



**HAL**  
open science

# IMPLICATION D'UNE FORME D'hCG ANORMALE ET DE SON RÉCEPTEUR (R-LH/CG) DANS LE DÉVELOPPEMENT PLACENTAIRE LORS D'UNE GROSSESSE ASSOCIÉE À UNE TRISOMIE 21

Guillaume Pidoux

► **To cite this version:**

Guillaume Pidoux. IMPLICATION D'UNE FORME D'hCG ANORMALE ET DE SON RÉCEPTEUR (R-LH/CG) DANS LE DÉVELOPPEMENT PLACENTAIRE LORS D'UNE GROSSESSE ASSOCIÉE À UNE TRISOMIE 21. Sciences du Vivant [q-bio]. Paris 7, 2006. Français. NNT: . tel-02556183

**HAL Id: tel-02556183**

**<https://inserm.hal.science/tel-02556183>**

Submitted on 27 Apr 2020

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

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

**UNIVERSITE PARIS 7 – DENIS DIDEROT**  
*UFR de Biologie et Sciences de la Nature*

**THÈSE**

Pour l'obtention du DIPLÔME de DOCTORAT

**Discipline :**

Physiologie du Développement et de la Différenciation Fonctionnelle

**Guillaume PIDOUX**

**IMPLICATION D'UNE FORME D'hCG ANORMALE ET DE SON  
RÉCEPTEUR (R-LH/CG) DANS LE DÉVELOPPEMENT PLACENTAIRE  
LORS D'UNE GROSSESSE ASSOCIÉE À UNE TRISOMIE 21.**

**Thèse dirigée par Jean-Louis FRENDO**

Soutenue le 24 Octobre 2006

**JURY**

Monsieur D. LUTON	Président
Monsieur P. BISCHOF	Rapporteur
Monsieur Y. COMBARNOUS	Rapporteur
Madame A-L. DELEZOIDE	Examinatrice
Madame D. EVAÏN-BRION	Examinatrice
Monsieur J-L. FRENDO	Examineur



## REMERCIEMENTS

Je remercie vivement le Docteur D. EVAIN-BRION pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et qui m'a permis de réaliser cette thèse alors que tous les éléments ne plaidaient pas en ma faveur. Je tiens à la remercier pour sa grande disponibilité et pour sa rigueur scientifique.

Je souhaite remercier le Professeur D. LUTON pour avoir accepté la présidence de ce jury de thèse.

Je remercie les Professeurs P. BISCHOF et Y. COMBARNOUS qui me font l'honneur de juger ce travail et d'y avoir consacré un temps précieux.

Je remercie le Docteur A-L DELEZOIDE, qui a bien voulu examiner ce travail.

À Mr le docteur Jean-Louis FRENDO, qui a dû faire preuve d'un savant mélange de patience et de folie cérébrale pour tenter de me supporter pendant toutes ces longues années et de feindre que le bruit et l'odeur ne l'importunaient pas. Tu m'as converti à ta religion du Gnagnatis et ce malgré mes réticences. Tu m'as enseigné et appris les techniques de biologie cellulaire et moléculaire nécessaires pour mener à bien ce travail. Plus qu'un chef, c'est tout d'abord un ami à qui je souhaite dire tout simplement merci.

À Mme le docteur Pascale Laurent GERBAUD, pour son soutien sans aucune mesure dans les bons comme dans les mauvais moments. Pour tes conseils toujours éclairés dans tous les domaines (travail, relation humaine...). Avec tous les moments que nous avons passé ensemble à la paillasse, cette thèse est aussi la tienne. Malgré les coups reçus, les réprimandes et les quolibets que j'ai subis quotidiennement de ta part, tu garderas une place particulière et je suis fier de pouvoir te compter parmi mes amies.

À Mlle Fatima FERREIRA qui est à la base de tous les travaux de l'équipe. Elle réalise sans complexe et avec succès toutes les cultures cellulaires. Ces cultures sont toujours synonymes de grande qualité. Je tiens à te remercier pour ta gentillesse et ta bonne humeur quotidienne. Je te souhaite bonne route pour l'avenir.

Je tiens à remercier Olivier MARPEAU, Michael GRYNBERG et Sédami GNIDEHOU pour leur passage plus ou moins long dans le bocal 1, mais toujours accompagné d'un soupçon de bonne humeur et d'une pincée de fou rire garanti.

Je souhaite remercier tout particulièrement les docteurs Josette BADET et André MALASSINÉ pour leurs échanges scientifiques, pour les différentes collaborations et leurs conseils avisés.

Un grand merci à Mr le docteur Jean GUIBOURDENCHE, dit le super-doseur. Pour ses relectures du manuscrit, mais également pour tout le travail que nous avons réalisé ensemble. Quand deux bourguignons se retrouvent cela donne forcément de bons résultats.

Je souhaite remercier l'ensemble du bocal 2: Thierry FOURNIER, Vassilis TSATSARIS et Karen HANDSHUH qui m'a permis de me surpasser durant cette thèse et qui m'a appris à prendre sur moi.

Je remercie les "expatriées" de l'unité 767: Céline MEHATS, Michèle BREUILLER-FOUCHÉ, Marie-Jo LEROY, Emmanuelle DALLOT, Roxane HERVÉ, pour les cafés et les gâteaux au chocolat, partagés de bon cœur en votre charmante compagnie.

Je remercie tous les autres membres de l'unité 767: Nicole BURKY, Audrey CHISSEY, Nadine SEGOND, Mickaël GUESNON.

Je souhaite remercier très chaleureusement tous les “anciens” de l’unité 349 de l’INSERM: le Dr MS. MOUKHTAR, le Dr A. JULLIENNE, Dr F. LASMOLES et le Dr F. TREILHOU-LAHILLE, c’est à votre contact et en vous écoutant parler de votre passion, que j’ai su ce que je voulais faire de ma vie.

Bien sûr, je voudrais remercier toute ma famille pour votre soutien qui a été très important pour moi, il m’a permis de garder le cap dans les moments difficiles. Pour mes parents: Elisabeth et Jean-Claude qui sont des modèles pour moi dans la vie de tous les jours, je suis très fier de vous et de ce que vous avez réussi à faire de nous, la partie n’était pourtant pas gagnée d’avance. À ma sœur: Odile, sa petite famille et Elise et Margot, malgré la distance qui nous sépare, les événements ont su nous rapprocher, pour former une véritable famille. À Olivier, mon frère parti bien trop tôt, j’aurai tellement aimé que tu sois là et à qui j’aimerais dédier ce travail.

Je tiens à remercier tout particulièrement Julie, pour ses encouragements et son soutien de tous les jours, pour sa patience envers moi, car il en faut beaucoup. Merci de m’avoir accompagné, d’avoir cru en moi, j’espère que cela continuera encore longtemps.

Je voudrais remercier tous mes amis, tout particulièrement mes anciens co-locataires: Ben, Olivier et leurs charmantes compagnes. La Delpy’s family et tous les ex de la HFI family, vous vous reconnaîtrez bien sûr.

Je remercie l’Inserm et le Conseil régional d’Ile-de-France pour le co-financement qui m’a permis de réaliser ce travail.

Et enfin, désolé pour tous ceux que j’ai pu oublier, il est difficile de pouvoir penser à tout le monde.

**À Olivier mon frère et sa fille Margot**

**À ma famille**

**À Julie**



## TABLE DES MATIÈRES

17	<b><u>Avant-propos</u></b>
19	<b><u>A: Introduction</u></b>
20	<b>I. La placentation humaine</b>
21	<b>1. Morphogenèse placentaire</b>
21	1.1. Développement préimplantatoire.
23	1.2. Les différents stades de développement placentaire.
23	1.2.1. Stade prélacunaire.
23	1.2.2. Stade lacunaire.
25	1.2.3. Stade vilieux.
25	1.3. Placenta à terme
25	1.3.1. Structure du placenta à terme.
25	1.3.2. La chambre intervillieuse.
27	1.3.3. Mise en place du flux sanguin maternel dans la chambre intervillieuse.
27	<b>2. Les structures villositaires</b>
29	2.1. La villosité ancrée (ou crampon).
31	2.2. La villosité choriale.
33	2.2.1. Trophoblaste vilieux.
35	2.2.2. Cellules de Hofbauer (macrophages fœtaux) et autres types cellulaires.
35	<b>3. Pathologies placentaires constitutives</b>
35	3.1. Les anomalies de l'implantation.
35	3.1.1. Le placenta praevia.
36	3.1.2. Les grossesses extra-utérines (ectopiques).
36	3.2. La prééclampsie (ou toxémie gravidique).
36	3.3. Les tumeurs placentaires.
36	3.5.1. La môle hydatiforme.
37	3.5.2. Le choriocarcinome et les lignées cellulaires issues de choriocarcinomes.
38	<b>II. L'hormone chorionique gonadotrope humaine (hCG)</b>
39	<b>1. Structure et biosynthèse de l'hCG</b>
39	1.1. Biosynthèse.
39	1.1.1. La sous-unité $\alpha$ .
41	1.1.2. La sous-unité $\beta$ .
41	1.2. Structure biochimique.
41	1.2.1. Structure primaire.
43	1.2.2. Structure tridimensionnelle.
45	1.3. Structure glycanique.
47	1.3.1. Les chaînes N-oligosaccharidiques.
49	1.3.2. Les chaînes O-oligosaccharidiques.
49	1.3.3. Processus de maturation et de sécrétion.
49	- Les N-glycosylations.
50	- Les O-glycosylations.



51	<b>2. Physiologie et métabolisme</b>
51	2.1. Relation structure-activité.
51	2.1.1. Demi-vie de l'hCG dans la circulation.
52	2.1.2. Liaison au récepteur LH/CG.
52	2.1.3. Stimulation des cellules cibles.
53	2.2. Sécrétion physiologique de l'hCG.
55	2.3. Rôle physiologique de l'hCG.
55	2.3.1. Fonctions endocrines.
55	2.3.2. Fonctions autocrines et paracrines.
55	- Fonctions autocrines.
56	- Fonctions paracrines.
56	2.4. Intérêt clinique de l'hCG.
57	2.4.1. Chez l'enfant.
57	2.4.2. Chez l'homme.
57	2.4.3. Chez la femme enceinte (hors pathologie hypophysaire)
57	- Diagnostic de grossesse.
57	- En cours de grossesse.
58	2.4.4. Dans les cas de tumeurs placentaires.
58	2.4.5. Dans le dépistage de la trisomie 21.

58	<b>3. Régulation de la production d'hCG <i>in vitro</i></b>
59	3.1. Les différentes voies de régulation.
59	3.1.1. La voie de l'AMPC-PKA.
59	- Le promoteur de la sous-unité $\alpha$ .
61	- Le promoteur de la sous-unité $\beta$ .
63	3.1.2. La voie du DAG-Ca <sup>2+</sup> -PKC.
64	3.2. Action de différents agents
64	3.2.1. Les facteurs de croissance.
65	3.2.2. Les stéroïdes.
65	3.2.3. L'hCG.

### 67 III. Le récepteur LH/CG (R-LH/CG)

67	<b>1. Structure et biosynthèse</b>
67	1.1. Structure du gène du récepteur LH/CG.
69	1.2. Variants, polymorphismes et mutations du gène du récepteur LH/CG.
71	1.3. La protéine du récepteur LH/CG.
71	1.3.1. La chaîne polypeptidique du R-LH/CG.
72	- Les formes de 65 et 75kDA.
72	- Les formes de 85 et 95kDA.
72	- Les formes entre 165 et 200kDA.
73	1.3.2. Les domaines du R-LH/CG.
73	- Le domaine extracellulaire (ou ectodomaine).
75	- Le domaine transmembranaire.
77	- Le domaine intracellulaire (ou endodomaine).
77	<b>2. Fonctionnement du R-LH/CG</b>
77	2.1. Expression du R-LH/CG.
79	2.2. Les voies de signalisation du R-LH/CG.
81	2.3. Fixation de l'hCG ou de la LH sur le R-LH/CG.
83	2.4. Activation du R-LH/CG.
83	2.4.1. Les régions responsables de l'activation du R-LH/CG.
83	2.4.2. Modèle 1.
84	2.4.3. Modèle 2.

- 84 2.4.4. Modèle 3.
- 85 2.5. Régulation du R-LH/CG.
- 85 2.5.1. Régulation transcriptionnelle.
- 87 2.5.2. Régulation post-traductionnelle.
- 87 - Le découplage.
- 89 - L'internalisation.
- 90 - La régulation négative ("down regulation").

### 91 3. Pathologie liée au R-LH/CG

- 91 3.1. Mutations activatrices du gène du R-LH/CG.
- 91 3.2. Mutations inactivatrices du gène du R-LH/CG.

## 94 IV. Trisomie 21 et aneuploïdies

### 95 1. Généralités sur la trisomie 21

- 95 1.1. Définition et différents types de trisomie 21.
- 97 1.1.1. La trisomie 21 libre et homogène.
- 97 1.1.2. La trisomie 21 par translocation.
- 97 1.1.3. La trisomie 21 en mosaïque.
- 97 1.2. Epidémiologie.
- 99 1.3. Phénotype associé à la trisomie 21.

### 101 2. Le dépistage de la trisomie 21

- 101 2.1. Dépistage échographique.
- 103 2.2. Dépistage biologique.
- 103 2.2.1. L'âge maternel.
- 103 2.2.2. Au premier trimestre.
- 103 - La sous-unité  $\beta$  de l'hCG.
- 104 - La PAPP-A.
- 104 - Les tests combinés.
- 104 2.2.3. Au deuxième trimestre.
- 104 - L' $\alpha$  fœto-protéine (AFP).
- 105 - L'hCG et la sous-unité  $\beta$ .
- 105 - L'œstriol non conjugué (uE3).
- 105 - Les tests combinés.
- 107 - Le calcul du risque d'une grossesse associée à une trisomie 21.
- 107 2.3. Les méthodes de diagnostic de la trisomie 21.
- 107 2.3.1. L'amniocentèse.
- 108 2.3.2. La choriocentèse (ou biopsie de trophoblaste).
- 108 2.3.3. La ponction de sang fœtal.
- 108 2.4. L'hCG hyperglycosylée: un nouveau marqueur sérique de la trisomie 21.

### 109 3. Trisomie 21 et placenta

- 109 3.1. Anomalie de la différenciation morphologique et fonctionnelle du cytotrophoblaste villositaire dans la trisomie 21.
- 111 3.2. Trisomie 21 et stress-oxydant.

### 113 4. Les différents modèles d'étude de la trisomie 21

- 113 4.1. Les modèles murins.
- 116 4.2. Le modèle de culture cellulaire humaine.

### 116 5. Les autres aneuploïdies

- 116 5.1. La trisomie 13.
- 116 5.2. La trisomie 18.

## 119 **V. Objectifs du travail**

### 121 **B: Matériel et méthodes**

#### 123 **I. Biologie cellulaire**

- 123 1.1. Extraits totaux de placenta humain.
- 123 1.2. Inconvénient des études sur des extraits de placenta total.

125 Pidoux G., Gerbaud P., Laurendeau I., Guibourdenche J., Bertin G., Vidaud M., Evain-Brion D. & Frendo J-L. Large variability of trophoblast genes expression within and between human normal term placentas. *Placenta* 2004,25(5):469-73.

- 133 1.3. Culture primaire trophoblastique (cytotrophoblastes villos).
- 133 1.4. Lignées tumorales.

#### 135 **II. Biologie moléculaire**

- 135 2.1. Extraction d'ARN totaux.
- 135 2.2. Transcription inverse et réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR).
- 136 2.3. Quantification des ARN messagers par RT-PCR quantitative en temps réel.
- 138 2.4. Clonage et séquençage de l'ADN complémentaire.
- 138 2.5. Hybridation des produits d'amplification par une sonde radio-marquée.
- 139 2.6. ARN interférence.

#### 140 **III. Biochimie**

- 140 3.1. Extraction et dosage de protéines.
- 140 3.2. Western-blot et immunodétection.
- 142 3.3. Ligand blot.
- 142 3.4. Immunoprécipitation.
- 142 3.5. Crosslinking et immunoprécipitation.
- 143 3.6. Immunohistochimie.
- 144 3.7. Immunocytochimie.
- 144 3.8. Dosage d'AMPc.
- 144 3.9. Marquage d'affinité.
- 145 3.10. Marquage de l'hCG à l'I<sup>125</sup>.
- 145 3.11. Dosages hormonaux.

### 147 **C: Résultats**

#### **I. Publication N°1: Trophoblast production of a weakly bioactive hCG in trisomy 21-affected pregnancy.**

- 150 1. Introduction.
- 151 2. Résultats.
- 153 3. Conclusion.
- 155 4. L'article.

Frendo J-L., Guibourdenche J., Pidoux G., Vidaud M., Luton D., Giovagranti Y., Porquet D., Muller F. & Evain-Brion D. Trophoblast production of a weakly bioactive hCG in trisomy 21-affected pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003; 89: 727-732.

## **II. Publication N°2: Regulation of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor during human placenta development.**

162	1. Introduction.
163	2. Résultats.
167	3. Conclusion.
169	4. L'article.

G. Pidoux, P. Gerbaud, V. Tsatsaris, O. Marpeau, F. Ferreira, G. Meduri, D. Evain-Brion and J-L Frenodo. Regulation of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor during human placenta development. *J Cell Physiol*, article en revision.

## **III. Publication N°3: Trisomy 21 is associated with abnormal autocrine hCG signaling impairing trophoblast fusion and differentiation.**

204	1. Introduction.
205	2. Résultats.
211	3. Conclusion.
213	4. L'article.

G. Pidoux, P. Gerbaud, O. Marpeau, J. Guibourdenche, F. Ferreira, G. Meduri, J. Badet, D. Evain-Brion and J-L Frenodo. Trisomy 21 is associated with abnormal autocrine hCG signaling impairing trophoblast fusion and differentiation.

## 223 **D: Discussion**

## 239 **Références bibliographiques**

## 255 **Annexe (autres publications)**

Pidoux G., Guibourdenche J., Frenodo J-L., Gerbaud P., Conti M., Luton D., Muller. Evain-Brion D. Impact of trisomie 21 on human trophoblast behaviour and hormonal functions. *Placenta* 2004, Apr 25 Suppl:S79-84. .

Cronier L., Frenodo J-L., Defamie N., Pidoux G., Bertin G., Guibourdenche J., Pointis G. & Malassiné A. Requirement of transient gap junctional intercellular communication for villous trophoblast differentiation of the human placenta. *Biol Reprod*, 2003; 69: 1472–1480.

Guibourdenche J., Frenodo J-L., Pidoux G., Bertin G., Luton D., Muller F., Porquet D. & Evain-Brion D. Expression of pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) during human villous trophoblast differentiation in vitro. *Placenta*, 2003; 24: 532-539.

Lacroix M-C., Guibourdenche J., Frenodo J-L., Pidoux G. & Evain-Brion D. Placental growth hormones. *Endocrine*, 2002; 19: 73-9.

## ABRÉVIATIONS

<b>15ΔPGJ2</b>	15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J2
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ADNc</b>	Acide désoxyribonucléique complémentaire
<b>AFP</b>	Alfa fœtoprotéine
<b>AMPc</b>	Adénosine monophosphate cyclique
<b>AP-1</b>	Activator protein 1
<b>AP-2α</b>	Activator protein 2 alpha
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>ARNm</b>	Acide ribonucléique messenger
<b>ATF-1</b>	Activating transcription factor
<b>bHTH</b>	Beta helix turn helix
<b>BSA</b>	Bovine serum albumin
<b>CGA</b>	hCG alpha
<b>CGB</b>	hCG beta
<b>C-Jun</b>	Proto-Oncogene Proteins c-jun
<b>COUP-TF1</b>	Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor 1
<b>CRE</b>	cAMP responsive element
<b>CREB</b>	CRE binding protein
<b>CREM</b>	CRE modulators
<b>CT</b>	Cytotrophoblastes
<b>CTP</b>	Résidus carboxy-terminaux
<b>Cu/Zn SOD</b>	Cuivre/Zinc superoxyde dismutase 1
<b>CYT7</b>	Cytokératine 7
<b>CY<sup>TM</sup>3</b>	Cyanine 3
<b>DAB</b>	3,3' diaminobenzidine
<b>DAG</b>	Diacyl glycerol
<b>dCTP</b>	Désoxy cytosine tri-phosphate
<b>Dlx3</b>	Distal less homeobox 3
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>dNTP</b>	Désoxy nucléotide tri-phosphate
<b>DR</b>	Direct repeats
<b>DSCR</b>	Région critique du syndrome de Down
<b>DTSSP</b>	3,3'-Dithiobis(sulphosuccinimidyl propionate)
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>dTTP</b>	Désoxy thymidine tri-phosphate
<b>EAR</b>	Erb A related protein
<b>EGF</b>	Epidermal growth factor
<b>EGF-R</b>	Epidermal growth factor receptor
<b>EL (1 à 3)</b>	Extra loop (1 à 3)
<b>ELISA</b>	Enzyme linked immunosorbent assay
<b>EREh</b>	Estrogen receptor
<b>FISH</b>	Fluorescent <i>in situ</i> hybridization
<b>FITC</b>	Fluorescein isothiocyanate
<b>FSH</b>	Hormone folliculo stimulante
<b>FSH-R</b>	Récepteur de l'hormone folliculo stimulante
<b>FUT-1</b>	Fucosyl transférase 1
<b>Gcm1</b>	Glial cells missing homolog 1
<b>GM-CSF</b>	Granucyte macrophage colony stimulating protein
<b>GnRH</b>	Gonadolibérine
<b>GPX</b>	Glutathion peroxydase
<b>GRE</b>	Glucocorticoïd response element
<b>GRK</b>	G Protein-coupled Receptor Kinase
<b>HASH2</b>	Human homolog for mammalian achaete scute homolog 2

<b>hCG</b>	Hormone chorionique gonadotrope humaine
<b>hCG-βc</b>	Hormone chorionique gonadotrope humaine forme beta core
<b>HDAC</b>	Histone déacétylase
<b>HERV-FRD</b>	Human endogenous retrovirus FRD
<b>HERV-W</b>	Human endogenous retrovirus W
<b>hpGH</b>	Hormone de croissance placentaire humaine
<b>hPL</b>	Hormone lactogène placentaire
<b>HRP</b>	Horseradish peroxidase
<b>IBMX</b>	1-Methyl-3-isobutylxanthine
<b>id2</b>	Inhibitor of DNA binding 2
<b>IEF</b>	Isoelectrophocusing
<b>IGF</b>	Insulin growth factor
<b>IL (1 à 3)</b>	Intra loop (1 à 3)
<b>IP3</b>	Inositol triphosphate
<b>ITA</b>	Invasive trophoblast antigen
<b>JRE</b>	Junctional regulatory element
<b>LGR</b>	Leucine rich repeat-containing G protein-coupled receptors
<b>LH</b>	Hormone lutéinisante
<b>LIF</b>	Leukemia inhibitory factor
<b>LRBP1</b>	LH receptor binding protein 1
<b>MAPK</b>	Mitogen activated protein kinases
<b>MES</b>	4-Morpholineethanesulfonic acid monohydrate
<b>Mmp9</b>	Matrix metalloproteinase 9
<b>Mn SOD</b>	Manganese superoxide dismutase
<b>Mops</b>	4-(Morpholinopropane sulphonic acid)
<b>NGF</b>	Nerve growth factor
<b>Oct 3/4</b>	Embryonic transcription factor 3/4
<b>OPTI-MEM</b>	Reduced serum medium modification of MEM (Eagle's)
<b>PAPP-A</b>	Pregnancy-associated plasma protein A
<b>PBS</b>	Phosphate buffered saline
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction
<b>PDGF</b>	Platelet derived growth factor
<b>PEG</b>	Polyethylene glycol
<b>PGE</b>	Prostaglandine E
<b>PGI2</b>	Prostacycline
<b>PIC</b>	Preinitiation complex
<b>PIP2</b>	Phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphate
<b>PKA</b>	Protein kinase A
<b>PKC</b>	Protein kinase C
<b>PLC</b>	Phospholipase C
<b>PolII</b>	Polymerase II
<b>PPARγ</b>	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
<b>PPIA</b>	Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)
<b>Pro-MBP</b>	Precursor form of eosinophil major basic protein
<b>RbAp48</b>	Rb associated protein 48
<b>RCPG</b>	Récepteurs couplés aux protéines-G
<b>RIA</b>	Radio immuno assay
<b>RIPA</b>	Radio immuno precipitation
<b>R-LH/CG</b>	Récepteur LH/CG
<b>RNAi</b>	Acide ribonucléique interference
<b>Rnase</b>	Ribonuclease
<b>RPLP0</b>	Ribosomal protein large P0
<b>RRL</b>	Région riche en leucine

<b>RT-PCR</b>	Reverse transcriptase polymerase chain reaction
<b>RXR<math>\alpha</math></b>	Retinoid X receptor alpha
<b>SA</b>	Semaine amenorrhée
<b>SAE</b>	Signe d'appel échographique
<b>SDS</b>	Sodium dodecyl sulfate
<b>SIAT-1</b>	Sialyl transferase 1
<b>siRNA</b>	Silencing acide ribonucléique
<b>Sp</b>	Specificity protein transcription factor
<b>SSC</b>	Saline sodium citrate
<b>ST</b>	Syncytiotrophoblaste
<b>SVF</b>	Sérum de veau fœtal
<b>T21</b>	Trisomie 21
<b>TF (A à H)</b>	Transcription factor
<b>TGF <math>\beta</math>1</b>	Transforming growth factor beta 1
<b>TM (1 à 7)</b>	Transmembrane domain
<b>TR4</b>	Testicular receptor 4
<b>TSE</b>	Trophoblast specific element
<b>uE3</b>	Œstriol
<b>uNK</b>	Natural killer uterine
<b>uPA</b>	Urokinase-type plasminogen activator
<b><math>\alpha</math>ACT</b>	$\alpha$ activating element
<b><math>\alpha</math>CBF</b>	CAAT binding factor
<b><math>\beta</math>2N</b>	$\beta$ 2 microglobuline

#### TABLEAU DES ACIDES AMINÉS

Acides aminés	Symboles	Symboles
Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Asparagine	Asn	N
Aspartate	Asp	D
Cystéine	Cys	C
Glutamate	Glu	E
Glutamine	Gln	Q
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Méthionine	Met	M
Phénylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Sérine	Ser	S
Thréonine	Thr	T
Tryptophane	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V

## LISTE DES FIGURES

- p20: **Figure 1:** Représentation schématique des principales étapes du développement préimplantatoire.
- p22: **Figure 2:** Représentation schématique des principales étapes de l'implantation (stade prélacunaire).
- p24: **Figure 3:** Représentation schématique des dernières étapes du développement de l'implantation.
- p26: **Figure 4:** Structure du placenta humain à terme.
- p26: **Figure 5:** Représentation schématique des différentes vues du placenta humain.
- p28: **Figure 6:** Représentation schématique de la circulation fœtale et maternelle.
- p28: **Figure 7:** Principales voies de différenciation du cytotrophoblaste (CT).
- p30: **Figure 8:** Représentation schématique des cytotrophoblastes extravilleux au cours de leur différenciation.
- p32: **Figure 9:** Morphologie et structure de la villosité chorale.
- p32: **Figure 10:** Représentation schématique de la villosité chorale.
- p34: **Figure 11:** Représentation de la différenciation morphologique et fonctionnelle des trophoblastes *in vitro*.
- p38: **Figure 12 A:** Structure chromosomique et localisation des gènes des deux sous-unités de l'hCG.
- p38: **Figure 12 B:** Comparaison des sous-unités des hormones glycoprotéiques typiques.
- p40: **Figure 13 A:** Séquence nucléique (NM 000735) de la sous-unité  $\alpha$  de l'hCG.
- p40: **Figure 13 B:** Séquence peptidique (NP 000726) de la sous-unité  $\alpha$  de l'hCG.
- p42: **Figure 14 A:** Séquence nucléique (NM 033043) de la sous-unité  $\beta_5$  de l'hCG.
- p42: **Figure 14 B:** Séquence peptidique (NP 149032) de la sous-unité  $\beta_5$  de l'hCG.
- p44: **Figure 15:** Représentation schématique du dimère  $\alpha\beta$  de l'hCG.
- p44: **Figure 16:** Structure tridimensionnelle de l'hCG.
- p46: **Figure 17 A:** Structure de base des N-glycosylations de l'hCG.
- p46: **Figure 17 B:** Structure des O-glycosylations de la sous-unité  $\beta$  de l'hCG.
- p48: **Figure 18:** Représentation schématique des différentes étapes de la synthèse et de la dégradation de l'hCG.
- p54: **Figure 19:** Profil de sécrétion de l'hCG dans le sang maternel au cours de la grossesse.
- p60: **Figure 20:** Représentation schématique des éléments régulateurs dans la région 5' du gène de la sous-unité  $\alpha$  de l'hCG.
- p60: **Figure 21:** Représentation schématique d'un des mécanismes d'action de l'AMPC dans la régulation de la transcription  $\alpha$  du gène de l'hCG.
- p62: **Figure 22:** Régulation de l'expression induite par l'AMPC du gène codant la sous-unité  $\alpha$ .
- p62: **Figure 23:** Régulation de l'expression induite par l'AMPC du gène codant la sous-unité  $\beta$ .
- p68: **Figure 24:** Représentation schématique de l'organisation du gène du R-LH/CG.
- p68: **Figure 25:** Représentation schématique des différents variants du R-LH/CG.
- p70: **Figure 26:** Représentation schématique de la séquence peptidique du R-LH/CG.
- p74: **Figure 27:** Alignement des séquences en acides aminés du R-LH/CG humain et de rat.
- p76: **Figure 28 A:** Représentation schématique du domaine LRR du R-LH/CG.
- p76: **Figure 28 B:** Représentation schématique du domaine LRR du R-LH/CG.
- p78: **Figure 29:** Représentation schématique du domaine transmembranaire de la Rhodopsine.
- p80: **Figure 30:** Représentation schématique des principales voies de transduction du R-LH/CG.
- p86: **Figure 31:** Représentation schématique de l'organisation du promoteur du gène du R-LH/CG.
- p88: **Figure 32 A:** Représentation schématique du découplage du récepteur par phosphorylation.
- p88: **Figure 32 B:** Représentation schématique de l'internalisation du complexe hormone/récepteur.
- p88: **Figure 32 C:** Représentation schématique de la régulation négative ("down regulation").
- p92: **Figure 33:** Localisation des différentes mutations et polymorphismes du R-LH/CG.
- p94: **Figure 34:** Représentation schématique des processus de non disjonction des chromosomes 21 donnant naissance à une trisomie 21.
- p96: **Figure 35:** Représentation schématique d'un caryotype de trisomie 21.



