alors que chez la souris [94] et le rat [30], les études effectuées démontrent une expression de MMP-9.

La dernière étape est celle de la migration des cellules trophoblastiques par ancrage sur les protéines de la MEC et/ou de protéines déciduaires, telles que l'*Insulin Like Growth factor Binding Protein-1* (IGFBP-1) par l'intermédiaire d'intégrines dont

l'expression varie au cours du processus. L'IGFBP-1 est sécrétée sous l'effet de la progestérone, de l'EGF et de l'insuline [77]. De plus, l'IGFBP-1 contient une séquence RGD (Arg-Gly-Asp) de reconnaissance des intégrines, qui peut en particulier fixer l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  [77]. Pendant la migration des cellules trophoblastiques humaines, on observe une disparition de l'intégrine  $\alpha 6\beta 4$  au profit de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  [74]. Le complexe formé de IGFBP-1/intégrine  $\alpha 5\beta 1$  contribue peut-être à faire augmenter la migration cellulaire en diminuant l'interaction avec la MEC déciduale[77].

#### 1.4.4 Contrôle endocrinien

Afin que l'implantation puisse se dérouler correctement, une action préalable sur l'utérus par les oestrogènes, en particulier l'estradiol (E2), et la progestérone (P4) doit avoir lieu au cours du cycle menstruel et lors des premiers stades de la gestation [95;96]. Les oestrogènes (estradiol, oestrone et oestriol) sont produites par le placenta [97] et agissent par l'intermédiaire de leur liaison avec leurs récepteurs spécifiques qui abondent dans les tissus utérins. Une action cruciale des oestrogènes est d'induire la synthèse intracellulaire des récepteurs à la P4 [98].

La P4 est une hormone indispensable à l'établissement de la gestation et elle a pour rôle d'assurer un milieu favorable au développement de l'embryon et à son implantation. Par contre, la lutéolyse (régression du corps jaune) doit être inhibée afin de maintenir la sécrétion de P4. Afin que la transformation du corps jaune cyclique en corps jaune gestatif puisse avoir lieu, il doit y avoir inhibition de la lutéolyse ainsi que le maintien de stimuli hormonaux lutéotropes [74]. Le maintien de la sécrétion de la P4 par le corps jaune dépend de l'hCG chez les humains. Chez les rongeurs, s'il y a gestation, le corps jaune persiste jusqu'au terme car l'embryon provoque la transformation des cellules du stroma en cellules déciduales, inhibant ainsi la lutéolyse en favorisant la sécrétion de la prostaglandine  $E_2$  au lieu de la prostaglandine  $F_{2\alpha}$ . De plus, le placenta sécrète une hormone lactogène placentaire à activité lutéotrophique (PLII) et des oestrogènes (lutéotropiques chez les rongeurs). Par ailleurs, l'E2 provoque directement la croissance du corps jaune et sa sécrétion de P4 même en absence de l'hormone lutéinisante (*Luteinizing hormone*: LH) [74].

Chez les différentes espèces, l'importance de l'E2 au moment de l'implantation est différente. Chez la rate et la souris, l'E2 est indispensable alors que chez la femme, l'implantation peut très bien se dérouler en absence d'E2 [99].

## 1.5 Facteur de croissance transformant bêta

### 1.5.1 Description et rôles

La superfamille du facteur de croissance transformant bêta comporte une trentaine de membres retrouvés dans tout le règne animal, dont les TGF- $\beta$ s, les activines et les BMPs (*Bone Morphogenic Proteins*). Les facteurs de croissance, y compris le TGF- $\beta$ , sont impliqués dans un grand nombre de processus biologiques liés au développement, à l'homéostasie, à la reproduction et à la réparation des tissus. Plus particulièrement, le TGF- $\beta$  est connu comme étant un peptide multifonctionnel ayant entre autre pour rôle de réguler l'expression des protéines de la MEC, la prolifération et la différenciation cellulaire, l'apoptose et l'angiogenèse [16;100]. Le TGF- $\beta$  peut aussi réguler la capacité d'invasion de plusieurs types de cellules [101], en plus de jouer un rôle dans l'implantation de l'embryon et le développement placentaire. Sous forme exogène, le TGF- $\beta$  facilite le développement embryonnaire *in vitro* en promouvant la prolifération et le développement du blastocyste et en augmentant le nombre de cellules du blastocyste [102-104]. De nombreux types cellulaires synthétisent du TGF- $\beta$  dont les plaquettes, les macrophages, les fibroblastes, les ostéoblastes et les cellules épithéliales. Plusieurs types de cellules cancéreuses produisent également du TGF- $\beta$ .

Chez l'humain, le TGF- $\beta$ 1 est fortement exprimé au niveau des tissus de la rate, et joue un rôle de maintien des fonctions immunitaires. Le TGF- $\beta$ 1 et le TGF- $\beta$ 2 sont exprimés dans l'oocyte en développement ainsi que dans l'embryon[105]. Le TGF- $\beta$ 3 est quant à lui exprimé principalement au cours de l'embryogénèse, notamment lors de la gastrulation [106;107].

Au niveau de l'endomètre plus spécifiquement, le TGF- $\beta$ 2 est localisé de façon prédominante au stroma, alors que le TGF- $\beta$ 1 et TGF- $\beta$ 3 sont présents autant au niveau des cellules épithéliales que stromales [108-110].

### 1.5.2 TGF- $\beta$ dans l'implantation et l'invasion

Des études ont permis de démontrer l'expression des trois isoformes du TGF- $\beta$  dans l'utérus de rates gestantes [15]. En effet, on observe une augmentation des niveaux de TGF- $\beta$ 1 et de TGF- $\beta$ 2 dans les cellules épithéliales et dans le stroma en début de gestation, au moment de l'implantation. Leur expression est cependant détectée tout au long de la gestation, en étant particulièrement élevé durant les phases apoptotiques telles que lors de la régression de la déciduale basale. Par contre, l'expression du TGF- $\beta$ 3 n'est pas détectée au début de la gestation, suggérant que son action n'est pas requise lors de l'implantation [15;101;111;112].

De plus, chez l'humain, le TGF- $\beta$  jouerait un rôle dans l'implantation, par la stimulation de production de fibronectine ou de VEGF (*vascular endothelial growth factor*) [113;114] ou alors en promouvant l'adhésion des trophoblastes à la MEC [115]. Il serait aussi responsable de la mise en place de l'implantation en promouvant la décidualisation des cellules du stroma endométrial. De plus, une étude a démontré que le TGF- $\beta$ 1 serait responsable de l'augmentation de la production, par les cellules épithéliales, d'une cytokine favorisant l'implantation, le *leukemia inhibitory factor* (LIF) [116].

Par ailleurs, une étude effectuée précédemment montre que le TGF- $\beta$  inhibe la prolifération et l'invasion des trophoblastes, probablement en diminuant l'activation des MMPs et en stimulant la sécrétion de leurs inhibiteurs (TIMPs) [117]. Une autre étude montre que la capacité d'invasion des trophoblastes suite à un traitement avec le TGF- $\beta$  est due à une diminution des niveaux de MMP-9 et de l'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA), sans affecter les niveaux de TIMPs ou la prolifération cellulaire [112]. De plus, des concentrations élevées de TGF- $\beta$ 1 dans le plasma de femmes

souffrant de pré-éclampsie ont été observées [118], ce qui pourrait expliquer le défaut d'implantation au cours de la prééclampsie [119].

### 1.5.3 Structure

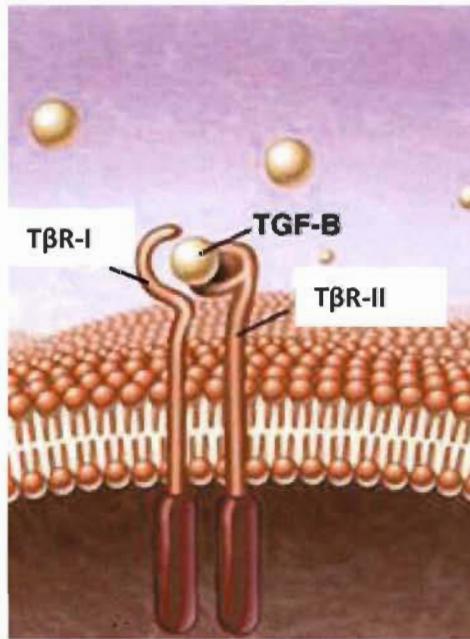
Chez les mammifères, il existe trois isoformes du TGF- $\beta$ ; TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 et TGF- $\beta$ 3. Tous trois sont codés par des gènes distincts, situés sur des chromosomes différents. Du point de vue de leur structure, ces trois isoformes, possédant de 76 à 80% d'homologie entre leurs séquences protéiques, sont très similaires. Le poids moléculaire de chacun des isoformes diffère légèrement avec 15, 12.5 et 12 KDa pour le TGF- $\beta$ 1,  $\beta$ 2 et  $\beta$ 3 respectivement. Le TGF- $\beta$  est synthétisé sous forme d'un précurseur inactif clivé seulement avant la sécrétion. Le LTGF- $\beta$  (pour *Latent TGF- $\beta$* ) requiert une maturation pour se fixer à son récepteur et induire une réponse cellulaire. Il est constitué d'un peptide signal de sécrétion dans sa région aminotermrale, d'une région appelée LAP (pour *Latency Associated Protein*) et d'une région carboxyterminale. C'est cette partie qui constituera le TGF- $\beta$  actif après maturation. La forme biologique active du TGF- $\beta$  est constituée par un homodimère dont les deux chaînes sont liées par des interactions hydrophobes et par un nœud de six cystéines qui forment trois ponts disulfures [120;121]. La dimérisation du TGF- $\beta$  est possible grâce à l'engagement d'une septième cystéine dans un pont disulfure reliant les deux monomères.

#### 1.5.4 Récepteurs et signalisation

Afin qu'il puisse exercer ses fonctions, le TGF- $\beta$  doit se lier à un récepteur transmembranaire possédant une activité sérine/thréonine kinase au niveau de sa partie cytoplasmique [121;122]. La figure 1.6 nous montre le TGF- $\beta$  se liant au récepteur. En fait, il y a deux types de récepteur qui ont été caractérisés, soit le récepteur de type I ou T $\beta$ R-I et le récepteur de type II ou T $\beta$ R-II. Ces récepteurs sont composés d'une petite région extracellulaire riche en cystéine et d'un domaine intracellulaire où se situe leur domaine kinase. Le récepteur de type I se distingue du récepteur de type II par le fait qu'il demeure inactif s'il n'est pas phosphorylé ainsi que par la présence d'un domaine GS cytoplasmique (séquence riche en glycine et sérine) qui précède le domaine kinase [123], alors que le T $\beta$ R-II possède une activité kinase intrinsèque.

Le TGF- $\beta$  se lie tout d'abord au récepteur de type II, entraînant la reconnaissance et le recrutement du récepteur de type I. Le T $\beta$ R-I peut alors être activé par la phosphorylation de résidus séries et thréonines dans son domaine GS. La structure dimérique du TGF- $\beta$  suggère qu'il fonctionne en associant ensemble une paire de chacun des types de récepteur, entraînant ainsi la formation d'un complexe hétérotétramérique [120;121]. Les deux chaînes de T $\beta$ R-II phosphorylent alors les chaînes de T $\beta$ R-I, qui à leur tour vont phosphoryler leurs substrats [124-126].

Le bêtaglycane, aussi connu sous le nom de récepteur de type III (T $\beta$ R-III), permet la fixation du TGF- $\beta$  au T $\beta$ R-II avec une meilleure affinité [120]. Il n'a par ailleurs pas été montré si cette molécule peut initier par elle-même la transduction d'un signal cellulaire, mais il semblerait qu'il ne puisse transmettre directement un signal cellulaire [127].



**Figure 1.6 Liaison du TGF- $\beta$  sur son récepteur**

La liaison du TGF- $\beta$  se fait sur le récepteur de type II, ce qui entraîne le recrutement du récepteur de type I et son activation par la phosphorylation de résidus séries et thréonines dans son domaine GS.

Tiré et adapté de *Medecine World* [2]

## 1.6 Signalisation cellulaire activée par le TGF- $\beta$

Les cellules ont différentes formes de communication dont : la signalisation paracrine, autocrine, endocrine et synaptique. Précédemment, nous avons mentionné que certaines cellules du corps humain sécrétaient du TGF- $\beta$ . Parmi celles-ci, certaines possèdent les récepteurs du TGF- $\beta$ , leur permettant ainsi d'établir une signalisation autocrine, en plus de la signalisation paracrine pouvant être induite. Par ailleurs, le TGF- $\beta$ , de même que d'autres facteurs de croissance et cytokines, exercent leurs effets biologiques sur les cellules cibles en activant spécifiquement différentes voies de signalisation cellulaire. Afin d'activer la voie de signalisation, le ligand doit interagir avec son récepteur spécifique, entraînant la multimérisation des chaînes du récepteur. Les protéines kinases ainsi activées vont, grâce à la phosphorylation, activer certaines protéines cytoplasmiques, permettant l'activation d'une cascade de phosphorylation aboutissant à la propagation et à l'amplification du signal. Dans une même cellule, un même récepteur est en mesure d'activer plusieurs voies de signalisation. La figure 1.7 résume l'activation de ces voies en présence de TGF- $\beta$ . Quelques-unes des principales voies activées par le TGF- $\beta$  seront décrites en détails un peu plus loin.

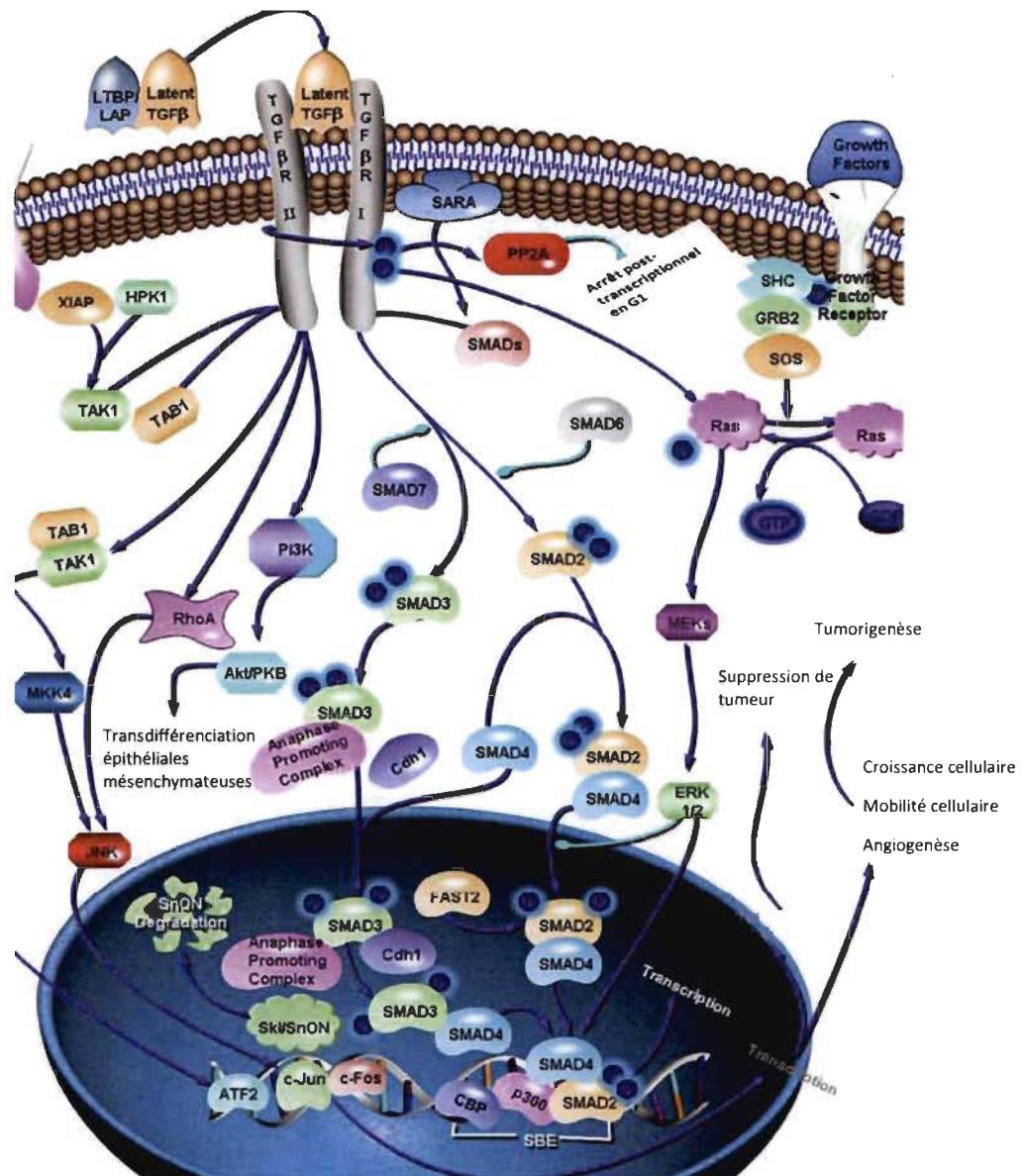


Figure 1.7 Voies de signalisation cellulaire induites par le TGF-β

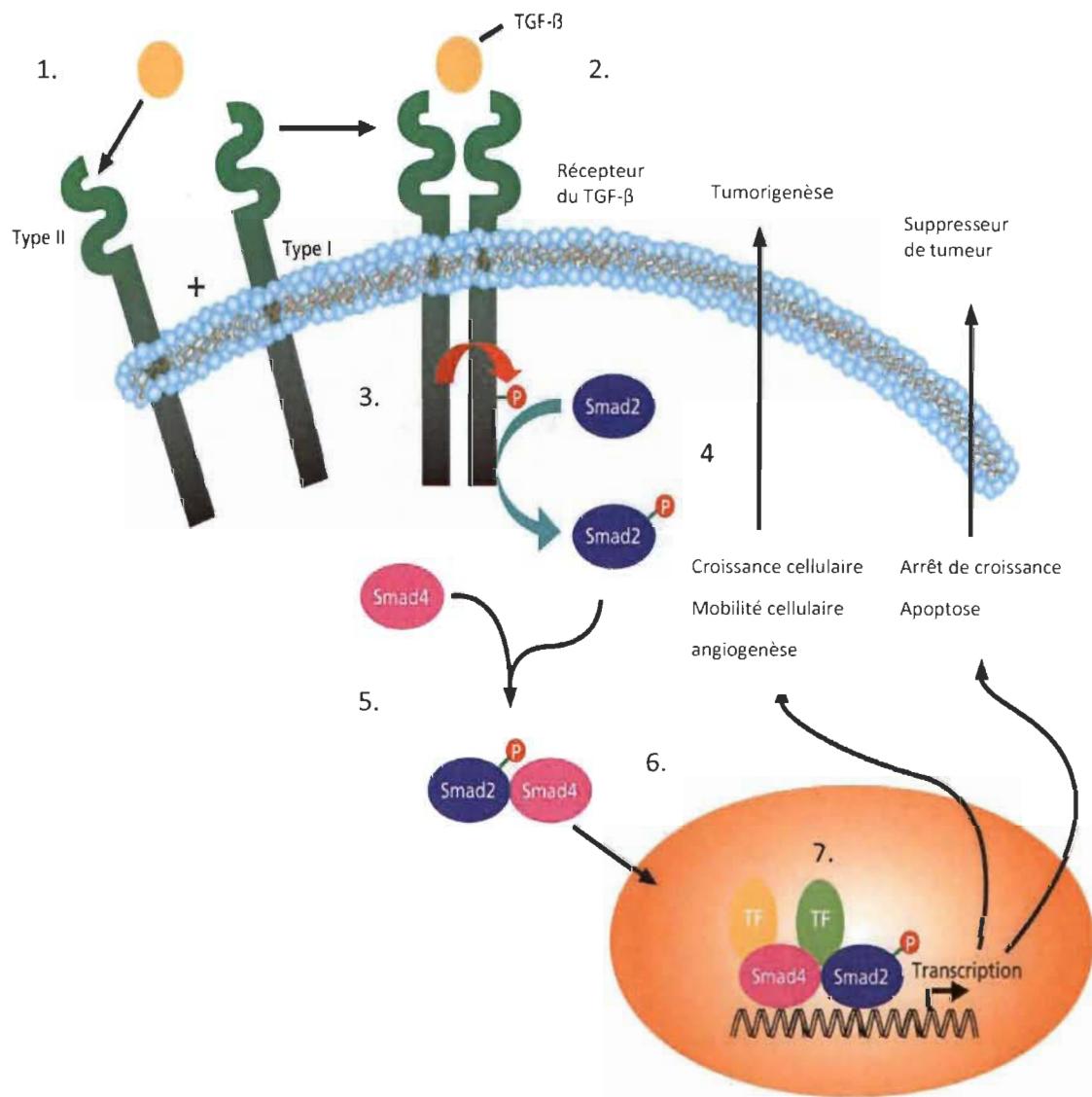
Le TGF-β se lie à son récepteur de type II, ce qui entraîne la phosphorylation du récepteur de type I sur des résidus spécifiques (sérine et/ou thréonine). Une fois activé, ce dernier va à son tour phosphoryler les protéines Smad2 ou Smad3, entraînant la formation d'un complexe avec la protéine Smad4. Le complexe ainsi formé sera transloqué dans le noyau où il jouera son rôle de facteur de transcription. Le TGF-β peut aussi activer des voies de signalisation Smad-indépendantes telles que les voies de p38 MAPK, ERK 1/2, JNK ainsi que la voie de la PI3K.