- p98: **Figure 36:** Représentation schématique de la translocation Roberstonienne.
- p98: **Figure 37:** Représentation schématique d'un caryotype de trisomie 21 suite à une translocation Robertsonienne du 21q sur le chromosome 14.
- p100: **Figure 38:** Table montrant le rapport entre l'âge maternel et le risque d'une grossesse associée à une trisomie 21.
- p102: **Figure 39:** Protocole classique du diagnostic et du dépistage de la trisomie 21 en France.
- p106: **Figure 40:** Profil de sécrétion de l'hCG dans le sang maternel au cours de la grossesse.
- p110: **Figure 41:** Représentation du défaut de différenciation morphologique et fonctionnelle des trophoblastes trisomiques *in vitro*.
- p112: **Figure 42:** Représentation schématique du chromosome 21 avec la localisation des principaux gènes.
- p114: **Figure 43:** Représentation des différentes constructions chromosomiques ayant servies à la construction de souris transgéniques trisomiques.
- p226: **Figure 44 A:** 1<sup>ère</sup> hypothèse: production syncytiale augmentée?
- p226: **Figure 44 B:** 2<sup>ème</sup> hypothèse: décalage du pic physiologique?
- p226: **Figure 44 C:** 3<sup>ème</sup> hypothèse: clairance maternelle anormale?
- p234: **Figure 45 A:** Modèle proposé dans les cellules trophoblastiques normales.
- p236: **Figure 45 B:** Modèle proposé dans les cellules trophoblastiques trisomiques.

## Avant-propos

**H**uit jours après la fécondation, le blastocyste, issu de la fusion de l'ovule et du spermatozoïde, a épuisé ses réserves nutritives. Il lui est donc nécessaire pour sa survie de développer en partenariat avec l'organisme maternel, un organe qui lui permettra de poursuivre son développement: le placenta.

Le tissu trophoblastique est le tissu spécifique du placenta. Le trophoblaste se différencie d'une part en cytotrophoblastes extravilloux invasifs indispensables à l'implantation de l'œuf dans l'endomètre utérin et d'autre part, en cytotrophoblastes villex qui vont fusionner pour donner naissance à la couche externe de la villosité choriale: le syncytiotrophoblaste. Ce dernier se forme *in vitro*, comme *in vivo*, par différenciation des cytotrophoblastes villex, qui s'agrègent puis fusionnent pour former une masse cytoplasmique multinucléée. Ce processus morphologique et fonctionnel se déroule tout au long de la grossesse et assure le renouvellement du syncytiotrophoblaste. Le syncytiotrophoblaste participe aux fonctions d'échanges du placenta et il assure des fonctions métaboliques indispensables à son développement et au maintien de la grossesse. Le syncytiotrophoblaste est le siège de la synthèse d'un grand nombre d'hormones, de peptides et de protéines qui sont majoritairement sécrétés dans la circulation maternelle, la plupart sont nécessaires au maintien de la grossesse, à l'adaptation de l'organisme maternel et au développement fœtoplacentaire. Parmi ces hormones, l'hCG (hormone chorionique gonadotrophine humaine) peut être considérée comme "l'hormone de la grossesse". Elle est indispensable à son maintien et elle est utilisée comme marqueur positif de grossesse chez les femmes enceintes.

L'hCG est une glycoprotéine synthétisée par le trophoblaste, principalement par le syncytiotrophoblaste. Elle régule la différenciation du cytotrophoblaste de façon autocrine, paracrine et endocrine. L'action de l'hCG sur des cellules cibles est médiée par la fixation et l'activation de son récepteur. Le récepteur de l'hCG (R-LH/CG) est commun avec la LH, c'est un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé aux protéines G. La fixation de l'hCG sur son récepteur va entraîner l'activation de plusieurs voies de transduction du signal et par un jeu de phosphorylations en cascade, stimuler ou réprimer des gènes cibles, indispensables notamment pour la différenciation et la fusion cellulaires.

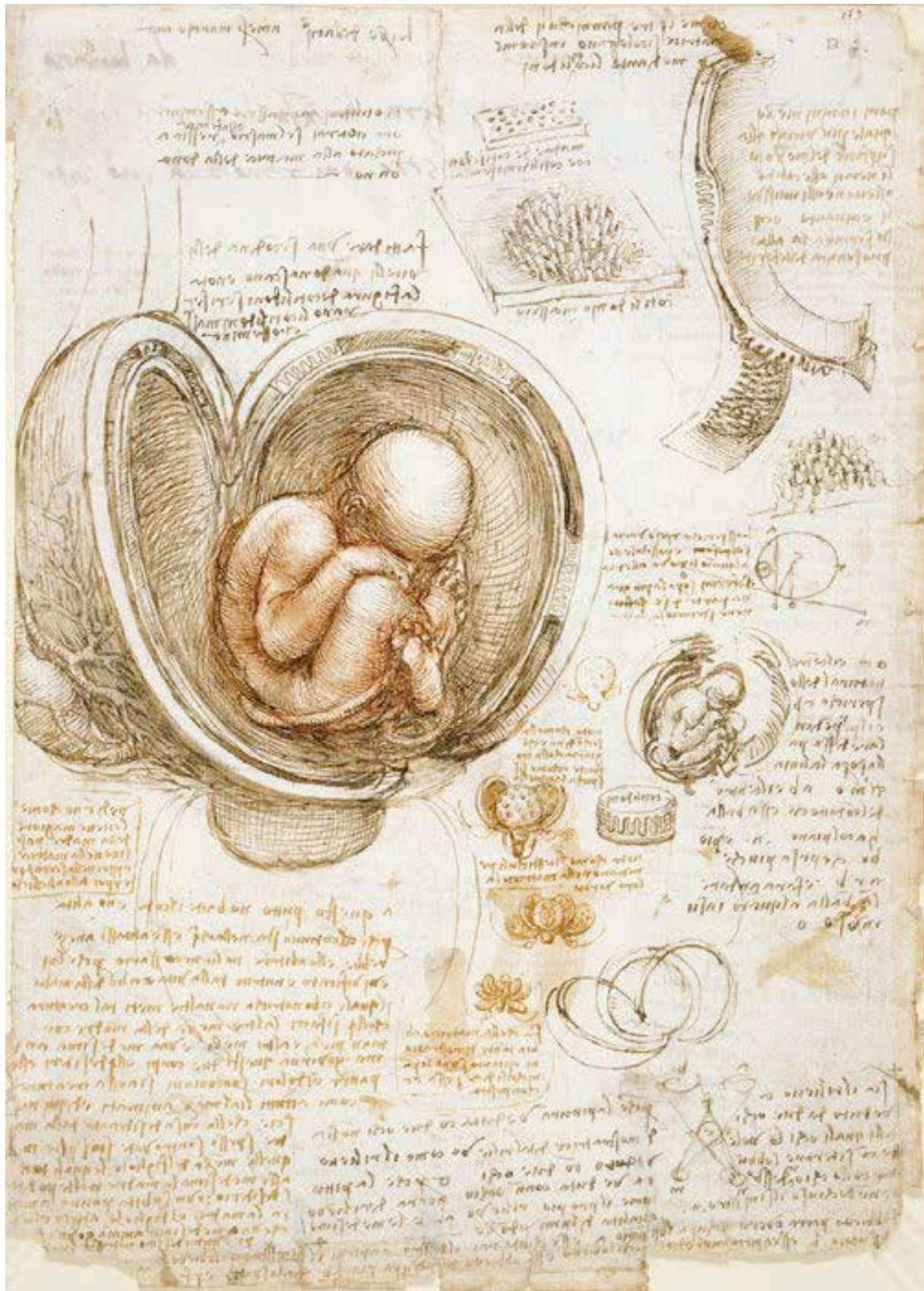
Nous avons montré récemment, que dans la trisomie 21, il existe un défaut de différenciation et de fusion cellulaire, associé à une diminution de la synthèse et de la sécrétion de l'hCG. Le placenta ayant le même caryotype que le fœtus, nous avons comparé *in vitro*, des cytotrophoblastes isolés de placenta de sujets normaux avec des cytotrophoblastes issus de placenta de grossesse associée à une trisomie 21.

L'étude comparée de la cellule trophoblastique trisomique et de la cellule trophoblastique normale, *via* les modèles de cultures primaires des cytotrophoblastes mis au point au laboratoire est une bonne approche pour tenter de comprendre l'implication de l'hCG et de ce son récepteur dans la différenciation du trophoblaste humain.

Dans l'introduction de ce manuscrit, nous présentons les données et les connaissances nécessaires à la compréhension de notre travail. Nous décrivons notre modèle d'étude: le placenta humain et plus particulièrement le cytotrophoblaste villositaire. Nous présentons l'hormone chorionique gonadotrope humaine (hCG) ainsi que son récepteur, tous deux impliqués dans la différenciation du cytotrophoblaste en syncytiotrophoblaste et enfin nous parlerons de la trisomie 21, utilisée en tant que modèle pathologique du défaut de différenciation morphologique et fonctionnelle du placenta humain.

Après avoir détaillé les principales méthodes et techniques utilisées (chapitre B), nous présenterons nos résultats (chapitre C) qui seront ensuite discutés (chapitre D).

# CHAPITRE A : INTRODUCTION



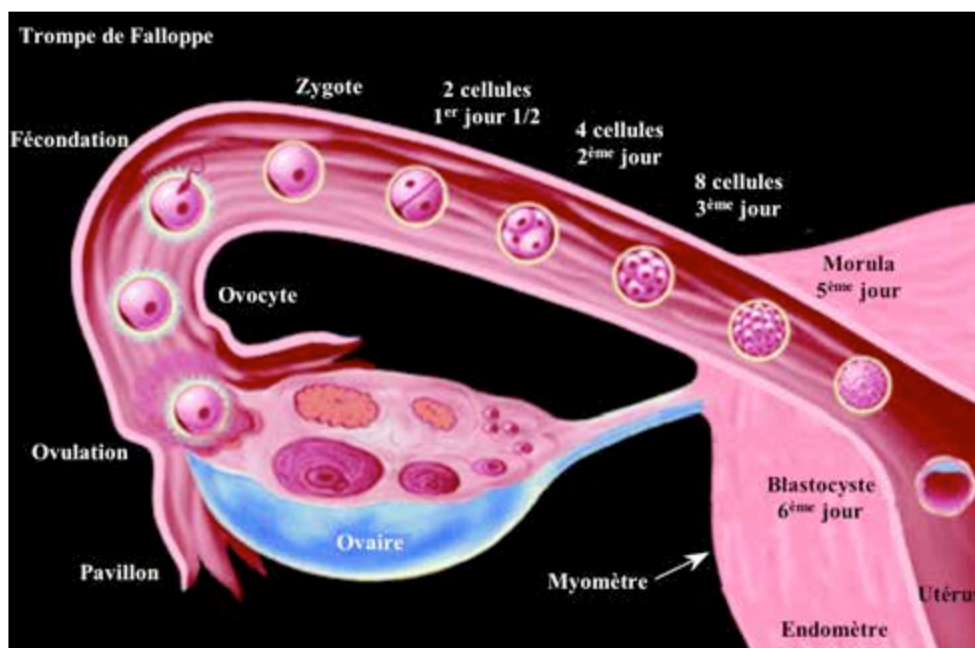


Figure 1: Représentation schématique des principales étapes du développement préimplantatoire.

(Modification d'après Red-Horse K, 2004).

# I. La placentation humaine

**L**e placenta est un organe transitoire, indispensable au développement de l'embryon et du fœtus. Il permet les échanges respiratoires et nutritionnels avec la mère ainsi que l'élimination des déchets. Il est indispensable à la survie et à la croissance fœtale. Il joue aussi un rôle endocrine essentiel dans le maintien de la grossesse et permet l'adaptation métabolique maternelle. Grâce au placenta, le fœtus bénéficie d'une protection partielle contre des micro-organismes pathogènes.

## 1. MORPHOGENÈSE PLACENTAIRE

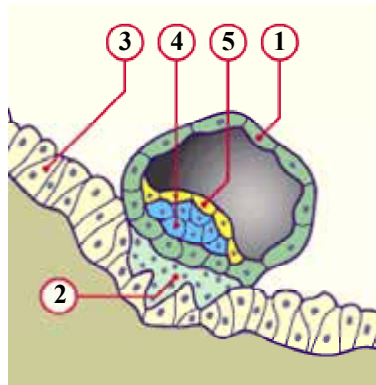
**D'après :** (Benirschke and Kaufmann, 2000)

### 1.1. Développement préimplantatoire.

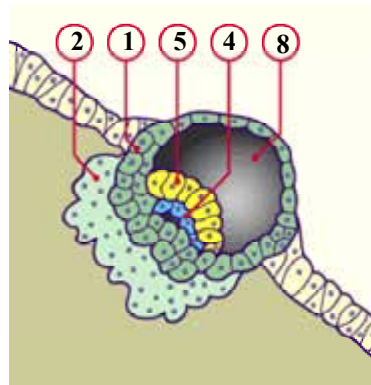
Après fécondation de l'ovocyte par le spermatozoïde, 24 à 48h après l'ovulation dans la trompe de Fallope (**Figure 1**), le zygote ainsi formé, entouré de sa zone pellucide, migre vers la cavité utérine. Il passe au stade morula (masse de 12 à 16 cellules) par mitoses successives. Le blastocyste se forme alors par l'apparition, dans la morula, d'une cavité interne remplie de liquide. Les cellules en périphérie du blastocyste forment le trophoectoderme qui donnera naissance au trophoblaste dont seront issus les tissus extra-embryonnaires, tel que le placenta. La masse cellulaire interne définit le pôle embryonnaire : elle donnera naissance à l'embryon et au mésoderme extra-embryonnaire.

Arrivé dans la cavité utérine, le blastocyste a épuisé l'ensemble de ses réserves, pour sa survie il va s'implanter dans la muqueuse utérine (**Figure 2**). 72h après l'entrée dans la cavité utérine, la zone pellucide entourant le blastocyste se rompt. La couche trophoblastique syncytiale (qui dérive de la fusion des cytotrophoblastes) entre en contact direct avec la muqueuse utérine permettant l'implantation, selon 3 phases:

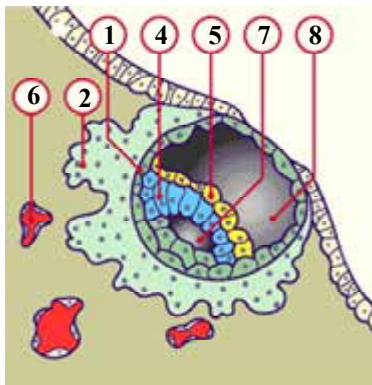
- Phase d'apposition : le blastocyste adhère à la paroi utérine, il y a alors contact entre les cellules épithéliales utérines et le syncytiotrophoblaste (ST), qui est une masse cytoplasmique multinucléée qui se forme par fusion des cellules sous-jacentes (les cytotrophoblastes)



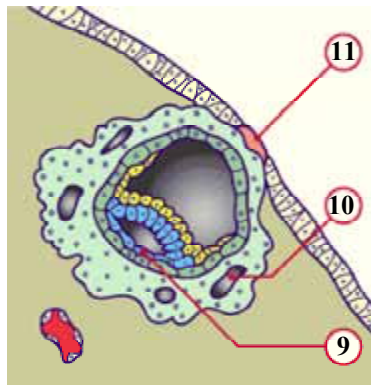
**Implantation 6-7<sup>ème</sup> jour**



**Implantation 7-8<sup>ème</sup> jour**



**Implantation 8<sup>ème</sup> jour**



**Implantation 9<sup>ème</sup> jour**

**Figure 2: Représentation schématique des principales étapes de l'implantation (stade prélacunaire).**

(d'après <http://www.embryology.ch/francais/fplacenta/planmodpl01.html>. © [www.embryology.ch](http://www.embryology.ch)).

A: stade prélacunaire, B: stade lacunaire.

**Légende:**

- |                                      |                            |
|--------------------------------------|----------------------------|
| 1- Cytotrophoblastes                 | 7- Cavité amniotique       |
| 2- Syncytiotrophoblaste              | 8- Blastocèle              |
| 3- Epithélium de la muqueuse utérine | 9- Amnioblastes            |
| 4- Epiblaste                         | 10- Lacune trophoblastique |
| 5- Hypoblaste                        | 11- Bouchon de Fibrine     |
| 6- Capillaires sanguins maternel     |                            |

- Phase d'adhésion : l'interaction entre le blastocyste et l'épithélium utérin devient plus forte.
- Phase d'invasion : le trophoblaste pénètre l'épithélium utérin.

Le succès de l'implantation nécessite une bonne synchronisation entre l'utérus et le blastocyste mature. Le blastocyste peut s'implanter entre les jours 20 à 24 d'un cycle régulier de 28 jours. Pendant ce laps de temps, l'endomètre devient plus vascularisé et œdémateux.

## 1.2. Les différents stades de développement placentaire.

### 1.2.1. Stade prélacunaire (**Figure 2 A et 2 B**).

Dès la phase d'implantation, la première ébauche du placenta apparaît au niveau du pôle du blastocyste orienté vers l'endomètre. Le trophœctoderme se différencie en deux types cellulaires : une couche interne, mononuclée, qui est constituée de cytotrophoblastes et d'une couche externe, possédant un fort potentiel invasif et qui forme le syncytiotrophoblaste. Ce dernier, très invasif à ce stade, pénètre l'épithélium utérin et envahit l'endomètre, grâce à une activité protéolytique aboutissant à la nidation du blastocyste au sein de la muqueuse utérine.

À la fin de ce stade prélacunaire, le blastocyste est complètement encastré dans la paroi de l'endomètre.

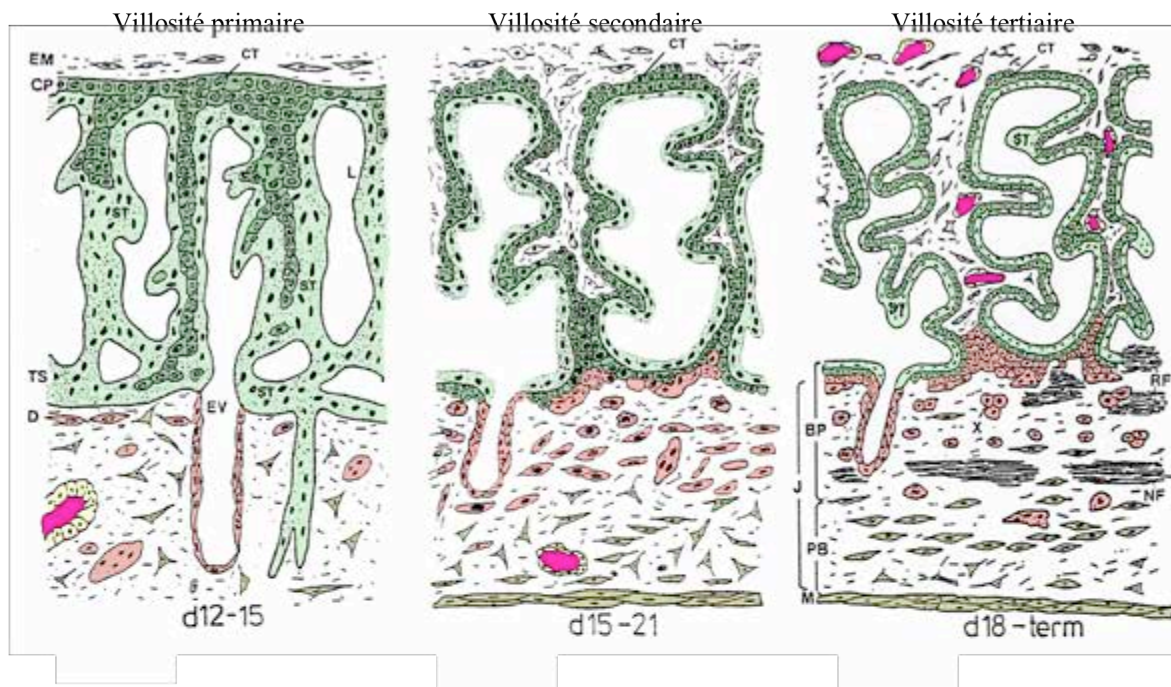
### 1.2.2. Stade lacunaire (**Figure 2 B et Figure 3**).

Vers le 8<sup>ème</sup> ou le 9<sup>ème</sup> jour après la fécondation, des cavités vont se former dans le syncytiotrophoblaste. Peu à peu, ces cavités vont s'agrandir et fusionner pour former des lacunes divisant le syncytiotrophoblaste. Ces lacunes vont se remplir de sang maternel au fur et à mesure que ce syncytium rencontre et dégrade les parois des vaisseaux décidaux (**Figure 3**).

La formation des lacunes divise l'assise trophoblastique en 3 parties:

- Une plaque chorale située du côté fœtal
- Le système lacunaire, avec les trabécules de syncytiotrophoblastes, précurseur de la chambre intervillieuse du placenta mature.
- La couche trophoblastique, s'appuyant sur l'endomètre, qui formera la plaque basale.





**Figure 3: Représentation schématique des dernières étapes du développement de l'implantation.**  
(d'après BENIRSCHKE et KAUFMANN, 1990).

**Légende:**

- CT: Cytotrophoblastes
- ST: Syncytiotrophoblaste
- EM: Mésoderme extra embryonnaire
- CP: Plaque choriale
- T: Villosité primaire
- L: Lacunes renfermant le sang maternel
- TS: Coque cytotrophoblastique
- EV: Vaisseau endométtrial
- D: Décidue
- RF et NF: Fibrinoïde
- X: Cytotrophoblaste extravilleux
- BP: Plaque basale
- PB: Lit placentaire
- J: Zone jonctionnelle

### 1.2.3. Stade vilieux (**Figure 3**).

À partir du 12<sup>ème</sup> jour, les cytotrophoblastes envahissent les travées du syncytiotrophoblaste : on parle alors de villosité primaire. Entre le 15<sup>ème</sup> et le 21<sup>ème</sup> jour, le cœur des villosités primaires est envahi par le mésenchyme embryonnaire : on parle alors de villosité secondaire. La lame basale trophoblastique apparaît puis le mésenchyme se vascularise, on parle de villosité tertiaire à partir du moment où les vaisseaux fœtaux (qui conduiront le sang fœtal) apparaissent.

La villosité chorale apparaît dans sa constitution définitive vers la troisième semaine après la fécondation. Au début du développement placentaire, les villosités se forment sur toute la surface du sac embryonnaire, elles sont plus nombreuses au niveau du pôle embryonnaire.

## 1.3. Placenta à terme.

### 1.3.1. Structure du placenta à terme.

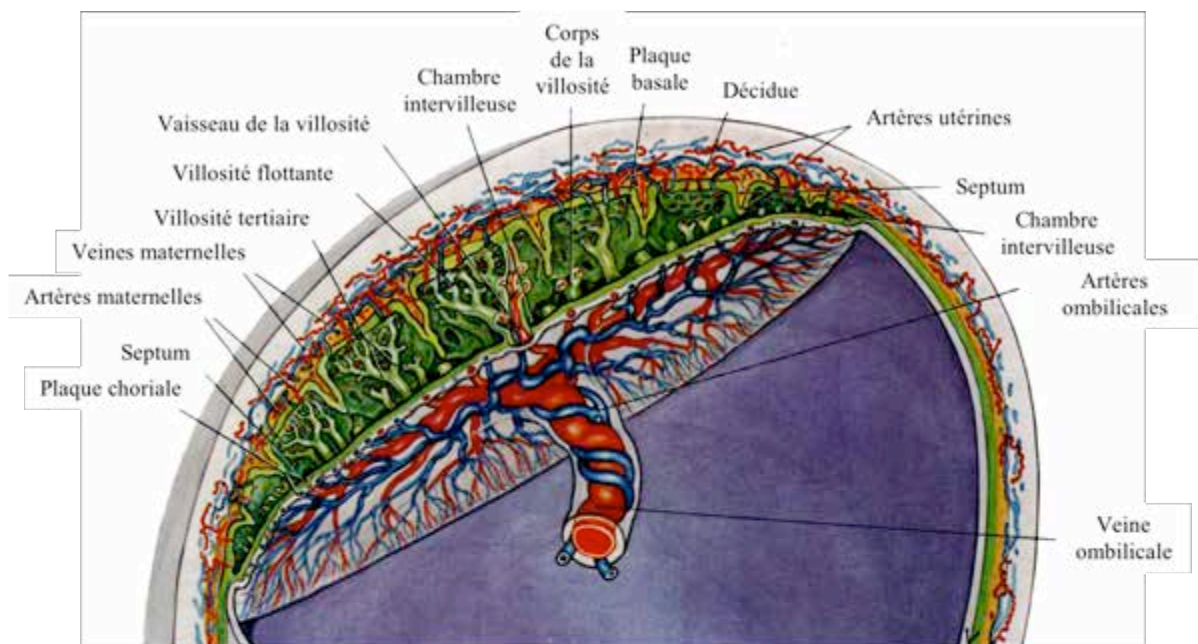
À la naissance, le placenta humain mature est un organe discoïdal (20 cm de diamètre, 3 cm d'épaisseur et pesant 500 g). À la fin du 4<sup>ème</sup> mois de gestation, le placenta humain rentre dans sa "période d'état", c'est à dire qu'il possède sa structure définitive (**Figure 4**).

La face fœtale est appelée plaque chorale (avec l'insertion du cordon ombilical comportant 2 artères, et 1 veine) alors que la face maternelle est appelée plaque basale (**Figure 5**). Entre ces deux plaques, les villosités chorales flottent dans la chambre intervillieuse dans laquelle circule le sang maternel.

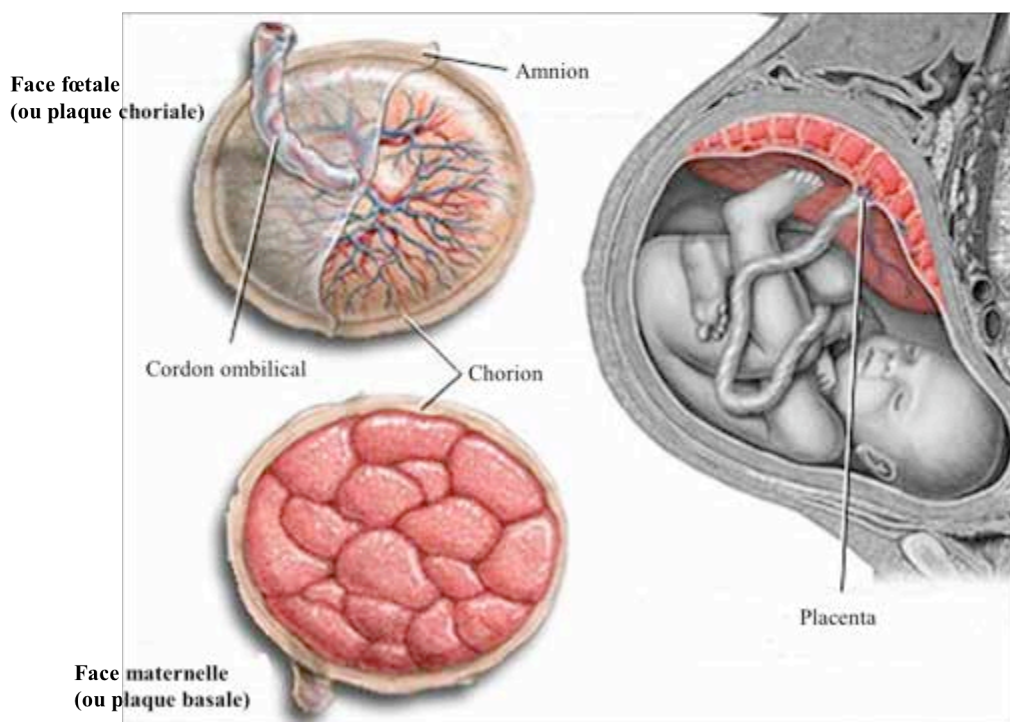
### 1.3.2. La chambre intervillieuse.

Dans la chambre intervillieuse, le sang maternel arrive par les artères spiralées et repart par les veines utéro-placentaires (**Figure 6**).

La présence d'une seule couche trophoblastique au contact direct du sang maternel caractérise le type de la placentation humaine. En effet, le sang fœtal et le sang maternel ne sont jamais en contact, ils sont séparés par la barrière placentaire au niveau des villosités (**Figure 6**). Le placenta humain est de type chorioallantoïdien, c'est à dire que les tissus qui séparent le sang maternel du sang fœtal sont formés du trophoblaste chorionique, de mésenchyme et de vaisseaux allantoïdiens. L'interface d'échange est de type hémochorial car le sang maternel est directement en contact avec le trophoblaste chorionique. Le placenta humain est de type : hémochorial.



**Figure 4: Structure du placenta humain à terme.**  
(d'après BOYD et HAMILTON, 1970).



**Figure 5: Représentation schématique des différentes vues du placenta humain.**  
(d'après [www.nlm.nih.gov](http://www.nlm.nih.gov)).

Il existe d'autres types de placentation chez les mammifères euthériens mettant en évidence des différences notamment au niveau de sa forme extérieure, avec des inter-digitations entre tissus maternels et fœtaux et des inter-relations entre les flux sanguins maternels et fœtaux (Leiser and Kaufmann, 1994). La pluridisciplinarité des fonctions réalisées par le placenta (échange gazeux, de nutriments et l'élimination des déchets) n'est retrouvée dans aucun autre organe de mammifères. Bien que l'on retrouve des structures placentaires différentes selon les espèces, la fonction du placenta reste globalement la même chez tous les mammifères.

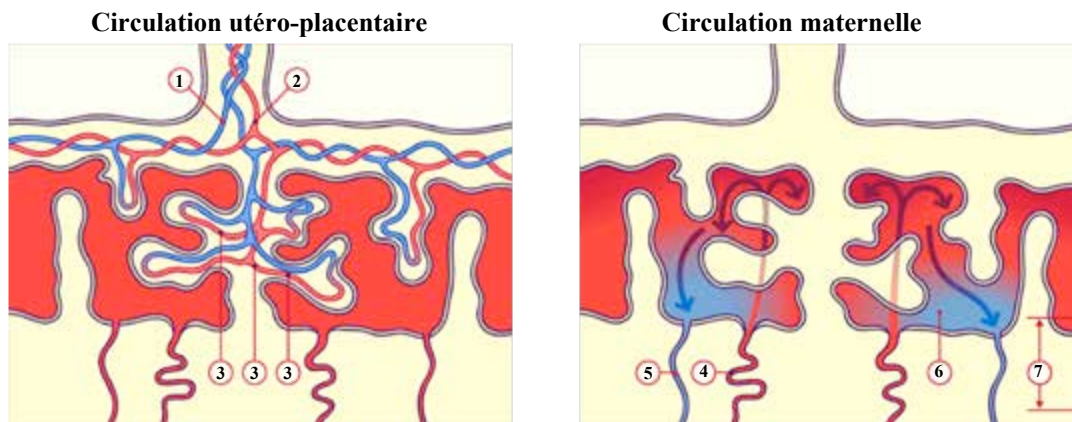
### 1.3.3. Mise en place du flux sanguin maternel dans la chambre intervillieuse

Jusqu'à la 12<sup>ème</sup> semaine de grossesse environ, le sang maternel n'arrive pas dans la chambre intervillieuse : des agrégats de cytotrophoblastes obstruent les artères utéro-placentaires ne laissant passer que du sérum et des quantités réduites de sang maternel. Ainsi durant tout le premier trimestre le développement se déroule dans des conditions hypoxiques (Burton et al., 1999). La circulation de sang maternel dans la chambre intervillieuse ne débute donc qu'au second trimestre et s'associe à une augmentation de la pression partielle en oxygène.