Tiré et adapté de SABschience, Qiagen Company [6]

### 1.6.1 Voie des SMADs

La transduction du signal induit par le TGF- $\beta$ , du récepteur jusqu'au noyau, est principalement assurée par la famille de facteurs de transcription Smads (de la fusion de Sma et Mad, noms des deux premiers membres identifiés chez *C. elegans* et la drosophile respectivement) [121]. Trois groupes fonctionnels forment cette famille. Premièrement, les Smads associés au récepteur (R-Smads), qui interagissent spécifiquement avec le T $\beta$ R-I activé et sont spécifiques d'un ligand. Smad1, Smad5 et Smad8 étant associés en réponse au BMP ou au facteur antimüllérien alors que Smad2 et Smad3 le sont par le TGF- $\beta$  et l'activine [128]. Les Co-Smads, tels que Smad 4 et Smad4b, médiateurs communs pour tous les membres de la famille du TGF- $\beta$ , font partie du deuxième groupe alors que les I-Smads ou Smads inhibiteurs tels que Smad6 et Smad7, font partie du dernier.

Afin que l'activation de ces facteurs de transcription puisse s'effectuer, le TGF- $\beta$  doit se lier au T $\beta$ R-II, qui comme nous l'avons déjà mentionné, va former un complexe hétérodimérique avec T $\beta$ R-I tel qu'illustré à la figure 1.8. Ce réarrangement va entraîner l'acquisition d'une activité kinase par le T $\beta$ R-II, phosphorylant ainsi le T $\beta$ R-I sur des résidus sérine et/ou thréonine. Lorsqu'il est activé, le T $\beta$ R-I peut à son tour phosphoryler, donc activer, les protéines R-Smad dans un motif Ser-X-Ser situé dans leur région C-terminale. Suite à la phosphorylation de Smad2 ou Smad3 par le TGF- $\beta$ , il y a formation d'un complexe avec Smad4. Smad4 est une protéine retrouvée dans les cellules de la peau, du pancréas, du colon, de l'utérus et de l'épithélium. Elle se situe dans le cytoplasme de la cellule, et lorsque le complexe R-Smad/Smad4 est formé, il est transloqué dans le noyau où il pourra se lier à l'ADN, soit directement ou en s'associant avec d'autres protéines fixant l'ADN pour jouer son rôle de facteur de transcription [121]. Il est important de noter que Smad4 ne peut être importée dans le noyau que lorsqu'elle est associée aux R-Smads, alors que Smad2 et Smad3 sont importées de façon indépendante de Smad4 [129].



**Figure 1.8 Voie de signalisation des Smads**

1) Liaison du TGF-β avec le TβR-II. 2) Formation du complexe TβR-II/TβR-I. 3) Phosphorylation du TβR-I par le TβR-II. 4) Phosphorylation de Smad2 ou Smad3 par TβR-I. 5) Formation d'un complexe Smad2/Smad4 ou Smad3/Smad4. 6) Transport du complexe vers le noyau. 7) Liaison du complexe à l'ADN et début de la transcription.

Tiré et adapté de [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com) [3]

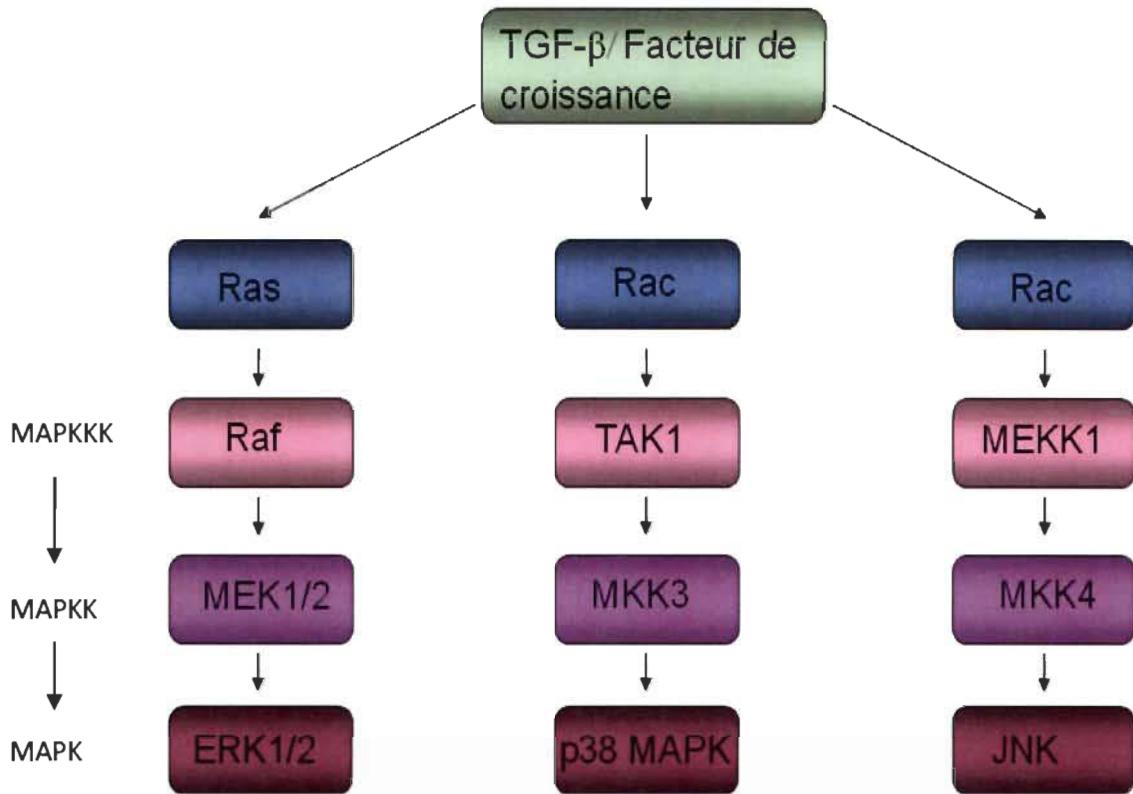
### 1.6.2 Voie des Mitogen Activated Protein Kinases (MAPK)

La voie des MAPK constitue l'une des principales voies de transmission des signaux de prolifération et figure parmi les plus conservées au cours de l'évolution. Il n'est donc pas surprenant qu'elle ait un rôle à jouer dans les processus d'invasion et de migration des cellules. Chez les mammifères, la voie des MAPK se divise en 4 sous-familles soit : la voie ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinase*), la voie Jnk (*Jun kinase*), la voie p38 et la voie ERK5. L'activation de ces différentes voies de signalisation dépend du type cellulaire ainsi que du stimulus extracellulaire impliqué [130]. Les voies de ERK, p38 MAPK et Jnk sont connues pour réguler la migration chez différents types de cellules, par des mécanismes tels que la régulation à la hausse des niveaux de MMP-9 [131] et la phosphorylation de la kinase d'adhésion focale (FAK) [132].

Le point de départ afin d'activer la voie des MAPK est la phosphorylation d'une tyrosine du récepteur d'un facteur de croissance, le RTK (récepteur à tyrosine kinase). Ceci permet à la protéine adaptatrice Grb2, qui possède des domaines SH2 et SH3, de s'accrocher au récepteur tyrosine kinase par son domaine SH2 au résidu phosphotyrosine du récepteur, alors que les deux domaines SH3 interagissent avec la région riche en proline de la protéine adaptatrice Sos. Sos est un facteur d'échange GDP-GTP qui peut interagir avec Ras, une petite protéine à activité GTPase, qui se situe dans le cytosol, près de la membrane plasmique. Sous sa forme activée, chargée de GTP, Ras peut entrer en interaction avec la MAPKKK Raf, entraînant un changement de conformation de Raf qui est activée suite à la phosphorylation. Raf activée va à son tour phosphoryler la MAPKK MEK qui elle-même phosphoryle la MAPK ERK. Cette dernière entre ensuite dans le noyau cellulaire où elle ajoute des groupements phosphate aux résidus sérine et thréonine des facteurs de transcription fos et jun (préalablement phosphorylé par la protéine kinase Jnk) qui s'associent pour former le facteur de transcription AP-1 (*activating protein-1*). AP-1 active l'expression du gène de la cycline D, entraînant l'activation du cycle cellulaire et par le fait même, augmente la prolifération cellulaire [74]. Les voies de Jnk et de p38 sont aussi activées par une cascade de protéines kinases tel que le montre la figure 1.9.

Des études sur la voie de signalisation ERK1/2 ont démontré que MEK1 joue un rôle essentiel dans la formation du placenta durant le stade du développement de l'embryon [133] et que l'activation des voies ERK1/2 et p38 sont nécessaires afin d'initier la différenciation des trophoblastes [134]. De plus, tel que mentionné précédemment, les cellules épithéliales de l'endomètre (CEE) qui sont adjacentes aux cellules trophoblastiques entrent en apoptose au moment de l'implantation. Cependant, les mécanismes de signalisation conduisant à l'apoptose des CEE demeurent flous. Une étude a démontré l'activation des voies p38 MAPK et ERK1/2 dans des CEE formant une monocouche (RL95-2) après incubation avec une masse cellulaire formée de cellules BeWo (cellules provenant de choriocarcinomes humains). La croissance des cellules BeWo sur les CEE a été significativement inhibée par le SB203580 (un inhibiteur de p38MAPK), mais non par le PD98059 (un inhibiteur de ERK1/2), suggérant que la voie de p38 MAPK plutôt que ERK1/2 serait impliquée dans le développement des excroissances produites par la prolifération des trophoblastes [8]. Ils ont aussi suggéré que les trophoblastes éliminent les CEE en induisant l'apoptose dans ces dernières via l'activation de la voie p38 MAPK, facilitant ainsi l'implantation. De plus, une étude effectuée précédemment a démontré que l'apoptose des CEE pouvait entre autre être induite par le TGF- $\beta$  [135]. Le TGF- $\beta$  étant sécrété par les trophoblastes [136;137], il est possible que celui-ci ait un rôle à jouer dans l'activation de la p38 MAPK chez les trophoblastes de même que l'apoptose des CEE.

Tel que mentionné un peu plus haut, le MMP-9 a un rôle à jouer dans l'invasion des trophoblastes. Cohen et al. ont démontré qu'un traitement des cellules trophoblastiques HIPEC 65 (*Human Invasive, Proliferative, Extravillous Cytotrophoblast*) par le TNF- $\alpha$  entraîne une augmentation du double de l'expression de MMP-9, de leur sécrétion et de leur activité via l'activation des voies ERK1/2 et JNK [138]. Zhou et al. ont quant à eux démontré que la cyclosporine A augmente l'expression de MMP-2, MMP-9, ainsi que l'invasivité des cellules trophoblastiques humaines en induisant l'activation de la voie de ERK1/2 [139].



**Figure 1.9 Représentation de la cascade d'activation des MAPK**

Des stimuli tels que le TGF-β ou d'autres facteurs de croissances entraînent l'activation des voies MAPK, par des mécanismes médiés par des protéines à GTPase (Ras, Rac). Une fois que les MAPKKKs sont activées, elles phosphorylent les MAPKKs sur deux résidus sérines. Les MAPKKs vont à leur tour phosphoryler les MAPK, résultant en l'activation catalytique des MAPK. Une fois activée, MAPK peut transloquer vers le noyau afin de phosphoryler des facteurs de transcription tel que AP-1.

Tiré et adapté de Liu et al. Nature Reviews Immunology 7, 202–212 (Mars 2007) [8]

### 1.6.3 Mort cellulaire induite par le TGF- $\beta$

Dans le tissu normal, il existe un équilibre entre la survie et la mort cellulaire. Pour le développement embryonnaire, ce processus est essentiel. Plusieurs facteurs peuvent causer la mort de la cellule. La mort cellulaire accidentelle peut être causée par une agression structurale ou chimique dont la cellule ne peut se remettre. Dans la mort cellulaire programmée ou l'apoptose, les cellules se suicident en raison de l'activation d'un programme intracellulaire prévu à cet effet [140-142]. Un dérèglement dans le contrôle de l'apoptose entraîne la survie non désirée des cellules.

Le TGF- $\beta$  a la capacité d'induire l'apoptose chez plusieurs lignées cellulaires par différents processus: activation de la voie des SMADs, activation des caspases ou même par la modulation de l'activité de NF $\kappa$ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) [143]. L'équipe de Jang et al. ont démontré que le TGF- $\beta$  induit l'expression d'une protéine kinase associée à la mort cellulaire, la DAP-kinase (*death-associated protein kinase*) comme une réponse immédiate dans les cellules qui subissent l'apoptose en réponse au TGF- $\beta$  [144]. La DAP-kinase est un médiateur positif de l'apoptose induit par certaines cytokines et oncogènes. Le promoteur de la DAP-kinase est activé par le TGF- $\beta$  via l'action de Smad2, Smad3 et Smad4 [144]. Une autre étude effectuée avec des cellules mésangiales de rat démontre que le TGF- $\beta$  induit la surexpression de Smad7, qui augmente l'activation des caspases 3, menant à l'apoptose [145]. Ils ont par ailleurs démontré que Smad7, mais non Smad2 ou Smad3 avait un rôle à jouer dans l'induction de l'apoptose par le TGF- $\beta$  dans les cellules mésangiales de rat.

Il a été suggéré que le TGF- $\beta$ 1 pouvait induire l'apoptose dans les lymphocytes B ainsi que des lignées cellulaires de lymphomes de Burkitt [146-148]. L'apoptose induite dans ces cellules suite à un traitement avec le TGF- $\beta$ 1 est dûe à l'activation de la caspase 8 [149]. Par ailleurs, une autre étude a démontré que le TGF- $\beta$  pouvait induire l'apoptose dans des lymphocytes B grâce à l'activation des caspases [150]. Plus particulièrement, l'activation de la caspase 3 est associée, *in vivo*, au clivage de la poly(ADP-ribose) polymérase (PARP), qui est l'un des premiers substrats clivés et inactivés par les caspases durant l'apoptose. De plus, le clivage de la protéine Rb, qui est

une protéine suppressive de tumeur, par la caspase 3 induirait une forme apoptotique de Rb [150].

Un traitement des lymphocytes B avec le TGF- $\beta$ 1 diminue l'expression du gène c-myc, un proto-oncogène, et par conséquent, induit l'apoptose [151]. NF $\kappa$ B joue un rôle dans le contrôle de la transcription du gène c-myc. Par ailleurs, il a été démontré qu'un traitement avec le TGF- $\beta$ 1 entraîne une réduction dans l'activité de NF $\kappa$ B [151].

#### 1.6.4 Pathologies associées au TGF- $\beta$

En plus de son rôle à jouer dans l'implantation et l'invasion de l'endomètre, le TGF- $\beta$  est aussi impliqué dans différentes pathologies humaines dont la fibrose et le cancer [13;152]. Une augmentation de l'expression des composantes de la MEC pourrait entre autre induire des réponses pro-fibrotiques. Dans les stades précoce de la tumorigénèse, le TGF- $\beta$  inhibe la croissance tumorale, alors que lors des stades tardifs, l'effet antiprolifératif du TGF- $\beta$  est supprimé chez les cellules malignes, entraînant croissance et invasion tumorale, dissémination des cellules cancéreuses par l'évasion de la surveillance immunitaire ainsi que métastases [153;154].

Des pathologies associées spécifiquement à la protéine Smad4 sont aussi répertoriées. Des mutations au niveau de cette protéine entraîneront une croissance cellulaire sans inhibition puisque la transcription du TGF- $\beta$  ne se fera pas, d'où l'apparition de certaines tumeurs ou cancers. Tel est le cas du cancer du pancréas ou du colon [155]. De plus, il semblerait que le syndrome de la polyposse juvénile serait aussi la conséquence d'une mutation dans le gène codant pour la protéine Smad4 [156].

Le virus du papillome humain (VPH) exprime une oncoprotéine E7. Cette oncoprotéine empêche l'activation par le TGF- $\beta$  de la voie des Smads en séquestrant les protéines Smads au noyau et en bloquant la liaison du complexe Smad2/Smad4 ou Smad3/Smad4 à sa séquence cible sur l'ADN [157]. L'inactivation de la voie des Smads est nécessaire afin d'empêcher le TGF- $\beta$  d'accomplir sa fonction de suppresseur de tumeur. Par ailleurs, l'oncoprotéine E7 pourrait contribuer à l'accumulation de la

protéine Rb hyperphosphorylée, par la suppression de l'activité des Smads [157]. La phosphorylation de Rb, diminue son affinité pour E2F (facteurs de transcription prolifératifs) qui peut alors agir comme oncogène, entraînant le développement d'une tumeur ou d'un cancer.

## 1.7 Hypothèse

Bien que le placenta soit un tissu normal, les trophoblastes, cellules qui le constituent, partagent plusieurs caractéristiques communes avec les cellules malignes. Tout d'abord, la prolifération des trophoblastes, tout comme les cellules cancéreuses, est très active. Elles sont aussi capables d'échapper aux effecteurs du système immunitaire, et ce en particulier lors du premier trimestre. De plus, tout comme les cellules cancéreuses, les trophoblastes ont la capacité de migrer. Cependant, le phénomène d'invasion de l'endomètre par les trophoblastes est un processus qui est précisément contrôlé, contrairement à la capacité d'invasion des cellules cancéreuses. À cause de ces caractéristiques particulières, les trophoblastes sont considérés comme étant des cellules pseudo-malignes [158-161].

Des isoformes du TGF- $\beta$  sont présents dans l'utérus lors de la grossesse et jouent un rôle dans l'implantation embryonnaire et le développement placentaire [15]. De plus, nous savons que le TGF- $\beta$ 3 est capable d'augmenter la capacité d'invasion de certaines cellules [14] et que les trophoblastes expriment T $\beta$ R-I et T $\beta$ R-II. Par conséquent, nous avons émis comme hypothèse que certains isoformes du TGF- $\beta$  pourraient réguler la capacité d'invasion des cellules trophoblastiques. Nos objectifs de recherche sont donc de déterminer l'impact des isoformes du TGF- $\beta$  sur l'activité des voies de signalisation cellulaire SMAD, ERK et p38 MAPK, de même que de vérifier leur impact sur la prolifération et l'invasivité des cellules trophoblastiques.