## 2. LES STRUCTURES VILLOSITAIRES

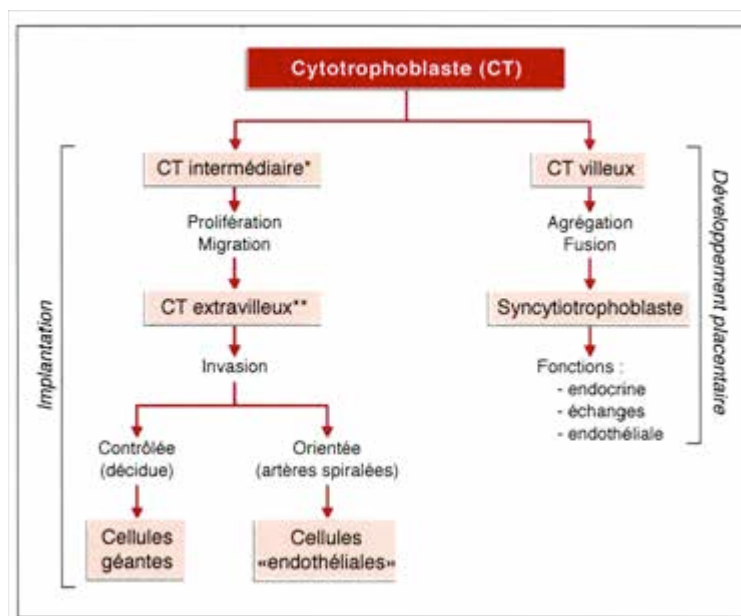
L'arbre villositaire est formé de 2 types de villosités: les villosités crampons, permettant un ancrage dans l'endomètre maternel et les villosités choriales flottantes reliées à la plaque choriale, où se feront les échanges fœto-maternels.

Les cellules trophoblastiques sont présentes au niveau de ces deux types de villosités. Il existe deux voies de différenciation trophoblastique, spécifiques du type de villosité (**Figure 7**). Les deux voies de différenciation sont caractérisées par l'expression de facteurs de transcriptions différents. En effet, les facteurs de transcriptions Id2 et Hash2 sont nécessaires pour permettre la différenciation des cytotrophoblastes en cytotrophoblastes extravillieux de la colonne. Le caractère invasif des cytotrophoblastes extravillieux est régulé par l'activation des facteurs de transcription Mmp9 et uPa et l'inhibition de Hash2 et Gcm1 (Roberts et al., 2004). Le facteur de transcription Gcm1 est indispensable pour la différenciation des cytotrophoblastes en syncytiotrophoblaste (Roberts et al., 2004). Les cytotrophoblastes extravillieux que l'on retrouve au niveau des villosités ancrées prolifèrent, puis migrent et envahissent l'endomètre utérin. Certains cytotrophoblastes extravillieux remplacent les cellules endothéliales des artères spiralées utérines correspondant aux cytotrophoblastes extravillieux endovasculaires. Les autres cytotrophoblastes extravillieux demeurent interstitiels et peuvent fusionner pour donner les cellules géantes (Malassiné and Cronier, 2002).



**Figure 6: Représentation schématique de la circulation fœtale et maternelle.**

(d'après <http://www.embryology.ch/francais/fplacenta/planmodpl01.html>. © [www.embryology.ch](http://www.embryology.ch)).  
 1: Artère ombilicale, 2: Veine ombilicale, 3: Capillaires fœtaux, 4: Artères spiralées, 5: Veines utérines, 6: Chambres intervilluses, 7: Plaque basale.



**Figure 7: Principales voies de différenciation du cytotrophoblaste (CT).**

(d'après ALSAT, MS, 1999). \* ou extravilleux prolifératif, \*\* ou extravilleux invasif. Dans la zone d'implantation du blastocyste le CT des colonnes, dit intermédiaire prolifère, puis migre vers l'endomètre maternel et devient extravilleux. Ce CT extravilleux colonise la décidue et le premier tiers du myomètre. Au cours de sa différenciation terminale, il remplace les cellules endothéliales des artères de l'endomètre maternel, ou il se (dé)différencie en cellules géantes bi- ou tri- nucléées au sein de la décidue. Cette invasion est contrôlée et orientée par de multiples interactions avec les cellules environnantes. Au cœur du placenta, les CT vilieux créent par fusion cellulaire le syncytiotrophoblaste qui constitue la principale interface fœto-maternelle et possède de nombreuses fonctions indispensables au développement fœto-placentaire.

L'autre voie de différenciation s'oriente vers les cytotrophoblastes villosités que l'on retrouve au niveau des villosités chorales: après agrégation, ces cellules fusionnent et forment le syncytiotrophoblaste, assurant une part essentielle des fonctions d'échanges et endocrines du placenta.

### **2.1. Villosités ancrées (ou crampon) (Aplin, 1991)**

La majeure partie de l'assise trophoblastique intervient dans le développement des villosités. Le placenta humain est caractérisé par une invasion profonde de l'endomètre utérin par les cytotrophoblastes extravilloux.

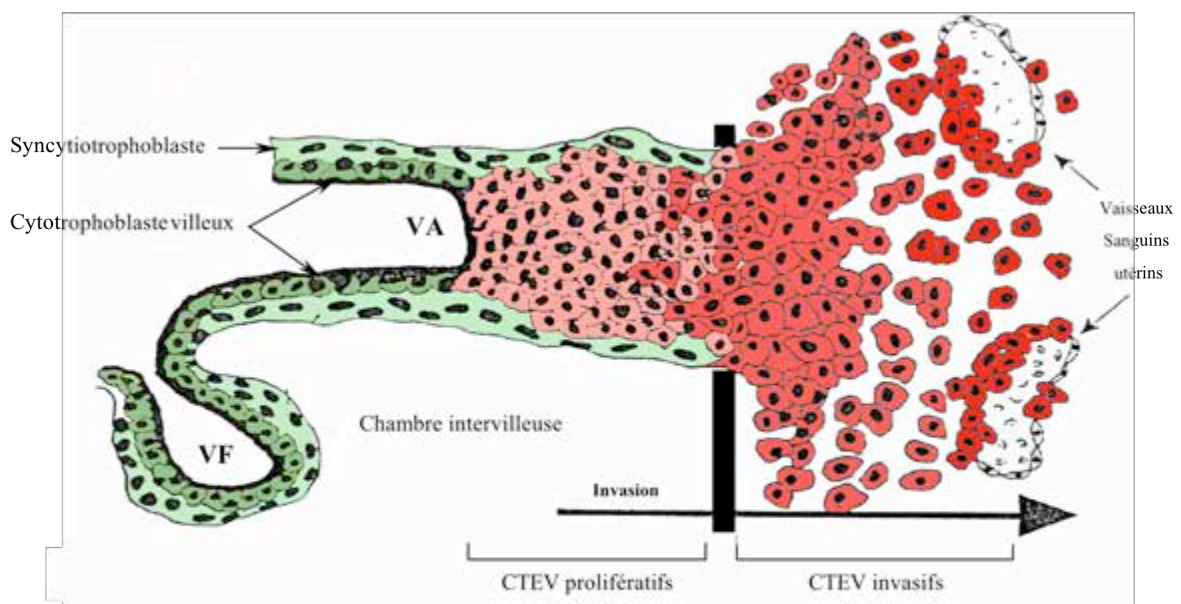
Cette invasion a pour point de départ les villosités ancrées qui assurent un ancrage au niveau de l'endomètre maternel (**figure 8**). La base des villosités ancrées est située au niveau de la plaque basale placentaire. Cette base est constituée de cytotrophoblastes de la colonne, au phénotype prolifératif. À partir de la colonne, des cytotrophoblastes extravilloux adoptent un phénotype invasif. Ils envahissent l'endomètre maternel jusqu'au tiers supérieur du myomètre. Ces cytotrophoblastes extravilloux invasifs, pour certains, atteignent les artères spiralées utérines maternelles et y remplacent l'endothélium vasculaire : ils constituent alors les cytotrophoblastes extravilloux endovasculaires. Ces cytotrophoblastes extravilloux endovasculaires ainsi que le syncytiotrophoblaste sont en contact direct avec le sang maternel. Au cours de leur migration à partir de la villosité ancrée jusqu'à l'artère spiralée maternelle, les cytotrophoblastes extravilloux adoptent un phénotype endothélial (Kaufmann et al., 2003).

L'activité invasive de ces trophoblastes s'accompagne de la production de métalloprotéases comme les collagénases ou les stromelysines (Bischof et al., 1995) (Maquoi et al., 1995) et va conduire à la digestion de la matrice extracellulaire et de la paroi des capillaires et artères maternelles pour les remplacer par une substance fibrinoïde. La disparition des cellules musculaires lisses et des fibres élastiques associées permet de réduire la résistance du flux sanguin vers la chambre intervillouse et d'augmenter ainsi l'apport sanguin (et donc de nutriments) au fœtus.

Ce phénomène d'invasion permet d'utiliser le modèle placentaire comme modèle d'étude du développement pseudo-tumoral. Cette invasion cellulaire trophoblastique est limitée dans le temps (avant 20 semaines d'aménorrhées, ou SA), orientée dans l'espace (vers les artères utérines) et dûment contrôlée par de multiples interactions avec les cellules environnantes. Elle est régulée par des cellules de l'endomètre. Les cellules déciduales (cellules stromales de l'endomètre différenciées sous l'effet de la progestérone et des estrogènes) sécrètent des facteurs solubles régulant la synthèse de protéases et de protéines de la matrice extracellulaire (Bischof et al., 2000). Des cellules inflammatoires telles que les Natural Killer utérines (uNK) régulent aussi l'invasion trophoblastique.

Fœtus (placenta)

Mère (utérus)



**Figure 8: Représentation schématique des cytotrophoblastes extravilloux au cours de leur différenciation.**

(modification d'après le schéma de GEMBACEV, 1997).

(VF): villosité flottante, (VA): villosité ancrée

Dans la décidue, des cellules géantes plurinucléées (2 à 3 noyaux), expriment la cytokératine. Ces cellules seraient issues de la fusion des cytotrophoblastes extravilleux invasifs (Benirschke and Kaufmann, 2000).

## 2.2. Villosités chorales

Bien que les villosités chorales ne représentent qu'environ 50% du volume placentaire total, elles assurent l'ensemble des échanges materno-fœtaux et fœto-maternels. La structure de cette unité fonctionnelle du placenta est représentée sur la **figure 9 (A et B)**.

La villosité est recouverte d'une structure pseudo-épithéliale correspondant au trophoblaste. Contrairement aux autres épithélia, le trophoblaste en contact avec le sang maternel ne comprend pas de cellules individualisées, mais est constitué d'une couche ininterrompue de cellules multinucléées, les syncytiotrophoblastes. Entre ces syncytia et la lame basale, se situent des cellules cytotrophoblastiques, qui sont les "cellules souches" des syncytiotrophoblastes. Ces cytotrophoblastes participent à la croissance des syncytia et à leur renouvellement au cours de la gestation. La villosité chorale, se présente comme un tronc, avec un axe mésenchymateux, plus ou moins développé suivant le degré de maturation de la villosité et de capillaires fœto-placentaires.

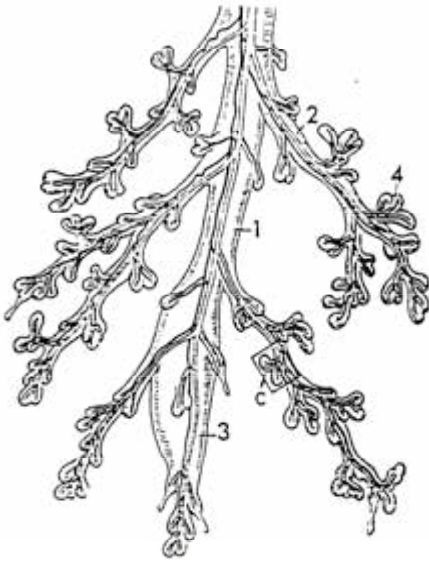
L'axe mésenchymateux est composé:

- De fibres de collagène.
- De cellules de tissu conjonctif (fibroblastes).
- De macrophages, également appelés cellules d'Hofbauer.
- De vaisseaux fœtaux.

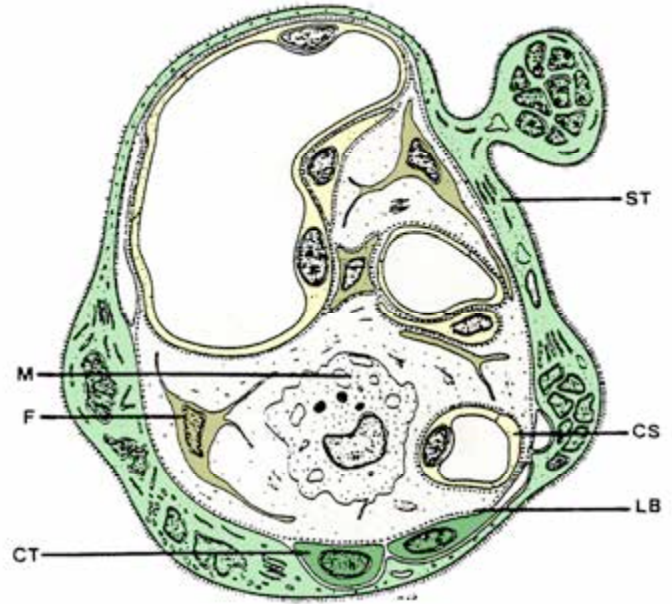
D'une manière générale, la structure des vaisseaux fœto-placentaires ne présente que de légères différences avec celle des vaisseaux d'autres organes. Il est à noter cependant que dans les vaisseaux fœto-placentaires, la couche musculaire est fine et les cellules musculaires lisses plus dispersées. Comme pour les villosités chorales, on note une prédominance des vaisseaux fœtaux près de la plaque chorale au niveau du centre des arbres villeux. La majorité des capillaires se retrouve au niveau des villosités terminales. Ces capillaires fœtaux humains comportent une monocouche continue de cellules endothéliales.



A

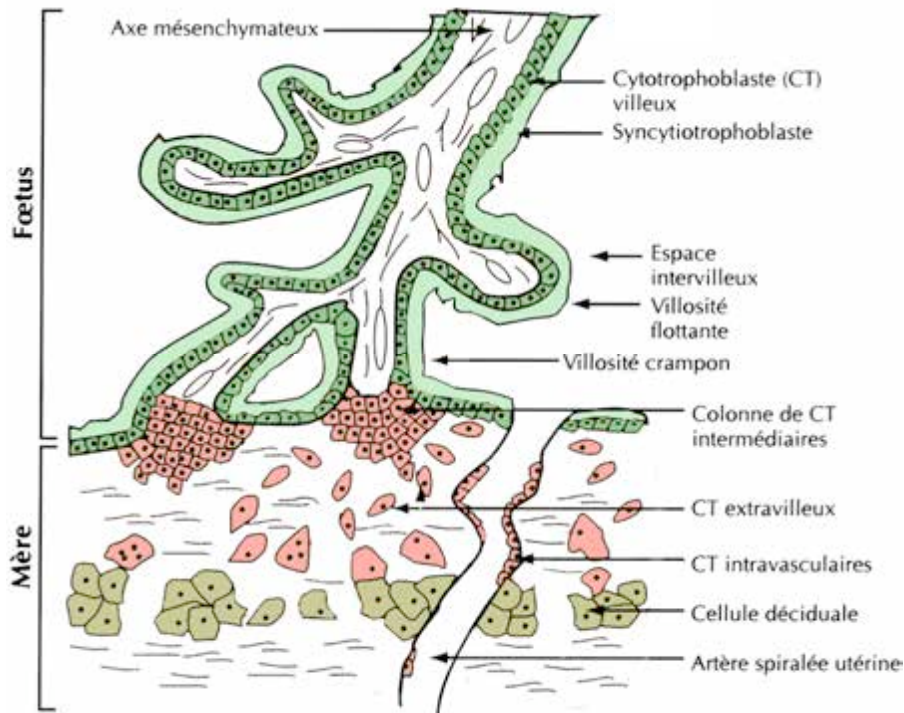


B



**Figure 9: Morphologie et structure de la villosité chorale.**

(d'après BENIRSCHKE et KAUFMANN, 1990). A: Villosité chorale avec: (1) villosité souche, (2) villosité intermédiaire, (3) villosité immature, (4) villosité terminale. B: Schéma de coupe transversale de villosité terminale avec: (CT) cytotrophoblaste, (ST) syncytiotrophoblaste, (F) fibroblaste, (M) macrophage ou cellule de Hofbauer, (LB) lame basale, (CS) capillaire sanguin fœtal.



**Figure 10: Représentation schématique de la villosité chorale.**

(modification d'après un schéma de PANIGEL, 1993).

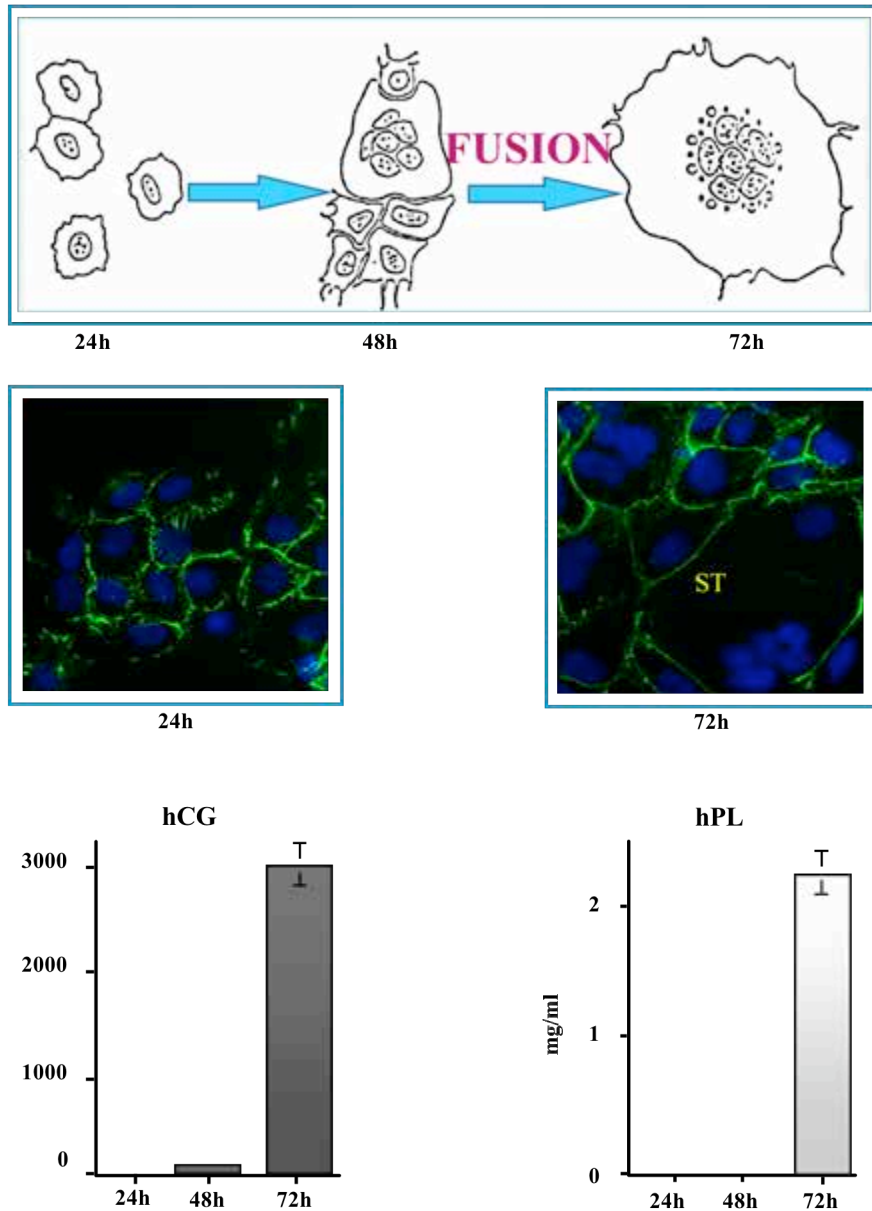
### 2.2.1. Le trophoblaste vilieux

Le trophoblaste vilieux se compose d'une assise syncytiale, appelée syncytiotrophoblaste et d'une couche de cellules mononuclées, les cytotrophoblastes vilieux. Ces derniers reposent sur la lame basale trophoblastique. Le syncytiotrophoblaste naît de la fusion des cytotrophoblastes vilieux sous jacents, il borde alors la chambre intervillieuse et est en contact direct avec le sang maternel dès la fin du premier trimestre de la gestation (**figure 10**).

Le syncytiotrophoblaste est une composante cellulaire à rôles multiples. C'est un épithélium, polarisé par sa structure (microvillosités au niveau apical) contenant des transporteurs d'acides aminés et de glucose, il contrôle les échanges fœto-maternels. Il assure également des fonctions métaboliques.

La différenciation morphologique par fusion des cytotrophoblastes vilieux s'accompagne d'une différenciation fonctionnelle. Le syncytium devient l'unité endocrine du placenta (Ringler and Strauss, 1990), sécrétant dans le sang maternel 99% des hormones polypeptidiques telles que : l'hCG (Human chorionic gonadotropin), l'hPL (Human placental lactogen), l'hPGH (hormone de croissance placentaire), la leptine (Linnemann et al., 2000). Le syncytiotrophoblaste est aussi une source d'hormones stéroïdiennes (Albrecht and Pepe, 1990): la progestérone est produite à partir de 8 semaines de grossesse, les estrogènes sont produits en coopération avec le fœtus (concept d'unité fœto-placentaire). En contact avec le sang maternel, le syncytiotrophoblaste exprime des facteurs régulant l'hémostase tel que la thrombomoduline (Fazel et al., 1998) et l'annexine V.

La compréhension des mécanismes impliqués dans la différenciation du cytotrophoblaste vilieux en syncytiotrophoblaste a été possible grâce à la capacité d'isoler, de purifier et de maintenir ces cellules en culture (Kliman et al., 1986). L'expression de protéines d'enveloppe rétrovirale endogène, comme la syncytine (HERV-W) (Blond et al., 2000) (Mi et al., 2000) (Frendo et al., 2003b) et FRD (HERV-FRD) sont impliqués *in vitro* dans le processus de différenciation et de fusion des cytotrophoblastes en syncytiotrophoblaste. Certaines protéines des jonctions communicantes comme la connexine 43 (Cronier et al., 2001) (Cronier et al., 2003) (Frendo et al., 2003a) est impliquée dans le processus de fusion cellulaire et son expression est modulée au cours de la différenciation. Divers facteurs solubles, d'origine placentaire ou déciduale stimulent la formation de syncytium *in vitro*. Il s'agit de facteurs de croissance (EGF ou epidermal growth factor, GM-CSF ou Granulocyte Colony Stimulating Factor) (Morrish et al., 1998), d'hormones: l'hCG (Cronier et al., 1994), l'estradiol (Cronier et al., 1999), ainsi que les milieux conditionnés de macrophages placentaires mis en cultures (Malassiné and Cronier, 2002), et l'AMPc (Keryer et al., 1998). Par contre le TGF- $\beta$ 1 (transforming growth factor beta-1), le LIF (Leukemia inhibitory factor), la 15 $\Delta$ PGJ2 (15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J2), l'endothéline et la diminution en oxygène (hypoxie) inhibent la formation syncytiale (Alsat et al., 1996) (Frendo et al., 2001) (Malassiné and Cronier, 2002) (Pidoux et al., 2004).



**Figure 11: Représentation de la différenciation morphologique et fonctionnelle des trophoblastes *in vitro*.**

(d'après FRENDON, 2000). Schéma de la différenciation *in vitro*. Immunocytologie: en bleu les noyaux marqué au DAPI, en vert les membranes cellulaires marquées avec un anti-desmoplakine. Les graphiques représentent la sécrétion des hormones (hCG et hPL) dans le milieu de culture à 24, 48 et 72h, en gris foncé la sécrétion d'hCG, et en gris clair la sécrétion d'hPL.

*In vitro*, il est possible d'isoler, de purifier et de mettre en culture les cytotrophoblastes à partir de placenta (Kliman et al., 1986), les cytotrophoblastes s'agrègent spontanément entre 24h et 48h de culture et fusionnent entre 48h et 72h pour donner un syncytiotrophoblaste. Cette différenciation morphologique s'accompagne d'une différenciation fonctionnelle, puisque l'on observe au fur et à mesure de la formation du syncytiotrophoblaste, une augmentation de la synthèse et de la sécrétion des hormones de la grossesse (hCG et hPL notamment) (**figure 11**). La méthodologie est détaillée dans le matériel et méthodes.

### 2.2.2. Cellules de Hofbauer (macrophage fœtaux) et autres types cellulaires.

Les cellules de Hofbauer sont observées dans les villosités au jour 18 pc (post-conception), ce sont des macrophages. Elles ont notamment pour fonction le remaniement du stroma pour en permettre la plasticité pendant le développement du placenta.

Par microscopie électronique, des mastocytes ont été observés en nombre restreint au niveau placentaire (Benirschke and Kaufmann, 2000). Ces mastocytes sécrètent une quantité relativement importante d'histamine, puissant vasoconstricteur. Ils sont présents au niveau du cordon ombilical et localisés à proximité des vaisseaux.

Des myofibroblastes sont également présents dans le mésenchyme villositaire.

## 3. PATHOLOGIES PLACENTAIRES CONSTITUTIVES.

Les pathologies placentaires couvrent un large spectre d'affections diverses, qui vont des anomalies d'implantation et de forme, aux tumeurs et aux infections, en passant par les complications fœtales et maternelles. Ces pathologies ne seront pas abordées de manière exhaustive dans ce chapitre.

### 3.1. Les anomalies de l'implantation.

#### 3.1.1. Le placenta praevia.

Le placenta praevia est caractérisé par une insertion basse du placenta (segment inférieur de l'utérus), qui obstrue donc partiellement ou complètement la voie d'expulsion naturelle, constituant un obstacle mécanique à l'accouchement par voie vaginale. C'est une pathologie qui touche 0,5% des femmes. Le placenta praevia constitue un danger de mortalité fœtale, voire maternelle, en raison des

hémorragies dues au décollement placentaire prématuré lors des contractions utérines ou de la dilatation du col.

### 3.1.2. Les grossesses extra-utérines (ectopiques).

Les grossesses extra-utérines qui touchent une grossesse sur 300 sont dues à une implantation de l'embryon ailleurs que dans la cavité utérine. La localisation la plus fréquente est dans les trompes de Fallope (environ 85%), mais il arrive que l'ovaire, la cavité abdominale, ou la partie intra-utérine des trompes de Fallope en soient la cible. L'explication de ces nidations ectopiques peut être dû à un retard de la captation de l'ovule ou à un ralentissement de la migration de l'œuf vers l'utérus.

### **3.2. La prééclampsie (ou toxémie gravidique).**

La prééclampsie n'est pas une maladie au sens strict de terme mais un syndrome complexe de la grossesse associant au deuxième et troisième trimestre une hypertension artérielle, des œdèmes et une protéinurie. Il s'agit d'une maladie maternelle endothéliale dont l'origine est placentaire. Elle est spécifique à l'espèce humaine et à la gestation. La prééclampsie est liée à une dysfonction placentaire car elle ne survient qu'au cours de la grossesse, disparaît après l'expulsion du placenta, peut survenir en l'absence d'embryon comme en témoignent des cas de prééclampsie compliquant une grossesse molaire, et enfin n'est pas liée à l'environnement utérin, puisqu'elle peut survenir en cas de grossesse extra-utérine. En France, la prééclampsie survient dans 1 à 7% des grossesses, et constitue un danger de mortalité fœtale et maternelle.

### **3.3. Les tumeurs placentaires.**

#### 3.5.1. La môle hydatiforme.

La môle hydatiforme est une anomalie rare de la grossesse (1/1000), définie par la prolifération kystique des villosités chorales (habituellement sans embryon) associée à une dégénérescence tumorale du trophoblaste. Les manifestations de cette pathologie sont les suivantes: sécrétion excessive d'hCG, nausées, vomissements. Le risque majeur de cette pathologie est l'évolution d'un choriocarcinome, tumeur maligne de mauvais pronostic si elle n'est pas dépistée et traitée à temps.

On peut distinguer 3 types de grossesse molaire :

- La forme typique ou môle complète se traduit vers 10-12 SA par un gros utérus dont la cavité est souflée par une prolifération de trophoblastes multivésiculaires associés à de gros ovaires multikystiques fonctionnels par hyperstimulation. Elle est caractérisée par l'absence d'embryon. Un diagnostic précoce par voie vaginale est parfois possible (6 à 8 SA) devant une hypertrophie kystique de la muqueuse associée à un taux d'hCG circulante, anormalement élevé.

- La môle embryonnée est caractérisée par un petit oeuf, dont l'embryon meurt rapidement. Cependant la prolifération trophoblastique continue à se développer. Il s'agit presque toujours d'une triploidie et le risque de dégénérescence est faible.

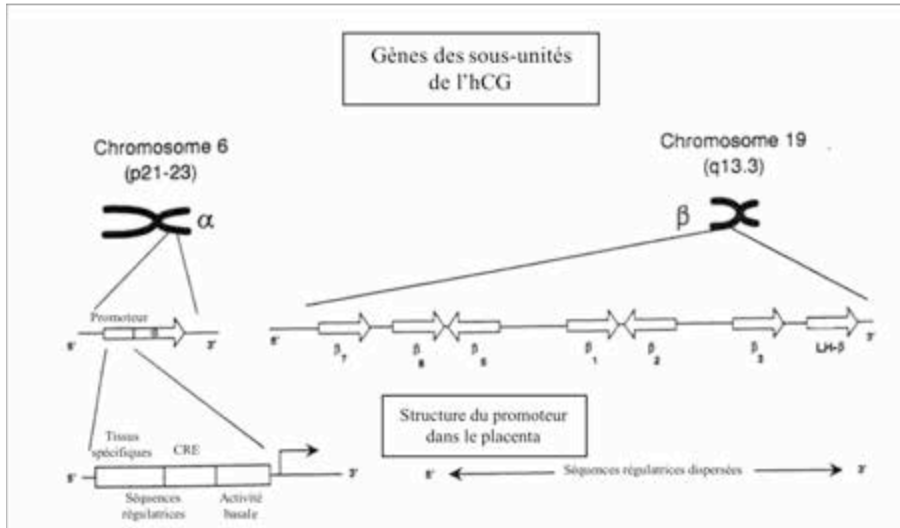
- La môle gémellaire, très rare et toujours dizygote, associe un oeuf embryonné normal (trophoblaste sain) à une môle typique qui correspond à un deuxième oeuf.