## CHAPITRE 2

### ARTICLE

#### 2.1 Résumé

L'implantation d'un embryon dans l'endomètre est une étape essentielle pour la poursuite de la grossesse. Les échecs d'implantation sont une cause majeure d'infertilité chez la femme. Chez le rat, le processus d'implantation implique l'invasion de l'endomètre par les cellules trophoblastiques, en vue d'atteindre les cellules stromales. Le *Transforming Growth Factor-β* (TGF-β) est une cytokine multifonctionnelle qui régule la prolifération, la différenciation et le caractère invasif de multiples lignées cellulaires. Nous avons utilisé deux lignées cellulaires de rat, soit les cellules HRP-1 et les cellules RCHO-1, afin d'effectuer cette étude. Les cellules HRP-1 proviennent d'un placenta normal de rat Holtzman, alors que les cellules RCHO-1 ont été établies à partir d'un choriocarcinome de rat. Des tests de prolifération MTT ont révélé que chaque isoforme du TGF-β diminue la croissance cellulaire des cellules HRP-1 d'une manière dose-dépendante, alors que les cellules RCHO-1 étaient résistantes à l'effet antiprolifératif du TGF-β. L'activation de certaines voies de signalisation cellulaire telles que ERK, p38 MAPK ou Smad est connue pour jouer un rôle dans la prolifération cellulaire, et nos résultats montrent que le TGF-β active ces voies chez les cellules HRP-1 et RCHO-1 d'une manière isoforme-spécifique. De plus, les tests de prolifération MTT ont révélé que la voie ERK est partiellement impliquée dans la prolifération des cellules HRP-1. Une coloration des noyaux cellulaires au Hoechst a démontré que le TGF-β n'induit pas l'apoptose dans les deux lignées cellulaires. Les tests d'invasion sur Matrigel montrent que les cellules HRP-1 et RCHO-1 possèdent la capacité intrinsèque d'invasion dans des conditions basales. La capacité des cellules HRP-1 à envahir le Matrigel a été augmentée sélectivement par le TGF-β2 et TGF-β3, tandis que tous les isoformes du TGF-β sont en mesure d'augmenter le caractère envahissant des cellules RCHO-1. Ces études révèlent pour la première fois l'implication du TGF-β dans la régulation de la prolifération et de l'invasivité des cellules trophoblastiques.

## 2.2 Contribution des auteurs

Les auteurs du chapitre 2 sont : moi-même, 1er auteur, j'ai effectué la majeure partie des expérimentations, le traitement de données et la rédaction de l'article; Parvesh Chaudry, second auteur, qui a participé à la rédaction de l'article; Marie-Judith Lafleur, 3<sup>e</sup> auteur qui a contribué à l'achèvement de l'article; Céline Van Themsche, 4<sup>e</sup> auteur qui a contribué à la supervision des travaux; Michael J Soares, 5<sup>e</sup> auteur, qui a offert les cellules modèles et finalement Éric Asselin, dernier auteur, qui a élaboré la stratégie expérimentale, effectué la supervision des travaux et aussi la révision de l'article.

## 2.3 Article

### Transforming Growth Factor- $\beta$ Regulates Proliferation and Invasion of Rat Placental Cell Lines

Lyne Lafontaine<sup>1</sup>, Parvesh Chaudhry<sup>1</sup>, Marie-Judith Lafleur<sup>1</sup>, Céline Van Themsche, Michael J Soares<sup>2</sup>, Eric Asselin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Research group in molecular oncology and endocrinology, Department of chemistry-biology, Université du Québec à Trois-Rivières, C.P. 500, Trois-Rivières, Québec, Canada G9A 5H7;

<sup>2</sup>Institute of Maternal-Fetal Biology, Departments of Pathology and Laboratory Medicine and Obstetrics and Gynecology, University of Kansas Medical Center, Kansas City, KS 66160, USA

Running title: TGF-  $\beta$  regulates placental cell invasion

Summary: This study is the first to show the involvement of different TGF- $\beta$  isoforms and their signalling pathways in the regulation of placental cell invasion.

Key Words: TGF-  $\beta$ , proliferation, apoptosis, invasion, trophoblast, endometrium

\*Corresponding Author: Eric Asselin, Ph.D.

Département de Chimie-Biologie

Research group in molecular oncology and endocrinology

Université du Québec à Trois-Rivières, C.P. 500

Trois-Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7

E-mail: Eric.Asselin@uqtr.ca

<sup>†</sup> This work has been supported by a grant from NSERC (238501). Eric Asselin is holder of the Canada research chair in Molecular Gyneco-oncology.

DISCLOSURE STATEMENT: The authors have nothing to disclose.

### Abstract

Implantation of an embryo in the endometrium is a critical step for continuation of pregnancy and implantation failure is a major cause of infertility. In rats, the implantation process involves invasion of the endometrial epithelial lining by the trophoblastic cells in order to reach the underneath stromal cells. Transforming Growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) is a multifunctional cytokine which regulates proliferation, differentiation and invasiveness of multiple cell lineages. We used rat HRP-1 and RCHO-1 placental cell lines to perform this study. HRP-1 cells were derived from a midgestation chorioallantoic placental explants of the outbred Holtzman rat, whereas RCHO-1 cells were established from a rat choriocarcinoma. MTT proliferation assays revealed that each TGF- $\beta$  isoform decreased HRP-1 cell growth in a dose-dependent manner, whereas RCHO-1 cells were resistant to the growth-suppressive effect of TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 3. Only TGF- $\beta$ 2 reduced RCHO-1 cell proliferation. Activation of ERK, p38 MAPK or Smad pathways is known to play a role in cell proliferation, and we found that TGF- $\beta$  activates these pathways in both HRP-1 and RCHO-1 cells in an isoform-specific manner. MTT proliferation assays revealed that ERK pathway is partially implicated in TGF- $\beta$ 3-reduced HRP-1 cell proliferation. Hoechst nuclear staining and caspase-3 cleavage demonstrated that TGF- $\beta$  isoforms failed to induce apoptosis in both cell lines. Matrigel invasion assays showed that both HRP-1 and RCHO-1 cells exhibit intrinsic invasive ability under untreated conditions. The capacity of HRP-1 cells to invade the Matrigel was selectively increased by TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3, whereas all TGF- $\beta$  isoforms could increase the invasiveness of RCHO-1 cells. These important functional studies progressively reveal a key role for TGF- $\beta$  in regulating proliferation and invasiveness of placental cells.

## Introduction

Implantation of the endometrium is the process during which the embryo attaches and invades the mother endometrium. Trophoblast cells, which form the placenta, are responsible of the endometrium invasion. Trophoblast cell invasion of the uterus is essential for the maintenance of the pregnancy and this is a highly temporally and spatially regulated process. Some factors such as cytokines, growth factors and hormones produced by the uterus during pregnancy or by trophoblast themselves [1, 2], are suspected to be responsible for this regulation, and other factors are still undetermined.

Transforming growth factor- $\beta$ s (TGF- $\beta$ s) are members of a large superfamily of cytokines including activins, inhibins, bone morphogenic proteins and others [3]. In mammals, TGF- $\beta$  exists in three isoforms called TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3, encoded by three different genes [4]. TGF- $\beta$  is known to regulate a variety of cellular functions including cell proliferation, differentiation, apoptosis, migration/invasion, matrix synthesis and the immune response [5-7]. TGF- $\beta$  initiates these processes by binding to specific cell surface receptors with intrinsic serine/threonine kinase activity, designated TGF- $\beta$  receptor types (TGF- $\beta$ R) I, II and III [8]. Upon binding with the ligand (TGF- $\beta$ ), TGF- $\beta$ RII phosphorylates and activates TGF- $\beta$ RI which in turn will induce Smad2 or Smad3 phosphorylation. Phosphorylated Smad2/Smad3 associates with Smad4 to form a heterodimeric complex. This complex then translocates to the nucleus where it acts as a transcription factor for various genes [9]. In addition to the Smad pathway, various signaling pathways such as PI3K and MAPK (p38, ERK1/2 and JNK) are activated by TGF- $\beta$  in different cell lines [10]. Activation of these pathways has been shown to play an important role in growth-factor-dependent regulation of trophoblast growth differentiation, invasion and migration [11].

Although it has been shown that TGF- $\beta$  isoforms are present in the uterus during pregnancy [12, 13], little information is available about the specific effect of each isoform in

trophoblast cells. It is known that successful invasion of the maternal vascular system by trophoblast cells is a prerequisite for the establishment of a normal placenta and continuation of pregnancy. Previous studies also suggest that TGF- $\beta$  could play a crucial role in the invasion of trophoblastic cells [14-16]. However, the mechanisms of action through which it exerts its effect are still poorly understood. Rat and mouse models have provided valuable insights into the molecular mechanisms that occur during trophoblast differentiation and invasion, however, these models do not necessarily translate to the human because of different reproductive physiology [17]. The present study offers the rationale for investigating the effect of each TGF- $\beta$  isoform to activate signaling pathways and to modulate the proliferation and invasion of two rat placental cell lines; HRP-1 cells, which were derived from a normal midgestation chorioallantoic placenta [18] and RCHO-1 cells, which were established from a choriocarcinoma [19, 20]. The results from the present study suggest the involvement and the importance of TGF- $\beta$  in the invasion of rat placental cell lines.

## Materials and Methods

### *Cell lines and Reagents*

Placental HRP-1 and RCHO-1 cells were maintained in RPMI 1640 medium, supplementend with 20% fetal bovine serum heat inactivated, 100 $\mu$ g/ml penicillin-streptomycin, 1 mM sodium pyruvate, and 50  $\mu$ M 2-mercaptoethanol. TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 2 were purchased from Biosource (Invitrogen) and TGF- $\beta$ 3 was from Calbiochem (San Diego, CA). All of the antibodies were from Cell Signaling Technology (Beverly, MA) except for the anti-rabbit secondary antibody (Bio-Rad) and anti- $\beta$ -actin antibody (Sigma). PD98059 (MEK1 inhibitor) was purchased from Cell Signaling Technology (Beverly, MA) and SB431542 (specific TGF- $\beta$ R inhibitor) was from Sigma (St. Louis, MO). These inhibitors were reconstituted in DMSO.

### ***RNA isolation and Analysis***

Total RNA was isolated from cells using TRIzol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. First strand cDNA was synthesized from 0.4 µg of RNA using Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen). Primers for PCR amplification are listed in Table 1. PCRs were conducted in a MJ Research Thermal cycler (model PTC-100), using the following conditions: 30 s at 94 °C, 30 s at Tm (Table 1), and 1min at 72 °C for 36 cycles, except for GAPDH (25 cycles). The reaction mixture was size-separated on an agarose gel and visualized using SYBR-SafeTM (Invitrogen) staining upon ultraviolet transillumination.

### ***Western Blot Analysis***

Cells were washed with PBS and submitted to lysis in cold radioimmune precipitation assay buffer (PBS 1X pH=7,4; 1% Nonidet P-40 0.5% sodium deoxycholate; 0.1% SDS) containing protease inhibitors (CompleteTM from Roche Applied Science) followed by three freeze-thaw cycles. Homogenates were centrifuged (13 000 rpm for 20min at 4°C) to remove insoluble material. The supernatant was recovered and stored at -20 °C until further analysis. Equal amounts of cell lysates (as determined using Bio-Rad DC protein assay) were separated onto 8% polyacrylamide gels and then transferred onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad). The membranes were blocked with 5% bovine serum albumin (BSA) in PBS with 0.05% Tween 20 for 1 h at room temperature, probed with primary antibody, washed in PBS with 0.05% Tween 20, and incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Bio-Rad). Detection was performed using SuperSignal West FemtoTM substrate (Pierce), as described by the manufacturer. Signal was visualized using the Biochemi Imaging System (UVP, CA, USA). Densitometrical analyses were performed (protein of interest and β-actin) using Quantity One software (Bio-Rad). Results are expressed as a ratio (protein of interest/β-actin) to correct for loading for each sample.

### ***MTT Proliferation Assay***

The cells were plated in 96-well plates at a density of  $7 \times 10^3$  cells/well for HRP-1 cells and  $8.5 \times 10^3$  cells/well for RCHO-1 cells, in 180 $\mu$ l of culture medium and incubated overnight at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere, after which they reached 50% confluence. Recombinant TGF- $\beta$ s were added to selected wells at the indicated concentrations in 100 $\mu$ l culture medium, and plates were incubated for the indicated times at 37°C. MTT reagent (tetrazolium salt; Sigma) was added to the wells (10 $\mu$ l of a 0.5% solution in PBS) 3.5 h before the end of incubation period, after which conversion of yellow tetrazolium salt to blue thiazol crystals by metabolically active cells was stopped by adding 100 $\mu$ l of a 10% SDS, 0.1% HCl in PBS solution to each well. The plates were incubated overnight at 37 °C to allow complete solubilization of thiazol crystals, and the intensity of blue emission in each well was measured using a FluoStar multiwell plate reader (BMG Laboratories, Durham, NC). The percentage of proliferating cells was calculated as the ratio of optical densities of treated to non-treated (control) cells.

### ***Hoechst Nuclear Staining***

The treated cells were collected, washed twice in PBS 1X, resuspended at an approximate density of  $2 \times 10^5$  cells/ml in PBS containing Hoechst 33258 (Sigma), and incubated for 24 h at 4 °C before fluorescence microscopy analysis of apoptotic cells. At least 200 cells were counted for each sample, and a percentage of apoptotic cells was calculated as the ratio of apoptotic cells (with characteristic apoptotic morphology such as nuclear shrinkage and condensation) to total cell count.

### ***Matrigel Invasion Assay***

The invasive properties of TGF- $\beta$ s treated HRP-1 and RCHO-1 cells were measured using Matrigel-coated Transwell inserts (Costar, Corning, NY). Briefly, transwell inserts with a 8- $\mu$ m pore size were coated with 2 mg/ml Matrigel, and the cells were collected after 24h of treatment, washed, and resuspended in basal medium without serum. The lower chambers were filled with 700 $\mu$ l of culture medium, and 1X10<sup>5</sup> treated cells were added to the upper chamber inserts. The plates were incubated for 48 h at 37 °C. After the incubation period, non invading cells were removed from the top of the Matrigel using a cotton swab. Cells that had reached the filter by degrading the Matrigel were fixed in methanol, washed and stained with Hoechst. The filter was then removed and mounted on a glass slide with invasive cells facing up and submitted to densitometric analysis using Quantity One software. Results are expressed as a ratio (invasive treated cells/invasive non treated cells) to show the fold increase in invasion for each treatment.

### ***Statistical Analysis***

All the experiments were repeated at least three times. Results subjected to statistical analysis were expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Data was subjected to one-way analysis of variance (PRISM software version 3.03; GraphPad, San Diego, CA). Differences between experimental groups were determined by post-hoc Student-Newman-Keuls test. Statistical significance was accepted when P < 0.05.

## Results

### ***TGF- $\beta$ isoforms and their receptors are expressed by both HRP-1 and RCHO-1 trophoblast cells***

We examined whether HRP-1 and RCHO-1 rat placental cell lines express TGF- $\beta$  isoforms and their receptors. The results showed that these cell lines express TGF- $\beta$  type I and type II receptor at both transcript and protein levels (Fig. 1A). At the transcript level, TGF- $\beta$ 1 was found only in RCHO-1 cells, whereas TGF- $\beta$ 3 was found in both cell lines. However, TGF- $\beta$ 2 was not detected in either of the placental cell line used in the present study (Fig. 1B).

### ***TGF- $\beta$ isoforms activate Smad, ERK and p38 MAPK signaling pathways in HRP-1 and RCHO-1 trophoblast cells***

As mentioned previously, the TGF- $\beta$  signaling pathway involves phosphorylation and thereby activation of Smad proteins. In the present study, total levels of Smad2, Smad3 and their phosphorylated forms (pSmad2 and pSmad3) were determined in HRP-1 (Fig. 2A) and RCHO-1 cells (Fig. 2B) by Western blot analysis. The results showed that both the cell lines have high levels of total Smad2 as compared to total Smad3 and the levels of total Smad2 remain unchanged with TGF- $\beta$  treatment in HRP-1 and RCHO-1 cells. Further, there was no effect on the levels of total Smad3 in HRP-1 cells. However, the levels of Smad3 were undetectable in RCHO-1 cells with the antibody used. We observed a similar increase in the phosphorylation of Smad2 in both the cell lines in response to all the TGF- $\beta$  isoforms. Smad3 was also found to be phosphorylated in both cell lines in the presence of TGF- $\beta$ .

Further, we also examined if ERK and p38 MAPK signaling pathways could be triggered by TGF- $\beta$  isoforms in both model cell lines. Results showed an increase in the

phosphorylation of pERK and p38 MAPK by TGF- $\beta$ 1 in HRP-1 and RCHO-1 cells (Fig. 3). TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3 also activated p38 MAPK and ERK signaling pathways in a similar manner (data not shown). Therefore, all the three TGF- $\beta$  isoforms have the ability to phosphorylate and thus activate the Smad, ERK and p38 MAPK signaling pathways in both HRP-1 and RCHO-1 cells.

### ***Effect of TGF- $\beta$ on HRP-1 and RCHO-1 cell growth***

We have compared the growth inhibitory effects of TGF- $\beta$  isoforms on each cell line using the MTT proliferation assays. We found that TGF- $\beta$  has a growth suppressive effect on HRP-1 cells (Fig.4A: 24h; 4B: 48h). It was observed that cell growth was inhibited by all TGF- $\beta$  isoforms and TGF- $\beta$ 2 showed the highest inhibitory activity. On the other hand, no such growth inhibitory effect was observed in RCHO-1 cells with TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 3 treatments while TGF- $\beta$ 2 had a slight but significant inhibitory effect (Fig. 4C: 24h; 4D: 48h).

### ***Smad pathway is not implicated in HRP-1 cell proliferation while ERK pathway is partially implicated in TGF- $\beta$ 3 action***

In order to investigate which particular pathway is involved in the growth inhibitory effects of TGF- $\beta$  isoforms, we pre-treated HRP-1 cells for 1h with SB431542, a specific TGF- $\beta$ R inhibitor or PD98059, a MEK1 inhibitor and cell proliferation was monitored using MTT proliferation assays. After a pretreatment with SB431542, TGF- $\beta$  isoforms still showed a growth suppressive effect on HRP-1 cells indicating that the Smad pathway is probably not responsible for the inhibition of cell proliferation (Fig.5A). In spite of the fact that Smad2 and Smad3 were found to be activated with TGF- $\beta$  treatment. On the other hand, we found that PD98059 partially reversed TGF- $\beta$ 3-induced growth suppression in HRP-1 cells after 48h exposure (Fig.5 B). To confirm efficiency of pathway inhibition, phospho-Smad2 and phospho-ERK were both

measured. It was observed that in the presence of SB431542 and PD98059 the levels of phospho-Smad2 and phospho-ERK decreased respectively (data not shown).

#### ***TGF- $\beta$ isoforms are unable to trigger apoptosis***

In order to determine if the growth inhibitory effect of TGF- $\beta$  on HRP-1 and RCHO-1 cell growth was due to increased apoptosis, we stained cells using Hoechst nuclear staining following TGF- $\beta$  treatment. There was no significant increase in the apoptosis of HRP-1 (Fig. 6A) and RCHO-1 (Fig.6B) cells in the presence of TGF- $\beta$  isoforms. On the contrary, TGF- $\beta$ 3 significantly decreased the percentage of apoptotic cells as compared to control. Further, we examined cleaved caspase-3 by western blot analysis. The results demonstrate that TGF- $\beta$  isoforms failed to activate caspase-3 (data not shown).

#### ***TGF- $\beta$ increases HRP-1 and RCHO-1 cell invasion***

We next tested the effect of TGF- $\beta$  isoforms on the invasiveness of HRP-1 and RCHO-1 cells using the Matrigel invasion assay. HRP-1 cells exhibited low intrinsic invasive properties, but invasiveness was selectively increased with TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3 treatment (Fig. 7A). RCHO-1 cells also exhibited low intrinsic invasive properties but all three TGF- $\beta$  isoforms could induce cell invasion. (Fig. 7B).

## Discussion

Trophoblast cells undergo various differential stages including proliferation, differentiation and migration/invasion in order to guarantee successful placental development. During these phases, trophoblast cells are constantly exposed to the uterine fluid rich in growth factors, cytokines and hormones [21]. These molecules play a role in regulating trophoblast differentiation along the invasive pathway in both an autocrine and a paracrine fashion. Signaling cascades initiated by aforementioned stimuli need to be precisely coordinated and integrated at all the times. Because different isoforms of TGF- $\beta$  are expressed by the uterus during pregnancy [13] and several studies suggest that TGF- $\beta$  has a role to play in the invasion of the endometrium by the trophoblast [14, 15, 22], therefore, we tried to explore the role of each TGF- $\beta$  isoform on the ability of placental cell invasion. This is the first report to demonstrate that the three TGF- $\beta$  isoforms can increase invasiveness of placental cells: TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3 increases the invasiveness of HRP-1 cells while RCHO-1 invasiveness was increased by all three TGF- $\beta$  isoforms.

In the rat and mouse, trophoblast cells located at the maternal interface achieve a unique phenotype and are referred to as trophoblast giant cells. These cells arise from precursors by a process referred to as endoreduplication and possess endocrine activities and the potential for invasion [23-25]. Trophoblast giant cells express and secrete MMP-9 and has been shown to be involved in the induction of the invasive phenotype of RCHO-1 cells [26]. Thus, RCHO-1 cells are a well described model to study trophoblast cell differentiation [27, 28] and the current results support the hypothesis that TGF- $\beta$  isoforms might be important factors involved in this process. TGF- $\beta$  signaling occurs through the interaction of TGF- $\beta$  with two different types of serine/threonine kinase receptor: type I and type II. Firstly, we assessed the transcript levels of TGF- $\beta$  receptor and endogenous TGF- $\beta$  in HRP-1 and RCHO-1 cells. The present data indicate

that both HRP-1 and RCHO-1 cells express TGF- $\beta$  receptors and TGF- $\beta$  isoforms. Further the results suggest a possible autocrine and/or paracrine action for TGF- $\beta$  in rat placental cell lines. Therefore, these cells offer an excellent model to study the impact of TGF- $\beta$  isoforms on the regulation of placental cell invasion during the implantation process and/or later during pregnancy.

Smad proteins are downstream effectors of the transforming growth factor- $\beta$  superfamily [29]. To test whether TGF- $\beta$  modulates Smad activation through phosphorylation in placental cells, we treated HRP-1 and RCHO-1 cells with different TGF- $\beta$  isoforms. Our results showed that upon TGF- $\beta$  treatment Smad2 and Smad3 were phosphorylated suggesting that the TGF- $\beta$  pathway is active in these cells. We have earlier highlighted the importance of the Smad pathway in TGF- $\beta$  induced cellular invasiveness in endometrial cancer cells [30]. It was logical to suggest that the similar pathway could be involved in the increased invasiveness of trophoblast cells.

Given the fact that MAPKs regulate almost all cellular activities, it was therefore not surprising that these enzymes also control cell invasion/migration. Moreover, TGF- $\beta$  activates non-Smad pathways, including the three distinct MAP kinase pathways: the Erk, c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 MAP kinase pathways [31-33]. The results of the present study also showed that upon TGF- $\beta$  treatment ERK and p38 MAPK pathways were triggered in the form of increased phosphorylation. Previously, these pathways were shown to regulate migration in different cell types using multiple mechanisms including phosphorylation of the focal adhesion adaptor paxillin [34], activation of myosin light chain kinase [35], upregulation of MMP-9 [36] and processing of MMP-2 [37]. As both cell lines (HRP-1 and RCHO-1) express endogenous TGF- $\beta$ , this could explain why Smad2, p38 MAPK and p44/42 are constitutively phosphorylated in these cells.

We further examined the effect of TGF- $\beta$  isoforms on HRP-1 and RCHO-1 cell growth. MTT proliferation assays revealed a growth suppressive effect on HRP-1 placental cell lines. In a previous report TGF- $\beta$ 1 has been shown to be able to reduce RCHO-1 cell proliferation after 8 days of culture [38]. Previously, members of Src family kinases (SFKs) were found to be involved in human trophoblast differentiation [39]. In the current study, although we could see a trend towards growth inhibition, we did not see a significant inhibitory effect of either TGF- $\beta$  isoforms at the same dose used in the previous study and this may be explained by the short exposure time (48h) to TGF- $\beta$  isoforms. It is well known that trophoblast cells differentiate into extravillous trophoblast in order to invade the endometrium. Moreover, inhibition in cell proliferation and apoptosis is a pre-requisite for any cell to differentiate. Given the timing of trophoblast invasion in rats which is between day 6 and day 7, the growth inhibitory effect of TGF- $\beta$  on trophoblastic cells in our study suggest that and this differentiation process could be more pronounced with TGF- $\beta$  treatment. A longer period of treatment with TGF- $\beta$ s is probably necessary to induce a significant growth inhibition. In order to verify if apoptosis is involved in this phenomenon, we performed Hoechst nuclear staining and caspase-3 cleavage measurement and our results showed that TGF- $\beta$  isoforms were unable to trigger apoptosis. In a previous study, we have reported the growth suppressive effect of TGF- $\beta$  in endometrial cells [30]. The latter study highlighted the involvement of XIAP in the growth inhibitory effect of TGF- $\beta$ ; nonetheless, this supports our recent findings that TGF- $\beta$  could be involved in inhibiting trophoblast cell growth.

Throughout these years TGF- $\beta$  isoforms have been widely studied in association with cancer progression and metastases [40, 41], there is limited information on their role in trophoblast invasion. Our results showed that TGF- $\beta$  2 and TGF- $\beta$ 3 increases the invasiveness of HRP-1 cells while RCHO-1 invasiveness was not influenced by TGF- $\beta$  isoforms. Although we have previously reported that TGF- $\beta$  isoforms differ in their ability to regulate invasive

behavior, as only TGF- $\beta$ 3 could increase the invasiveness of endometrial cancer cells [30]. This is, however, the first evidence of an increased invasive phenotype of placental cells by TGF- $\beta$  isoforms. On the contrary, others have reported an inhibition of trophoblast cell invasion by TGF- $\beta$  isoforms [14, 42]. This discrepancy could be well explained by the fact that these authors have used a lower dose of TGF- $\beta$  to treat the trophoblast cells. Furthermore in these studies the trophoblast cells were derived from placental explants obtained from humans and the difference could arise from species specificity as reviewed in [17]. During implantation in rats, the luminal epithelium forms an invagination to surround the trophoblast whereas in humans interstitial implantation occurs where the trophoblast passes through the luminal epithelium to invade the endometrial stroma and become imbedded into the wall of the uterus.

In conclusion, this study suggests for the first time that not only the isoforms of TGF- $\beta$  have a different role on the ability of trophoblast invasion, but they also activate the cellular signaling pathways such as Smad, ERK and p38 MAPK in these two placental cells line. Further studies are needed to determine the impact of Smad, ERK and p38 MAPK pathway in trophoblast and placental cell invasion. This study also provide evidence that the RCHO-1 cell line is a valuable model to study trophoblast invasion *in vitro* and further analyses are required to determine the molecular mechanisms involved in TGF- $\beta$ -regulated invasion. The HRP-1 placental stem cell line also represents an important model to further study the role of TGF- $\beta$ -regulated placental development.

## References

1. Hill JA. Maternal-embryonic cross-talk. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 943:17-25.
2. Spencer TE, Bazer FW. Biology of progesterone action during pregnancy recognition and maintenance of pregnancy. *Front Biosci* 2002; 7:d1879-1898.
3. Herpin A, Lelong C, Favrel P. Transforming growth factor-beta-related proteins: an ancestral and widespread superfamily of cytokines in metazoans. *Dev Comp Immunol* 2004; 28:461-485.
4. Khalil N. TGF-beta: from latent to active. *Microbes Infect* 1999; 1:1255-1263.
5. Bierie B, Moses HL. Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6:506-520.
6. Massague J, Blain SW, Lo RS. TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 2000; 103:295-309.
7. Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003; 113:685-700.
8. Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science* 2002; 298:1912-1934.
9. Miyazono K. TGF-beta signaling by Smad proteins. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000; 11:15-22.
10. Zhang YE. Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res* 2009; 19:128-139.
11. Pollheimer J, Knofler M. Signalling pathways regulating the invasive differentiation of human trophoblasts: a review. *Placenta* 2005; 26 Suppl A:S21-30.
12. Shooner C, Caron PL, Frechette-Frigon G, Leblanc V, Dery MC, Asselin E. TGF-beta expression during rat pregnancy and activity on decidual cell survival. *Reprod Biol Endocrinol* 2005; 3:20.
13. Simpson H, Robson SC, Bulmer JN, Barber A, Lyall F. Transforming growth factor beta expression in human placenta and placental bed during early pregnancy. *Placenta* 2002; 23:44-58.
14. Lash GE, Otun HA, Innes BA, Bulmer JN, Searle RF, Robson SC. Inhibition of trophoblast cell invasion by TGFB1, 2, and 3 is associated with a decrease in active proteases. *Biol Reprod* 2005; 73:374-381.

15. Caniggia I, Grisaru-Gravrosky S, Kuliszewsky M, Post M, Lye SJ. Inhibition of TGF-beta 3 restores the invasive capability of extravillous trophoblasts in preeclamptic pregnancies. *J Clin Invest* 1999; 103:1641-1650.
16. Belkacemi L, Lash GE, Macdonald-Goodfellow SK, Caldwell JD, Graham CH. Inhibition of human trophoblast invasiveness by high glucose concentrations. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:4846-4851.
17. Lee KY, DeMayo FJ. Animal models of implantation. *Reproduction* 2004; 128:679-695.
18. Soares MJ, Schaberg KD, Pinal CS, De SK, Bhatia P, Andrews GK. Establishment of a rat placental cell line expressing characteristics of extraembryonic membranes. *Dev Biol* 1987; 124:134-144.
19. Hunt JS, Deb S, Faria TN, Wheaton D, Soares MJ. Isolation of phenotypically distinct trophoblast cell lines from normal rat chorioallantoic placentas. *Placenta* 1989; 10:161-177.
20. Faria TN, Soares MJ. Trophoblast cell differentiation: establishment, characterization, and modulation of a rat trophoblast cell line expressing members of the placental prolactin family. *Endocrinology* 1991; 129:2895-2906.
21. Pijnenborg R. Implantation and immunology: maternal inflammatory and immune cellular responses to implantation and trophoblast invasion. *Reprod Biomed Online* 2002; 4 Suppl 3:14-17.
22. Xu G, Chakraborty C, Lala PK. Reconstitution of Smad3 restores TGF-beta response of tissue inhibitor of metalloprotease-1 upregulation in human choriocarcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 300:383-390.
23. De SK, Larsen DB, Soares MJ. Trophoendodermal stem cell-derived extracellular matrices: absence of detectable entactin and presence of multiple laminin species. *Placenta* 1995; 16:701-718.
24. Enders AC, Welsh AO. Structural interactions of trophoblast and uterus during hemochorial placenta formation. *J Exp Zool* 1993; 266:578-587.
25. Gardner RL, Beddington RS. Multi-lineage 'stem' cells in the mammalian embryo. *J Cell Sci Suppl* 1988; 10:11-27.
26. Peters TJ, Albieri A, Bevilacqua E, Chapman BM, Crane LH, Hamlin GP, Seiki M, Soares MJ. Differentiation-dependent expression of gelatinase B/matrix metalloproteinase-9 in trophoblast cells. *Cell Tissue Res* 1999; 295:287-296.
27. Sahgal N, Canham LN, Canham B, Soares MJ. Rcho-1 trophoblast stem cells: a model system for studying trophoblast cell differentiation. *Methods Mol Med* 2006; 121:159-178.

28. Sahgal N, Canham LN, Konno T, Wolfe MW, Soares MJ. Modulation of trophoblast stem cell and giant cell phenotypes: analyses using the Rcho-1 cell model. *Differentiation* 2005; 73:452-462.
29. Schiller M, Javelaud D, Mauviel A. TGF-beta-induced SMAD signaling and gene regulation: consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing. *J Dermatol Sci* 2004; 35:83-92.
30. Van Themsche C, Mathieu I, Parent S, Asselin E. Transforming growth factor-beta3 increases the invasiveness of endometrial carcinoma cells through phosphatidylinositol 3-kinase-dependent up-regulation of X-linked inhibitor of apoptosis and protein kinase c-dependent induction of matrix metalloproteinase-9. *J Biol Chem* 2007; 282:4794-4802.
31. Hocevar BA, Brown TL, Howe PH. TGF-beta induces fibronectin synthesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent, Smad4-independent pathway. *EMBO J* 1999; 18:1345-1356.
32. Adachi-Yamada T, Nakamura M, Irie K, Tomoyasu Y, Sano Y, Mori E, Goto S, Ueno N, Nishida Y, Matsumoto K. p38 mitogen-activated protein kinase can be involved in transforming growth factor beta superfamily signal transduction in Drosophila wing morphogenesis. *Mol Cell Biol* 1999; 19:2322-2329.
33. Atfi A, Djelloul S, Chastre E, Davis R, Gespach C. Evidence for a role of Rho-like GTPases and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK) in transforming growth factor beta-mediated signaling. *J Biol Chem* 1997; 272:1429-1432.
34. Huang C, Jacobson K, Schaller MD. A role for JNK-paxillin signaling in cell migration. *Cell Cycle* 2004; 3:4-6.
35. Cho SY, Klemke RL. Extracellular-regulated kinase activation and CAS/Crk coupling regulate cell migration and suppress apoptosis during invasion of the extracellular matrix. *J Cell Biol* 2000; 149:223-236.
36. Turchi L, Chassot AA, Bourget I, Baldescchi C, Ortonne JP, Meneguzzi G, Lemichez E, Ponzio G. Cross-talk between RhoGTPases and stress activated kinases for matrix metalloproteinase-9 induction in response to keratinocytes injury. *J Invest Dermatol* 2003; 121:1291-1300.
37. Takino T, Miyamori H, Watanabe Y, Yoshioka K, Seiki M, Sato H. Membrane type 1 matrix metalloproteinase regulates collagen-dependent mitogen-activated protein/extracellular signal-related kinase activation and cell migration. *Cancer Res* 2004; 64:1044-1049.
38. Hamlin GP, Soares MJ. Regulation of deoxyribonucleic acid synthesis in proliferating and differentiating trophoblast cells: involvement of transferrin, transforming growth factor-beta, and tyrosine kinases. *Endocrinology* 1995; 136:322-331.

39. Daoud G, Rassart E, Masse A, Lafond J. Src family kinases play multiple roles in differentiation of trophoblasts from human term placenta. *J Physiol* 2006; 571:537-553.
40. Shigeoka Y, Igishi T, Matsumoto S, Nakanishi H, Kodani M, Yasuda K, Hitsuda Y, Shimizu E. Sulindac sulfide and caffeic acid phenethyl ester suppress the motility of lung adenocarcinoma cells promoted by transforming growth factor-beta through Akt inhibition. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004; 130:146-152.
41. Farina AR, Coppa A, Tiberio A, Tacconelli A, Turco A, Colletta G, Gulino A, Mackay AR. Transforming growth factor-beta1 enhances the invasiveness of human MDA-MB-231 breast cancer cells by up-regulating urokinase activity. *Int J Cancer* 1998; 75:721-730.
42. Graham CH. Effect of transforming growth factor-beta on the plasminogen activator system in cultured first trimester human cytotrophoblasts. *Placenta* 1997; 18:137-143.

**Table 1.** Primers for PCR amplification

Gene	Forward primer	Reverse primer	Tm	cycle	size (bp)
TGF- $\beta$ 1	gatagccatttcctcaccga	ggtggcggtcatgttaggagt	66	40	756
TGF- $\beta$ 2	gcgacgaagagactacgcc	ctccattgctgagacgtcaa	58	40	218
TGF- $\beta$ 3	ggtttccgcgtcaatgtgt	gcagttctcctccaagttgc	58	40	556
TGF- $\beta$ RI	tcaggaagtggctctggct	cgtttccctgaaccatgact	59	36	180
TGF- $\beta$ RII	atgacctggctaacagtgg	gccatggagtagacatcggt	58	36	121
GAPDH	ccattttccacccatgt	gtctggatggaattgtgag	58	25	265

### Figure Legend

**Figure 1: TGF- $\beta$  receptor and TGF- $\beta$  isoforms in HRP-1 and RCHO-1 cells.** TGF- $\beta$  receptors transcript levels (A) and protein levels (B) were measured by RT-PCR and western blot analysis respectively. Endogenous TGF- $\beta$  (C) transcript levels in HRP-1 and RCHO-1 cells. Total RNA from MCF-7 cells was used as positive control (C+). GAPDH and  $\beta$ -actin was included as a loading control. The results shown are representative of three independent experiments.

**Figure 2: Smad signaling is activated in TGF- $\beta$  treated HRP-1 and RCHO-1 trophoblastic cells.** The levels of total Smad2, total Smad3 and phosphorylated Smad2 and Smad3 protein were analyzed by western blotting in HRP-1 (A) and RCHO-1 (B) cells treated for 1h with the three TGF- $\beta$  isoforms at a concentration of 1ng/ml or 10ng/ml.  $\beta$ -actin was used as a loading control. The results shown are representative of three independent experiments.

**Figure 3: Time course activation of p38 MAPK and ERK pathways in HRP-1 and RCHO-1 cells.** Phosphorylated p38 MAPK and p44/42 ERK protein level were measured in trophoblastic cells after treatment with 10ng/ml TGF- $\beta$ 1 for the indicated times (15min to 24h) using western blotting.  $\beta$ -actin was used as a loading control. The results shown are representative of three independent experiments.

**Figure 4: Effect of TGF- $\beta$  isoforms on HRP-1 and RCHO-1 cell proliferation.** Cell proliferation rate were measured using the MTT assay. Cells were treated with 0ng/ml, 0.1ng/ml, 1ng/ml and 10ng/ml TGF- $\beta$  isoforms in HRP-1 cells for 24h (A) or 48h (B) and in RCHO-1 cells for 24h (C) or 48h (D). The results are the mean  $\pm$  SEM of eight independent experiments, each performed in duplicate. \*P < 0.05 compared to untreated cells.

**Figure 5: Inhibition of Smad receptor or MAPK signaling pathway in TGF- $\beta$ -treated HRP-1 cell proliferation.** HRP-1 cellular proliferation was assessed using MTT

proliferation assay. Cells were pre-treated with SB431542 (A) or PD98059 (B) for 1h followed by treatment with 10ng/ml TGF- $\beta$  isoforms for 48h. Mock group received equal amount of vehicle (DMSO). The results are the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments, each performed in duplicate. \* P < 0.05 compared to untreated cells.

**Figure 6: TGF- $\beta$  has no effect on apoptosis in both HRP-1 and RCHO-1 cells.** The apoptotic effect of TGF- $\beta$  isoforms on HRP-1 and RCHO-1 was determined by treatment with 0ng/ml, 0.1ng/ml, 1ng/ml and 10ng/ml TGF- $\beta$  isoforms for 24h, followed by nuclear staining with Hoechst dye. Apoptotic and non-apoptotic cells were counted under a fluorescent microscope. The results are presented as the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments.

**Figure 7: Invasiveness of placental cells is selectively increased by TGF- $\beta$  isoforms.** The effect of TGF- $\beta$  isoforms (1ng/ml) on the invasive capacity of HRP-1 (A) and RCHO-1 (B) cells was determined using the Matrigel invasion assay. The results are presented as the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments, each performed in duplicate. \* P < 0.05 compared to untreated cells.