### 3.5.2. Le choriocarcinome et les lignées cellulaires issues de choriocarcinome.

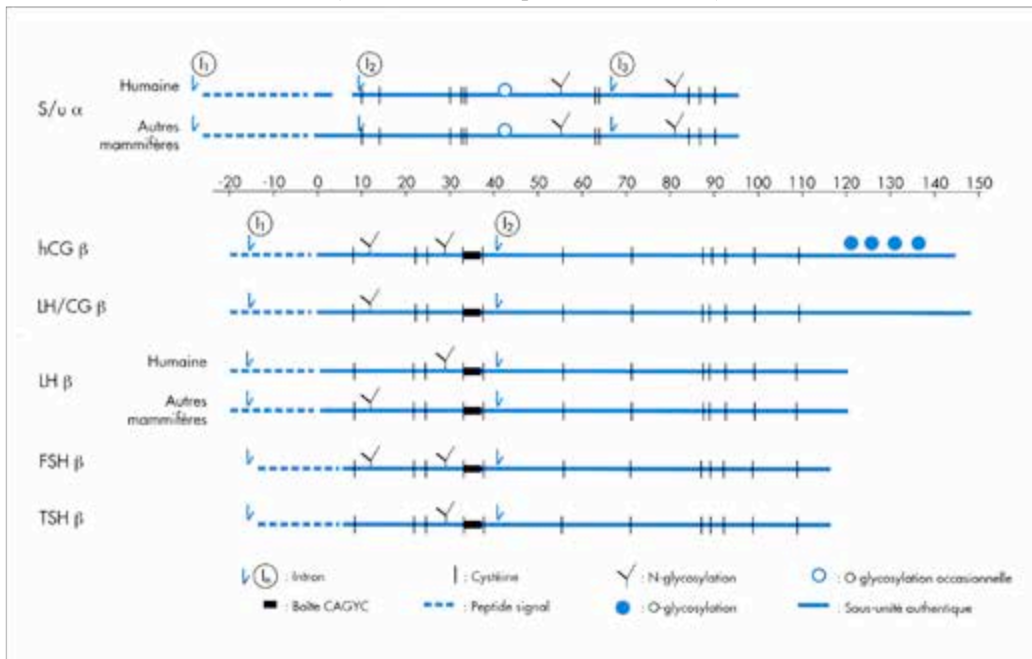
Les môles hydatiformes peuvent être à l'origine d'un choriocarcinome, qui est une tumeur épithéliale maligne dérivant des cellules trophoblastiques. En effet, une maladie trophoblastique, au cours de laquelle du tissu trophoblastique résiduel prolifère de manière tumorale, peut se développer après IVG ou avortement spontané.

Des cellules issues de tumeurs malignes de chorion humain ont été utilisées pour l'étude des fonctions trophoblastiques *in vitro*. Ces cellules de choriocarcinome, dont les principales lignées sont les JEG-3, Jar et BeWo (qui sont toutes les trois des cellules adhérentes de types épithéliales synthétisant de l'hCG), sont majoritairement des cytotrophoblastes mitotiquement actifs qui ont perdu la propriété de se différencier en syncytiotrophoblastes en absence de stimulation. Cependant, la forskoline et le méthotrexate sont capables d'induire la différenciation des cellules de la lignée BeWo, ce qui confère à cette lignée un intérêt particulier pour l'étude de la différenciation des cellules, alors qu'au contraire, les cytotrophoblastes normaux, isolés de placenta, forment spontanément des syncytiotrophoblastes en culture (Kliman et al., 1986).

Ces lignées sont également capables de produire les hormones trophoblastiques spécifiques *in vitro* et d'être stimulées par les analogues de l'AMPc, tout comme les trophoblastes normaux (Wice et al., 1990).



**Figure 12 A: Structure chromosomique et localisation des gènes des deux sous-unités de l'hCG.**  
 (Modification d'après MERZ, 1996)



**Figure 12 B: Comparaison des sous-unités des hormones glycoprotéiques typiques.**  
 (d'après COUNIS, 1998)

Les sous-unités sont représentées linéarisées et sous leur forme précurseur (peptide signal en ligne hachurée), on peut noter le parfait alignement des positions des cystéines, des sites de N-glycosylation et des introns.

## II. L'hormone chorionique gonadotrope humaine

**D**écouverte en 1927 par Asheim et Zondek, l'hormone chorionique gonadotrope humaine (ou hCG) est un marqueur de l'activité trophoblastique. L'hCG est une hormone glycoprotéique dont le rôle est d'assurer le maintien de la gestation. Sécrétée par le trophoblaste, elle peut se détecter dans le sang et les urines maternelles dès le 7<sup>ème</sup> jour de grossesse (test de grossesse). L'expression de l'hCG dans le placenta est un événement relativement récent du point de vue de l'évolution puisqu'elle est observée exclusivement chez les primates supérieurs.

L'hCG appartient à une famille de glyco-hormones à laquelle appartiennent la LH (hormone lutéinisante), FSH (hormone folliculo-stimulante), TSH (hormone thyro-stimulante). Ces glycoprotéines présentent deux caractéristiques majeures: elles sont formées par l'association non covalente de deux sous-unités dénommées alpha (hCG $\alpha$ , LH $\alpha$ , FSH $\alpha$ , TSH $\alpha$ ) et bêta (hCG $\beta$ , LH $\beta$ , FSH $\beta$ , TSH $\beta$ ) toutes deux glycosylées et elles agissent *via* un récepteur membranaire aux protéines G. Les chaînes glycaniques de ces hormones jouent un rôle plus ou moins défini sur l'assemblage des sous-unités entre elles, la sécrétion hormonale, la liaison de l'hormone à son récepteur, la modulation de la demi-vie plasmatique et l'activité biologique hormonale (Pierce and Parsons, 1981).

### 1. STRUCTURE ET BIOSYNTHÈSE DE L'hCG.

#### 1.1. Biosynthèse.

Les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  de l'hCG sont codées par des gènes différents, localisés sur des chromosomes différents (Gharib et al., 1990) (**Figure 12 A**). Notons que dans le placenta, la sous-unité  $\alpha$  est exprimée en large excès par rapport à la sous-unité  $\beta$  (Merz, 1996), la synthèse de l'hCG est donc limitée par le taux de transcription de la sous-unité  $\beta$ .

##### 1.1.1. La sous-unité $\alpha$ .

La sous-unité  $\alpha$  est codée par un gène unique localisé sur le chromosome 6 (6 q14-21), comportant 4 exons et 3 introns (Naylor et al., 1983) (**Figure 12 B**). Ce gène unique code pour la





sous-unité  $\alpha$  des hormones glycoprotéiques (hCG, LH, FSH, TSH), dont les séquences (**Figure 13 A et B**) sont identiques au sein d'une même espèce pour les quatre hormones. Cependant, la taille du gène varie en fonction des espèces en raison de la longueur du premier intron. La sous-unité  $\alpha$  possède une "TATA box" en position -29 pb ainsi qu'une "CAAT box" en position -89 pb. Des modifications de la séquence régulatrice (notamment au niveau "cAMP responsive element", et des "upstream regulatory element") ont permis au gène de la sous-unité  $\alpha$  d'être notamment exprimé dans le placenta et dans les glandes pituitaires.

### 1.1.2. La sous-unité $\beta$ (**figure 14 A et B**).

À l'inverse, la sous-unité  $\beta$  est spécifique de chaque hormone et est codée par des gènes différents. Les gènes codant l'hCG $\beta$  sont au nombre de 6 ( $\beta 7$ , 8, 5, 1, 2, et 3) présents sur le chromosome 19 q13-3 dans un "cluster", ou groupe multigénique de 52kb, adjacent au gène  $\beta 4$  codant pour la sous-unité hLH $\beta$  (**Figure 12 A**). Seuls les gènes  $\beta 7$ , 8, 5 et 3 codent pour la sous-unité  $\beta$  de l'hCG (Talmadge et al., 1983) (Talmadge et al., 1984), ils comportent 3 exons et 2 introns (**Figure 12 B**).

Les gènes  $\beta 1$  et  $\beta 2$  contiennent une insertion de 770 pb dans la région 5', transcrite, non traduite et une mutation au niveau du site d'épissage 5' de l'exon 1, donnant des transcrits dont la phase de lecture est différente. Le placenta exprime essentiellement les gènes  $\beta 5$ ,  $\beta 8$ , et  $\beta 3$ .

Certains tissus normaux non trophoblastiques expriment le gène hCG $\beta$  : l'endothélium vésical exprime le gène  $\beta 7$  et les transcrits  $\beta 5$ ,  $\beta 8$  et  $\beta 3$  sont retrouvés dans les cellules des carcinomes de la vessie. Les séquences nucléique et protéique de la  $\beta$ -hCG sont données dans la figure 14.

## 1.2. Structure biochimique.

### 1.2.1. Structure primaire

La sous-unité  $\alpha$ , est une glycoprotéine commune aux quatre hormones (hCG, LH, FSH, TSH) au sein d'une même espèce, elle présente une structure hautement conservée d'une espèce à une autre. Elle comporte, chez l'homme 92 acides aminés (96 chez tous les non-primates) et deux chaînes N-oligosaccharidiques, au niveau des asparagines 52 et 78. Elle présente aussi des sites potentiels de O-glycosylation (**Figure 12 B**). La sous-unité  $\alpha$  contient 10 cystéines (Cys) et l'appariement des demi-cystéines forme les 5 ponts disulfures intrachaînes situés entre les demi-cystéines 10-60, 28-82, 32-84, 7-31, 59- 87 (Wu et al., 1994) (Lapthorn et al., 1994) (**Figure 12 B et 13 B**).

```

1   tccagcactt tgctcgggtc acggcctcct cctggctccc aggacccac
51  cataggcaga ggcaggcctt cctacaccct actccctgtg cctccaggct
101 cgactagtcc ctagcactcg acgactgagt ctctgagatc acttcaccgt
151 ggtctccgcc tcacccttgg cgctggacca gtgagaggag agggctgggg
201 cgctccgctg agccactcct ggcccccctt ggccttgtct acctcttgcc
251 ccccggaagg ttagtgtcga gctcacccca gcatcctaca acctcctggg
301 ggccttgccg cccccacaac cccgaggtat aaagccaggt acacgaggca
351 ggggacgcac caaggatgga gatgttccag gggctgctgc tgttgctgct
401 gctgagcatg ggcgggacat gggc atccaa ggagccgctt cggccacggg
451 gccgccccat caatgccacc ctggctgtgg agaaggaggg ctgccccgtg
501 tgcatacccg tcaacaccac catctgtgcc ggctactgcc ccaccatgac
551 ccgctgctg caggggggtcc tgccggccct gcctcaggtg gtgtgcaact
601 accgcatgtt gcgcttcgag tccatccggc tccctggctg cccgcgcggc
651 gtgaaccccg tggctctcta cgccgtggct ctgagctgtc aatgtgact
701 ctgccgccc agcaccactg actgcggggg tcccaaggac cacccttga
751 cctgtgatga cccccgttc caggactcct cttc ctcaaa ggccccctcc
801 cccagccttc caagtccatc ccgactcccg gggccctcgg acaccccgat
851 cctcccacaa taaaggcttc tcaatccgca

```

  
Poly (A)

**Figure 14 A: Séquence nucléique (NM 033043) de la sous-unité  $\beta_5$  de l'hCG.**

En bleu: séquence nucléique du peptide signal. En rouge: la séquence nucléique traduite. En vert: le site signal de polyadénylation.

```

-20      1
MEMFQGLLLL LLLSMGGTWA SKEPLRPRCR PINATLAVEK EGCPVCITVN
TTICAGYCPT MTRVLQGVLP ALPQVVCNYR DVRFESIRLP GCPRGVNPVV
SYAVALSCQC ALCRRSTTDC GGPKDHLPTC DDPRFQDSSS SKAPPSLPS
PSRLPGPSDT PILPQ CTP
145

```

**Figure 14 B: Séquence peptidique (NP 149032) de la sous-unité  $\beta_5$  de l'hCG.**

En bleu: séquence du peptide signal. En rouge: les sites de N-glycosylation. En vert: les sites de O-glycosylation. En violet: les 12 cytéines impliquées dans la formation des 6 ponts disulfures. CTP: résidus carboxy-terminaux

Il est à signaler que l'absence de quatre acides aminés dans la partie N-terminale de la sous-unité  $\alpha$  ne se retrouve que chez les primates. En alignant les séquences des différentes espèces sur la base des résidus cystéine, les quatre acides aminés manquant dans la sous-unité  $\alpha$  humaine correspondent aux acides aminés 5 à 8 des autres espèces.

La sous-unité  $\beta$  assure la spécificité biologique de l'hormone; elle est composée chez l'homme pour l'hCG de 145 acides aminés, dont une séquence de 24 résidus carboxy-terminaux (CTP) (**Figure 14 B**). Elle possède six chaînes glycaniques dont quatre chaînes O-glycosidiques, situées sur la partie carboxy-terminale (sérine, en position 121, 127, 132, et 138). Les deux autres chaînes glucidiques sont des N-glycannes en position 13 et 30 (**Figure 12 B**).

Il existe un certain degré d'homologie entre les sous-unités  $\beta$  des différentes espèces mais également au sein d'une même espèce. Ainsi, les sous-unités hLH $\beta$  et hCG $\beta$  sont identiques à 85% pour les 114 amino-acides initiaux, l'hétérogénéité de structure entre ces deux sous-unités  $\beta$  siège dans la présence ou non des résidus CTP (absents dans la hLH $\beta$ ).

Les sous-unités  $\beta$  des différentes glyco-hormones possèdent 12 cystéines en position invariable formant six ponts disulfures (**Figure 12 B et 14 B**).

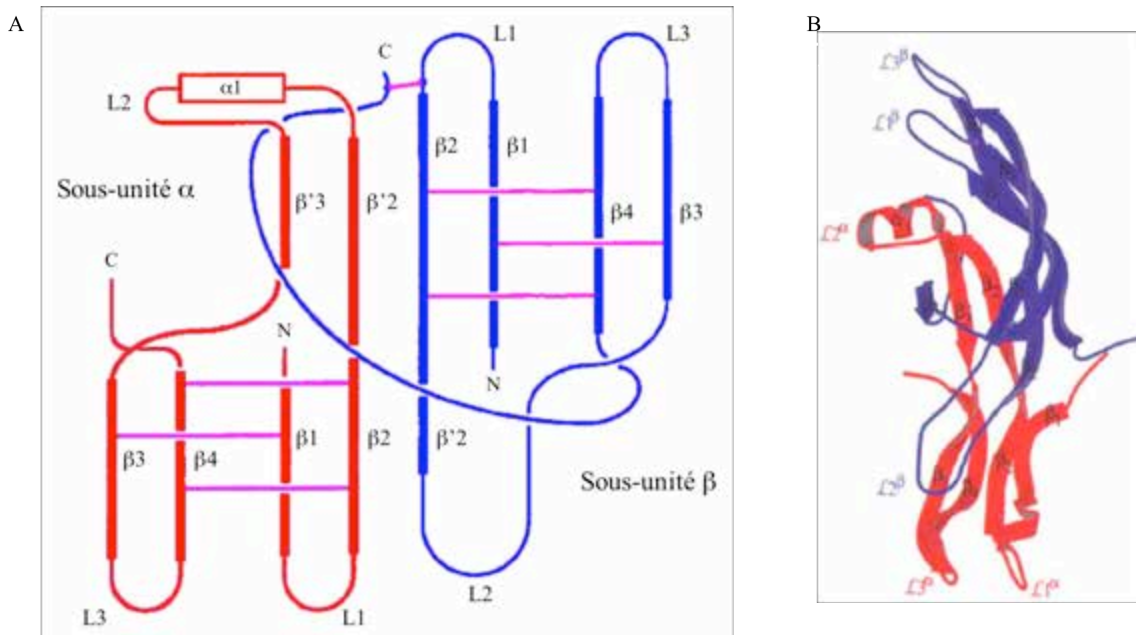
Il est possible que les gènes codant pour les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  des gonadotrophines aient évolué à partir d'un gène ancestral commun, en un gène unique codant pour la sous-unité  $\alpha$  et une famille de gènes codant pour les différentes sous-unités  $\beta$ .

Il a été mis en évidence que les gènes de la sous-unité  $\beta$ -hCG résultaient d'une mutation du gène de la  $\beta$ -LH qui a décalé et prolongé son cadre de lecture, de sorte que la séquence peptidique de la  $\beta$ -hCG est plus longue que celle de la  $\beta$ -LH (Talmadge et al., 1984). Contrairement au gène  $\beta$ -LH, dont l'expression est restreinte à la glande pituitaire, les gènes de la sous-unité  $\beta$  de l'hCG sont exprimés préférentiellement dans le placenta, reflétant très certainement l'acquisition de nouvelles séquences régulatrices contrôlant l'expression spécifique du placenta (Johnson et al., 1997).

### 1.2.2. Structure tridimensionnelle

La structure tridimensionnelle globale des différentes glyco-hormones est sans doute très proche, d'une hormone à l'autre et d'une espèce à l'autre, puisque la position des résidus cystéine et des ponts disulfures est inchangée.

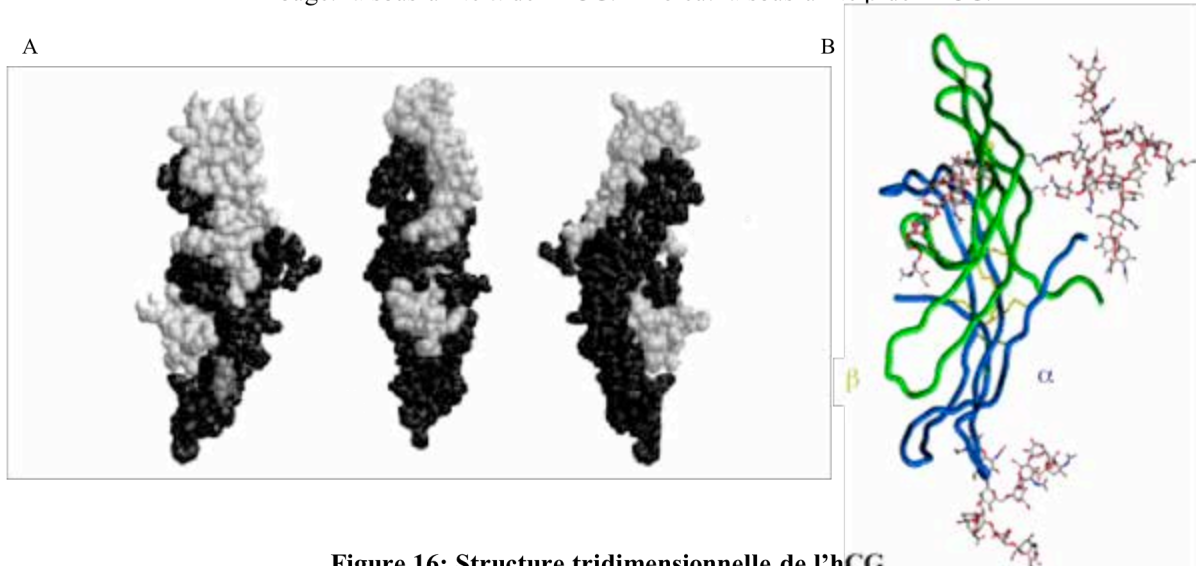
Certaines études ont montré que les gonadotrophines ont une très faible portion de leur séquence en hélice- $\alpha$  (5 à 8%) par rapport aux feuillet- $\beta$  qui représentent 25 à 40% de leur structure (Iles and Chard, 1993) (**figure 15 A**).



**Figure 15: Représentation schématique du dimère  $\alpha\beta$  de l'hCG.**

(d'après WU, 1994) **A:** En rouge: la sous-unité  $\alpha$ . En bleu: la sous-unité  $\beta$ . En violet: les ponts disulfures formant le nœud de cystéine. ( $\alpha 1$ ): hélice-  $\alpha$ , ( $\beta x$ ): les différents feuillet-  $\beta$ , (L1, L2, L3): les repliements des sous-unités. **B:** Vue dans l'espace de l'hCG.

En rouge: la sous-unité  $\alpha$  de l'hCG. En bleu: la sous-unité  $\beta$  de l'hCG.



**Figure 16: Structure tridimensionnelle de l'hCG.**

**A:** (d'après COMBARNOUS, 1999) En blanc: la sous-unité  $\alpha$ . En noir la sous-unité  $\beta$ . La figure centrale montre l'hCG en vue de "face", c'est à dire telle qu'elle se présente à son récepteur, les deux autres profils sont obtenus par rotation d'un quart de tour dans chaque sens.

**B:** Vue dans l'espace de l'hCG et de ces glycosylation. En bleu: la sous-unité  $\alpha$  de l'hCG. En vert: la sous-unité  $\beta$  de l'hCG.

Grâce à la détermination de la structure tridimensionnelle de l'hCG, réalisée par cristallographie aux rayons X (Laphorn et al., 1994) (Wu et al., 1994) (**figure 16 A et B**), il a été possible de montrer que les ponts disulfures de la sous-unité  $\alpha$ : 10-60, 28-82, et 32-84 révélèrent un repliement des chaînes peptidiques semblable à celui retrouvé dans une famille de facteurs de croissance avec nœuds de cystéines, incluant le NGF (nerve growth factor), le TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ ) et le PDGF (Platelet Derived Growth Factor).

La sous-unité  $\beta$  de l'hCG présente elle aussi comme la sous-unité  $\alpha$ , des demi-cystéine aux positions: 9-57, 34-88, 38-90, 23-72, 26-110, et 93-100 (**figure 13 B**). Les ponts 9-57, 34-88, et 38-90, forment ainsi un nœud de cystéines. Cette structure est présente dans les deux sous-unités de l'hCG ( $\alpha$  et  $\beta$ ) et se trouve aussi dans toutes les autres sous-unités ( $\alpha$  et  $\beta$ ) des hormones glycoprotéiques. La structure tertiaire globale de toutes les glyco-hormones est sensiblement la même. Chaque sous-unité, bien qu'ayant une structure primaire différente, présente une organisation identique; leur repliement forme trois boucles (L1, L2, L3) dont la cohésion est assurée par les nœuds de cystéines.

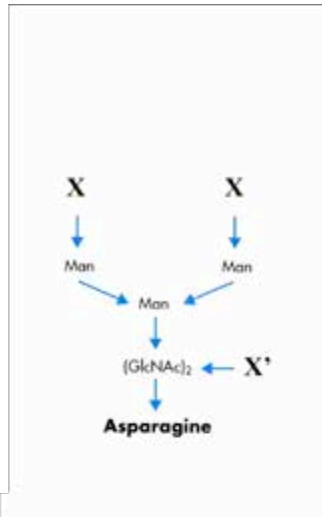
L'association des deux sous-unités est indispensable pour l'expression de l'activité biologique de l'hormone. Les deux sous-unités se présentent sous une forme très étendue et sont constituées de longues séquences d'acides aminés en feuilletts  $\beta$  antiparallèles (**figure 15 B**). La sous-unité  $\beta$  enserre la sous-unité  $\alpha$  par une "ceinture de sécurité" qui est formée des résidus  $\beta$  93-110 et qui est "bouclée" par le pont disulfure entre les cystéines  $\beta$ 26 et  $\beta$ 110 (**figure 16**).

La vitesse de dissociation des sous-unités étant faible, l'activité et l'élimination de l'hormone peuvent avoir lieu avant qu'il n'y ait l'altération de la structure tridimensionnelle. La vitesse de dissociation est limitée par l'ouverture du pont  $\beta$ 26-110 qui ferme la "ceinture de sécurité" et enserre les sous-unités.

### 1.3. Structure glycanique.

L'hCG dimérique est l'objet d'un polymorphisme important, ce qui explique la variabilité de sa masse moléculaire (37-45 kDA) (Green et al., 1986). Les variations de la masse moléculaire des différentes formes résultent de la microhétérogénéité des chaînes glucidiques (isoformes) qui représentent 30 à 33% de la masse de l'hCG pouvant atteindre jusqu'à 45% pour la CG équine, on parle alors de glycoformes (**figure 16 B**). On sait aujourd'hui que les chaînes glycaniques de l'hCG jouent des rôles plus ou moins définis sur l'assemblage des sous-unités entre elles, la sécrétion hormonale, la liaison de l'hormone à son récepteur, la modulation de la demi-vie plasmatique et l'activité biologique hormonale. L'élimination de certains résidus terminaux (acide sialique) entraîne la perte d'activité de l'hCG *in vivo*, mettant alors en évidence une diminution de la

A

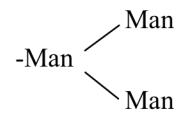


X peut être:

- Ø
- Man
- GlcNAc-Gal
- GlcNAc-Gal-NANA
- GlcNAc-GlcNAc
- GlcNAc-GlcNAc-SO<sub>4</sub>

X' peut être:

- Fuc



**Figure 17 A: Structure de base des N-glycosylations de l'hCG.**  
(modification d'après LAHLOU)

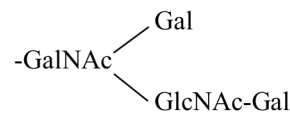
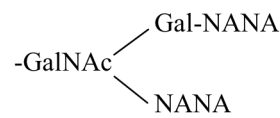
GlcNAc: N-acétyl-glucosamine, Gal: galactosamine, Man: mannose, NANA: acide sialique (acide N-acétyl-neuraminique), Fuc: fucose, SO<sub>4</sub>: sulfate, Ø: aucun sucre.

B



Y peut être:

- GalNAC-NANA
- GalNAC-Gal-NANA
- GalNAC-Gal



**Figure 17 B: Structure des O-glycosylations de la sous-unité  $\beta$  de l'hCG.**

GlcNAc: N-acétyl-glucosamine, GalNac: N-acétyl-galactosamine, Gal: galactosamine, NANA: acide sialique (acide N-acétyl-neuraminique)

demi-vie (Combarrous, 1994). Il a été montré que les hormones déglycosylées sont capables de se fixer aux récepteurs, mais n'entraînent pas d'activation du mécanisme de couplage (Merz, 1988).

*In vivo*, la glycosylation est un phénomène indispensable à la formation correcte des ponts disulfures (Huth et al., 1992), à l'association des deux sous-unités (Strickland et al., 1985) (Matzuk and Boime, 1988b) et à la stabilité du dimère.

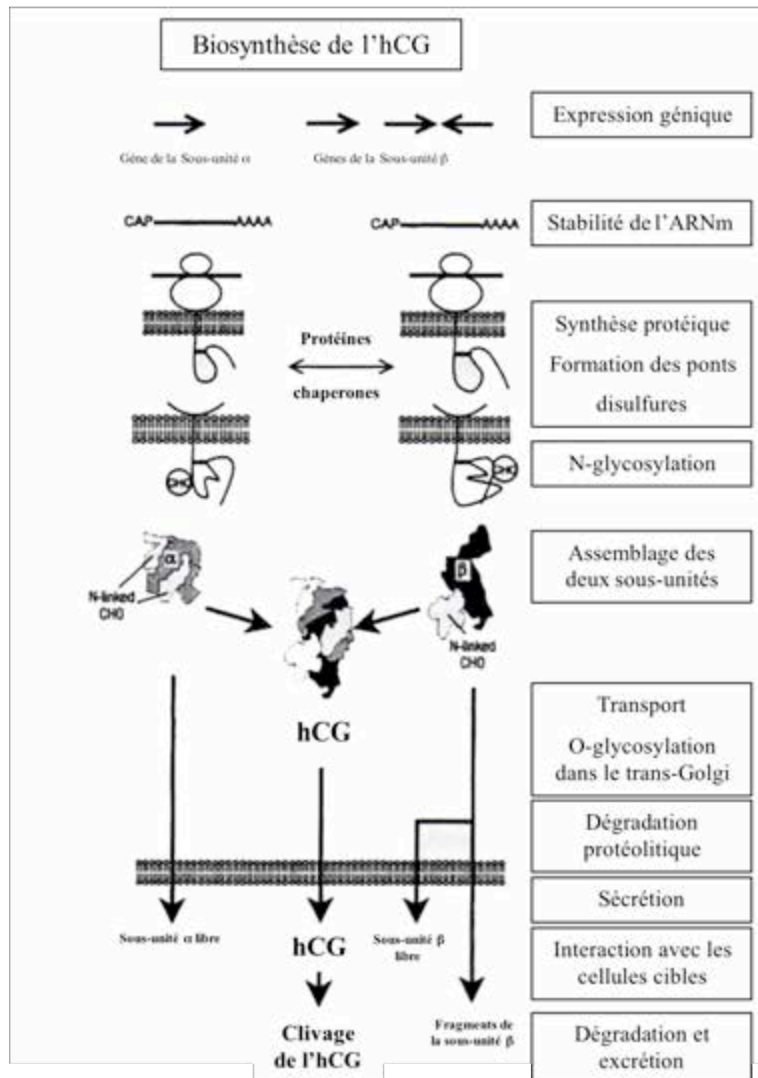
### 1.3.1. Les chaînes N-oligosaccharidiques.

Les glyco-hormones possèdent des chaînes N-glycanniques sur chacune de leurs sous-unités (Bahl et al., 1978). Les sites putatifs de N-glycosylation sont sur les résidus asparagines impliqués dans les séquences du type Asn – X – Thr/Ser (Hartree and Renwick, 1992). Ces sites sont présents chez l'homme, sur la sous-unité  $\alpha$  en position 52 et 78, et en position 13 et 30 pour la sous-unité  $\beta$  (la hLH est glycosylée sur son Asn<sup>30</sup>, tandis que toutes les LHs des autres espèces ainsi que la  $\beta$ -eCG sont glycosylées sur l'Asp<sup>13</sup> (**figure 13 B** et **14 B**).

Les chaînes N-oligosaccharidiques des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  de l'hCG possèdent toutes la structure pentamérique de base fixée sur les asparagines (Asn) de l'axe peptidique suivant: 2 N-acétylglucosamine (GlcNac), fucosylé ou non suivi d'un groupement mannose (Man) sur lequel sont fixés deux groupements mannose (**figure 17 A**). La majorité des glycannes greffés sur l'axe polypeptidique appartiennent surtout à la famille biantennée, de type N-acétylglucosamine ou de type N-acétyl-lactosamine, mais on retrouve aussi une minorité de chaînes triantennés ou polyantennées (Frendo et al., 2004). Sur cette figure pentamérique se greffent des molécules de galactose, de N-acétylglucosamine (GlcNac), de mannose (Man), de fucose (Fuc), d'acide sialique (acide N-acétylneuraminique, ou NANA), de groupement sulfate (GalNac-SO<sub>4</sub>). La présence de ces résidus est aléatoire, c'est ce qui explique la très grande hétérogénéité de l'hCG. Il semble quand même que les résidus NANA, GalNac et GalNac-SO<sub>4</sub> soient retrouvés de manière préférentielle au niveau des résidus terminaux. Le contenu en acide sialique joue un rôle important dans l'activité de l'hormone (**figure 17 A**).