Fig.1

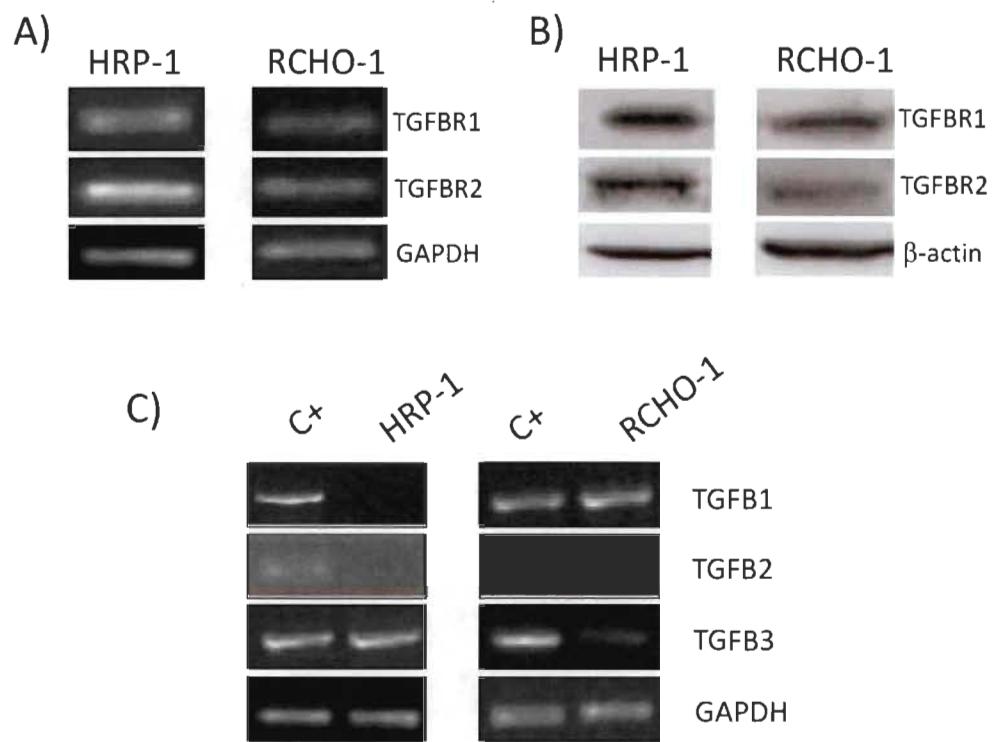
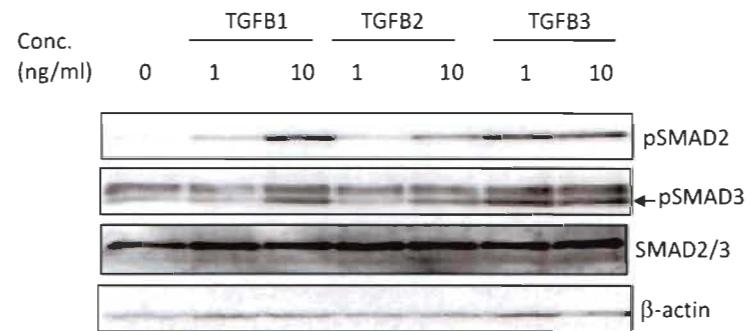


Fig.2

A)



B)

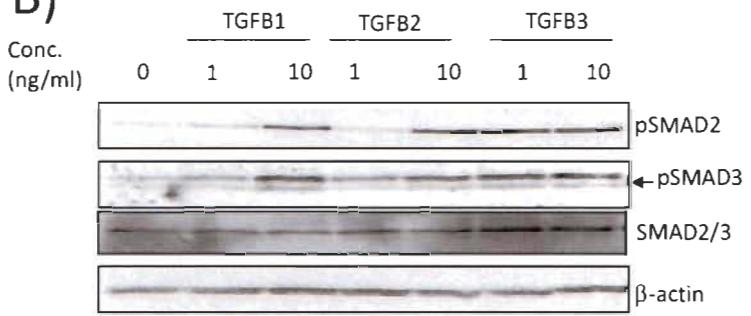


Fig.3

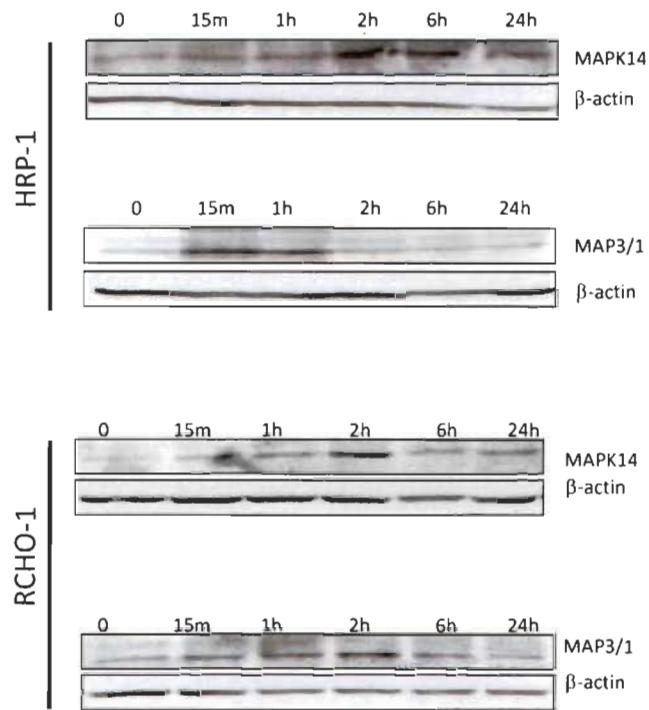


Fig.4

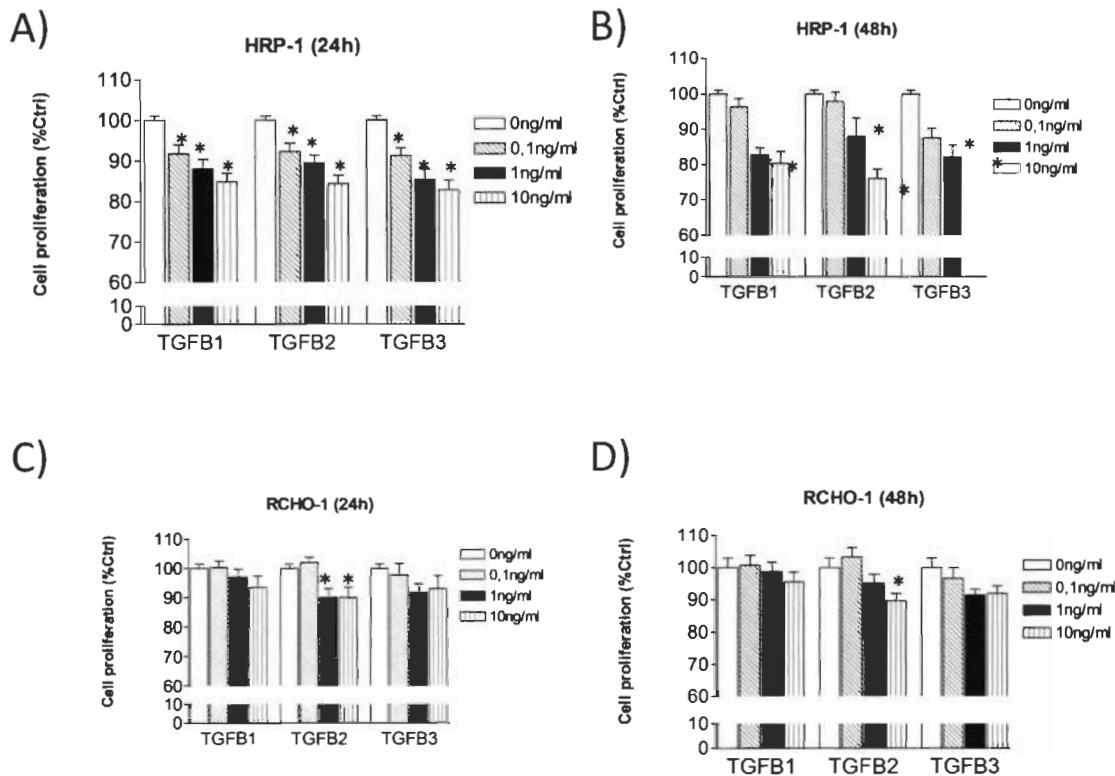


Fig.5

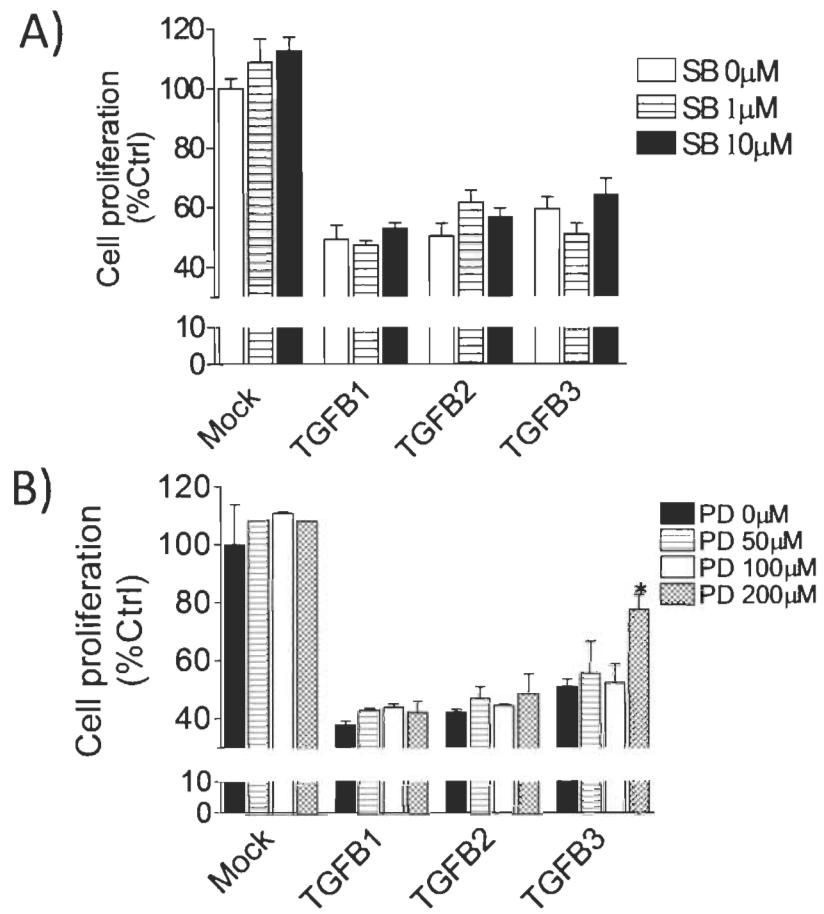


Fig.6

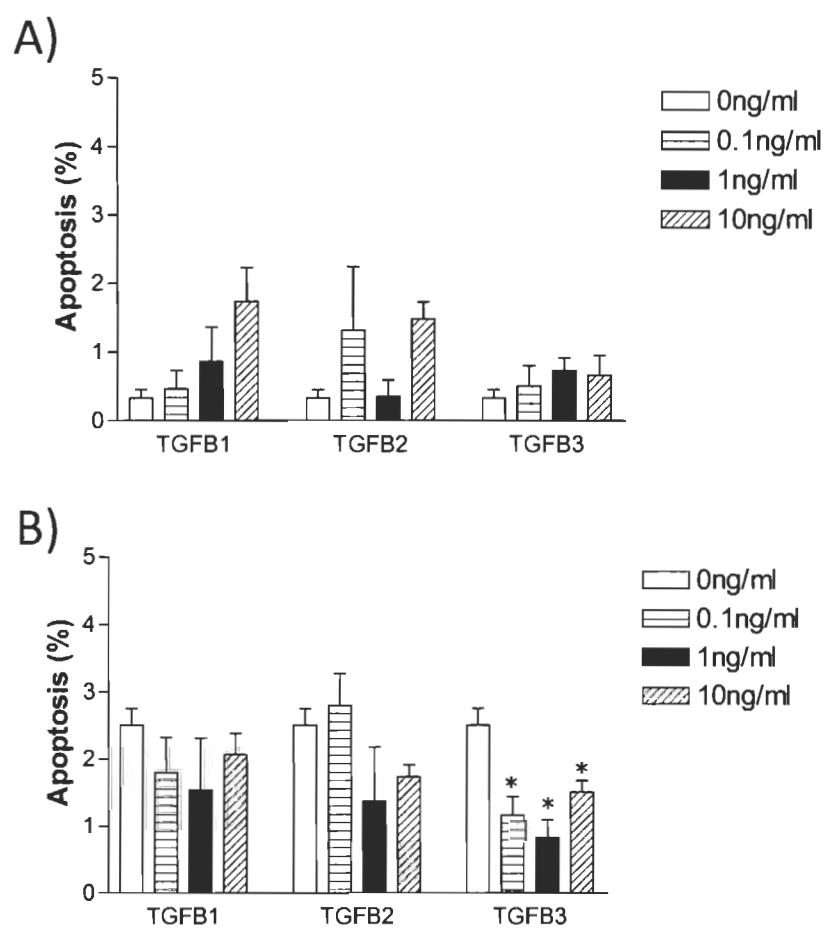
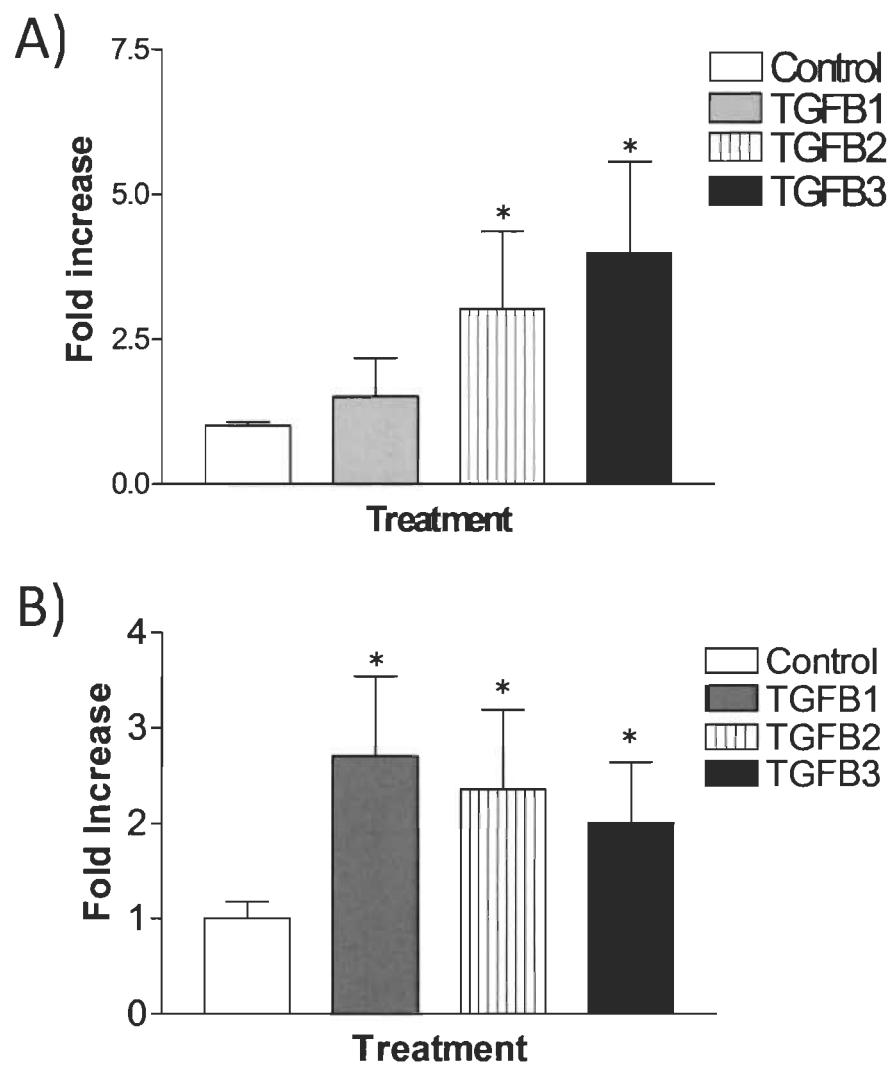


Fig.7



## CHAPITRE 3

### DISCUSSION ET CONCLUSION

#### 3.1 Discussion

Le succès d'une grossesse dépend de l'implantation de l'embryon dans la paroi utérine ainsi que de la perception de son existence par l'organisme maternel. Tout au long des phases menant à l'implantation, les cellules trophoblastiques sont exposées au fluide utérin riche en facteurs de croissance, en cytokines et en hormones [162]. Ces molécules jouent un rôle dans la modulation de l'invasion de l'endomètre par les trophoblastes. Bien que l'implantation soit une étape clé du processus reproductif chez de nombreuses espèces, l'implantation chez la femme est un processus unique et aucun autre mammifère ne peut reproduire un modèle d'implantation identique [61].

En plus des problèmes d'éthique concernant l'utilisation d'échantillons de tissu provenant de placenta humain, des difficultés au niveau de la culture de tels tissus peuvent être rencontrées. En effet, bien que les cellules primaires de cytotrophoblastes humains montrent un caractère invasif, il est très difficile de les utiliser pour la recherche sur l'invasion puisqu'elles se différencient spontanément en un phénotype endocrinien, perdant par le fait même leur caractère invasif. De plus, le fait qu'elles représentent généralement une population mixte de cellules trophoblastiques et non trophoblastiques entraîne des problèmes d'interprétation [30]. Parmi les lignées cellulaires provenant de choriocarcinomes humains utilisées pour les tests d'invasion, on retrouve : JAR, JEG-3 et BeWo. Cependant, ces cellules seraient faiblement invasives et ne possèdent pas le phénotype invasif dépendant de la différenciation [117], contrairement aux cellules RCHO-1. Dans le cadre de notre étude, nous avons utilisé des cellules de trophoblastes ayant été établies à partir d'un extrait de placenta de rat, les cellules HRP-1, ainsi que les cellules RCHO-1, provenant d'un choriocarcinome de rat. Puisqu'elles expriment des caractéristiques propres aux cellules invasives, ces deux lignées cellulaires ont déjà été utilisées afin d'étudier la capacité d'invasion des trophoblastes [29;30;163]. Elles

constituent donc un bon modèle pour l'étude de l'implantation *in vitro*, puisque l'invasion de l'endomètre par les trophoblastes est une étape importante du processus.

Chez le rat et la souris, les cellules trophoblastiques situées à l'interface maternelle possèdent un phénotype unique, les TGCs. Ces dernières sont des cellules plurinucléées et correspondent à la forme de différenciation terminale de la voie extravilleuse au cours de l'embryogenèse et sont d'une haute importance pour l'implantation ainsi que la modulation de la placentation post-implantation [164]. Au début de la gestation, les TGCs médient l'attachement et l'invasion du blastocyste dans l'épithélium utérin. Les cellules RCHO-1 sont bien établies comme étant un modèle pour l'étude de la différenciation cellulaire puisqu'elles reproduisent de nombreux aspects de la différenciation des TGCs [31], et les résultats actuels soutiennent l'hypothèse que le TGF- $\beta$  pourrait être un facteur impliqué dans ce processus. De plus, il a été démontré que durant les différents stades menant à la différenciation des cellules RCHO-1 en TGCs, la capacité d'invasion de même que les niveaux de MMP-9 ont été augmentés [30].

Il est connu que différents isoformes du TGF- $\beta$  sont exprimés par l'utérus lors de la grossesse [136] et plusieurs études suggèrent que le TGF- $\beta$  a un rôle à jouer dans l'invasion de l'endomètre [112;165;166]. Par conséquent, dans le cadre de cette étude, nous voulions déterminer l'effet de chacun des isoformes du TGF- $\beta$  sur la capacité d'invasion des cellules trophoblastiques. Notre étude est la première à démontrer que le TGF- $\beta$  a la capacité d'augmenter le caractère envahissant des trophoblastes. Plus précisément, le TGF- $\beta$ 2 et le TGF- $\beta$ 3 augmentent la capacité d'invasion des cellules HRP-1 alors que la capacité d'invasion des cellules RCHO-1 est augmentée en réponse aux trois isoformes du TGF- $\beta$ .

Afin que le TGF- $\beta$  puisse exercer ses fonctions, son récepteur doit être présent au niveau de la cellule cible. Nous avons débuté cette étude en déterminant l'expression des récepteurs du TGF- $\beta$  chez les cellules HRP-1 et RCHO-1. Il a été observé que les deux lignées cellulaires expriment les deux types de récepteurs du TGF- $\beta$ , qui une fois sous forme de dimère, sont nécessaires à la liaison de la cytokine et par conséquent, à

l'activation des voies de signalisation cellulaire telles que la voie des Smads. La présence du T $\beta$ R-III, qui agirait en tant que présentateur du TGF- $\beta$  (plus particulièrement du TGF- $\beta$ 2) au T $\beta$ R-II, n'a pas été vérifiée. De plus, la présence de TGF- $\beta$  endogène a aussi été détectée chez les deux lignées cellulaires. Par conséquent, les cellules HRP-1 et RCHO-1 constituent un bon modèle afin d'étudier l'impact *in vitro* du TGF- $\beta$  sur la capacité d'invasion des cellules trophoblastiques au moment de l'implantation. *In vivo*, nous pourrions déterminer l'impact du TGF- $\beta$  sur la capacité d'invasion des cellules trophoblastiques, et par conséquent de l'embryon, par injection de TGF- $\beta$  dans l'utérus de souris ou de rates gestantes par rapport à des souris n'ayant pas reçu de traitement avec le TGF- $\beta$ .

Comme nous l'avons mentionné précédemment, les trois isoformes du TGF- $\beta$  sont produits en différentes quantités par le placenta et l'utérus lors de la grossesse. Les résultats que nous avons obtenus dans la présente étude suggèrent que le TGF- $\beta$  pourrait agir de manière autocrine et paracrine en tant que régulateur de différents processus cellulaires tels que la prolifération et l'invasion, et ce en activant différentes voies de signalisation cellulaire. La voie de signalisation principale du TGF- $\beta$ , la voie des Smads, est l'une des voies qui pourrait être impliquée dans ces processus.