Il existe également une très grande hétérogénéité structurale des chaînes saccharidiques due à la variabilité du nombre et de la longueur des antennes saccharidiques. Cela se traduit par un important polymorphisme de charges puisque l'acide sialique et le groupe sulfate sont tous deux électronégatifs. La nature des résidus terminaux dépend d'un grand nombre de critères. En effet, la nature des résidus terminaux peut dépendre du type cellulaire dans lequel s'effectue la biosynthèse et du lieu où l'on prélève l'hCG. Dans le sang maternel, il existe une très grande hétérogénéité dans l'expression des résidus terminaux de l'hCG, en revanche dans les urines, il sera retrouvé des formes différentes, ces dernières ayant subi en partie le catabolisme hépatique et l'élimination par le rein provoquant ainsi des modifications dans la structure des résidus terminaux.





**Figure 18: Représentation schématique des différentes étapes de la synthèse et de la dégradation de l'hCG.**

(Modification d'après MERZ, 1996)

De même il a été montré que dans certains types de cancer (moles hydatiformes, moles invasives, et choriocarcinomes), il existait un profil type de glycanes dans la séquence des résidus terminaux des chaînes N-liées (Kobata and Takeuchi, 1999).

### 1.3.2. Les chaînes O-oligosaccharidiques.

Les chaînes O-saccharidiques sont présentes sur les choriogonadotropines (humaines et équine). Elles sont uniquement portées par les résidus sérines ou thréonines des extensions C-terminales (CTP) de la sous-unité  $\beta$  (Kessler et al., 1979). Pour l'hCG et plus précisément la sous-unité  $\beta$ , les chaînes O-oligosaccharidiques se trouvent sur les sérines 121, 127, 132, et 138. Les glycanes O-liés sont plus courts que les glycanes N-liés et sont présents sous différentes formes (de mono à penta-saccharidiques) contenant principalement du galactose et des acides sialiques (**figure 17 B**). Il existe une chaîne O-liée sur la thréonine 43 de la sous-unité  $\alpha$  libre humaine (Peters et al., 1989) (mais également sur les formes équine et bovine). Cette forme de la sous-unité  $\alpha$  correspond à un excès de la sous-unité  $\alpha$  synthétisée par rapport à  $\beta$ . Cette glycosylation empêche toute association avec la  $\beta$ .

### 1.3.3. Processus de maturation et de sécrétion (**figure 18**).

#### - Les N-glycosylations:

C'est au niveau du réticulum endoplasmique que les deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  se combinent et que débute la phase initiale de la maturation du polysaccharide précurseur. Elle prend fin dans l'appareil de Golgi où interviennent les modifications responsables, en partie, du polymorphisme et de la microhétérogénéité des chaînes glycaniques juste avant l'étape de sécrétion. La présence d'un peptide signal sur les séquences des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ , leur permettent d'être transférées du noyau au réticulum endoplasmique.

L'étape de N-glycosylation débute dans la lumière du réticulum endoplasmique par une voie commune. Un oligosaccharide contenant 2 résidus N-acétyl-glucosamine, 9 mannoses et 3 glucoses est formé sur un lipide spécial, le dolichol. Le dolichol est un lipide très hydrophobe qui se retrouve à l'intérieur de la membrane du réticulum endoplasmique, son groupement actif faisant face à la lumière. L'oligosaccharide est élaboré par addition successive des résidus sucrés qui se fixent sur le dolichol par un groupement pyrophosphate et transféré "en bloc" (d'une seule fois) sur la protéine cible (ou la sous-unité) par un enzyme lié à la membrane, la glycosyltransférase, dont le site actif est

exposé dans la lumière du réticulum endoplasmique. L'hétérodimère est ensuite transféré vers l'appareil de Golgi (cis-Golgi), où se déroule la maturation des chaînes glycaniques sous l'action de glycosyl-transférases spécifiques. Les étapes terminales de maturation des N-glycosylations ont lieu dans le trans-Golgi.

Le potentiel redox du réticulum endoplasmique et l'intervention de différentes protéines chaperonnes (BIP, ERp72, ERp94, (Feng et al., 1996)), jouent un rôle important dans la constitution des hétérodimères  $\alpha\beta$  des gonadotrophines.

La glycosylation de l'Asn<sup>52</sup> de la sous-unité  $\alpha$ , régule la formation du dimère  $\alpha\beta$  de l'hCG. En effet, il a été montré que la délétion de cette Asn entraîne une diminution de 70% de la formation du dimère (Matzuk and Boime, 1988a). Ces auteurs ont également montré que la mutation de l'Asn<sup>13</sup> possédant une chaîne glycanique de la sous-unité  $\beta$  n'affecte pas la sécrétion de l'hormone mais sa vitesse de sécrétion (Matzuk and Boime, 1988b).

#### - Les O-glycosylations:

Les O-glycosylations ont lieu dans le trans-Golgi et sont réalisées par des glycosyl-transférases. La sous-unité  $\alpha$  possède un site putatif de O-glycosylation sur la thréonine 43 (Peters et al., 1989), ce site doit être libre de toute O-glycosylation pour que la sous-unité  $\alpha$  et la sous-unité  $\beta$  puissent former le dimère hCG. La sous-unité  $\beta$  possède des O-glycosylations dans la région CTP (carboxy-terminale). La région CTP ainsi que les chaînes O-glycaniques jouent un rôle important sur l'assemblage du dimère et sa sécrétion (Muyan et al., 1996).

Des études de localisation ultrastructurale ont suggéré que la sécrétion de l'hCG s'effectue par exocytose de granules sécrétoires (Morrish et al., 1987b). L'hormone est libérée rapidement après sa synthèse et n'est que très peu stockée (Ruddon et al., 1981).

## 2. PHYSIOLOGIE ET MÉTABOLISME.

### 2.1. Relation structure-activité.

L'activité biologique globale des gonadotrophines (et donc de l'hCG) et leur efficacité dépend des trois étapes suivantes:

- Un maintien plus ou moins long dans la circulation (la demi-vie)
- Leur affinité pour leur récepteur spécifique
- Leur aptitude à stimuler les réponses de leurs cellules cibles après liaison au récepteur.

#### 2.1.1. Demi-vie de l'hCG dans la circulation.

Environ 80% de l'hCG est métabolisée par le foie et le rein, 20% se retrouve à l'état non dégradée dans l'urine. La demi-vie sérique de l'hCG est d'environ 24-36h (contrairement aux gonadotrophines hypophysaires qui ont une demi-vie très courte de 20 à 120 min), son élimination peut être décomposée en différentes phases, une rapide (5-6h) et deux autres plus lentes (> 24h). Les demi-vies des sous-unités  $\alpha$  libres sont respectivement de 13min pour la demi-vie courte et de 1,3h pour la plus longue. Pour la sous-unité  $\beta$  libre, elle est respectivement 40min pour la demi-vie courte et de 3,9h pour la plus longue.

L'hCG circulante est clivée au niveau hépatique (par les récepteurs aux asialo-protéines) et rénal puis sécrétée dans les urines à 80% sous forme dégradée. L'urine renferme des produits de dégradation notamment des fragments désialylés de la sous-unité  $\beta$ , mais également le fragment  $\beta$ -core de l'hCG (hCG- $\beta$ cf) qui représente à terme le métabolite urinaire le plus abondant de l'hCG. C'est un petit fragment glycoprotéique de la sous-unité  $\beta$  de 9 kDA, très alcalin et très instable. Il est produit essentiellement au niveau rénal et il est constitué des peptides 6-40 et 52-92 de la sous-unité  $\beta$ , reliés entre eux par des ponts disulfures (Udagawa et al., 1998) (Norman et al., 2000). Son profil d'excrétion urinaire au cours de la grossesse reflète celui de l'hCG sérique. Les clairances urinaires de l'hCG et de ses sous-unités sont l'objet de légères variations interindividuelles.

D'autres part, *in vivo*, l'élimination des acides sialiques terminaux de l'hCG (Van Hall et al., 1971) entraîne une chute de la demi-vie et donc de l'activité biologique. Dans ce cas, l'élimination rénale joue un rôle important puisque la désialylation entraîne une diminution de la taille et des charges négatives de la molécule, facilitant la filtration glomérulaire.

L'extension CTP, ainsi que les chaînes O-oligosaccharidiques de la sous-unité  $\beta$  de l'hCG participent à l'augmentation de la demi-vie de l'hCG. En effet, la fixation d'une extension CTP avec les chaînes O-liées entraîne pour la LH une très nette augmentation de sa demi-vie (Matzuk et al., 1990).

Les chaînes saccharidiques jouent un rôle important dans la demi-vie sérique de l'hCG, en modifiant sa vitesse de capture par les cellules ou organes cibles.

### 2.1.2. Liaison au récepteur LH/CG.

L'hCG agit par l'intermédiaire d'un récepteur cellulaire spécifique situé à la membrane des cellules-cibles. L'ensemble des informations concernant sur le R-LH/CG sera détaillé dans une partie ultérieure. L'élimination des chaînes oligosaccharidiques n'empêche pas la liaison spécifique des gonadotrophines à leurs récepteurs. Lorsque les gonadotrophines humaines sont désialylées par la neuraminidase, on observe une augmentation de l'affinité de l'hormone pour son récepteur indiquant que les résidus d'acide sialique défavorisent la liaison hormone-récepteur.

Le modèle proposé par Y. Combarous (Combarous, 1992) sur la "spécificité négative" implique que la sous-unité  $\alpha$  joue un rôle dans la forte affinité non spécifique des hétérodimères  $\alpha\beta$  pour les récepteurs tandis que la sous-unité  $\beta$  détermine la spécificité des interactions hormone-récepteur en inhibant la liaison de chaque hormone aux récepteurs des autres hormones glycoprotéiques.

La région N-terminale extracellulaire du récepteur "capture" l'hCG circulante et permet l'interaction de l'hormone avec la région du domaine transmembranaire responsable de la transduction du signal (détaillé plus loin).

Suite à des études de mutagenèse dirigée, il a été montré que la région C-terminale de la sous-unité  $\beta$  de l'hCG et plus précisément de courtes séquences présentes dans la "ceinture de sécurité", étaient responsables de la spécificité de l'hormone pour son récepteur.

La spécificité de liaison de l'hCG à son récepteur dépend de la structure de l'hormone mais également de celle de son récepteur. Plusieurs études portant sur des expériences de mutagenèse ont été réalisées sur le R-LH/CG ainsi que sur l'hCG afin de déterminer les régions responsables de la liaison de l'hormone et de son récepteur (voir chapitre sur le récepteur).

### 2.1.3. Stimulation des cellules cibles.

Bien que n'intervenant pas directement dans la liaison au récepteur, les N-glycosylations de l'hCG (comme pour toutes les autres hormones glycoprotéiques) sont indispensables pour la transmission du message hormonal (Matzuk et al., 1989).

Il a été possible de déterminer l'implication des glycanes dans la stimulation des cellules cibles. Ainsi, il a été démontré que la chaîne N-oligosaccharidique présente sur l'Asn<sup>56</sup> de la sous-unité  $\alpha$  est indispensable pour la transduction du signal hormonal, mais il semble que les autres chaînes soient également importantes pour l'efficacité de la transduction du signal (Matzuk et al., 1989) (Sairam and Jiang, 1992). Il a été montré que la région CTP et les chaînes O-oligosaccharidiques qui conditionnent la demi-vie de l'hormone, ne sont pas importantes ni pour la liaison, ni pour la transduction du signal hormonal (Nemansky et al., 1995).

## 2.2. Sécrétion physiologique de l'hCG.

L'hCG est sécrétée par les cellules trophoblastiques dès la formation du placenta. De ce fait, on retrouve la présence des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  dans les cytotrophoblastes et le syncytiotrophoblaste. Le taux de transcrits de la sous-unité  $\beta$  est prédominant en début de grossesse, alors que la sous-unité  $\alpha$  est majoritaire en fin de grossesse.

L'hCG est détectable dans le sang maternel périphérique 48 heures après l'implantation de l'œuf dans l'endomètre et reste dosable dans le sang maternel pendant toute la durée de la grossesse.

Le taux de sécrétion de l'hCG augmente rapidement entre la 4<sup>ème</sup> et la 8<sup>ème</sup> semaine d'aménorrhée (SA) et son taux plasmatique double tous les 2 à 3 jours. Il atteint son maximum entre la 8<sup>ème</sup> et la 10<sup>ème</sup> SA, puis il chute rapidement et se maintient, à une valeur basse et relativement constante jusqu'à la fin de la grossesse (taux qui est variable d'un individu à un autre) (**figure 19**).

L'hCG disparaît totalement du sang maternel dans les 5 jours qui suivent l'accouchement et l'expulsion du placenta. On la retrouve dans le sang fœtal (1 – 3 % des taux maternels) et dans le liquide amniotique (20 – 25 % des taux maternels).

*In vivo*, le pic sécrétoire observé au cours du premier trimestre de l'hCG n'est toujours pas clairement expliqué, plusieurs hypothèses ont été avancées:

- Des décharges de GnRH (gonadolibérine) libérées en début de grossesse (Gohar et al., 1996).
- La prolifération puis l'apoptose de cellules trophoblastiques sécrétant de l'hCG, provenant de cytotrophoblastes bordant la cavité cœlomique et dont la disparition a lieu vers 10 SA (Chard et al., 1995).
- Un rétrocontrôle négatif entraînant une diminution de la transcription pouvant impliquer l'hCG elle-même et ses récepteurs présents sur les cytotrophoblastes (Lei and Rao, 1992) (Licht et al., 1993).

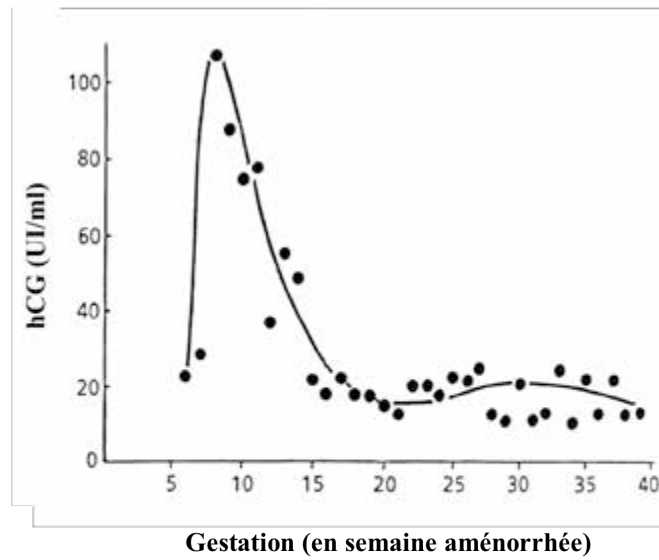


Figure 19: Profil de sécrétion de l'hCG dans le sang maternel au cours de la grossesse.

## **2.3. Rôle physiologique de l'hCG.**

### 2.3.1. Fonctions endocrines.

Le rôle physiologique essentiel de l'hCG est d'assurer le maintien de la gestation. En effet, cette hormone est sécrétée par le syncytiotrophoblaste dans le sang maternel (dans la chambre intervillieuse) dès les premiers jours de l'implantation de l'embryon. C'est l'hormone de la grossesse, en l'absence de celle-ci la gestation est impossible. La fonction principale de l'hCG correspond à son action lutéotrope, permettant de transformer un corps jaune cyclique lutéal en un corps jaune gravidique. L'hCG stimule la stéroïdogénèse ovarienne et maintient la sécrétion de progestérone par le corps jaune pendant quelques semaines jusqu'à ce que la production de ce stéroïde par le placenta soit bien établie et autonome.

Des études cliniques ont montré que des patients atteints de tumeurs sécrétant de l'hCG présentaient des signes d'hyperthyroïdie. Il a été confirmé que l'hCG est capable de stimuler la sécrétion d'hormone T<sub>3</sub>, la capture d'iode et la formation d'AMPc par des thyrocytes en culture (Kraiem et al., 1994). L'hCG possède donc également une action thyrotropique. L'hCG posséderait également encore d'autres fonctions biologiques, permettant d'expliquer la présence de faibles quantités d'hCG d'origine hypophysaire chez des individus normaux, en dehors de toute grossesse.

### 2.3.2. Fonctions autocrines et paracrines.

L'hCG possède également d'autres fonctions biologiques, notamment sur l'unité fœto-placentaire. Des récepteurs LH/CG ont été mis en évidence au niveau du placenta, des membranes fœtales et de la décidue. L'hCG est donc susceptible de réguler des fonctions fœto-placentaires par action autocrine et/ou paracrine (Lei and Rao, 1992).

#### - Fonctions autocrines.

La production d'autres hormones et facteurs de croissance d'origine placentaire peut également être modulée par l'hCG (inhibine, PGE, Prostacycline (PGI<sub>2</sub>) et IGF-II (Ogren and Talamantes, 1994)). L'hCG régule sa synthèse et sa sécrétion par les cellules trophoblastiques (Licht et al., 1993).



- Fonctions paracrines.

Des travaux récents ont montré que l'hCG pouvait avoir un rôle angiogénique. *In vitro*, l'hCG induit la formation de bourgeons capillaires sur des cellules endothéliales microvasculaires utérines (UMVEC) cultivées sur microporteurs (Zygmunt et al., 2002). En revanche d'autres auteurs ont montré sur un modèle de cellules de Kaposi que l'hCG induit une inhibition de l'angiogenèse (Pfeffer et al., 2002).

Au niveau du myomètre, des récepteurs LH/CG ont été identifiés (Zuo et al., 1994). L'action relaxante de l'hCG sur les cellules musculaires lisses du myomètre pourrait jouer un rôle dans le maintien de la grossesse.

Des récepteurs LH/CG ont été mis en évidence au niveau de l'amnion et du chorion (Lei and Rao, 1992). Au niveau de l'amnion, l'hCG contenue dans le liquide amniotique a été décrite comme régulateur de l'activité de la cyclooxygénase et de la prostacycline synthétase (PGI<sub>2</sub> synthétase) (Toth and Rao, 1994) (Toth and Rao, 1994).

Il est à noter que des récepteurs LH/CG ont été décrits dans de nombreux tissus, notamment dans le cordon ombilical (Rao et al., 1993), dans les trompes de Fallope (Lei et al., 1993b), au niveau du cerveau (Lei et al., 1993a) et bien d'autres tissus. L'ensemble de ces données sera détaillé ultérieurement.

#### **2.4. Intérêt clinique de l'hCG.**

(d'après (Sturgeon and McAllister, 1998))

Des taux sériques faibles d'hCG dimérique d'origine non trophoblastique (inférieur à 10mUI/ml de l'ordre de 1000pg/ml) sont détectables chez des sujets sans pathologie décelable, probablement dûs à une synthèse hypophysaire. Des taux sériques d'hCG $\alpha$  libre (inférieur à 3000pg/ml) et d'hCG $\beta$  libre (toujours inférieur à 100pg/ml) sont décelables chez des sujets normaux. La détection et la quantification de l'hCG sérique sont des indices importants pour le diagnostic des grossesses ectopiques.

#### 2.4.1. Chez l'enfant.

L'augmentation sérique de la sous-unité  $\alpha$  de l'hCG est le signe de tumeurs hypophysaires (adénomes gonadotropes et thyroïdote), alors qu'une augmentation de la sous-unité  $\beta$  est le reflet d'une tumeur germinale.

#### 2.4.2. Chez l'homme.

A l'exception des pathologies hypophysaires, une augmentation sérique de l'hCG et de la sous-unité  $\beta$  est synonyme de tumeurs testiculaires, alors que l'augmentation de la sous-unité  $\beta$  est surtout le reflet des tumeurs vésicales.

#### 2.4.3. Chez la femme enceinte (hors pathologies hypophysaires).

- Diagnostic de grossesse.

L'augmentation plasmatique et urinaire de l'hCG (et de sa sous-unité  $\beta$ ) est le premier signe de la grossesse. L'hCG est détectable dans le sang maternel périphérique dès le 9<sup>ème</sup> jour après la fécondation ou 2 jours après l'implantation dans l'endomètre. Le dosage de l'hCG dans le sang maternel permet de faire le diagnostic précoce de la grossesse avant le retard de règles et avant l'apparition des signes échographiques de la gestation.

- En cours de grossesse.

Une chute ou une diminution des taux d'hCG plasmatiques témoignent d'un développement anormal de la grossesse (menace de fausse-couche, et grossesse extra-utérine). Un taux élevé d'hCG plasmatique ne témoigne pas de la vitalité de l'embryon, elle est simplement le reflet de la présence de cellules trophoblastiques actives. Pour cette raison, il est possible de trouver des taux d'hCG plasmatiques significativement élevés dans le cas d'une grossesse qui vient de cesser d'évoluer (mort de l'embryon), ou sur une grossesse de type œuf clair (sac gestationnel sans embryon).

#### 2.4.4. Dans les cas de tumeurs placentaires.

L'hCG et sa sous-unité  $\beta$  libre sont aussi d'excellents marqueurs des tumeurs placentaires (mole, et choriocarcinome) et testiculaires. Dans certaines maladies trophoblastiques il existe une élévation rapide et importante des taux d'hCG, dont la valeur du rapport  $\beta$ -libre/hCG totale permet de préciser le caractère tumoral. Au cours de la grossesse normale ce rapport est compris entre 0,05 et 1%, dans les grossesses molaire il est compris entre 1 et 5%, et en cas de choriocarcinome le rapport est supérieur à 5%.

Les tumeurs de type dysembryones immatures malins développés à partir des gonades et contenant du tissu trophoblastique (comme le choriocarcinome de l'ovaire et du testicule) sécrètent de l'hCG (hCG totale ou  $\beta$ -libre).

La sécrétion unique de la sous-unité  $\beta$  libre est caractéristique des tumeurs non placentaires et non testiculaires (tumeurs vésicales et cérébrales).

#### 2.4.5. Dans le dépistage de la trisomie 21.

Associée au dosage de l' $\alpha$ -foetoprotéines (AFP) et de l'œstriol (uE3), la détermination des taux sériques de ces 3 hormones chez la mère entre la 14<sup>ème</sup> et la 18<sup>ème</sup> semaine de grossesse sont utilisés pour la mise en évidence des aberrations chromosomiques et en particulier des trisomies 21 (chapitre détaillé en IV).

### **3. RÉGULATION DE LA PRODUCTION D'hCG *IN VITRO*.**

**D'après :** (Ogren and Talamantes, 1994) (Merz, 1994)

De nombreuses substances intervenant dans la régulation de la synthèse et/ou de la sécrétion de l'hCG ont été mises en évidence.

Deux mécanismes d'action sont impliqués: l'activation des systèmes AMPc-PKA et DAG-PKC entraînant tous deux une stimulation de la sécrétion d'hCG.

### 3.1. Les différentes voies de régulation.

#### 3.1.1. La voie de l'adénylate cyclase-AMPC-PKA.

Une élévation du taux intracellulaire d'AMPC ou la présence d'un analogue de l'AMPC (8Br-AMPC) stimule la sécrétion d'hCG par les trophoblastes normaux en culture (Feinman et al., 1986) mais également par des lignées cellulaires de choriocarcinome (Sibley et al., 1991). Les effets de l'AMPC sur la production de l'hCG sont générés par une action au niveau transcriptionnel des gènes  $\alpha$  et  $\beta$ , à la fois sur les taux d'ARNm synthétisés et sur la stabilité de ces mêmes ARNm (Jameson and Lindell, 1988). Par ailleurs, l'AMPC a également été décrit comme un activateur de la N-glycosylation de l'hCG (Konrad and Merz, 1994).

Les cinétiques d'induction des ARNm de la sous-unité  $\alpha$  et  $\beta$  de l'hCG sous stimulation d'AMPC sont très différentes. Pour la sous-unité  $\alpha$ , l'activation de la transcription est plus rapide (quelques heures) que celle de la sous-unité  $\beta$  (environ 16 h) (Albanese et al., 1991).

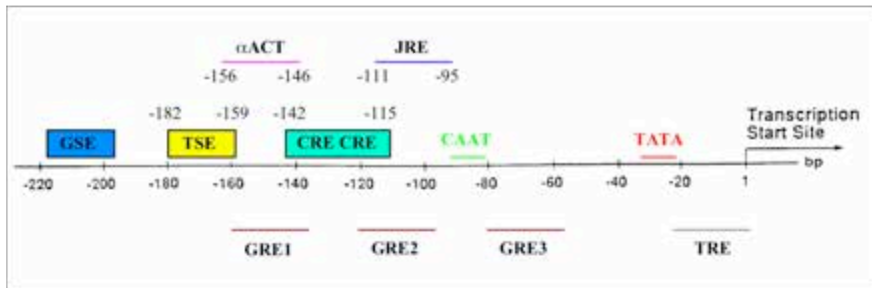
#### - Le promoteur de la sous-unité $\alpha$ (figure 20)

Au niveau du gène de la sous-unité  $\alpha$ , l'activation de la transcription a bien été décrite et correspond à l'activation de la voie de l'AMPC, mise en évidence pour d'autres gènes. Il existe différents éléments régulateurs situés dans la région 5' flanquante du promoteur de l'hCG  $\alpha$ . On note la présence d'un site TSE ("trophoblast specific element") liant le facteur de transcription AP-2 $\alpha$  (Johnson et al., 1997), un site  $\alpha$ ACT (" $\alpha$  activating element") contenant un site consensus de GATA et capable de fixer aussi bien GATA2 que GATA3 (Steger et al., 1994). Il existe aussi deux sites CRE ("cAMP-Responsive Element") adjacents et en tandem, de 18 pb chacun et présent aux positions -146 pb et -111 pb. Ces sites lient les protéines CREB ("CRE Bindind Protein") (Knofler et al., 2000). On retrouve un site JRE ("junctional regulatory element") fixant le facteur homeobox Dlx3 ("distal-less 3") (Roberson et al., 2001). Notons enfin la présence d'une boîte CAAT, liant le facteur  $\alpha$ CBF ("CAAT binding factor")

Les protéines liant ces sites agissent en synergie. Une étude de mutagenèse a permis de définir la contribution individuelle de chaque élément activateur du promoteur de la sous-unité  $\alpha$ , suite à une induction de l'AMPC (Knofler et al., 2000).

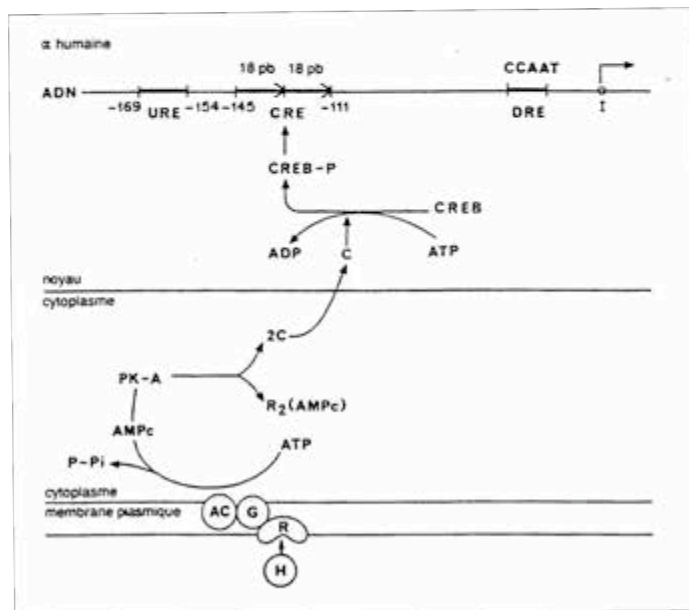
L'inactivation des éléments  $\alpha$ ACT et JRE dans les cultures primaires de trophoblastes a montré que les facteurs (GATA et Dlx3) liant ces deux sites consensus contribuent à l'expression basale de la sous-unité  $\alpha$ , mais pas réellement à l'expression induite au cours de la différenciation.

La PKA, activée par l'AMPC va phosphoryler grâce à sa sous-unité catalytique, une protéine CREB



**Figure 20: Représentation schématique des éléments régulateurs dans la région 5' du gène de la sous-unité  $\alpha$  de l'hCG.**

(modification d'après OGREN et TALAMENTES, 1994). CRE: cAMP responsive element, TSE: trophoblast specific element, GRE: glucocorticoid responsive element, TRE: thyroid responsive element, GSE: gonadotrope specific element, JRE: junctional regulatory element,  $\alpha$ ACT:  $\alpha$  activating element, TATA: boîte TATA, CCAAT: boîte CAAT.



**Figure 21: Représentation schématique d'un des mécanismes d'action de l'AMPc dans la régulation de la transcription  $\alpha$  du gène de l'hCG.**

(d'après COMBARNOUS, 1994). CREB: CRE binding protein, H: hormone hCG, R: récepteur, G: protéine Gs, AC: adénylate cyclase, R2: sous-unité régulatrice de la PKA, C: sous-unité catalytique, P: phosphate.

(“CRE Bindind Protein”), qui sous forme dimérisée va, par sa fixation aux séquences consensus CRE, induire la transcription du gène  $\alpha$  de l’hCG (**figure 21 et 22**). La délétion des sites CRE réduit de manière drastique l’activation de la transcription de la sous-unité  $\alpha$  lors de la différenciation des trophoblastes, suggérant que les facteurs de transcription CREB sont requis pour l’activation de la transcription de la sous-unité  $\alpha$  lors de la différenciation des trophoblastes. De même, il semble que le facteur AP-2 $\alpha$  est impliqué dans la transcription de la sous-unité  $\alpha$  au moment de la différenciation, puisqu’une inactivation de la séquence TSE, induit une diminution de la transcription au moment de la différenciation des trophoblastes (Knofler et al., 2000).

Il est à noter que les protéines CREB ne sont pas les seules protéines phosphorylables par la PKA. En effet, des facteurs CREM (“CRE Modulators”), ATF-1 (“Activating Transcription Factor-1”), AP-1 (“Activator Protein-1”) et c-Jun interviennent également dans la modulation de la transcription du gène de la sous-unité  $\alpha$  (Ryseck and Bravo, 1991) (Drust et al., 1991).