Les protéines Smads agissent en tant que molécules de signalisation, transmettant les signaux du TGF- $\beta$  de la surface cellulaire jusqu'au noyau. Afin de vérifier si le TGF- $\beta$  module l'activation de la voie des Smads par la phosphorylation dans les cellules trophoblastiques, nous avons traité les cellules HRP-1 et RCHO-1 avec les différents isoformes du TGF- $\beta$ . Nos résultats montrent que les protéines Smad2 et Smad3 sont phosphorylées suite au traitement avec le TGF- $\beta$ , suggérant que la voie canonique du TGF- $\beta$  est active dans ces cellules. Nous avons aussi observé que chacun des isoformes active différemment la voie des Smads chez les deux lignées cellulaires. Ceci pourrait être expliqué par le fait que les cellules HRP-1 et RCHO-1 produisent toutes deux du TGF- $\beta$  sous forme endogène. De plus, nous avons déjà mentionné que les trois isoformes du TGF- $\beta$  sont différent, et par conséquent ont des activités et effets propres à chacuns. Des études complémentaires devront être réalisées afin de déterminer le rôle

exact de chacun des isoformes pour ce qui est de la prolifération, l'apoptose, ainsi que l'invasion.

Par ailleurs, une étude a démontré que la voie des Smads est fonctionnelle chez deux lignées trophoblastiques humaines, les NPC et les JEG-3, des cellules normales de trophoblaste et des cellules de choriocarcinome respectivement [167]. Cette même étude a mis en évidence la fonction autocrine du TGF- $\beta$ 1 dans la régulation de l'expression des gènes. En effet, ils ont démontré que même en absence de TGF- $\beta$  exogène, il y avait de l'activité transcriptionnelle dans les cellules JEG-3 et que cette activité était augmentée par la surexpression de Smad2, Smad3 et Smad4, mais était diminuée par la surexpression de Smad7. L'ARNm de TGF- $\beta$ 1 de même que des niveaux protéiques ont aussi été détectés dans les cellules JEG-3. Par contre, les gènes endogènes ciblés par le TGF- $\beta$ 1 et la voie des Smads restent à identifier [167].

Notre étude nous a aussi permis de constater que les niveaux de Smad3 étaient indétectables dans les cellules RCHO-1. Une étude effectuée par l'équipe de Xu et al. a démontré que chez des lignées humaines de choriocarcinomes (JAR et JEG-3), la présence de Smad3 n'a pu être détectée, autant au niveau des protéines que de l'ARNm, comparativement à des lignées trophoblastiques normales ou précancéreuses [168]. Chez des fibroblastes humains, le TGF- $\beta$  régule l'expression de TIMP-1 grâce à la voie de Smad3 [169]. La régulation à la hausse de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 (PAI-1 : *Plasminogen activator inhibitor-1*) est aussi régulé via Smad3, dont la présence est essentielle pour l'activation du promoteur de PAI-1 par le TGF- $\beta$  par le biais des sites de fixation Sp1 [170]. Bien que les cellules JAR et JEG-3 contiennent les gènes de TIMP-1 et de PAI-1, le manque de Smad3 au niveau des protéines et de l'ARNm dans ces cellules pourrait prévenir la régulation à la hausse de PAI-1 et TIMP-1 par le TGF- $\beta$ . Ce qui pourrait expliquer la perte de l'effet anti-invasif du TGF- $\beta$  chez ces cellules [168].

Nous avons précédemment souligné l'importance de la voie des Smads, induite suite à un traitement au TGF- $\beta$ , dans la capacité d'invasion des cellules du cancer de l'endomètre [14]. Par conséquent, il était logique de penser que cette voie pourrait aussi

être impliquée dans l'augmentation de la capacité d'invasion des cellules trophoblastiques.

En plus de la voie des Smads, le TGF- $\beta$  active les trois voies distinctes des MAP kinases soit : la voie de ERK, la voie de c-Jun N-terminal kinase (JNK) et la voie p38 MAP kinase [171-173]. Les voies de signalisation de la famille des MAPK font parties des voies de signalisation cellulaire les plus conservées au cours de l'évolution. Lorsque l'on prend en considération que les MAPK sont activées par un très grand nombre de stimuli extracellulaires et qu'elles régissent presque toutes les activités cellulaires, il n'est alors pas surprenant de penser que ces enzymes puissent également contrôler l'invasion et la migration de plusieurs cellules, dont les trophoblastes.

Les résultats obtenus lors de notre étude ont montré que suite au traitement avec le TGF- $\beta$ , les niveaux de phosphorylation des protéines p38 MAPK et p44/42 (ERK 1/2) des cellules HRP-1 et RCHO-1 sont considérablement augmentés, démontrant par le fait même qu'autant la voie de p38 MAPK que la voie de ERK ont été activées chez ces cellules. Précédemment, il a été démontré que ces voies sont impliquées dans la régulation de la migration de différents types cellulaires, et ce par différents mécanismes tels que la phosphorylation de l'adaptateur d'adhésion focal paxilline [174], l'activation de la kinase des chaînes légères de myosine [175;176], la régulation positive de MMP-9 [177] ainsi que l'activité de MMP-2 [178]. Il est par ailleurs intéressant de noter que l'activation de la voie de ERK a été détectée dans des cellules trophoblastiques intermédiaires, un phénotype invasif [179].

De plus, nous avons observé que les cellules HRP-1 et RCHO-1 expriment du TGF- $\beta$  endogène. Ce pourrait être une explication au fait que les protéines Smad2, Smad3, p38 MAPK et p44/42 (ERK) sont phosphorylées de façon constitutive, mais à un faible niveau, dans les deux lignées cellulaires.

Le TGF- $\beta$  est connu pour avoir un effet antiprolifératif chez plusieurs lignées cellulaires en empêchant la phosphorylation de Rb, entraînant ainsi l'arrêt de progression du cycle cellulaire, les cellules demeurant alors en phase G1 du cycle

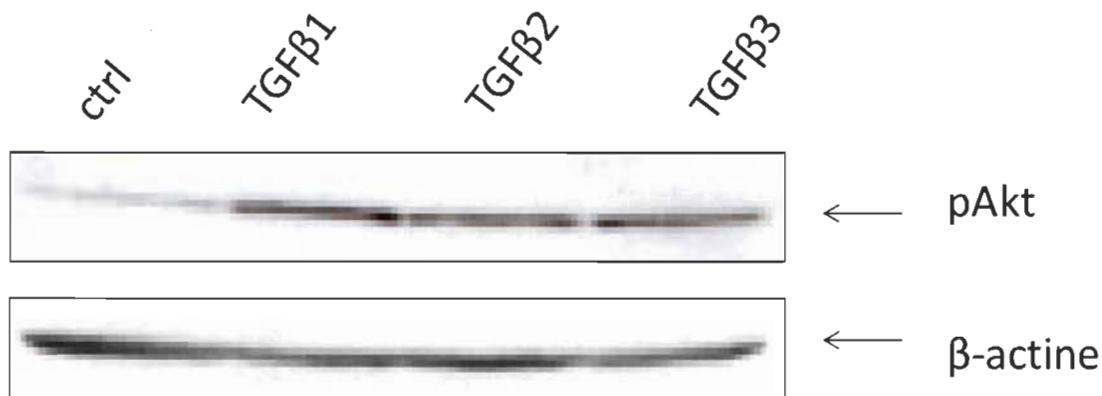
[180;181]. En analysant le rôle du TGF- $\beta$  sur la croissance des cellules trophoblastiques, nous avons observé que les trois isoformes du TGF- $\beta$  inhibent la prolifération des cellules HRP-1, tandis que les cellules RCHO-1 sont résistantes à l'effet antiprolifératif des trois isoformes du TGF- $\beta$ . Des études ont par ailleurs déjà démontré la résistance à l'effet antiprolifératif chez des cellules anormales humaines, soit JAR et JEG-3 [117]. Une des explications qui a été proposée afin d'expliquer cette différence au niveau de la prolifération des cellules normales et anormales est que le type ainsi que la distribution des récepteurs du TGF- $\beta$  peut différencier selon les cellules [117]. Notre étude nous a permis de voir que les deux types de récepteurs sont présents chez les deux lignées cellulaires, mais les cellules HRP-1 semblent les exprimer plus fortement. D'autre part, parmi les mécanismes proposés afin d'expliquer cette résistance des cellules face à l'effet antiprolifératif du TGF- $\beta$ , on retrouve une faible expression ou une mutation du récepteur du TGF- $\beta$ , de Smad2 ou Smad4 ou alors une surexpression des protéines I-Smad [182].

De plus, afin de vérifier que l'apoptose n'était pas la cause de cette diminution de croissance, nous avons effectué un test de coloration des noyaux cellulaires au Hoechst et nous avons procédé à l'analyse des niveaux de caspase-3 clivée. Nos résultats démontrent que le TGF- $\beta$  n'induit pas d'apoptose de façon significative chez les deux lignées cellulaires. Au contraire, chez les cellules RCHO-1, le TGF- $\beta$  a diminué de façon significative le pourcentage de cellules apoptotiques comparativement au contrôle. Il a par ailleurs été démontré que la voie de survie cellulaire PI3K/Akt est active chez les cellules RCHO-1 [108].

Une étude effectuée précédemment dans notre laboratoire a démontré l'effet antiprolifératif du TGF- $\beta$  chez des cellules endométriales [14]. De plus, ces cellules étaient résistantes à l'effet pro-apoptotique du TGF- $\beta$ . Cette même étude nous a permis de démontrer l'implication de XIAP, protéine inhibitrice de l'apoptose liée au chromosome X, dans l'effet antiprolifératif du TGF- $\beta$ , supportant ainsi nos résultats démontrant que le TGF- $\beta$  pourrait être impliqué dans l'inhibition de la croissance des trophoblastes.

Plus précisément, ces cellules endométriales sont résistantes à l'effet pro-apoptotique du TGF- $\beta$ 3 grâce à la régulation à la hausse de XIAP, via l'activation de la voie de la PI3K/Akt. L'expression de XIAP dans ces cellules est modulée par chacun des isoformes du TGF- $\beta$  et une augmentation dans son expression confère une résistance à l'effet pro-apoptotique induit par le TGF- $\beta$ . Puisque la voie de la PI3K/Akt est aussi active chez les cellules RCHO-1, il est possible que dans ce cas-ci, XIAP ait aussi un rôle à jouer dans l'inhibition de l'apoptose induite par le TGF- $\beta$ .

Des études préliminaires effectuées chez les cellules HRP-1 nous ont permis de constater qu'en plus d'être active chez les cellules RCHO-1, tel que démontré par l'équipe de Kamei et al. [108], la voie de la PI3K/Akt est aussi activée par le TGF- $\beta$  dans les cellules HRP-1. À la figure 3.1, les cellules HRP-1 ont été traitées avec les trois isoformes du TGF- $\beta$ , à une concentration de 10ng/ml, pour une période de 24h. Des études supplémentaires devront être effectuées pour confirmer que chez les cellules HRP-1, les trois isoformes du TGF- $\beta$  modulent la phosphorylation d'Akt de manière similaire. De plus, il reste à déterminer l'effet de chacun des isoformes du TGF- $\beta$  sur la phosphorylation d'Akt dans les cellules RCHO-1.



**Figure 3.1 Modulation de la phosphorylation d'Akt dans les cellules HRP-1**

Les cellules HRP-1 furent traitées avec les différents isoformes du TGF- $\beta$  (10 ng/ml) pour une période de 24 heures. La protéine d'intérêt pAkt a été détectée par immunobuvardage de type Western avec un anticorps spécifique. Ce test préliminaire a été réalisé une fois (n=1).

L'inhibition de la prolifération cellulaire ainsi que l'apoptose sont des pré-requis à la différenciation cellulaire. Il est par ailleurs bien connu que les trophoblastes se différencient en trophoblaste extravilleux afin d'envahir l'endomètre et ce processus de différenciation pourrait être accentué avec le traitement des cellules au TGF- $\beta$  [183;184].

Différentes voies de signalisation cellulaire reconnues comme ayant un rôle à jouer dans la prolifération cellulaire, la différenciation ainsi que la motilité, trois processus essentiels menant à une placentation adéquate, sont activées par le TGF- $\beta$  chez les cellules trophoblastiques. L'effet de deux inhibiteurs sur la prolifération des cellules HRP-1 a été évalué lors de cette étude. Le PD98059 inhibiteur de MEK1 et par conséquent de la voie de ERK, ainsi que le SB431542, qui est un inhibiteur de ALK5 (activin receptor-like kinase 5), soit le T $\beta$ R-I, agissant sur l'activation de la voie des Smads. Suite à l'inactivation de ces deux voies de signalisation cellulaire, nous avons effectué un test de prolifération cellulaire. Les résultats que nous avons obtenus nous permettent de penser que la voie de ERK pourrait être partiellement impliquée dans le contrôle de la prolifération cellulaire puisque l'on observe qu'après 48h d'exposition au TGF- $\beta$ 3, son effet antiprolifératif est renversé partiellement lorsque celle-ci est bloquée. Par contre, la voie des Smads semble n'avoir aucun impact sur la prolifération des cellules HRP-1, puisque même lorsque cette dernière est inactivée, le TGF- $\beta$  est tout de même en mesure d'induire un effet antiprolifératif. Il est possible que la voie des Smads ait plutôt un rôle à jouer dans la motilité/invasion ou la différenciation des cellules HRP-1. Des études supplémentaires seront nécessaires afin de déterminer l'implication de la voie des Smads dans l'invasion des cellules HRP-1 et RCHO-1.

Bien que depuis plusieurs années le TGF- $\beta$  a été largement étudié en lien avec la progression du cancer et des métastases [185;186], son rôle dans l'invasion du trophoblaste est encore mal compris. Les tests d'invasion sur Matrigel nous ont permis de démontrer que le TGF- $\beta$ 2 et le TGF- $\beta$ 3 augmentent le caractère envahissant des cellules HRP-1 tandis que les trois isoformes du TGF- $\beta$  possèdent la capacité d'augmenter celui des cellules RCHO-1. Bien que les isoformes du TGF- $\beta$  partagent 80% d'homologie, chacun des isoformes du TGF- $\beta$  est différent dans sa capacité à

réguler le caractère envahissant des cellules. Une étude ayant été effectuée récemment dans notre laboratoire nous a permis de démontrer que seul le TGF- $\beta$ 3 pourrait augmenter le caractère invasif des cellules du cancer de l'endomètre [14].

La présente étude est la première à démontrer que le TGF- $\beta$  peut augmenter le caractère envahissant des cellules trophoblastiques. D'autres études ont au contraire rapporté une diminution de l'invasion des cellules trophoblastiques par les isoformes du TGF- $\beta$  [112;187]. Cette différence pourrait bien s'expliquer par le fait que ces auteurs ont utilisé une dose plus faible de TGF- $\beta$  pour traiter les cellules trophoblastiques. De plus, les cellules trophoblastiques utilisées lors de ces études provenaient d'extraits de placenta humain et la différence pourrait donc provenir de la spécificité d'espèce.

Une étude effectuée précédemment par l'équipe de Graham et al. a permis de démontrer que la prolifération des trophoblastes, qui comme nous l'avons déjà mentionné constitue la première étape du processus d'invasion, était inhibée significativement lorsque ceux-ci étaient exposés au TGF- $\beta$ 1 ou au TGF- $\beta$ 2 et que cet effet pouvait être évité par l'addition d'anticorps neutralisant anti-TGF- $\beta$  [101]. De plus, ils ont montré que le TGF- $\beta$ 1 supprimait la capacité d'invasion des trophoblastes, alors que l'ajout d'anticorps neutralisant permettait de restaurer cette dernière en régulant à la baisse les TIMPs [111]. Les résultats observés lors de notre étude portent à croire que d'autres phénomènes encore inexplorés seraient impliqués dans le processus d'invasion puisque même si la prolifération des cellules HRP-1 est diminuée lors d'un traitement avec le TGF- $\beta$ , la capacité d'invasion des cellules peut tout de même être augmentée avec le TGF- $\beta$ 2 et le TGF- $\beta$ 3. Tel que mentionné auparavant, plusieurs voies de signalisation cellulaire sont activées par le TGF- $\beta$ . Il est possible que le TGF- $\beta$ 2 et le TGF- $\beta$ 3 activent spécifiquement une voie de signalisation cellulaire, telle que la PI3K/AKT et régule la capacité d'invasion des trophoblastes dépendamment de XIAP comme c'est le cas chez les cellules endométriales [14]. L'activation de la voie de ERK est impliquée dans la régulation de différents types cellulaires entre autre par la régulation positive de MMP-9 [131] ainsi que l'activité de MMP-2 [178]. Par ailleurs, nous savons que cette voie est active chez les lignées HRP-1 et RCHO-1. Ainsi, il est possible que l'activation de cette voie, soit par le TGF- $\beta$ 2 ou le TGF- $\beta$ 3 conduise à

l'augmentation de MMP-9 ou MMP-2, résultant en une augmentation de la capacité d'invasion des trophoblastes.

### 3.2 Nouvelles perspectives de recherche

Bien que cette étude a permis de faire avancer les recherches menant à la compréhension du phénomène de l'implantation de l'embryon et plus particulièrement de l'invasion de l'endomètre par les trophoblastes, des études supplémentaires devront être effectuées afin d'envisager un jour avoir des traitements pour les problèmes d'infertilité et d'avortements spontanés ou précoces.

Tout d'abord, il serait intéressant de vérifier l'effet des inhibiteurs de la voie des Smads et la voie de ERK sur la prolifération des cellules RCHO-1. Dans le même ordre d'idée, sachant que le TGF- $\beta$  active aussi la voie de p38 MAPK chez les deux lignées cellulaires, nous pourrions déterminer l'impact de celle-ci sur la prolifération cellulaire.

De plus, comme nous savons que le TGF- $\beta$  augmente le caractère envahissant des cellules HRP-1 et RCHO-1, nous pourrions déterminer si les voies activées dans celles-ci, telles que la voie des Smads, de p38 MAPK et ERK, ont un rôle à jouer dans ce processus.

Dans la présente étude, nous avons vérifié l'activation de différentes voies de signalisation chez les deux lignées de trophoblastes. Par contre, des études complémentaires sont nécessaires afin de déterminer s'il y a d'autres voies de signalisation qui sont activées par le TGF- $\beta$  dans ces deux lignées cellulaires de même que leur rôle sur la prolifération et la capacité d'invasion des cellules trophoblastiques.

Par ailleurs, il est connu que les MMPs et les TIMPs sont des régulateurs de l'invasion chez plusieurs types de cellules dont les trophoblastes. En effet, la dégradation et la reconstitution de la matrice extracellulaire de l'endomètre utérin est requis pour l'invasion des trophoblastes et est régulé par les MMPs. Au moins 21 MMPs ont été identifiés jusqu'à présent [188]. Parmi ceux-ci, le MMP-9 semble être celui qui a

un plus grand rôle à jouer dans l'invasion des trophoblastes. Des études ont déjà démontré que l'expression ainsi que l'activation de MMP-9 est un pré-requis et une étape limitante dans l'invasion des trophoblastes [189;190]. Dans les cas où l'expression de MMP-9 est déficiente ou inexistante, on remarque des difficultés dans le maintien de la grossesse ou dans la capacité de reproduction. Par conséquent, il serait intéressant de vérifier l'expression des MMPs et de leurs inhibiteurs dans les cellules HRP-1 et RCHO-1.

De plus, il serait intéressant de déterminer l'impact du TGF- $\beta$  sur l'activation de la voie PI3K/Akt ainsi que l'expression de XIAP chez les deux lignées cellulaires à l'étude.

Enfin, nous pourrions déterminer la capacité d'invasion des cellules trophoblastiques lorsqu'elles sont en co-culture avec des cellules épithéliales ou stromales de l'endomètre, puisque ces dernières sont en mesure de sécréter des cytokines et des molécules, telles que le LIF, l'expression d'intégrines, la mucine et autres, ayant un rôle à jouer dans la régulation de l'invasion de l'endomètre.

### 3.3 Conclusion

L'étude et la compréhension des mécanismes et phénomènes impliqués dans la grossesse constituent une étape importante dans le traitement des différents problèmes liés à l'infertilité ainsi qu'au maintien de la grossesse.