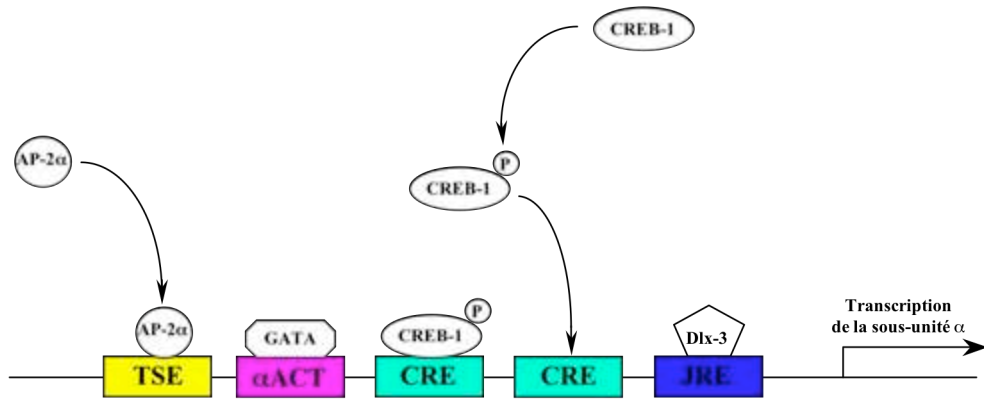
Les sites CRE peuvent également fixer les membres de la famille ATF. L’augmentation considérable de la phosphorylation de CREB-1 comparée à celle des ATF-1 suggère que CREB-1 est le facteur de transcription de la sous-unité  $\alpha$  activé principalement par la voie de la PKA. ATF-1 phosphorylé pourrait donc augmenter ou atténuer les effets de CREB-1. En effet, ATF-1 peut avoir un effet antagoniste sur la transcription dépendante de CREB-1 par la formation d’hétérodimère (Knofler et al., 2000).

#### - Le promoteur de la sous-unité $\beta$ (**figure 23**)

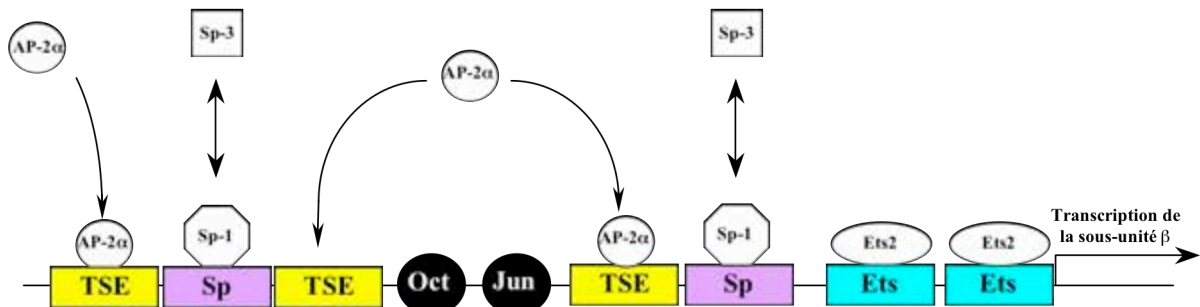
Les éléments régulateurs de la sous-unité  $\beta$  de l’hCG ont été particulièrement difficiles à identifier, notamment à cause de l’absence d’une boîte TATA et d’autres séquences canoniques, mais également à cause de l’activité transcriptionnelle relativement faible de ce promoteur comparé à celui de la sous-unité  $\alpha$ . Il a été montré que plusieurs régions du promoteur de la sous-unité  $\beta$  de l’hCG fonctionnent en “combinaison” pour maintenir une expression basale (Steger et al., 1993).

Knöfler et al. (Knofler et al., 2004) ont montré la présence de trois sites TSE et de deux sites Sp important pour l’induction du taux basal de l’expression de la sous-unité  $\beta$ . Ces sites sont composés de séquences courtes riches en GC. Sur les sites TSE se fixe AP-2 $\alpha$ , alors que Sp1 se fixe aux sites Sp. Les sites TSE et Sp sont des sites adjacents, de ce fait, dû à l’encombrement stérique il est impossible qu’un facteur AP-2 $\alpha$  puisse se fixer si un facteur Sp1 est déjà fixé et inversement. Lors de l’activation de la voie de l’AMPc, c’est AP-2 $\alpha$  qui va être responsable de l’augmentation de la transcription de la sous-unité  $\beta$  de l’hCG.

Des facteurs ont été décrits comme inhibant l’expression de l’hCG- $\beta$ , il s’agit de C-Jun et Oct3/4. Ces deux facteurs se fixent sur des régions proches des TSE empêchant alors l’AP-2 $\alpha$  de fixer.



**Figure 22: Régulation de l'expression induite par l'AMPc du gène codant la sous-unité  $\alpha$ .**  
 TSE: trophoblast specific element,  $\alpha$ ACT:  $\alpha$  activating element, CRE: cAMP responsive element, JRE: junctional regulatory element, CREB: CRE binding protein. L'activation de la voie de l'AMPc permet l'activation de la protéine AP-2 $\alpha$  et sa fixation sur le TSE, ainsi que la phosphorylation de CREB-1, ce qui induit sa fixation sur les CRE.



**Figure 23: Régulation de l'expression induite par l'AMPc du gène codant la sous-unité  $\beta$ .**  
 TSE: trophoblast specific element, Sp: élément régulateur de type Sp, Ets: élément régulateur de Ets, Oct et Jun: sont des séquences des éléments régulateurs oct3/4 et C-Jun.

Le facteur Sp3 est capable de réprimer l'activation de Sp1 d'une manière dose dépendante sur le promoteur de la sous-unité  $\beta$  de l'hCG. En fonction du ratio Sp1/Sp3, il va y avoir compétition de Sp1 et Sp3 sur les sites Sp. Le taux d'expression des facteurs Sp1, Sp3 et AP-2 $\alpha$  varient au cours de la différenciation du syncytiotrophoblaste et sont donc impliqués dans la modulation de la transcription de la sous-unité  $\beta$  de l'hCG dans les trophoblastes (Knofler et al., 2004).

Il a récemment été montré que d'autres facteurs sont aussi impliqués dans la régulation de la sous-unité  $\beta$  de l'hCG. Le facteur Ets2 appartient à la famille des facteurs de transcription se fixant à un domaine ETS. Les facteurs Ets2 possèdent une séquence bHTH ("helix turn helix") d'environ 85 acides aminés hautement conservés, responsable de la liaison à l'ADN. Deux sites Ets2 ont été identifiés dans le promoteur de la sous-unité  $\beta$  de l'hCG, ces deux sites sont capable de fixer les facteurs Ets2. Les facteurs Ets2 sont activés par Ras et par des facteurs agissant *via* la voie de transduction du signal Ras/MAPK, voie qui est elle même activée par l'augmentation de l'AMPc (Ghosh et al., 2003).

### 3.1.2. La voie de la phospholipase C-DAG-Ca<sup>2+</sup>-PKC.

L'implication de la voie phospholipase C-DAG (diacylglycerol)-Ca<sup>2+</sup>-PKC dans la modulation de la synthèse et/ou de la sécrétion de l'hCG a été mise en évidence dans des trophoblastes normaux (Iwashita et al., 1992) (shi and Zhuang, 1993) et des lignées cellulaires provenant de choriocarcinome (Ilekis and Benveniste, 1985) (Yamawaki and Toyoda, 1994), grâce à l'utilisation d'ester de phorbol, d'analogues du DAG et des inhibiteurs de la PKC. Une réponse retardée, suggérant une modulation de la synthèse plutôt que celle de la libération de l'hormone, est enregistrée, montrant une augmentation des taux d'ARNm des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de l'hCG. Dans certains types cellulaires, la PKC est capable de phosphoryler des protéines appartenant à la famille des AP-1/Jun et Fos, qui régulent la transcription de gènes spécifiques en se fixant sur des PRE ("Phorbol ester-Responsive Element") (**figure 20**). Ce type de séquence a notamment été décrit dans les choriocarcinomes. De plus, des études ont montré que la PKC était capable de stimuler la production d'AMPc et donc que cette kinase pouvait interagir indirectement *via* les CREB sur la transcription des gènes  $\alpha$  et  $\beta$ .

Le Ca<sup>2+</sup> est impliqué dans la stimulation de la sécrétion d'hCG. Par ailleurs, il a été démontré, grâce à l'utilisation d'inhibiteurs ou de bloquants, qu'une entrée de calcium à travers des canaux calciques de type L ou par l'échange Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> lors d'une dépolarisation stimule la sécrétion d'hCG par des explants placentaires (Pollioti et al., 1994) (Meuris et al., 1994). Une autre étude, effectuée sur des cellules de lignée BeWo, n'a pas mis en évidence d'augmentation de sécrétion d'hCG en présence d'un ionophore calcique (Yamawaki and Toyoda, 1994).



Dans certains cas, une synergie d'action entre la voie de l'AMPC-PKA et DAG-Ca<sup>2+</sup>-PKC a été mise en évidence, se produisant au niveau de la transcription pour le gène de la sous-unité  $\alpha$  et au niveau post-transcriptionnel pour le gène de la sous-unité  $\beta$  (Andersen et al., 1988). Sur les BeWo, une interaction entre les deux voies a été suggérée par la phosphorylation possible de protéines CREB par la PKC.

### 3.2. Action de différents agents.

#### 3.2.1. Les facteurs de croissance.

Le 3<sup>ème</sup> type de modulateur de la sécrétion d'hCG n'utilise pas la synthèse de second messagers, mais agit *via* des récepteurs possédant une activité kinase intrinsèque (Insuline, EGF, TGF- $\beta$ ...). Certains de ces facteurs de croissance (Insuline, EGF) interagissent avec des récepteurs qui possèdent une activité tyrosine kinase ou d'autres, comme le récepteur du TGF- $\beta$ , qui a une activité kinase particulière (serine/thréonine).

Le TGF- $\beta$ , étroitement apparenté du point de vue structural à l'activine et l'inhibine, est un membre de la famille des cytokines. Il influence de nombreux processus physiologiques, principalement la croissance et la différenciation cellulaires, mais également l'implantation, la stéroïdogénèse et l'hématopoïèse (Benzakour, 1994) (Shull and Doetschman, 1994).

Le TGF- $\beta$  se fixe à deux types de récepteurs différents (Type I et II), les deux récepteurs sont indispensables pour entraîner l'action du TGF- $\beta$ . Une autophosphorylation du récepteur ne semble pas se produire, comme dans le cas des autres facteurs de croissance mentionnés précédemment, mais plutôt une phosphorylation du récepteur de type I par le récepteur de type II (Wrana et al., 1994). Ces phosphorylations se produisent sur des résidus sérine ou thréonine, activant l'activité kinase du récepteur de type I responsable de la propagation intracellulaire du signal.

La présence du TGF- $\beta$  a été décrite au niveau du placenta (Stromberg et al., 1982) et des récepteurs aux TGF- $\beta$  ont été mis en évidence au niveau du syncytiotrophoblaste (Ohlsson, 1989). Le TGF- $\beta$  inhibe la synthèse et la sécrétion de l'hCG, contrairement à l'EGF. Le TGF- $\beta$ , à long terme, possède également une action sur la différenciation trophoblastique (Morrish et al., 1991), or le syncytiotrophoblaste est le siège principal de la sécrétion d'hCG. Il est donc difficile d'apprécier si l'effet inhibiteur sur la sécrétion se produit secondairement à l'action sur la différenciation ou si c'est l'inverse, car les deux phénomènes sont très liés. Par ailleurs, comme c'est le cas pour de nombreux facteurs de croissance, le TGF- $\beta$  peut interagir avec d'autres facteurs et notamment l'EGF (Morrish et al., 1991) et les interleukines-1 et -6 (Matsusaki et al., 1992).

### 3.2.2. Les stéroïdes.

La progestérone, majoritairement produite par le placenta (suggérant un mécanisme autocrine et/ou paracrine), inhibe la sécrétion d'hCG par les trophoblastes normaux ainsi que dans les lignées de cellules issues de choriocarcinomes (Maruo et al., 1986).

Des récepteurs aux glucocorticoïdes ont été identifiés au niveau du placenta. La dexaméthasone (glucocorticoïde de synthèse) a été décrite comme un stimulateur de la sécrétion d'hCG *in vitro* sur des trophoblastes (Ringler and Strauss, 1990). Les taux des ARNm des deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  de l'hCG sont augmentés en présence de glucocorticoïde. D'une manière générale, les hormones stéroïdiennes se fixent sur des récepteurs protéiques nucléaires, qui en se liant à des séquences d'ADN spécifiques vont réguler la transcription de certains gènes (Ringler et al., 1989). Ainsi, au niveau du gène de la chaîne  $\alpha$  de l'hCG, des GRE ("Glucocorticoid-Response element") ont été identifiés.

Il a également été rapporté que les glucocorticoïdes augmentent la réponse à l'AMPc, ce qui suggère une éventuelle interaction avec le système CREB-CRE.

### 3.2.3. L'hCG.

La mise en évidence d'une action autocrine de l'hCG sur sa sécrétion a été réalisée sur des trophoblastes normaux de placenta à terme (Licht et al., 1993).

L'hCG à des concentrations faibles (< 200 mUI/ml) n'a pas d'effet sur sa propre synthèse et sécrétion, alors qu'elles l'augmentent pour une concentration moyenne (200-1000 mUI/ml), en revanche à de forte concentration (> 1000 mUI/ml) la sécrétion d'hCG diminue ou n'a aucun effet.

L'hCG et son récepteur activent principalement la voie de l'AMPc-PKA (voie qui sera plus amplement détaillée dans la partie "récepteur"), la boucle autocrine observée pour des concentration en hCG moyenne est due à l'activation du système CREB-CRE. Le fait qu'une trop forte concentration en hCG ne stimule pas sa propre synthèse et sécrétion est due au phénomène de la régulation négative (phénomène détaillé dans la partie récepteur).



### III. Le récepteur LH/CG

**D'après :** (Ascoli et al., 2002)

**L**es récepteurs des gonadotrophines (hCG, LH, FSH, TSH) sont des molécules présentes en très faible quantité dans les organes cibles. L'hCG se lie à un récepteur spécifique, capable de lier aussi la hLH. Le clonage des récepteurs LH/CG de rat et de porc en 1989 (Loosfelt et al., 1989; McFarland et al., 1989) et humain en 1990 (Minegishi et al., 1990) ont permis de caractériser une nouvelle famille de récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG), comprenant le récepteur LH/CG, mais aussi le récepteur de la FSH et celui de la TSH. De plus, ces récepteurs possèdent tous une région riche en leucines (RRL). Le R-LH/CG, le R-FSH, et le R-TSH, appartiennent à une grande famille de protéines caractérisée par la présence d'un large domaine N-terminal contenant plusieurs RRL, appelé LGR ("leucine-rich repeat-containing, G protein-coupled receptors"). La structure et la topologie de ces récepteurs font qu'ils appartiennent à la super-famille des récepteurs LGR de type A : Rhodopsine/ $\beta_2$ -adrénergique (Gether, 2000). Les récepteurs aux gonadotrophines se présentent comme l'assemblage de deux domaines: le domaine extracellulaire ou ectodomaine dédié à la reconnaissance hormonale alors que le domaine transmembranaire et cytoplasmique, ou endodomaine, joue un rôle dans la transduction du signal hormonal.

Le récepteur LH/CG a été localisé dans différents tissus et différents type cellulaires notamment, les cellules de la granulosa, de la thèque interne, à la surface des cellules de Leydig, mais également dans des tissus non gonadiques tels que l'endomètre, le myomètre, les trompes utérines, le placenta, le cerveau, les vaisseaux sanguins et la prostate (Ascoli and Segaloff, 1989) (Lei et al., 1993b) (Lei et al., 1993c) (Reiter, 1995).

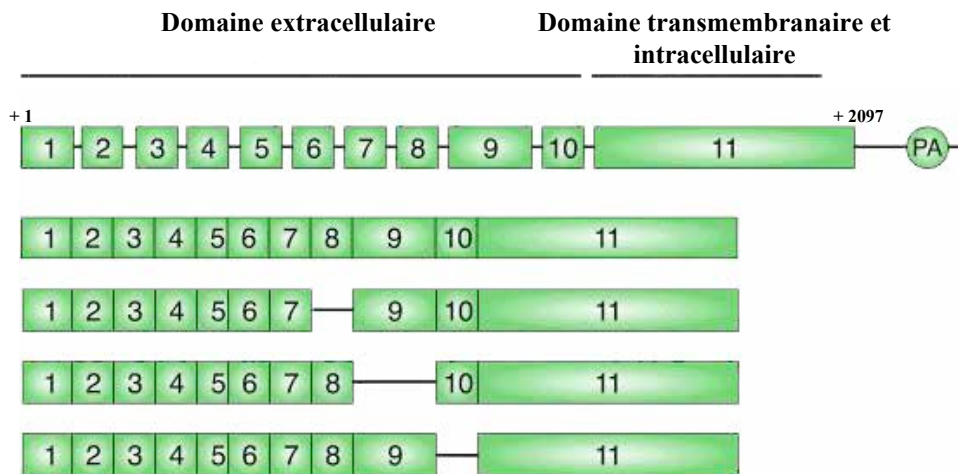
#### 1. STRUCTURE ET BIOSYNTÈSE.

##### 1.1. Structure du gène du récepteur LH/CG.

Le récepteur LH/CG humain (R-LH/CG) est codé par un seul gène présent sur le bras court du chromosome 2 (2p21) (Rousseau-Merck et al., 1990a), le gène du récepteur de la FSH partage la même localisation chromosomique (Rousseau-Merck et al., 1993). Ceci évoque la possibilité d'une duplication génique au cours de l'évolution à partir d'un gène ancestral commun. En revanche le



**Figure 24: Représentation schématique de l'organisation du gène du R-LH/CG.**  
 (d'après <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/LHRID288.html>). En vert: les 11 exon; les triangles rouges représentent les sites d'initiations de la transcriptions; PA: séquence de polyadénylation



**Figure 25: Représentation schématique des différents variants du R-LH/CG.**  
 (d'après <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/LHRID288.html>).

récepteur de la TSH est localisé sur un autre chromosome (le chromosome 14) (Rousseau-Merck et al., 1990b), ce qui suggère sa dispersion dans le génome au cours de l'évolution.

Le gène du récepteur LH/CG (comme tous les gènes des récepteurs aux gonadotrophines) est de très grande taille, et mesure environ 80kb. Il comprend 10 introns et 11 exons (Atger et al., 1995) (**figure 24**). La totalité du domaine transmembranaire et cytoplasmique (endodomaine) est codée par l'exon 11. La région N-terminale (domaine extracellulaire) riche en leucines (RRL) comme l'ensemble du domaine extracellulaire (ectodomaine) est codée par les exons 1 à 10.

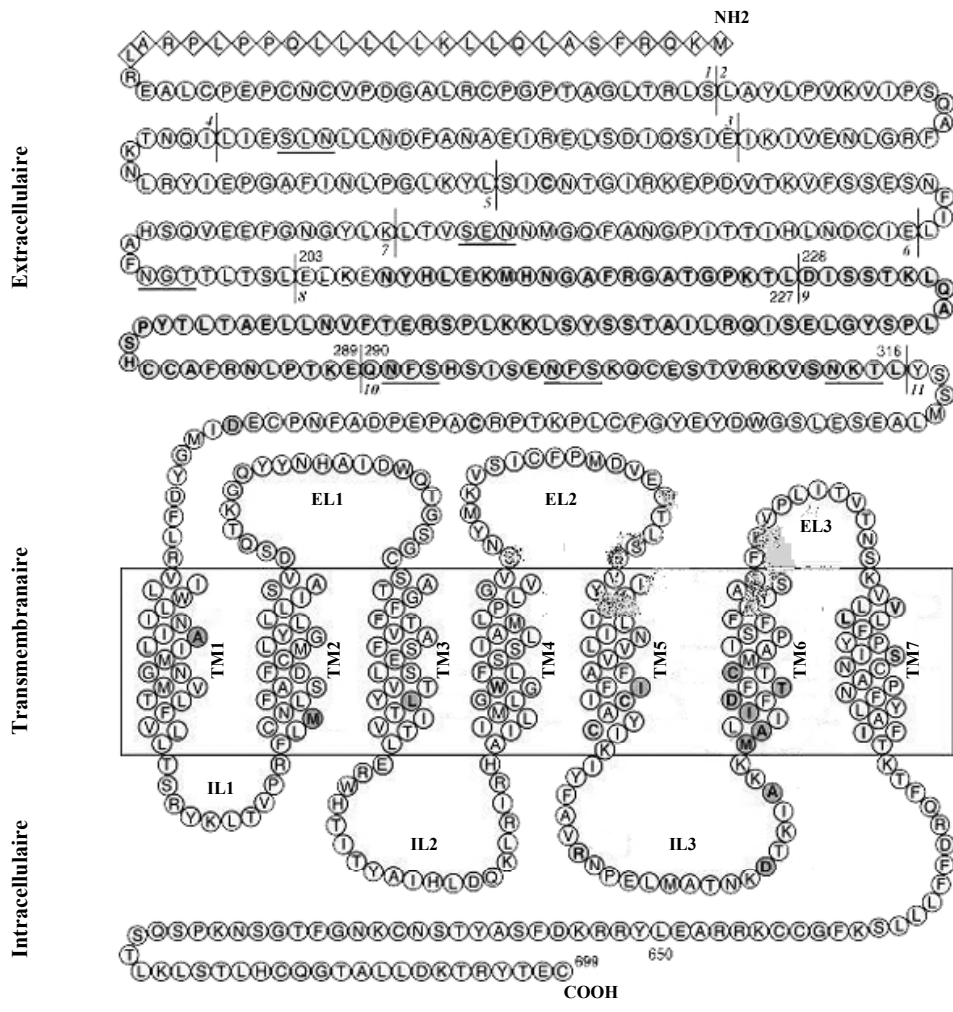
Le promoteur du R-LH/CG est situé dans la région 5' du gène allant de -176 pb au codon START (ARG, +1 pb), il possède plusieurs séquences riches en GC, certains auteurs ont montré la présence de deux sites putatifs de boîte TATA et de boîte CAAT (Atger et al., 1995), mais il semble en réalité que le promoteur ne possède pas de "TATA box" (Geng et al., 1999) mais un multi-site d'initiation de la transcription (**figure 24**). Le taux basal de transcription est assuré par différents facteurs de transcriptions qui seront détaillés plus loin.

## 1.2. Variants, polymorphismes et mutations du gène du récepteur LH/CG.

À côté du messenger codant pour le R-LH/CG complet, d'autres messagers ont été identifiés physiologiquement, tous résultent d'un épissage alternatif. Des variants du R-LH/CG ont montré une absence de l'exon 10 dans le gène codant pour le récepteur au niveau des gonades, il en découle alors une diminution de l'expression du récepteur à la membrane cellulaire (**figure 25**). Une délétion de l'exon 10 semble modifier le transport du récepteur à la membrane cellulaire, tandis que ces variants gardent la capacité de fixer l'hormone (LH, et hCG) normalement, et d'induire l'augmentation de l'AMPc et de l'IP<sub>3</sub> (Zhang et al., 1997).

Il existe d'autres formes de messagers du R-LH/CG résultant également d'un épissage alternatif qui présente une délétion, soit de toute la portion transmembranaire seule, soit de la partie intracellulaire (Loosfelt et al., 1989) (**figure 25**). Ces variants sont capables de lier l'hormone (LH et hCG) avec une affinité similaire à celle du récepteur complet. Des études ont montré que ces variants sont sécrétés hors de la cellule, leur rôle physiologique est encore inconnu. Ces formes sont retrouvées au niveau des testicules et des ovaires (Vuhai-Luuthi et al., 1990; VuHai-LuuThi et al., 1992).

Plusieurs polymorphismes du R-LH/CG ont été rapportés, ce qui a pour conséquence un changement de la séquence en acides aminés. Une insertion ou une délétion de 6 nucléotides entre les codons 18 et 19 de l'exon 1 sont à l'origine de deux variants qui diffèrent par la présence (LQ) ou l'absence ( $\alpha$ LQ) de deux acides aminés (Leu-Gln) proche de la région C-terminale du peptide signal (Rodien et al., 1998; Tsai-Morris et al., 1998). Ce polymorphisme a tout d'abord été décrit comme correspondant à un nouveau gène du R-LH/CG (Tsai-Morris et al., 1998), mais le séquençage du



**Figure 26: Représentation schématique de la séquence peptidique du R-LH/CG.**

(d'après <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/LHRID288.html>). Les triangles représentent le peptides signal; les traits noirs représentent les sites de N-glycosylation, EL (1, 2, 3): boucles extracellulaires; IL (1, 2, 3): boucles intracellulaires; TM (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7): domaines transmembranaires.

génomique humaine a permis d'exclure cette hypothèse. La fréquence de ce polymorphisme dans la population caucasienne est de 0.088 (LQ/LQ), 0.558 ( $\alpha$ LQ/ $\alpha$ LQ), et 0.354 (LQ/ $\alpha$ LQ), par ailleurs LQ est absente dans la population japonaise (Rodien et al., 1998). La présence ou l'absence de LQ n'affecte pas l'expression ou la fonctionnalité du R-LH/CG (Rodien et al., 1998).

Deux autres polymorphismes ont été observés, touchant chacun un seul nucléotide (SNP) de l'exon 10 du R-LH/CG (codon 291 et 312), codant respectivement pour une Asparagine (Asp) ou une Sérine (Ser). La fréquence de ce polymorphisme est inconnue, mais la présence d'une Asp ou d'une Ser n'affecte en rien l'expression et la fonctionnalité du récepteur (Laue et al., 1996). Il existe beaucoup d'autres polymorphismes de type SNP dans la région codante et dont les mutations restent silencieuses, ou alors des mutations dans les séquences introniques, sans effet sur la séquence protéique finale.

Il existe deux types de mutations du récepteur. Les premières peuvent entraîner un gain de fonction du récepteur. Elles sont localisées dans le domaine transmembranaire du récepteur qui est responsable de la transduction du signal. En revanche, les mutations perte de fonction peuvent être situées dans n'importe quel domaine du récepteur et entraîner soit une abolition de la capacité de liaison de l'hormone, soit une altération de la transduction du signal, ou encore altérer le trafic intracellulaire du récepteur et son expression à la surface cellulaire.

### **1.3. La protéine du récepteur LH/CG.**

Le récepteur LH/CG est constitué d'une seule chaîne polypeptidique, ayant une structure et une topologie qui font de lui un membre de la superfamille des récepteurs  $\beta$ 2-adrénérique/rhodopsine. Ces récepteurs sont couplés aux protéines G (RCPG) (Bockaert and Pin, 1999; Gether, 2000). Le récepteur LH/CG est constitué d'un grand domaine N-terminal correspondant au domaine extracellulaire, ou ectodomaine (340 acides aminés). Il possède 7 domaines transmembranaires (TM), reliés par 3 boucles extracellulaires et 3 boucles intracellulaires. Le domaine C-terminal est intracellulaire (endodomaine) (**figure 26**). Le pourcentage d'homologie de la séquence en acides aminés entre l'homme et le rat est approximativement de 88% dans le domaine extracellulaire, approximativement de 92% dans la région trans-membranaire et de 69% dans la partie C-terminale.

#### 1.3.1. La chaîne polypeptidique du R-LH/CG.

La taille de la chaîne polypeptidique du récepteur est de 675 acides aminés chez l'homme, la masse moléculaire prédite est de 75 kDa. Cependant, la masse moléculaire de la forme mature du



récepteur est plus importante car le récepteur est une protéine glycosylée. *In vitro*, dans des cellules transfectées par le vecteur d'expression du récepteur humain, trois groupes de protéines de masse moléculaire différente ont été décrits.

- Les formes de 65 à 75 kDa.

Les formes comprises entre 65 et 75 kDa correspondent aux précurseurs de la forme présente à la surface de la cellule (Hipkin et al., 1992) (Bradbury et al., 1997). Ces formes de récepteur sont intracellulaires car elles sont insensibles aux protéolyses de surface, mais également à la neuraminidase. En revanche, elles sont sensibles à la digestion par l'Endoglycosidase-H (glycosidase qui dégrade les carbohydrates de type mannose associés aux glycoprotéines immatures), suggérant qu'elles sont localisées dans le réticulum endoplasmique et qu'elles possèdent des chaînes glycaniques immatures (Hipkin et al., 1992; VuHai-LuuThi et al., 1992).

- Les formes de 85 à 95 kDa.

Les formes de 85 à 95 kDa représentent les formes matures du récepteur, celles qui sont présentes à la surface de la membrane cellulaire. Par contre, la forme mature du récepteur est sensible à la digestion par la neuraminidase et la peptide-N-glycosydase-F, qui sont toutes deux impliquées dans la digestion des chaînes carbohydrates matures généralement associées aux glycoprotéines présentes à la surface des cellules. En revanche ces formes ne sont pas sensibles à Endo-H (Hipkin et al., 1992) (VuHai-LuuThi et al., 1992).

- Les formes entre 165 à 200 kDa.

Les formes comprises entre 165 et 200 kDa sont des agrégats des formes 65 et 75kDa. Ceci a été démontré par différentes techniques et par différents auteurs, montrant que la synthèse des formes 65-75 kDa et 165-200 kDa sont liées. Ces deux formes sont sensibles à l'Endo-H et résistantes aux protéolyses sur cellules entières (Hipkin et al., 1992) (Min and Ascoli, 2000) (Fabritz et al., 1998).

Pour résumer, la forme mature du récepteur est présente à la membrane cellulaire, avec une masse moléculaire de 85-95 kDa qui provient de la maturation et du transport de la forme précurseur de 65-75 kDa qui est localisée dans le réticulum endoplasmique. Il a été montré que le précurseur est capable de lier l'hCG (ou la LH) avec la même affinité que la forme mature (Fabritz et al., 1998). La

maturation et le “turnover” de la forme mature du récepteur n’ont pas été étudiées en détail chez l’homme, en revanche chez le rat, la conversion de la forme immature en forme mature est un mécanisme lent (environ 120 min) qui nécessite l’association de la forme immature avec une protéine chaperone (la calnexine) (Rozell et al., 1998), cependant la totalité de la forme immature ne sera pas convertie en forme mature. La demi-vie de la forme immature est approximativement de 60 min. La forme mature, présente à la surface de la cellule est quant à elle beaucoup plus stable, puisqu’elle possède une demi-vie de 400 min.

### 1.3.2. Les domaines du R-LH/CG.

Le R-LH/CG est constitué d’un large domaine N-terminal extracellulaire, qui comprend 340 acides aminés, un domaine transmembranaire composé de sept passages transmembranaires (TM1-7), et d’un domaine C-terminal intracellulaire (**figure 26**). Chez le rat, le clonage de l’ADNc du R-LH/CG a révélé l’existence d’un précurseur contenant un peptide signal de 26 acides aminés dans la région N-terminale (McFarland et al., 1989) (**figure 27**). Par convention, le premier acide aminé de la chaîne est le premier résidu de la partie N-terminale, pour le R-LH/CG de rat, l’acide aminé en première position a été déterminé comme étant une arginine (Arg, R). Le clivage du peptide signal a donc lieu dans la partie N-terminale du récepteur au niveau de l’arginine. Le rôle du peptide signal est de faciliter l’adressage du récepteur à la membrane de la cellule. En effet, le récepteur étant volumineux, son trafic est assuré par le peptide signal qui est ensuite clivé.

Chez l’homme, il existe aussi un peptide signal, dont l’identité du premier acide aminé n’a pu être déterminée avec certitude, car la protéine du R-LH/CG humain n’a jamais été purifiée et séquencée. Par convention, le premier acide aminé du R-LH/CG humain a été choisi et numéroté à partir de la méthionine initiatrice (dans le peptide signal) du récepteur obtenu par extrapolation de la séquence de l’ADNc (Minegishi et al., 1990). Le site le plus probable de clivage du peptide signal chez l’homme a été prédit comme étant situé avant la leucine<sup>25</sup> (Leu<sup>25</sup>, L<sup>25</sup>) (**figure 27**).