Les problèmes d'infertilité et d'accouchements prématurés touchent de plus en plus de couples de nos jours. La principale cause d'infertilité chez la femme est reliée à une mauvaise communication entre l'embryon et le tissu utérin au moment de l'implantation, causant des échecs d'implantation [11;12;191]. Dans 10% des cas, la cause demeure inconnue [9]. C'est pourquoi la poursuite de l'étude des mécanismes et phénomènes impliqués aux différentes étapes de l'implantation et plus précisément lors de l'invasion de l'endomètre est importante. Un meilleur contrôle de l'invasion permettrait de régler une partie des problèmes rencontrés au niveau de l'implantation.

Cette étude souligne l'implication du TGF- $\beta$  dans la capacité d'invasion de l'endomètre par les cellules trophoblastiques. De plus, l'activation des différentes voies de signalisation cellulaire par le TGF- $\beta$  semble avoir un rôle à jouer dans ce processus. Par son rôle sur la capacité d'invasion des trophoblastes, le TGF- $\beta$  pourrait être une cible intéressante pour le traitement des problèmes d'infertilité reliés à un défaut dans le processus d'implantation de l'embryon.

Pour conclure, cette étude suggère pour la première fois que non seulement chacun des isoformes du TGF- $\beta$  régule, de façon isoforme-dépendante, la capacité d'invasion du trophoblaste, mais est aussi en mesure d'activer les voies de signalisation intracellulaire telles que Smad, ERK et p38 MAPK chez les cellules trophoblastiques.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] <http://www.sharedpregnancy.com/tag/unborn-baby/> . 2010.
- [2] Medecine World. <http://medicineworld.org/cancer/blog/previous/2005/Nov-21-2005.html> . 2010.
- [3] Sigma Aldrich Co. [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com) . 2008.
- [4] Embryologie humaine.  
<http://www.embryology.ch/francais/gnidation/etape02.html> . 2009.
- [5] Stem Cell Basics - Types of Stem Cells. <http://dels-old.nas.edu/bls/stemcells/types-of-stem-cells.shtml#embryonic> . 2009.
- [6] SABioscience, Qiagen Company. [www.superarray.com](http://www.superarray.com) . 2008.
- [7] Ertzeid G, Storeng R. The impact of ovarian stimulation on implantation and fetal development in mice. *Hum. Reprod.* 2001; 16: 221-225.
- [8] Li HY, Chang SP, Yuan CC, Chao HT, Ng HT, Sung YJ. Induction of p38 mitogen-activated protein kinase-mediated apoptosis is involved in outgrowth of trophoblast cells on endometrial epithelial cells in a model of human trophoblast-endometrial interactions. *Biol. Reprod.* 2003; 69: 1515-1524.
- [9] Tabibzadeh S. Molecular control of the implantation window. *Hum. Reprod. Update.* 1998; 4: 465-471.
- [10] Trounson A, Webb J. Fertilization of human oocytes following reinsemination in vitro. *Fertil. Steril.* 1984; 41: 816-819.
- [11] Ledee-Bataille N, Lapree-Delage G, Taupin JL, Dubanchet S, Frydman R, Chaouat G. Concentration of leukaemia inhibitory factor (LIF) in uterine

- flushing fluid is highly predictive of embryo implantation. *Hum. Reprod.* 2002; 17: 213-218.
- [12] Simon C, Moreno C, Remohi J, Pellicer A. Cytokines and embryo implantation. *J. Reprod. Immunol.* 1998; 39: 117-131.
- [13] Massague J. TGFbeta in Cancer. *Cell.* 2008; 134: 215-230.
- [14] Van Themsche C, Mathieu I, Parent S, Asselin E. Transforming growth factor-beta3 increases the invasiveness of endometrial carcinoma cells through phosphatidylinositol 3-kinase-dependent up-regulation of X-linked inhibitor of apoptosis and protein kinase c-dependent induction of matrix metalloproteinase-9. *J. Biol. Chem.* 2007; 282: 4794-4802.
- [15] Shooner C, Caron PL, Frechette-Frigon G, Leblanc V, Dery MC, Asselin E. TGF-beta expression during rat pregnancy and activity on decidual cell survival. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2005; 3:20.: 20.
- [16] Attisano L, Wrana JL, Lopez-Casillas F, Massague J. TGF-beta receptors and actions. *Biochim. Biophys. Acta.* 1994; 1222: 71-80.
- [17] Shi F, Soares MJ, Avery M, Liu F, Zhang X, Audus KL. Permeability and metabolic properties of a trophoblast cell line (HRP-1) derived from normal rat placenta. *Exp. Cell Res.* 1997; 234: 147-155.
- [18] Sahgal N, Canham LN, Canham B, Soares MJ. Rcho-1 trophoblast stem cells: a model system for studying trophoblast cell differentiation. *Methods Mol. Med.* 2006; 121:159-78.: 159-178.
- [19] Soares MJ, Chapman BM, Rasmussen CA, Dai G, Kamei T, Orwig KE. Differentiation of trophoblast endocrine cells. *Placenta.* 1996; 17: 277-289.

- [20] Gardner RL, Beddington RS. Multi-lineage 'stem' cells in the mammalian embryo. *J. Cell Sci. Suppl.* 1988; 10:11-27.: 11-27.
- [21] Soares MJ, Muller H, Orwig KE, Peters TJ, Dai G. The uteroplacental prolactin family and pregnancy. *Biol. Reprod.* 1998; 58: 273-284.
- [22] Verstuyf A, Goebels J, Sobis H, Vandeputte M. Influence of different growth factors on a rat choriocarcinoma cell line. *Tumour. Biol.* 1993; 14: 46-54.
- [23] Hamlin GP, Soares MJ. Regulation of deoxyribonucleic acid synthesis in proliferating and differentiating trophoblast cells: involvement of transferrin, transforming growth factor-beta, and tyrosine kinases. *Endocrinology.* 1995; 136: 322-331.
- [24] MacAuley A, Cross JC, Werb Z. Reprogramming the cell cycle for endoreduplication in rodent trophoblast cells. *Mol. Biol. Cell.* 1998; 9: 795-807.
- [25] Hattori N, Davies TC, Anson-Cartwright L, Cross JC. Periodic expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p57(Kip2) in trophoblast giant cells defines a G2-like gap phase of the endocycle. *Mol. Biol. Cell.* 2000; 11: 1037-1045.
- [26] Verstuyf A, Sobis H, Goebels J, Fonteyn E, Cassiman JJ, Vandeputte M. Establishment and characterization of a continuous in vitro line from a rat choriocarcinoma. *Int. J. Cancer.* 1990; 45: 752-756.
- [27] Kamei T, Hamlin GP, Chapman BM, Burkhardt AL, Bolen JB, Soares MJ. Signaling pathways controlling trophoblast cell differentiation: Src family protein tyrosine kinases in the rat. *Biol. Reprod.* 1997; 57: 1302-1311.

- [28] Yamamoto T, Chapman BM, Soares MJ. Protein kinase C dependent and independent mechanisms controlling rat trophoblast cell DNA synthesis and differentiation. *J. Reprod. Fertil.* 1997; 111: 15-20.
- [29] Grummer R, Hellmann P, Traub O, Soares MJ, el Sabban ME, Winterhager E. Regulation of connexin31 gene expression upon retinoic acid treatment in rat choriocarcinoma cells. *Exp. Cell Res.* 1996; 227: 23-32.
- [30] Peters TJ, Albieri A, Bevilacqua E, Chapman BM, Crane LH, Hamlin GP, Seiki M, Soares MJ. Differentiation-dependent expression of gelatinase B/matrix metalloproteinase-9 in trophoblast cells. *Cell Tissue Res.* 1999; 295: 287-296.
- [31] Faria TN, Soares MJ. Trophoblast cell differentiation: establishment, characterization, and modulation of a rat trophoblast cell line expressing members of the placental prolactin family. *Endocrinology.* 1991; 129: 2895-2906.
- [32] Hamlin GP, Lu XJ, Roby KF, Soares MJ. Recapitulation of the pathway for trophoblast giant cell differentiation in vitro: stage-specific expression of members of the prolactin gene family. *Endocrinology.* 1994; 134: 2390-2396.
- [33] Poppe K, Velkeniers B. Thyroid and infertility. *Verh. K. Acad. Geneeskd. Belg.* 2002; 64: 389-399.
- [34] Brewer CJ, Balen AH. The adverse effects of obesity on conception and implantation. *Reproduction.* 2010; 140: 347-364.
- [35] Pasquali R. Obesity, fat distribution and infertility. *Maturitas.* 2006; 54: 363-371.

- [36] Hurvitz M, Weiss R. The young female athlete. *Pediatr. Endocrinol. Rev.* 2009; 7: 123-129.
- [37] Schenker JG, Meirow D, Schenker E. Stress and human reproduction. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 1992; 45: 1-8.
- [38] Sepaniak S, Forges T, Monnier-Barbarino P. [Cigarette smoking and fertility in women and men]. *Gynecol. Obstet. Fertil.* 2006; 34: 945-949.
- [39] Keegan J, Parva M, Finnegan M, Gerson A, Belden M. Addiction in pregnancy. *J. Addict. Dis.* 2010; 29: 175-191.
- [40] Hadi HA, Hill JA, Castillo RA. Alcohol and reproductive function: a review. *Obstet. Gynecol. Surv.* 1987; 42: 69-74.
- [41] Gump DW, Dickstein S, Gibson M. Endometritis related to Chlamydia trachomatis infection. *Ann. Intern. Med.* 1981; 95: 61-63.
- [42] Pavletic AJ, Wolner-Hanssen P, Paavonen J, Hawes SE, Eschenbach DA. Infertility following pelvic inflammatory disease. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* 1999; 7: 145-152.
- [43] Xu X, Cho SI, Sammel M, You L, Cui S, Huang Y, Ma G, Padungtod C, Pothier L, Niu T, Christiani D, Smith T, Ryan L, Wang L. Association of petrochemical exposure with spontaneous abortion. *Occup. Environ. Med.* 1998; 55: 31-36.
- [44] Doyle P, Roman E, Beral V, Brookes M. Spontaneous abortion in dry cleaning workers potentially exposed to perchloroethylene. *Occup. Environ. Med.* 1997; 54: 848-853.

- [45] Lim CH, Maeng SH, Lee JY, Chung YH, Kim TG, Park JH, Moon YH, Yu IJ. Effects of 2-bromopropane on the female reproductive function in Sprague-Dawley rats. *Ind. Health.* 1997; 35: 278-284.
- [46] Heidam LZ. Spontaneous abortions among dental assistants, factory workers, painters, and gardening workers: a follow up study. *J. Epidemiol. Community Health.* 1984; 38: 149-155.
- [47] Rita P, Reddy PP, Reddy SV. Monitoring of workers occupationally exposed to pesticides in grape gardens of Andhra Pradesh. *Environ. Res.* 1987; 44: 1-5.
- [48] Rupa DS, Reddy PP, Reddi OS. Reproductive performance in population exposed to pesticides in cotton fields in India. *Environ. Res.* 1991; 55: 123-128.
- [49] Marylène Blondel, Véronique Lejeune. *Gynécologie, obstétrique et soins infirmiers.* 2008: 65.
- [50] Paria BC, Lim H, Das SK, Reese J, Dey SK. Molecular signaling in uterine receptivity for implantation. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2000; 11: 67-76.
- [51] Paria BC, Song H, Dey SK. Implantation: molecular basis of embryo-uterine dialogue. *Int. J. Dev. Biol.* 2001; 45: 597-605.
- [52] Sharkey AM, Smith SK. The endometrium as a cause of implantation failure. *Best. Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 2003; 17: 289-307.
- [53] Hofmann GE, Scott RT, Jr., Bergh PA, Deligdisch L. Immunohistochemical localization of epidermal growth factor in human endometrium, decidua, and placenta. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1991; 73: 882-887.

- [54] Bass KE, Morrish D, Roth I, Bhardwaj D, Taylor R, Zhou Y, Fisher SJ. Human cytotrophoblast invasion is up-regulated by epidermal growth factor: evidence that paracrine factors modify this process. *Dev. Biol.* 1994; 164: 550-561.
- [55] Staun-Ram E, Goldman S, Gabarin D, Shalev E. Expression and importance of matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and -9) in human trophoblast invasion. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2004; 2:59.: 59.
- [56] Maruo T, Matsuo H, Otani T, Mochizuki M. Role of epidermal growth factor (EGF) and its receptor in the development of the human placenta. *Reprod. Fertil. Dev.* 1995; 7: 1465-1470.
- [57] Dakour J, Li H, Chen H, Morrish DW. EGF promotes development of a differentiated trophoblast phenotype having c-myc and junB proto-oncogene activation. *Placenta.* 1999; 20: 119-126.
- [58] Li RH, Zhuang LZ. The effects of growth factors on human normal placental cytotrophoblast cell proliferation. *Hum. Reprod.* 1997; 12: 830-834.
- [59] Anteby EY, Greenfield C, Natanson-Yaron S, Goldman-Wohl D, Hamani Y, Khudyak V, Ariel I, Yagel S. Vascular endothelial growth factor, epidermal growth factor and fibroblast growth factor-4 and -10 stimulate trophoblast plasminogen activator system and metalloproteinase-9. *Mol. Hum. Reprod.* 2004; 10: 229-235.
- [60] Qiu Q, Yang M, Tsang BK, Gruslin A. EGF-induced trophoblast secretion of MMP-9 and TIMP-1 involves activation of both PI3K and MAPK signalling pathways. *Reproduction.* 2004; 128: 355-363.
- [61] Bischof P, Campana A. Molecular mediators of implantation. *Baillieres Best. Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 2000; 14: 801-814.

- [62] Licht P, Russu V, Wildt L. On the role of human chorionic gonadotropin (hCG) in the embryo-endometrial microenvironment: implications for differentiation and implantation. *Semin. Reprod. Med.* 2001; 19: 37-47.
- [63] Goldman S, Shalev E. Difference in progesterone-receptor isoforms ratio between early and late first-trimester human trophoblast is associated with differential cell invasion and matrix metalloproteinase 2 expression. *Biol. Reprod.* 2006; 74: 13-22.
- [64] Ni X, Hou Y, Yang R, Tang X, Smith R, Nicholson RC. Progesterone receptors A and B differentially modulate corticotropin-releasing hormone gene expression through a cAMP regulatory element. *Cell Mol. Life Sci.* 2004; 61: 1114-1122.
- [65] An BS, Choi JH, Choi KC, Leung PC. Differential role of progesterone receptor isoforms in the transcriptional regulation of human gonadotropin-releasing hormone I (GnRH I) receptor, GnRH I, and GnRH II. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005; 90: 1106-1113.
- [66] Bischof P, Campana A. Molecular mediators of implantation. *Baillieres Best. Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 2000; 14: 801-814.
- [67] Hill JA. Maternal-embryonic cross-talk. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2001; 943:17-25.: 17-25.
- [68] Suzuki N, Nakayama J, Shih IM, Aoki D, Nozawa S, Fukuda MN. Expression of trophinin, tastin, and bystin by trophoblast and endometrial cells in human placenta. *Biol. Reprod.* 1999; 60: 621-627.
- [69] Nadano D, Sugihara K, Paria BC, Saburi S, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Nakayama J, Fukuda MN. Significant differences between mouse and

human trophinins are revealed by their expression patterns and targeted disruption of mouse trophinin gene. *Biol. Reprod.* 2002; 66: 313-321.

- [70] Meseguer M, Aplin JD, Caballero-Campo P, O'Connor JE, Martin JC, Remohi J, Pellicer A, Simon C. Human endometrial mucin MUC1 is up-regulated by progesterone and down-regulated in vitro by the human blastocyst. *Biol. Reprod.* 2001; 64: 590-601.
- [71] Ferretti C, Bruni L, Dangles-Marie V, Pecking AP, Bellet D. Molecular circuits shared by placental and cancer cells, and their implications in the proliferative, invasive and migratory capacities of trophoblasts. *Hum. Reprod. Update.* 2007; 13: 121-141.
- [72] Lessey BA, Castelbaum AJ, Sawin SW, Sun J. Integrins as markers of uterine receptivity in women with primary unexplained infertility. *Fertil. Steril.* 1995; 63: 535-542.
- [73] Tabibzadeh S, Babaknia A. The signals and molecular pathways involved in implantation, a symbiotic interaction between blastocyst and endometrium involving adhesion and tissue invasion. *Hum. Reprod.* 1995; 10: 1579-1602.
- [74] Charles Thibault et Marie-Claire Levasseur. La reproduction chez les mammifères et l'homme. Charles Thibault et Marie-Claire Levasseur. La reproduction chez les mammifères et l'homme. 2001.
- [75] CANIVENC R, LAFFARGUE M, MAYER G. [Retarded nidation in castrated rat and injection of progesterone; effect of the time of castration on chronological aspect of ovo-implantation.]. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* 1956; 150: 2208-2212.
- [76] Yoshinaga K, Adams CE. Delayed implantation in the spayed, progesterone treated adult mouse. *J. Reprod. Fertil.* 1966; 12: 593-595.

- [77] Philippe Merviel, Jean-Claude Challier, Jean-Michel Foidart, Serge Uzan. Implantation et placentation : physiologie, pathologies et traitements. 2001.
- [78] Perrier dS, Charlet-Renard C, Goffin F, Foidart M, Geenen V. [The implantation window]. *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod. (Paris)*. 2002; 31: 440-455.
- [79] Tranguch S, Daikoku T, Guo Y, Wang H, Dey SK. Molecular complexity in establishing uterine receptivity and implantation. *Cell Mol. Life Sci.* 2005; 62: 1964-1973.
- [80] Charles Thibault et Marie-Claire Levasseur. La reproduction chez les mammifères et l'homme. Charles Thibault et Marie-Claire Levasseur. La reproduction chez les mammifères et l'homme.
- [81] Charles Thibault et Marie-Claire Levasseur. La reproduction chez les mammifères et l'homme. Charles Thibault et Marie-Claire Levasseur. La reproduction chez les mammifères et l'homme.
- [82] Nishi O, Tominaga T, Goto Y, Hayashi K, Mori T. Effects of platelet activating factor on mouse embryo implantation in vitro. *J. Assist. Reprod. Genet.* 1995; 12: 330-334.
- [83] Cocchiara R, Di Trapani G, Azzolina A, Albeggiani G, Geraci D. Early embryonic histamine-releasing factor: a new model for human implantation. *Hum. Reprod.* 1986; 1: 445-447.
- [84] Martin Catala. Embryologie: Développement précoce chez l'humain. 2006.
- [85] William James Larsen, Antoine Dhem. Embryologie humaine. 2008.

- [86] Pidoux G, Gerbaud P, Marpeau O, Guibourdenche J, Ferreira F, Badet J, Evain-Brion D, Frendo JL. Human placental development is impaired by abnormal human chorionic gonadotropin signaling in trisomy 21 pregnancies. *Endocrinology*. 2007; 148: 5403-5413.
- [87] Shi QJ, Lei ZM, Rao CV, Lin J. Novel role of human chorionic gonadotropin in differentiation of human cytotrophoblasts. *Endocrinology*. 1993; 132: 1387-1395.
- [88] Ozturk M, Brown N, Milunsky A, Wands J. Physiological studies of human chorionic gonadotropin and free subunits in the amniotic fluid compartment compared to those in maternal serum. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1988; 67: 1117-1121.
- [89] Lenton EA, Neal LM, Sulaiman R. Plasma concentrations of human chorionic gonadotropin from the time of implantation until the second week of pregnancy. *Fertil. Steril.* 1982; 37: 773-778.
- [90] Evain-Brion D. [The 2 differentiation pathways of the human trophoblast]. *Gynecol. Obstet. Fertil.* 2001; 29: 497-502.
- [91] Parr EL, Tung HN, Parr MB. Apoptosis as the mode of uterine epithelial cell death during embryo implantation in mice and rats. *Biol. Reprod.* 1987; 36: 211-225.
- [92] Charles Thibault et Marie-Claire Levasseur. La reproduction chez les mammifères et l'homme. Charles Thibault et Marie-Claire Levasseur. La reproduction chez les mammifères et l'homme.
- [93] Morgan M, Kniss D, McDonnell S. Expression of metalloproteinases and their inhibitors in human trophoblast continuous cell lines. *Exp. Cell Res.* 1998; 242: 18-26.