Il est alors possible de réaliser un alignement des séquences protéiques du R-LH/CG humain et de rat, à partir de la Leu<sup>25</sup> humaine correspondant à la Leu<sup>3</sup> du rat.

- Le domaine extracellulaire.

Le domaine extracellulaire du récepteur LH/CG possède 6 sites putatifs de N-glycosylation (**figure 27**), qui semblent tous être occupés. Une étude a montré que des mutations touchant n’importe lequel des 6 sites de glycosylation n’avaient aucune incidence sur la fixation de l’hormone et sur l’activation du récepteur (Tapanainen et al., 1993). La perte de fixation de l’hormone sur son récepteur



est le plus souvent due à un ensemble de mutations intervenant dans la structure de la protéine plutôt qu'à des mutations touchant les chaînes glycaniques. Ces résultats mettent clairement en évidence que les chaînes glycaniques du R-LH/CG n'interviennent ni dans la fixation de l'hormone ni dans l'activation du récepteur, mais pourrait être importantes pour le "routage" du récepteur dans la cellule et son expression à la membrane. En revanche, les glycosylations de l'hormone et plus particulièrement une chaîne N-glycanique fixée sur la sous-unité  $\alpha$ , serait responsable de l'activation du récepteur (Bielinska et al., 1989) (Matzuk et al., 1989) (Sairam, 1989).

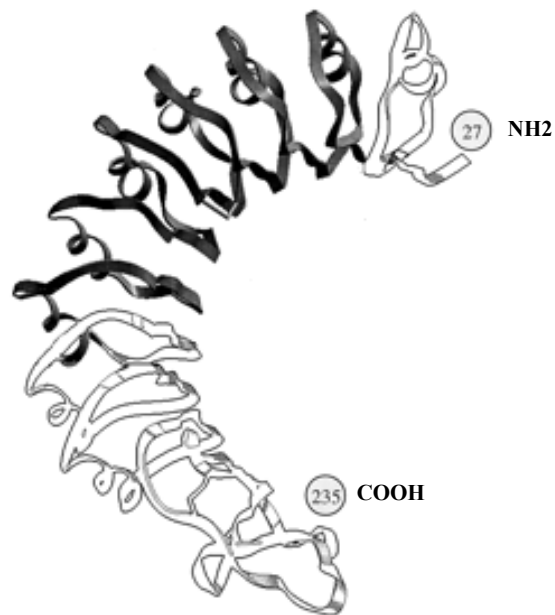
Le domaine extracellulaire du R-LH/CG est composé de plusieurs motifs répétés contenant des leucines (**figure 27**), au nombre de 9, ils sont riches en acides aminés hydrophobes et sont appelés "répétitions riche en Leucine" (RRL). L'ectodomaine (ou domaine extracellulaire) peut être divisé en trois régions distinctes : la région N-terminale, riche en cystéine, suivie par 9 RRL et une région C-terminale, riche en cystéine. Les RRL semblent jouer un rôle dans les processus de reconnaissance et de la fixation de l'hormone sur son récepteur. La cristallisation du récepteur n'a pu être réalisée pour l'instant. En revanche, la structure de l'inhibiteur de la ribonucléase de porc étant connue comme possédant des RRL, ceci peut nous aider à imaginer une représentation de la structure du RRL dans le R-LH/CG. Les RRL sont organisés en une succession de feuillets- $\beta$  et d'hélices- $\alpha$  (**figure 28 A et B**). Ces unités forment une super-hélice, où tous les feuillets- $\beta$  et les hélices- $\alpha$  sont orientés parallèlement les uns par rapport aux autres conduisant à la formation d'une molécule non-globulaire et se présentant sous la forme d'un fer à cheval (**figure 28 B**). Dans cette molécule, tous les feuillets- $\beta$  sont orientés vers l'intérieur, alors que les hélices- $\alpha$  sont orientées vers l'extérieur de la super-hélice (Kobe and Deisenhofer, 1993).

- Le domaine transmembranaire.

Le domaine transmembranaire des protéines appartenant à la famille des RCPG (protéine à 7 domaines transmembranaire couplés aux protéines G), est caractérisé par une très grande homologie dans leur séquence en acides aminés. L'acquisition récente de la structure cristalline de la Rhodopsine a permis de construire un modèle théorique de la partie transmembranaire du R-LH/CG (Palczewski et al., 2000) (**figure 29**). La structure de la Rhodopsine présente huit hélices- $\alpha$ , les sept premières composent les sept domaines transmembranaires du R-LH/CG, la huitième hélice- $\alpha$  est entièrement cytoplasmique, localisée entre le septième domaine transmembranaire et la queue C-terminale. Pour résumer, le domaine transmembranaire possède sept segments transmembranaires (TM1-7) reliés par trois boucles intracellulaires (IL1-3) et trois boucles extracellulaires (EL1-3).



**Figure 28 A: Représentation schématique du domaine LRR du R-LH/CG.**  
(d'après bioinfo.mbb.yale.edu).



**Figure 28 B: Représentation schématique du domaine LRR du R-LH/CG .**  
(d'après bioinfo.mbb.yale.edu).

- Le domaine intracellulaire.

Aucune étude n'a permis de déterminer la structure 3D de la partie C-terminale du R-LH/CG. C'est une région qui diverge beaucoup selon les espèces et elle est connue pour posséder deux modifications post-traductionnelles: de palmitoylation (qui correspond à la fixation par liaison thioester d'un groupement palmitate sur la chaîne latérale d'une cystéine) et de phosphorylation. Le R-LH/CG possède deux cystéines adjacentes potentiellement palmitoylables. Cependant la palmitoylation du R-LH/CG n'a pas été mise en évidence chez l'homme, mais seulement chez le rat (Kawate and Menon, 1994) (Zhu et al., 1995). La palmitoylation n'est détectable que sur la forme mature du récepteur suggérant que cette modification post-traductionnelle a lieu pendant la maturation et le transport de la forme immature à la membrane cellulaire. Des mutations de la palmitoylation n'ont aucun effet sur la fixation de l'hormone sur son récepteur et sur la transduction du signal, mais il a été rapporté que cette modification post-traductionnelle stimulerait l'internalisation du récepteur (Kawate and Menon, 1994) (Zhu et al., 1995).

Il a également été montré que le R-LH/CG est phosphorylé (Min and Ascoli, 2000) lorsqu'il est exprimé dans des cellules transfectées. Seule la forme mature du récepteur est phosphorylée (Hipkin et al., 1993). La phosphorylation de la forme mature peut être induite dans des cellules par l'hCG, les esters de phorbol ou des analogues de l'AMPc (Min and Ascoli, 2000) (Hipkin et al., 1993). Les protéines kinases impliquées dans la phosphorylation du R-LH/CG ne sont pas encore connues, mais les protéines kinases appartenant à la famille des GRK (pour "G-protein receptor kinases" qui sont des sérine/thréonine kinases) semblent être de bons candidats (Pitcher et al., 1998). En effet, la surexpression de GRK2 est responsable d'une augmentation de phosphorylation du R-LH/CG (Min and Ascoli, 2000). Il semble que, comme chez le rat, les sites putatifs de phosphorylation du R-LH/CG soient les: Ser<sup>635</sup>, Ser<sup>639</sup>, Ser<sup>649</sup>, et la Ser<sup>652</sup> (Min and Ascoli, 2000) (Hipkin et al., 1995) (**figure 27**).

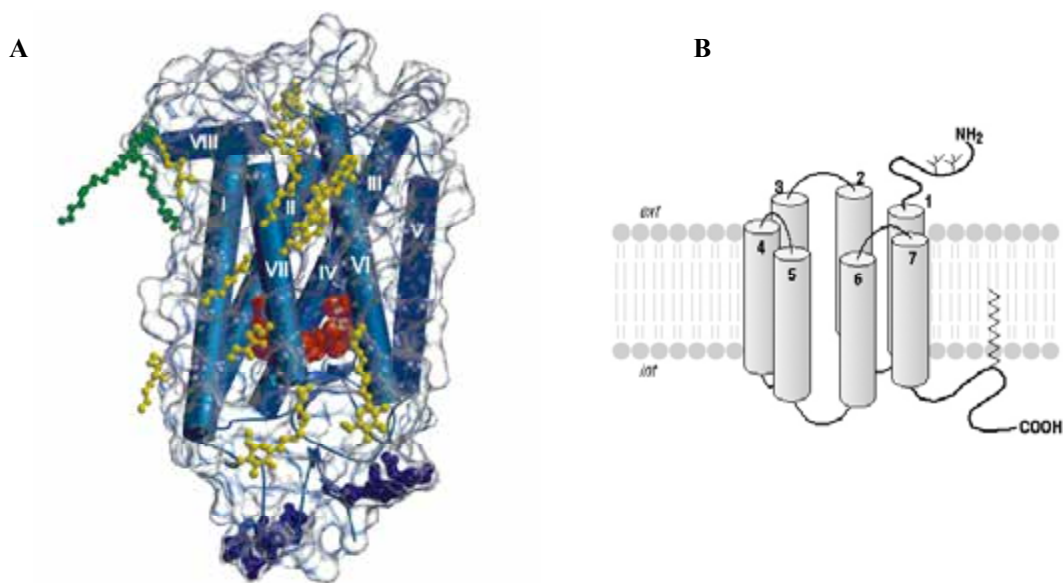
## **2. FONCTIONNEMENT DU R-LH/CG.**

### **2.1. Expression du R-LH/CG.**

De part le rôle de la LH et de son récepteur LH/CG dans les testicules et les ovaires, on pensait il y a quelques années, que le récepteur LH/CG ne pouvait être localisé que dans les gonades.

Dans les testicules, le R-LH/CG n'est présent que dans les cellules de Leydig. Dans les ovaires, l'expression du récepteur est retrouvée dans les cellules de la thèque, les cellules interstitielles, les cellules de la granulosa et dans les cellules lutéales (Rao, 1982).

De récentes études ont mis en évidence la présence du R-LH/CG dans les tissus extragonadiques. En effet, le récepteur a été observé dans l'endothélium de l'endomètre (Reshef et al., 1990), mais aussi



**Figure 29: Représentation schématique du domaine transmembranaire de la Rhodopsine.**  
 A: (d'après [www.bioinformatics.org](http://www.bioinformatics.org)). Les différents domaines transmembranaires sont notés (de I à VII). B: (d'après <http://www.chez.com/rcpg/>). Représentation de la Rhodopsine dans la membrane plasmique. La Rhodopsine possède 7 domaines transmembranaires, cette structure est sûrement très proche de celle du domaine transmembranaire de R-LH/CG.

dans d'autres tissus incluant les spermatozoïdes, les vésicules séminales, la prostate, la peau, la rétine, les cellules neuroendocrines, le cerveau (Rao, 1996) (Rao, 1999) (Lei et al., 2001). Le messager et la protéine du récepteur ont aussi été trouvés dans différentes cellules de lignées cancéreuses, comme les carcinomes de prostate et dans les cellules de cancer du sein (Meduri et al., 1997).

## 2.2. Les voies de signalisation du R-LH/CG.

Les protéines G (ou guanines nucléotidiques) sont constituées de trois sous-unités:  $\alpha$ ,  $\beta$ , et  $\gamma$ . Il est clairement bien établi maintenant que le récepteur LH/CG active la voie de la protéine G $\alpha$ s/adénylate cyclase/cAMP/PKA/MAPK (**figure 30**).

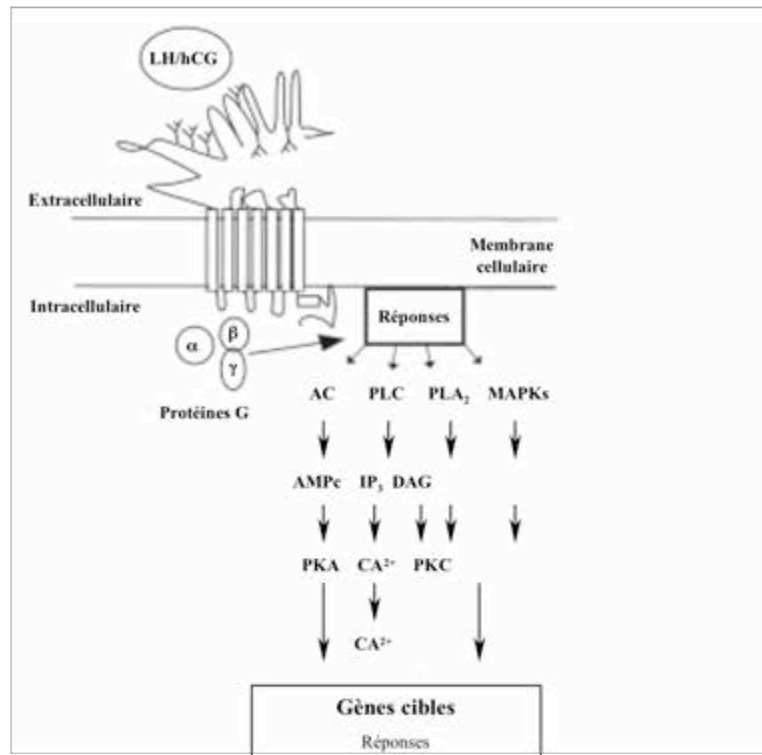
La liaison de l'hCG ou de la LH au récepteur entraîne l'activation des protéines G, induisant la dissociation de la sous-unité  $\alpha$  par changement de conformation allostérique qui va permettre l'échange GTP en GDP. Pour le récepteur R-LH/CG, c'est essentiellement la protéine G $\alpha$ s qui est impliquée dans la signalisation. Ceci provoque l'activation de l'adénylate cyclase et la production d'AMPc (adénosine monophosphate cyclique). L'accumulation d'AMPc intracellulaire permet l'activation de la protéine kinase A (PKA) entraînant la phosphorylation de différentes protéines (enzymes, facteurs de transcription). Cette phosphorylation sera responsable de l'activation ou de l'inhibition de gènes cibles *via* notamment les MAPK (Leung and Steele, 1992).

Il est maintenant clair que la voie de l'adénylate cyclase/AMPc n'est pas la seule voie mise en œuvre lors de l'activation du récepteur, en effet la voie de la PLC (phospholipase C) est elle aussi activée (Richards, 1994) (**figure 30**). Le R-LH/CG active la protéine G $\alpha$ s (Herrlich et al., 1996) (Rajagopalan-Gupta et al., 1998), mais l'identité des autres protéines G activées par le récepteur et notamment celles qui activent la voie de la PLC est très controversée. Cependant, il semble que lorsque le R-LH/CG se trouve en présence d'une forte concentration de ligand, il active une protéine G $\alpha$ i, qui a pour rôle l'inhibition de l'adénylate cyclase. Les sous-unités  $\beta\gamma$ , libérées par la G $\alpha$ i, vont ainsi activer la phospholipase C (PLC). La PLC, enzyme catalysant la réaction d'hydrolyse du PIP<sub>2</sub> (phosphatidyl inositol bis-phosphate) en IP<sub>3</sub> (inositol-3-phosphate) et DAG (diacylglycérol).

L'accumulation d'IP<sub>3</sub> va agir au niveau de récepteurs spécifiques, situés à la membrane de compartiments vésiculaires intracellulaires, entraînant une libération à l'intérieur du cytosol des ions calcium (Ca<sup>2+</sup>) contenus dans ces vésicules (Herrlich et al., 1996).

Le DAG quant à lui, active la protéine kinase C, qui elle aussi comme la protéine kinase A est capable de phosphoryler des protéines, afin d'en moduler l'activité. Cette voie est très mal décrite dans le système du R-LH/CG.





**Figure 30: Représentation schématique des principales voies de transduction du R-LH/CG .**  
 (d'après <http://herkules oulu.fi/isbn9514279298/isbn9514279298.pdf>). AC: adénylate cyclase, PLC: phospholipase C, PLA<sub>2</sub>: phospholipase A2, MAPKs: mitogen activated protein kinase, AMPc: adénosine monophosphate cyclique, IP<sub>3</sub>: inositol triphosphate, DAG: diacyl glycérol, PKA: protéine kinase A, PKC: protéine kinase C, Ca<sup>2+</sup>: calcium.

La voie de la PLC activée par le R-LH/CG est dépendante de la forte expression du récepteur à la surface des cellules, ainsi qu'en présence d'une forte concentration d'hCG (Hipkin et al., 1995) (Wang et al., 1996) (Wang et al., 1997) (Zhu et al., 1994).

La délétion de la partie C-terminale du R-LH/CG à partir de l'acide aminé 653, n'a aucun effet sur l'activation par l'hCG de la voie de l'adénylate cyclase, en revanche dans ces conditions, l'activation de la voie de la PLC se trouve fortement diminuée. Une délétion de l'acide aminé 628 active de manière constitutive les deux voies de transduction du R-LH/CG (Wang et al., 1996).

D'autres études sont en cours afin de mieux comprendre les bases moléculaires des différentes voies activées par le R-LH/CG.

### **2.3. Fixation de l'hCG ou de la LH sur le R-LH/CG.**

La séquence en acides aminés et la topologie supposée du R-LH/CG a permis de mettre en évidence que l'ectodomaine est responsable de la reconnaissance et de la haute affinité du récepteur pour l'hCG et la LH (Xie et al., 1990). En effet, la fixation de l'hormone et l'activation du récepteur (avec l'accumulation d'AMPC) se déroulent normalement dans des cellules transfectées par une construction donnant naissance à une protéine chimère possédant le domaine extracellulaire du R-LH/CG et l'endodomaine du R-FSH (Braun et al., 1991) (Nakamura et al., 1999b). Une forme soluble du domaine extracellulaire du R-LH/CG inhibe la fixation de l'hCG sur un R-LH/CG complet présent à la surface des cellules tandis qu'une forme soluble du domaine extracellulaire du R-LH/CG n'empêche pas la fixation de la FSH sur un R-FSH, la réciproque est vérifiée, une forme soluble du domaine extracellulaire de R-FSH inhibe la fixation de la FSH sur un R-FSH complet (Osuga et al., 1997). Ces résultats permettent de confirmer l'importance du domaine extracellulaire dans la reconnaissance de l'hormone et de son récepteur.

Les domaines extracellulaires des R-LH/CG chez l'homme, le rat, le porc présentent une affinité très proche pour l'hCG ( $K_d = 0,2-0,5$  nM) (Tsai-Morris et al., 1990) (Ji and Ji, 1991b) (VuHai-LuuThi et al., 1992). La forme immature (de 65-75 kDa) présente la même affinité que la forme mature (85-95 kDa) (Fabritz et al., 1998).

Un grand nombre d'études portant sur l'affinité de l'hCG pour le R-LH/CG ont été obtenues à partir de travaux portant sur des mutations réalisées sur le R-LH/CG de rat cloné dans différentes lignées cellulaires. Il a été démontré que différentes mutations du R-LH/CG avaient des implications sur la maturation et/ou le transport du récepteur à la membrane des cellules, mais on comprend aisément que des mutations du récepteur peuvent avoir une incidence sur l'affinité et la fixation de

l'hormone pour ce dernier. Plusieurs études ont donc été réalisées pour étudier l'implication de différentes mutations sur l'affinité de l'hCG (ou la LH) pour son récepteur.

Zhang et collaborateurs ont montré que dans des cellules transfectées (cellules 293) dans lesquelles le récepteur ne possède pas l'exon 10, il n'y a pas de modification de l'affinité, de l'hCG pour ce récepteur modifié (Zhang et al., 1998). En revanche la délétion de l'exon 8 du R-LH/CG présente une très nette diminution de l'affinité de l'hCG pour son récepteur (Laue et al., 1996). Contrairement à l'exon 10, l'exon 8 est très important pour la fixation de l'hormone à son récepteur. Suite à ces observations, Ji et collaborateurs (Hong et al., 1998) (Zeng et al., 2001) ont étudié plusieurs délétions de la partie C-terminale de l'ectodomaine. Des constructions de récepteur contenant uniquement les exons: 1-7, 1-8, et 1-9 voient l'affinité de l'hCG pour son récepteur diminuée de 10 à 20 fois (résultant de la délétion des acides aminés 180, 205 et 267 respectivement). Par contre des constructions possédant les exons: 1-6 et 1-5 diminuent l'affinité de l'hormone pour le R-LH/CG (délétion des acides aminés 157 et 131 respectivement), de manière plus importante, allant de 100 à 200 fois. Les constructions possédant les exons: 1-4, 1-3 et 1-2 diminuent l'affinité de l'hormone de manière drastique, de 300 à 600 fois (résultant de la délétion des résidus 106, 81 et 56). Les constructions ne possédant que l'exon 1 ne peuvent plus fixer l'hCG (Hong et al., 1998) (Zeng et al., 2001).

Thomas et collaborateurs, (Thomas et al., 1996) ont étudié l'implication de différentes délétions dans la région N-terminale du R-LH/CG sur l'affinité de l'hormone. Ils ont montré que les délétions successives des acides aminés: 1-11, 12-38, 39-63, 64-88, 89-112, 113-118 et 139-164 empêchent toute fixation de l'hCG sur le récepteur.

L'ensemble de ces résultats montre clairement que l'exon 1-7, qui code pour la région riche en cystéine du domaine N-terminal et les RRL1-RRL7, est essentiel pour la reconnaissance et la fixation de l'hCG sur le récepteur.

En revanche des études portant sur la délétion des exons 9 et 10 (codant pour les RRL-8, et RRL-9) ont montré que ces exons n'étaient pas nécessaires pour la reconnaissance et la fixation de l'hCG sur son récepteur (Braun et al., 1991) (Thomas et al., 1996) (Zhang et al., 1998).

Des mutations dans la région riche en cystéines (particulièrement dans les RRL-3 et RRL-4) n'ont aucun effet sur l'affinité de l'hormone pour son récepteur (Zhang et al., 1996). La plupart des mutations qui empêchent la fixation de l'hCG sur le R-LH/CG sont localisées dans les RLL qui forment des feuillets-  $\beta$  (Bhowmick et al., 1996) (Zhang et al., 1996) (Song et al., 2001) (Song et al., 2001), la localisation de ces acides aminés est intéressante puisqu'ils sont localisés dans les feuillets- $\beta$  impliqués dans la structure en fer à cheval du domaine extracellulaire.

D'autres auteurs ont montré l'importance des boucles extracellulaires et des hélices du domaine transmembranaire dans la fixation de la LH et de l'hCG au domaine extracellulaire du R-LH/CG, mais actuellement il n'y a aucun accord sur la façon dont les EL (les boucles extracellulaires) et les TM (les segments transmembranaires) agissent sur cette fixation (Ji and Ji, 1991a) (Quintana et al., 1993).

## 2.4. Activation du R-LH/CG.

Grâce au modèle de la structure 3D des RCPG, il a été possible d'émettre des hypothèses sur l'activation des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G.

Les RCPG peuvent être dans un état inactif ( $R_0$ ), lorsqu'ils sont en absence de ligand. Cet état est en équilibre avec l'état actif ( $R^*$ ) (Gether, 2000). Le ligand permet d'activer et surtout de stabiliser les RCPG dans un état actif ( $R^*$ ). Certaines études ont montré sur ce modèle théorique que l'activation des RCPG n'est pas seulement due à la fixation du ligand, mais peut être aussi activée par diverses mutations. Ces mutations qui vont avoir pour incidence de stabiliser les RCPG dans un état actif ( $R^*$ ), comme on l'observe lors de la fixation du ligand.

### 2.4.1. Les régions responsables de l'activation du R-LH/CG.

Comme pour les autres RCPG, le R-LH/CG interagit avec une protéine G. L'interaction présumée du récepteur avec la protéine G semble se localiser dans les quatre boucles intracellulaires, et les différentes hélices du domaine transmembranaire (TM) (proches du cytoplasme). Cependant, la région précise du R-LH/CG qui active les protéines G (Gs et autres) n'est pas clairement définie. Abell et collaborateurs (Abell and Segaloff, 1997) ont montré l'importance de l'IL3 (boucle intracellulaire 3) et les régions juxta-cytoplasmiques des TM4, TM5, TM6 et TM7 dans l'activation de la transduction du signal, en revanche ils ont montré que les TM1 et TM3 n'avaient aucun rôle sur l'activation des protéines G. Par contre, il a été mentionné par d'autres auteurs l'importance de l'IL3 dans l'activation du R-LH/CG (Gether, 2000) (Bockaert and Pin, 1999). Fanelli quand à lui, démontre que l'IL3 n'est pas la seule région du récepteur à être impliquée dans l'activation des RCPG, en effet il semblerait que l'IL2 comme l'IL3 (mais pas l'IL1), jouent un rôle dans la reconnaissance et l'activation de la protéine G (Fanelli et al., 1999).

Basés sur plusieurs études et la topologie présumée du récepteur, trois modèles d'activation du R-LH/CG ont été proposés:

### 2.4.2. Modèle 1.

La LH ou l'hCG se fixe au domaine extracellulaire du R-LH/CG et les deux hormones interagissent avec le domaine transmembranaire en activant ce dernier. Ce modèle tient compte de la très grande homologie entre les trois récepteurs des gonadotrophines et les quatre hormones. La spécificité de fixation est dictée par la séquence en acides aminés du domaine extracellulaire du R-

LH/CG et par la séquence en acides aminés de la sous-unité  $\beta$  de l'hormone. Les différentes étapes de l'activation du R-LH/CG sont communes à tous les récepteurs des glyco-hormones et sont basées sur l'interaction spécifique d'une séquence en acides aminés commune à toutes les sous-unités  $\alpha$  des quatre gonadotrophines et une séquence en acides aminés conservée dans le domaine transmembranaire des trois récepteurs aux glyco-hormones (Braun et al., 1991) (Ji et al., 1993) (Jiang et al., 1995) (Kajava et al., 1995). Ce modèle est étayé par différents travaux montrant que certaines mutations de l'hormone (LH ou hCG) peuvent inhiber l'activation du récepteur sans affecter la fixation de l'hormone sur le R-LH/CG (Strickland et al., 1985) (Sairam, 1989) (Ji et al., 1993) (Pierce and Parsons, 1981), toutes ces mutations sont localisés dans la sous-unité  $\alpha$  de l'hormone.

#### 2.4.3. Modèle 2.

La LH ou l'hCG se fixent au domaine extracellulaire du R-LH/CG qui permet alors l'activation du domaine transmembranaire. Le deuxième modèle est identique au premier, sauf que l'accent est mis sur le fait que c'est le domaine extracellulaire et non l'hormone fixée au R-LH/CG qui active le récepteur. Ce modèle a été mis en place suite à l'étude de mutations du domaine extracellulaire qui inhibe la transduction du signal mais pas la fixation de l'hormone (Alvarez et al., 1999). Ce modèle suggère que lorsque le récepteur est dans un état inactif, le domaine extracellulaire n'est pas étroitement lié avec le domaine transmembranaire, contrairement à l'état actif (dû à la fixation de l'hormone sur son récepteur), où le domaine extracellulaire est en contact avec le domaine transmembranaire.

#### 2.4.4. Modèle 3.

Le modèle 3, quant à lui propose que le domaine extracellulaire du R-LH/CG maintiendrait le domaine transmembranaire dans un état inactif, grâce à une interaction des deux domaines. La fixation de la LH, ou de l'hCG à l'ectodomaine, permet d'activer le domaine transmembranaire en diminuant l'interaction des deux domaines (Moyle et al., 1995) (Nakabayashi et al., 2000) (Zeng et al., 2001) (Nishi et al., 2001). Ce modèle a été mis en place suite à l'incidence de mutations du domaine extracellulaire, qui rendent le R-LH/CG actif de manière constitutive (Nakabayashi et al., 2000) (Zeng et al., 2001).

Ces trois modèles sont relativement bien étayés et actuellement il est impossible d'en favoriser un parmi les autres.

## 2.5. Régulation du R-LH/CG.

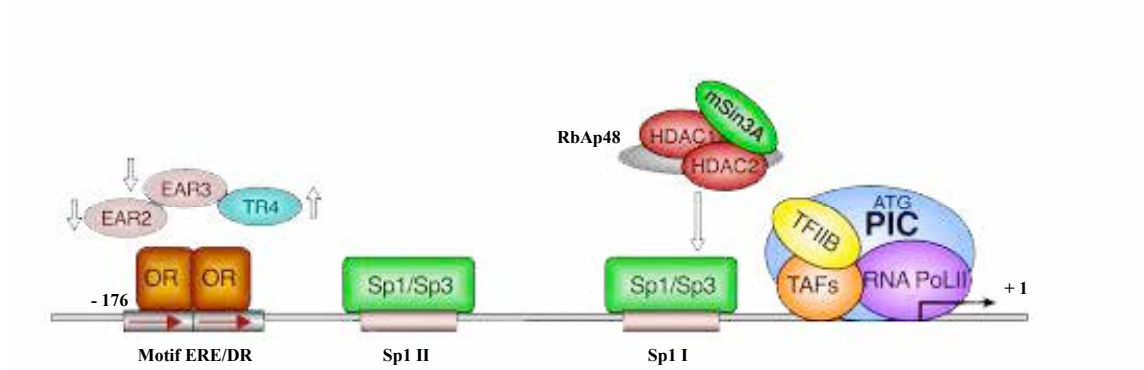
### 2.5.1. Régulation transcriptionnelle.

Le récepteur LH/CG est régulé négativement à la surface des cellules, en présence de très forte concentration de ligand (LH ou d'hCG) qui est caractérisé par la régulation de l'expression du récepteur à la surface des cellules, ainsi qu'une diminution de toutes formes d'ARNm du R-LH/CG (Segaloff et al., 1990) (LaPolt et al., 1990) (Hoffman et al., 1991) (Peegel et al., 1994). La régulation négative de l'ARNm du R-LH/CG observée en présence de fortes concentrations d'hormone n'est pas seulement due qu'à une diminution de la transcription du gène mais s'accompagne aussi d'une augmentation de la dégradation de l'ARNm du R-LH/CG (lu et al., 1993). Certains auteurs (Kash and Menon, 1998) (Kash and Menon, 1999) ont identifié une protéine: la "LH receptor binding protein 1" (LRBP1), qui se fixe sur une phase ouverte de lecture de l'ARNm du R-LH/CG. Il a été supposé, mais pas encore démontré que la LRBP1 régule la stabilité de l'ARNm du R-LH/CG. Ces observations ont été réalisées et mises en évidence chez le rat.

Chez l'homme, l'activité basale de la transcription a été étudiée par le laboratoire de M. Dufau (Tsai-Morris et al., 1998) (Geng et al., 1999) (Zhang and Dufau, 2000). La région promotrice du R-LH/CG est localisée dans les 176 pb de la région 5' du gène du récepteur (Tsai-Morris et al., 1998). Cette région du récepteur contient des séquences consensus avec deux sites Sp1 (Sp1 I et Sp1 II) qui fixent Sp1/Sp3 (Geng et al., 1999) et un élément de réponse aux estrogènes (EREhs). La délétion d'un ou des deux sites Sp1 entraîne une diminution de la transcription du R-LH/CG (Geng et al., 1999).