- [94] Sharma RK. Mouse trophoblastic cell lines: II--Relationship between invasive potential and proteases. *In Vivo*. 1998; 12: 209-217.
- [95] Finn CA, Martin L. Hormone secretion during early pregnancy in the mouse. *J. Endocrinol.* 1969; 45: 57-65.
- [96] Martin L, Finn CA, Carter J. Effects of progesterone and oestradiol-17 beta on the luminal epithelium of the mouse uterus. *J. Reprod. Fertil.* 1970; 21: 461-469.
- [97] Linda J.Heffner. *Reproduction humaine*. 2011.
- [98] Martin H Johnson BJE. *Reproduction*. 2002.
- [99] Charles Thibault et Marie-Claire Levasseur. *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. Charles Thibault et Marie-Claire Levasseur. *La reproduction chez les mammifères et l'homme*.
- [100] Rich J, Borton A, Wang X. Transforming growth factor-beta signaling in cancer. *Microsc. Res. Tech.* 2001; 52: 363-373.
- [101] Graham CH, Lysiak JJ, McCrae KR, Lala PK. Localization of transforming growth factor-beta at the human fetal-maternal interface: role in trophoblast growth and differentiation. *Biol. Reprod.* 1992; 46: 561-572.
- [102] Paria BC, Dey SK. Preimplantation embryo development in vitro: cooperative interactions among embryos and role of growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1990; 87: 4756-4760.
- [103] Lim J, Bongso A, Ratnam S. Mitogenic and cytogenetic evaluation of transforming growth factor-beta on murine preimplantation embryonic development in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 1993; 36: 482-487.

- [104] Nowak RA, Haimovici F, Biggers JD, Erbach GT. Transforming growth factor-beta stimulates mouse blastocyst outgrowth through a mechanism involving parathyroid hormone-related protein. *Biol. Reprod.* 1999; 60: 85-93.
- [105] Ingman WV, Robertson SA. Defining the actions of transforming growth factor beta in reproduction. *Bioessays.* 2002; 24: 904-914.
- [106] Chen W, Wahl SM. TGF-beta: receptors, signaling pathways and autoimmunity. *Curr. Dir. Autoimmun.* 2002; 5:62-91.: 62-91.
- [107] O'Kane S, Ferguson MW. Transforming growth factor beta s and wound healing. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1997; 29: 63-78.
- [108] Kamei T, Jones SR, Chapman BM, MCGonigle KL, Dai G, Soares MJ. The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway modulates the endocrine differentiation of trophoblast cells. *Mol. Endocrinol.* 2002; 16: 1469-1481.
- [109] Gold LI, Saxena B, Mittal KR, Marmor M, Goswami S, Nactigal L, Korc M, Demopoulos RI. Increased expression of transforming growth factor beta isoforms and basic fibroblast growth factor in complex hyperplasia and adenocarcinoma of the endometrium: evidence for paracrine and autocrine action. *Cancer Res.* 1994; 54: 2347-2358.
- [110] Godkin JD, Dore JJ. Transforming growth factor beta and the endometrium. *Rev. Reprod.* 1998; 3: 1-6.
- [111] Graham CH, Lala PK. Mechanism of control of trophoblast invasion in situ. *J. Cell Physiol.* 1991; 148: 228-234.
- [112] Lash GE, Otun HA, Innes BA, Bulmer JN, Searle RF, Robson SC. Inhibition of trophoblast cell invasion by TGFB1, 2, and 3 is associated with a decrease in active proteases. *Biol. Reprod.* 2005; 73: 374-381.

- [113] Chung IB, Yelian FD, Zaher FM, Gonik B, Evans MI, Diamond MP, Svinarich DM. Expression and regulation of vascular endothelial growth factor in a first trimester trophoblast cell line. *Placenta*. 2000; 21: 320-324.
- [114] Feinberg RF, Kliman HJ, Wang CL. Transforming growth factor-beta stimulates trophoblast oncofetal fibronectin synthesis in vitro: implications for trophoblast implantation in vivo. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1994; 78: 1241-1248.
- [115] Irving JA, Lala PK. Functional role of cell surface integrins on human trophoblast cell migration: regulation by TGF-beta, IGF-II, and IGFBP-1. *Exp. Cell Res.* 1995; 217: 419-427.
- [116] Perrier dS, Charlet-Renard C, Dubois M, Berndt S, Goffin F, Foidart JM, Geenen V. Human endometrial leukemia inhibitory factor and interleukin-6: control of secretion by transforming growth factor-beta-related members. *Neuroimmunomodulation*. 2005; 12: 157-163.
- [117] Graham CH, Connelly I, MacDougall JR, Kerbel RS, Stetler-Stevenson WG, Lala PK. Resistance of malignant trophoblast cells to both the anti-proliferative and anti-invasive effects of transforming growth factor-beta. *Exp. Cell Res.* 1994; 214: 93-99.
- [118] Djurovic S, Schjetelein R, Wisloff F, Haugen G, Husby H, Berg K. Plasma concentrations of Lp(a) lipoprotein and TGF-beta1 are altered in preeclampsia. *Clin. Genet.* 1997; 52: 371-376.
- [119] Caniggia I, Winter J, Lye SJ, Post M. Oxygen and placental development during the first trimester: implications for the pathophysiology of pre-eclampsia. *Placenta*. 2000; 21 Suppl A:S25-30.: S25-S30.

- [120] Massague J. TGF-beta signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 1998; 67:753-91.: 753-791.
- [121] Massague J, Chen YG. Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev.* 2000; 14: 627-644.
- [122] Attisano L, Wrana JL. Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science.* 2002; 296: 1646-1647.
- [123] Franzen P, Heldin CH, Miyazono K. The GS domain of the transforming growth factor-beta type I receptor is important in signal transduction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995; 207: 682-689.
- [124] Massague J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J.* 2000; 19: 1745-1754.
- [125] Wrana JL, Attisano L, Carcamo J, Zentella A, Doody J, Laiho M, Wang XF, Massague J. TGF beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell.* 1992; 71: 1003-1014.
- [126] Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massague J. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature.* 1994; 370: 341-347.
- [127] Martin Catala. *Embryologie : Développement précoce chez l'humain.* 2011.
- [128] Massague J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors. *Genes Dev.* 2005; 19: 2783-2810.
- [129] Fink SP, Mikkola D, Willson JK, Markowitz S. TGF-beta-induced nuclear localization of Smad2 and Smad3 in Smad4 null cancer cell lines. *Oncogene.* 2003; 22: 1317-1323.

- [130] Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv. Cancer Res.* 1998; 74:49-139.: 49-139.
- [131] Turchi L, Chassot AA, Bourget I, Baldescchi C, Ortonne JP, Meneguzzi G, Lemichez E, Ponzio G. Cross-talk between RhoGTPases and stress activated kinases for matrix metalloproteinase-9 induction in response to keratinocytes injury. *J. Invest Dermatol.* 2003; 121: 1291-1300.
- [132] Chakraborty C, Gleeson LM, McKinnon T, Lala PK. Regulation of human trophoblast migration and invasiveness. *Can. J. Physiol Pharmacol.* 2002; 80: 116-124.
- [133] Giroux S, Tremblay M, Bernard D, Cardin-Girard JF, Aubry S, Larouche L, Rousseau S, Huot J, Landry J, Jeannotte L, Charron J. Embryonic death of Mek1-deficient mice reveals a role for this kinase in angiogenesis in the labyrinthine region of the placenta. *Curr. Biol.* 1999; 9: 369-372.
- [134] Daoud G, Amyot M, Rassart E, Masse A, Simoneau L, Lafond J. ERK1/2 and p38 regulate trophoblasts differentiation in human term placenta. *J. Physiol.* 2005; 566: 409-423.
- [135] Kamijo T, Rajabi MR, Mizunuma H, Ibuki Y. Biochemical evidence for autocrine/paracrine regulation of apoptosis in cultured uterine epithelial cells during mouse embryo implantation in vitro. *Mol. Hum. Reprod.* 1998; 4: 990-998.
- [136] Simpson H, Robson SC, Bulmer JN, Barber A, Lyall F. Transforming growth factor beta expression in human placenta and placental bed during early pregnancy. *Placenta.* 2002; 23: 44-58.

- [137] Jokhi PP, King A, Loke YW. Cytokine production and cytokine receptor expression by cells of the human first trimester placental-uterine interface. *Cytokine*. 1997; 9: 126-137.
- [138] Cohen M, Meisser A, Haenggeli L, Bischof P. Involvement of MAPK pathway in TNF-alpha-induced MMP-9 expression in human trophoblastic cells. *Mol. Hum. Reprod.* 2006; 12: 225-232.
- [139] Zhou WH, Du MR, Dong L, Zhu XY, Yang JY, He YY, Li DJ. Cyclosporin A increases expression of matrix metalloproteinase 9 and 2 and invasiveness in vitro of the first-trimester human trophoblast cells via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Hum. Reprod.* 2007; 22: 2743-2750.
- [140] Wyllie AH. Death in normal and neoplastic cells. *J. Clin. Pathol. Suppl (R. Coll. Pathol.)*. 1974; 7:35-42.: 35-42.
- [141] Gerschenson LE, Rotello RJ. Apoptosis: a different type of cell death. *FASEB J.* 1992; 6: 2450-2455.
- [142] Edelblum KL, Yan F, Yamaoka T, Polk DB. Regulation of apoptosis during homeostasis and disease in the intestinal epithelium. *Inflamm. Bowel. Dis.* 2006; 12: 413-424.
- [143] Schuster N, Kriegstein K. Mechanisms of TGF-beta-mediated apoptosis. *Cell Tissue Res.* 2002; 307: 1-14.
- [144] Jang CW, Chen CH, Chen CC, Chen JY, Su YH, Chen RH. TGF-beta induces apoptosis through Smad-mediated expression of DAP-kinase. *Nat. Cell Biol.* 2002; 4: 51-58.

- [145] Okado T, Terada Y, Tanaka H, Inoshita S, Nakao A, Sasaki S. Smad7 mediates transforming growth factor-beta-induced apoptosis in mesangial cells. *Kidney Int.* 2002; 62: 1178-1186.
- [146] Chaouchi N, Arvanitakis L, Auffredou MT, Blanchard DA, Vazquez A, Sharma S. Characterization of transforming growth factor-beta 1 induced apoptosis in normal human B cells and lymphoma B cell lines. *Oncogene*. 1995; 11: 1615-1622.
- [147] Wang H, Grand RJ, Milner AE, Armitage RJ, Gordon J, Gregory CD. Repression of apoptosis in human B-lymphoma cells by CD40-ligand and Bcl-2: relationship to the cell-cycle and role of the retinoblastoma protein. *Oncogene*. 1996; 13: 373-379.
- [148] Schrantz N, Blanchard DA, Auffredou MT, Sharma S, Leca G, Vazquez A. Role of caspases and possible involvement of retinoblastoma protein during TGFbeta-mediated apoptosis of human B lymphocytes. *Oncogene*. 1999; 18: 3511-3519.
- [149] Inman GJ, Allday MJ. Apoptosis induced by TGF-beta 1 in Burkitt's lymphoma cells is caspase 8 dependent but is death receptor independent. *J. Immunol.* 2000; 165: 2500-2510.
- [150] Schrantz N, Blanchard DA, Auffredou MT, Sharma S, Leca G, Vazquez A. Role of caspases and possible involvement of retinoblastoma protein during TGFbeta-mediated apoptosis of human B lymphocytes. *Oncogene*. 1999; 18: 3511-3519.
- [151] Arsura M, Wu M, Sonenshein GE. TGF beta 1 inhibits NF-kappa B/Rel activity inducing apoptosis of B cells: transcriptional activation of I kappa B alpha. *Immunity*. 1996; 5: 31-40.

- [152] Varga J. Scleroderma and Smads: dysfunctional Smad family dynamics culminating in fibrosis. *Arthritis Rheum.* 2002; 46: 1703-1713.
- [153] Wakefield LM, Roberts AB. TGF-beta signaling: positive and negative effects on tumorigenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2002; 12: 22-29.
- [154] Akhurst RJ, Derynck R. TGF-beta signaling in cancer--a double-edged sword. *Trends Cell Biol.* 2001; 11: S44-S51.
- [155] Kitamura T, Kometani K, Hashida H, Matsunaga A, Miyoshi H, Hosogi H, Aoki M, Oshima M, Hattori M, Takabayashi A, Minato N, Taketo MM. SMAD4-deficient intestinal tumors recruit CCR1+ myeloid cells that promote invasion. *Nat. Genet.* 2007; 39: 467-475.
- [156] Chow E, Macrae F. A review of juvenile polyposis syndrome. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2005; 20: 1634-1640.
- [157] Lee DK, Kim BC, Kim IY, Cho EA, Satterwhite DJ, Kim SJ. The human papilloma virus E7 oncoprotein inhibits transforming growth factor-beta signaling by blocking binding of the Smad complex to its target sequence. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 38557-38564.
- [158] Even-Ram S, Uziely B, Cohen P, Grisaru-Granovsky S, Maoz M, Ginzburg Y, Reich R, Vlodavsky I, Bar-Shavit R. Thrombin receptor overexpression in malignant and physiological invasion processes. *Nat. Med.* 1998; 4: 909-914.
- [159] Genbacev O, Zhou Y, Ludlow JW, Fisher SJ. Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science.* 1997; 277: 1669-1672.
- [160] Mullen CA. Review: analogies between trophoblastic and malignant cells. *Am. J. Reprod. Immunol.* 1998; 39: 41-49.

- [161] Strickland S, Richards WG. Invasion of the trophoblasts. *Cell*. 1992; 71: 355-357.
- [162] Pijnenborg R. Implantation and immunology: maternal inflammatory and immune cellular responses to implantation and trophoblast invasion. *Reprod. Biomed. Online*. 2002; 4 Suppl 3:14-7.: 14-17.
- [163] Winterhager E, Reuss B, Hellmann P, Spray DC, Gruemmer R. Gap junction and tissue invasion: a comparison of tumorigenesis and pregnancy. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol*. 1996; 23: 1058-1061.
- [164] Hu D, Cross JC. Development and function of trophoblast giant cells in the rodent placenta. *Int. J. Dev. Biol*. 2010; 54: 341-354.
- [165] Caniggia I, Grisaru-Gravrosky S, Kuliszewsky M, Post M, Lye SJ. Inhibition of TGF-beta 3 restores the invasive capability of extravillous trophoblasts in preeclamptic pregnancies. *J. Clin. Invest*. 1999; 103: 1641-1650.
- [166] Lala PK, Hamilton GS. Growth factors, proteases and protease inhibitors in the maternal-fetal dialogue. *Placenta*. 1996; 17: 545-555.
- [167] Wu D, Luo S, Wang Y, Zhuang L, Chen Y, Peng C. Smads in human trophoblast cells: expression, regulation and role in TGF-beta-induced transcriptional activity. *Mol. Cell Endocrinol*. 2001; 175: 111-121.
- [168] Xu G, Chakraborty C, Lala PK. Expression of TGF-beta signaling genes in the normal, premalignant, and malignant human trophoblast: loss of smad3 in choriocarcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2001; 287: 47-55.
- [169] Verrecchia F, Chu ML, Mauviel A. Identification of novel TGF-beta /Smad gene targets in dermal fibroblasts using a combined cDNA

- microarray/promoter transactivation approach. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 17058-17062.
- [170] Datta PK, Blake MC, Moses HL. Regulation of plasminogen activator inhibitor-1 expression by transforming growth factor-beta -induced physical and functional interactions between smads and Sp1. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 40014-40019.
- [171] Atfi A, Djelloul S, Chastre E, Davis R, Gespach C. Evidence for a role of Rho-like GTPases and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK) in transforming growth factor beta-mediated signaling. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 1429-1432.
- [172] Adachi-Yamada T, Nakamura M, Irie K, Tomoyasu Y, Sano Y, Mori E, Goto S, Ueno N, Nishida Y, Matsumoto K. p38 mitogen-activated protein kinase can be involved in transforming growth factor beta superfamily signal transduction in *Drosophila* wing morphogenesis. *Mol. Cell Biol.* 1999; 19: 2322-2329.
- [173] Hocevar BA, Brown TL, Howe PH. TGF-beta induces fibronectin synthesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent, Smad4-independent pathway. *EMBO J.* 1999; 18: 1345-1356.
- [174] Huang C, Jacobson K, Schaller MD. A role for JNK-paxillin signaling in cell migration. *Cell Cycle.* 2004; 3: 4-6.
- [175] Klemke RL, Cai S, Giannini AL, Gallagher PJ, de Lanerolle P, Cheresh DA. Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. *J. Cell Biol.* 1997; 137: 481-492.
- [176] Cho SY, Klemke RL. Extracellular-regulated kinase activation and CAS/Crk coupling regulate cell migration and suppress apoptosis during invasion of the extracellular matrix. *J. Cell Biol.* 2000; 149: 223-236.

- [177] Turchi L, Chassot AA, Bourget I, Baldescchi C, Ortonne JP, Meneguzzi G, Lemichez E, Ponzio G. Cross-talk between RhoGTPases and stress activated kinases for matrix metalloproteinase-9 induction in response to keratinocytes injury. *J. Invest Dermatol.* 2003; 121: 1291-1300.
- [178] Takino T, Miyamori H, Watanabe Y, Yoshioka K, Seiki M, Sato H. Membrane type 1 matrix metalloproteinase regulates collagen-dependent mitogen-activated protein/extracellular signal-related kinase activation and cell migration. *Cancer Res.* 2004; 64: 1044-1049.
- [179] Fitzgerald JS, Busch S, Wengenmayer T, Foerster K, de la MT, Poehlmann TG, Markert UR. Signal transduction in trophoblast invasion. *Chem. Immunol. Allergy.* 2005; 88:181-99.: 181-199.
- [180] Laiho M, DeCaprio JA, Ludlow JW, Livingston DM, Massague J. Growth inhibition by TGF-beta linked to suppression of retinoblastoma protein phosphorylation. *Cell.* 1990; 62: 175-185.
- [181] Schwarz JK, Bassing CH, Kovesdi I, Datto MB, Blazing M, George S, Wang XF, Nevins JR. Expression of the E2F1 transcription factor overcomes type beta transforming growth factor-mediated growth suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1995; 92: 483-487.
- [182] Kelly DL, Rizzino A. Growth regulatory factors and carcinogenesis: the roles played by transforming growth factor beta, its receptors and signaling pathways. *Anticancer Res.* 1999; 19: 4791-4807.
- [183] Xu G, Guimond MJ, Chakraborty C, Lala PK. Control of proliferation, migration, and invasiveness of human extravillous trophoblast by decorin, a decidua product. *Biol. Reprod.* 2002; 67: 681-689.

- [184] Pollheimer J, Knofler M. Signalling pathways regulating the invasive differentiation of human trophoblasts: a review. *Placenta*. 2005; 26 Suppl A:S21-30.: S21-S30.
- [185] Shigeoka Y, Igishi T, Matsumoto S, Nakanishi H, Kodani M, Yasuda K, Hitsuda Y, Shimizu E. Sulindac sulfide and caffeic acid phenethyl ester suppress the motility of lung adenocarcinoma cells promoted by transforming growth factor-beta through Akt inhibition. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2004; 130: 146-152.
- [186] Farina AR, Coppa A, Tiberio A, Tacconelli A, Turco A, Colletta G, Gulino A, Mackay AR. Transforming growth factor-beta1 enhances the invasiveness of human MDA-MB-231 breast cancer cells by up-regulating urokinase activity. *Int. J. Cancer*. 1998; 75: 721-730.
- [187] Graham CH. Effect of transforming growth factor-beta on the plasminogen activator system in cultured first trimester human cytotrophoblasts. *Placenta*. 1997; 18: 137-143.
- [188] Nagase H, Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 21491-21494.
- [189] Bischof P, Meisser A, Campana A. Control of MMP-9 expression at the maternal-fetal interface. *J. Reprod. Immunol.* 2002; 55: 3-10.
- [190] Campbell S, Rowe J, Jackson CJ, Gallery ED. In vitro migration of cytotrophoblasts through a decidual endothelial cell monolayer: the role of matrix metalloproteinases. *Placenta*. 2003; 24: 306-315.
- [191] Bulletti C, Flamigni C, Giacomucci E. Reproductive failure due to spontaneous abortion and recurrent miscarriage. *Hum. Reprod. Update*. 1996; 2: 118-136.