En amont des sites Sp1, deux sites putatifs ERE/DR (élément de réponse aux œstrogènes/"direct repeats") est présent à - 171 nucléotides, là où il a été montré la fixation de trois récepteurs nucléaires, les "nuclear orphan receptor" qui sont retrouvés dans d'autres systèmes de régulation de la transcription (EAR2, EAR3/COUP-TF1) et TR4) (Zhang and Dufau, 2000). La fixation EAR2 (Erb A related protein 2) et EAR3/COUP-TF1 (Erb A related protein 3/ Chicken ovalbumine upstream promotor transcription factor 1) sur les deux sites putatifs ERE/DR entraînent une répression de la transcription du R-LH/CG, alors que la fixation de TR4 (Thyroid hormone receptor 4) qui est un autre "nuclear orphan receptor" active le promoteur du R-LH/CG en se fixant sur les mêmes sites putatifs que EAR2 et EAR3/COUP-TF1 (Zhang and Dufau, 2000) (Zhang and Dufau, 2001) (**figure 31**).

Il a été montré récemment que la structure de la chromatine, modulée par l'acétylation et la déacétylation des histones, joue un rôle important dans la régulation du gène du récepteur LH/CG (Zhang and Dufau, 2002). Le site Sp1 I du promoteur du gène du récepteur LH/CG a été identifié comme un site permettant le recrutement du complexe: histone déacétylase, (HDAC)-mSin3A-RbAp48, qui est responsable de la répression du gène du R-LH/CG *via* une hypoacétylation des histones qui entraîne une condensation de la chromatine (Zhang and Dufau, 2002) (**figure 31**).



**Figure 31: Représentation schématique de l'organisation du promoteur du gène du R-LH/CG.**  
 (d'après <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/LHRID288.html>). Flèche vers le haut: activation; flèche vers le bas: inhibition; ERE: élément de réponse aux oestrogènes; DR: "direct repeat"; OR: "orphan receptor"; Sp1 I et II: sites de fixation des facteurs de transcriptions Sp1; PIC: "preinitiation complex".

L'activation de la transcription du gène du récepteur LH/CG dépend de l'assemblage de la polymérase II (Pol II) avec d'autres facteurs de transcriptions tels que: TFIIA, -B, -D, -E, -F, et -H, qui forment ainsi dans la région promotrice un complexe de préinitiation (PIC, "preinitiation complex") (Zawel and Reinberg, 1993). Les activateurs de la transcription (Sp1, Sp3, TR4), et les répresseurs (EAR2, EAR3/COUP-TF1, HDAC-mSin3A-RbAp48) doivent être en contact avec TFIIB pour induire ou non la formation du complexe PIC (Zhang and Dufau, 2003) (**figure 31**).

### 2.5.2. Régulation post-traductionnelle.

La désensibilisation est le mot utilisé pour décrire la perte de réponse des cellules cibles à l'action continue d'un agoniste. La désensibilisation est un phénomène important de la régulation hormonale.

Il existe plusieurs étapes de désensibilisation de la réponse induite par l'agoniste : le découplage et l'internalisation sont les deux processus impliqués dans la régulation post-traductionnelle. Le processus de la régulation négative du nombre total de récepteurs à la surface cellulaire est un autre processus de régulation du R-LH/CG lors d'une exposition longue à un ligand agoniste.

#### - Le découplage.

La première étape, appelée découplage (**figure 32 A**), est une étape rapide, qui consiste à diminuer l'interaction du R-LH/CG avec les protéines G. L'activation du R-LH/CG active les protéines G intracellulaires. Ce couplage est peu à peu inhibé, car on assiste à une phosphorylation de cinq résidus sérine (quatre chez le rat), qui sont localisés dans la partie C-terminale, région en partie responsable de l'activation des protéines G. Cette phosphorylation est réalisée par des enzymes appartenant à la famille des sérines-thréonines kinases ou GRK. La région du récepteur phosphorylé est alors reconnue par une  $\beta$ -arrestine, qui se lie au récepteur et le rend incapable d'activer l'échange GDP-GTP au niveau des protéines G. Le complexe  $\beta$ -arrestine et R-LH/CG se forme de manière stœchiométrique.

Les protéines impliquées dans le découplage du R-LH/CG sous l'action de la LH ou de l'hCG ont été identifiées comme appartenant à la famille des  $\beta$ -arrestines et portent le nom d'arrestine 1 (ou  $\beta$ -arrestine 1) et arrestine 3 (ou  $\beta$ -arrestine 2).

Le complexe RCPG/ $\beta$ -arrestine est un intermédiaire dans la modulation de la fonction des RCPG. Tout d'abord il permet le découplage du R-LH/CG aux protéines G (Freedman and Lefkowitz, 1996) et enfin il permet la formation d'une espèce de puit recouvert de clathrine indispensable pour l'internalisation du récepteur (Krupnick and Benovic, 1998) (Ferguson, 2001).



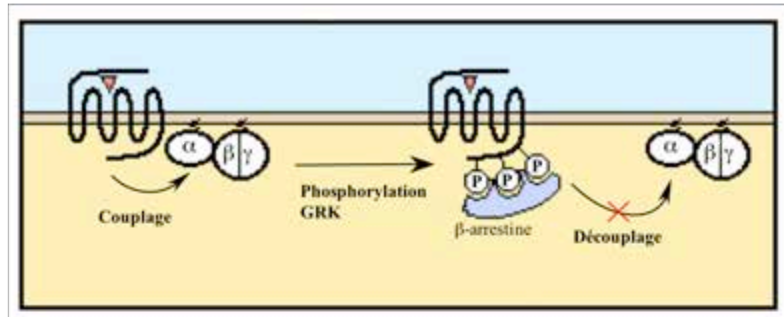


Figure 32 A: Représentation schématique du découplage du récepteur par phosphorylation.  
(d'après [www.chez.com/rcpg/partie4.html](http://www.chez.com/rcpg/partie4.html)).

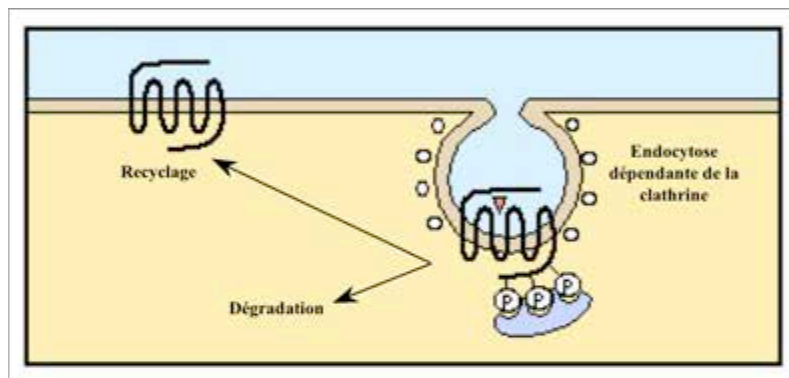


Figure 32 B: Représentation schématique de l'internalisation du complexe hormone/récepteur.  
(d'après [www.chez.com/rcpg/partie4.html](http://www.chez.com/rcpg/partie4.html)).

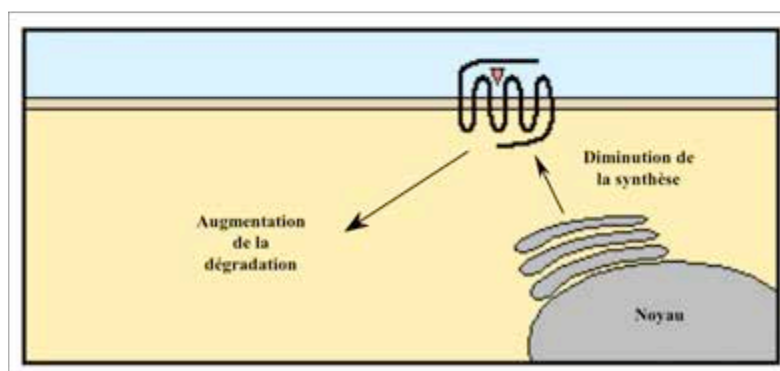


Figure 32 C: Représentation schématique de la régulation négative ("down regulation").  
(d'après [www.chez.com/rcpg/partie4.html](http://www.chez.com/rcpg/partie4.html)).

Il est clairement établi que l'hCG ou la LH induisent sous l'action des  $\beta$ -arrestines, le découplage du R-LH/CG, cependant la phosphorylation du RCPG sous stimulation d'agoniste et la fixation des  $\beta$ -arrestines dans le processus de découplage est soumis à controverse. En effet, chez l'homme, certaines mutations touchant des résidus cibles impliqués dans l'activation et/ou la phosphorylation du R-LH/CG, ont montré que la formation du complexe hormone/récepteur et la fixation des  $\beta$ -arrestines sont dues à l'activation du récepteur et dans une moindre mesure dû à sa phosphorylation (Min et al., 2002). La phosphorylation du récepteur R-LH/CG est nécessaire mais non suffisante pour le découplage du récepteur à l'adénylate cyclase et pour l'internalisation du complexe hormone-récepteur.

- L'internalisation.

Les mécanismes de phosphorylation du R-LH/CG et de liaison de l'arrestine sont suivis par une internalisation du complexe ligand-récepteur phosphorylé (Min and Ascoli, 2000) (Nakamura et al., 2000) (Nakamura and Ascoli, 1999) (**figure 32 B**).

En absence d'agoniste, le R-LH/CG a une répartition homogène à la membrane cellulaire, mais en présence d'agoniste, le complexe ligand-récepteur est internalisé dans des vésicules recouvertes de clathrine dans des endosomes (Ghinea et al., 1992). Les récepteurs ainsi endocytosés peuvent alors soit subir en recyclage à la membrane plasmique, ce qui nécessite une déphosphorylation du récepteur et une élimination du ligand (voie préférentielle chez l'homme), soit subir une dégradation, avec la fusion des vésicules d'endocytose avec les lysosomes (voie préférentielle chez le rat) (Kishi et al., 2001). L'internalisation du complexe hormone-récepteur est d'environ 20 min (Nakamura et al., 2000).

L'activation du R-LH/CG est essentielle pour déclencher le processus d'internalisation. Il a été montré que certaines mutations du R-LH/CG humain pouvaient diminuer, voir annuler toute internalisation du complexe ligand-récepteur (Min et al., 1998) (Min and Ascoli, 2000). En revanche, il existe des mutations activatrices qui augmentent l'endocytose (Min et al., 1998) (Min and Ascoli, 2000). L'importance de la phosphorylation des sérines dans la partie C-terminale du R-LH/CG dans le processus d'internalisation n'est pas encore très claire. En effet, les mutations de trois des cinq sérines Ser<sup>657</sup>, Ser<sup>661</sup>, et Ser<sup>670</sup>, susceptibles d'être phosphorylés chez l'homme n'ont peu ou pas d'effet sur l'internalisation du récepteur (Min and Ascoli, 2000), contrairement au rat, où de telles mutations diminuent son internalisation (Wang et al., 1996) (Wang et al., 1997).

L'analyse de sept mutations dans les IL2, IL3, et IL4, ont montré que les résidus Val<sup>439</sup>, Gln<sup>440</sup>, Arg<sup>525</sup>, Gln<sup>531</sup>, Thr<sup>536</sup>, Pro<sup>538</sup>, et Leu<sup>612</sup> étaient importants dans la vitesse d'internalisation du récepteur, des auteurs ont montré que ces acides aminés sont impliqués dans la reconnaissance et la fixation des  $\beta$ -arrestines (Nakamura et al., 2000).

Les complexes ligand-récepteur internalisés sont en général dissociés dans l'environnement acide (pH 5-6) des endosomes. Le complexe agoniste-récepteur LH/CG est insensible à la dissociation dans cet environnement (Ascoli, 1984). Le complexe formé de l'hCG et de R-LH/CG internalisé dans un endosome est alors délivré à un lysosome. L'environnement plus acide présent dans le lysosome permet la dissociation de l'agoniste et du récepteur, mais aussi la dégradation des deux sous unités qui composent l'hCG (ou de la LH) (Ascoli, 1982).

La dégradation lysosomale du récepteur internalisé est très mal connue, il semble que ce processus soit prédominant chez le rat, alors que chez l'homme, le recyclage du récepteur serait majoritaire (sauf dans le cas de "down régulation").

- La régulation négative ou "down regulation".

Le processus appelé "down regulation" est un processus lent qui a pour but de diminuer le nombre de récepteurs à la surface des cellules (**figure 32 C**). Lors d'une exposition longue, chronique, à un ligand agoniste, on peut observer une diminution du nombre total de récepteurs à la surface cellulaire. Deux phénomènes sont impliqués dans la régulation négative: une diminution de la synthèse des récepteurs et une augmentation de leur dégradation. Le phénomène de "down regulation" est précédé des processus de découplage et d'internalisation du R-LH/CG.

Le processus d'internalisation intervenant dans la régulation négative a été particulièrement étudié dans les MA-10 (Wang et al., 1991). Il est clair que l'hCG, *via* l'activation de son second messenger l'AMPC, diminue la transcription du gène et l'ARNm du R-LH/CG. L'hCG joue un rôle dans l'induction du processus de régulation négative.

Il existe une corrélation entre le taux d'internalisation du complexe hormone-récepteur et l'importance du phénomène de régulation négative. En effet, des mutations affectant l'internalisation du récepteur (activation ou inhibition) affectent aussi la régulation négative (en l'activant ou l'inhibant respectivement).

Le taux d'internalisation du R-LH/CG, en présence d'hCG ou de LH est déterminant pour induire le niveau de réponse de la régulation négative. Le complexe hormone/récepteur est accumulé dans les lysosomes après stimulation des cellules par l'agoniste, ce qui a pour conséquence une dégradation de l'hCG (Ghinea et al., 1992) (Ascoli, 1982) (Nakamura et al., 1999a), mais aussi une diminution de l'expression du R-LH/CG à la membrane cellulaire (Wang et al., 1991) (Nakamura et al., 1999a).

Dans le lysosome, le récepteur peut soit s'orienter dans une voie de dégradation (prépondérante en cas de régulation négative), soit se diriger dans une voie de recyclage du récepteur à la membrane cellulaire. Chez l'homme, la voie du recyclage est prépondérante à la voie de la dégradation, contrairement au rat (Kishi et al., 2001).

Kishi et collaborateurs (Kishi et al., 2001) ont montré chez l'homme la présence d'une séquence dans la région C-terminale appelé GTALL (pour la séquence en acides aminés), qui lorsqu'elle est ajoutée à la séquence du R-LH/CG présent chez le rat, permet de rediriger le récepteur dans la voie de recyclage, plutôt que dans celle de la dégradation. Cependant la délétion de cette séquence chez l'homme n'a aucune incidence sur le routage du R-LH/CG dans le recyclage.

### **3. PATHOLOGIE LIÉE AUX R-LH/CG.**

#### **3.1. Mutations activatrices du gène du R-LH/CG (figure 33).**

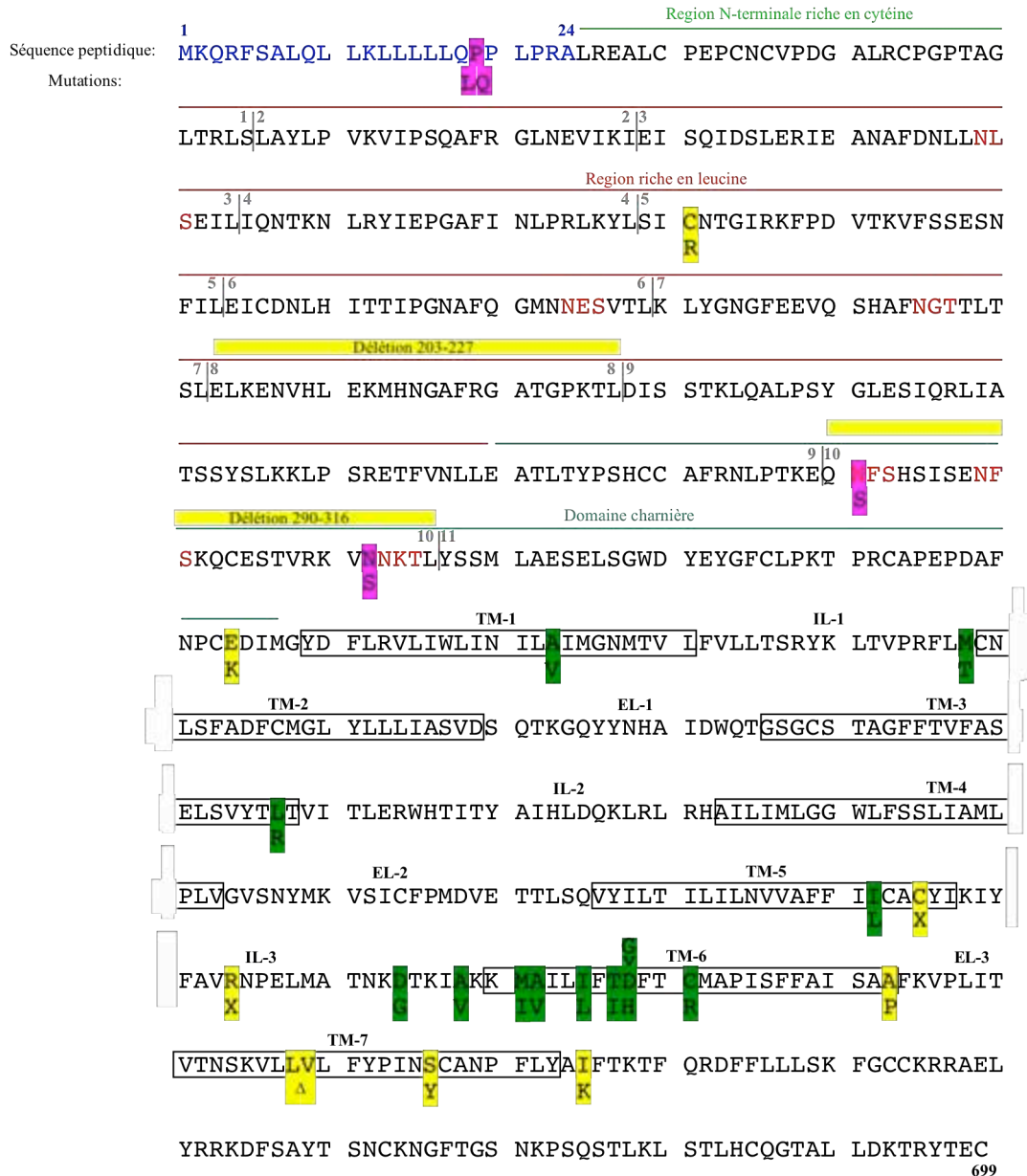
La puberté précoce familiale du garçon, appelée aussi testotoxicose, est indépendante des gonadotrophines. Elle se transmet sur le mode autosomique dominant et n'a pas d'équivalent chez la fille. La concentration de testostérone est très élevée alors que la concentration en LH est celle observée normalement en période prépubère. La cause du syndrome a été élucidée: il s'agit de mutations germinales activatrices du gène du récepteur LH/CG. Une substitution d'un acide aminé siégeant en position 578 dans le TM6 (sixième passage transmembranaire) a été trouvée (Shenker et al., 1993). Dans une lignée cellulaire (les COS-7), l'expression du récepteur muté dans cette même région augmente la concentration intracellulaire d'AMPC. La production excessive et autonome de testostérone chez les patients est donc liée à une activation constitutive du récepteur LH/CG muté.

Des mutations du TM2 et TM5, ainsi que de la troisième boucle intracellulaire (IL3) ont été identifiées comme activatrices du récepteur LH/CG (Yano et al., 1994) (Kosugi et al., 1995) (Latronico et al., 1995). L'activation constitutionnelle du R-LH/CG dans les cellules de la thèque et les cellules lutéales ou interstitielles de l'ovaire n'entraîne pas d'anomalie fonctionnelle chez la fille qui ne présente aucun signe clinique d'hyper androgénie, ni de puberté précoce (Laue et al., 1995). Les explorations hormonales réalisées à l'âge adulte chez une mère porteuse de la mutation 578 se sont révélées être normales (Rosenthal et al., 1996).

Dans les cas de puberté précoce sporadique du garçon, à taux de gonadotrophine basse (Yano et al., 1994), il a été décrit plusieurs types de mutations du gène du R-LH/CG localisées dans le TM6, dont celle située en position 578. L'expression clinique de ces mutations à l'âge adulte est inconnue. La fonction gonadique adulte semble normale.

#### **3.2. Mutations inactivatrices du gène du R-LH/CG (figure 33).**

La moitié des ambiguïtés sexuelles détectées à la naissance sont des pseudohermaphrodismes masculins liés à des anomalies de la différenciation sexuelle qui s'accompagnent d'un défaut de



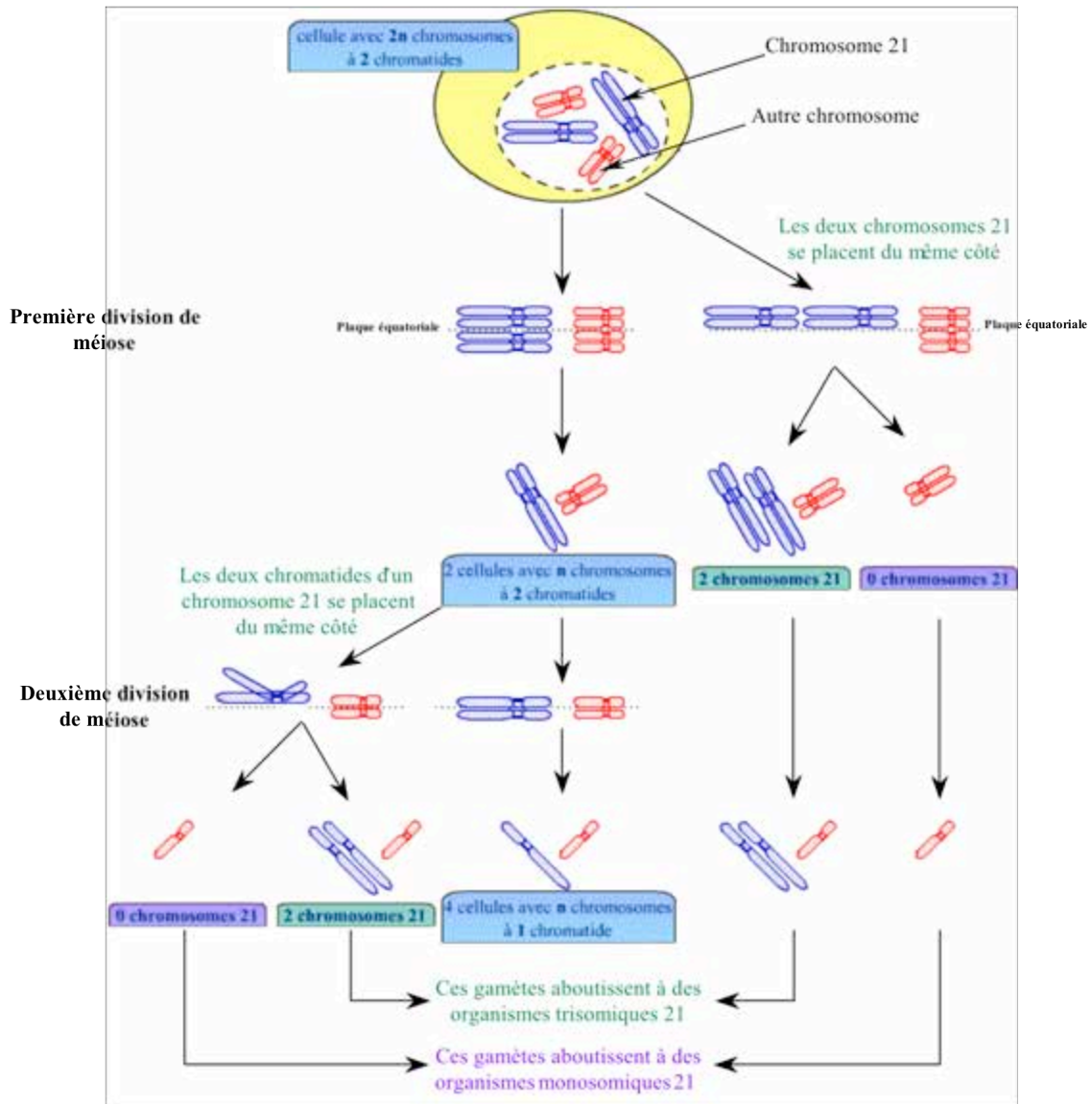
**Figure 33: Localisation des différentes mutations et polymorphismes du R-LH/CG.**

(d'après ASCOLI, 2002). En bleu: séquence du peptide signal; trait vert clair: domaine riche en cystéine; trait rouge: domaine riche en leucine; trait vert foncé: domaine charnière; en gris clair: emplacement des différents exons (notés 1 à 11); le cadre noir représente les domaines transmembranaires (notés TM-1 à TM-7); Les boucles extra-cellulaires sont notées EL-1 à EL-3 et les boucles intracellulaires sont notées IL-1 à IL-3. En rouge: résidus N-glycosylés; en violet: localisation des différents polymorphismes; en jaune les mutations perte de fonctions et en vert les mutations entraînant un gain de fonctions Δ: pour délétion.

virilisation d'un sujet porteur de deux testicules. Certaines sont bien connues, comme des anomalies de production de la testostérone, les anomalies de la 5 $\alpha$  réductase et des défauts d'action de la testostérone (anomalie du récepteur des androgènes). Cependant, malgré les progrès de l'endocrinologie, de 70 à 80% des pseudohermaphrodismes masculins restent de cause inconnue.

Le syndrome dit de résistance du testicule à la LH, ou agénésie des cellules de Leydig, a été décrit en 1976 (Berthezene et al., 1976). Ce syndrome est de transmission autosomique récessive, où l'examen des gonades met en évidence l'absence de cellule de Leydig mature. À la naissance, le phénotype de pseudohermaphrodisme masculin ou phénotype féminin est observé. À la puberté, les taux de testostérone et de ses précurseurs sont effondrés et le récepteur non stimuable par l'hCG; la LH est élevée et la FSH normale. Ce syndrome a été rattaché à des mutations homozygotes du onzième exon du gène du R-LH/CG chez des patients phénotypiquement féminins (Ala<sup>593</sup>, Cys<sup>545</sup>, Arg<sup>554</sup>). Une double mutation hétérozygote (Asn<sup>291</sup>, Ser<sup>616</sup>) et une mutation homozygote (Cys<sup>133</sup>) sont décrites chez des sujets présentant un phénotype ambigu à la naissance.

La première observation d'une fille, homozygote pour la mutation du récepteur de la LH, a été décrite, il y a une dizaine d'années. Elle présentait une aménorrhée primaire mais une féminisation normale, laissant supposer que le rôle de la LH dans son développement pubertaire est modeste. Ce syndrome est rattaché à une mutation homozygote dans le onzième exon (Ala<sup>593</sup>).



**Figure 34: Représentation schématique des processus de non disjonction des chromosomes 21 donnant naissance à une trisomie 21.**

En bleu: chromosome 21; en rouge chromosome autre que le 21

## IV. Trisomie 21 et aneuploïdies

**E**n 1833, Jean-Etienne Esquirol (psychiatre français, 1772-1840) fait pour la première fois part d'une curieuse maladie mentale, sa description est très loin de ce que l'on appellera plus tard la trisomie 21. En 1846, Edouard Séguin (médecin français, 1812-1880) décrit pour la première fois le visage très caractéristique des individus trisomiques, mais encore une fois sa description de la pathologie reste incomplète. C'est en 1866, qu'un médecin anglais, John Langdon Down (médecin britannique, 1828-1896) attire l'attention du monde scientifique sur un groupe d'enfants arriérés mentaux dont le faciès particulier lui suggère d'appeler ces enfants "mongoliens". L'origine de cette maladie congénitale est restée mystérieuse jusqu'en 1959, où Jérôme Lejeune (pédiatre et généticien, 1926-1994), Raymond Turpin (pédiatre et généticien, 1895-1988) et Marthe Gautier mettent en évidence la cause génétique de ce syndrome à savoir la présence dans le patrimoine génétique de trois chromosomes 21, le nom de "trisomie 21" était né (Lejeune et al., 1959). Ce fut la première maladie pour laquelle fut mise en évidence la relation entre génotype et phénotype. En 1961, un groupe de scientifiques dont le petit-fils du docteur J.L. Down propose que le terme de "mongolisme" soit remplacé par celui de "syndrome de Down". Ce terme est alors accepté par l'organisation mondiale de la santé en 1965.

### 1. GÉNÉRALITÉS SUR LA TRISOMIE 21

#### 1.1. Définition et différents types de trisomies 21.

La non-disjonction des chromosomes 21, survenant soit au cours de la première ou de la seconde division méiotique maternelle ou paternelle, soit lors des toutes premières divisions de l'œuf fécondé peut être considérée comme un accident isolé (**Figure 34**).

On distingue différents types de trisomies 21, à savoir les trisomies 21 libres, les trisomies 21 par translocation (Robertsonienne) et les trisomies 21 mosaïques.



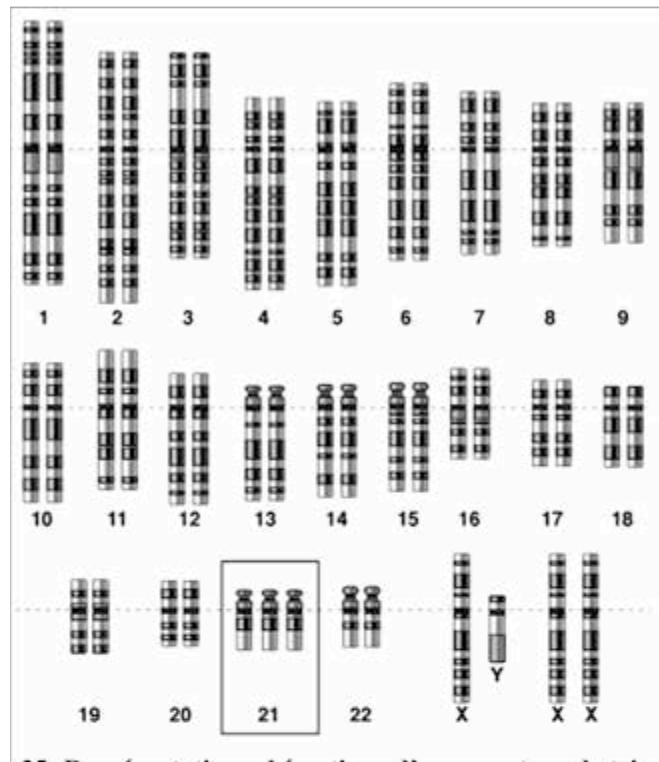


Figure 35: Représentation schématique d'un caryotype de trisomie 21.

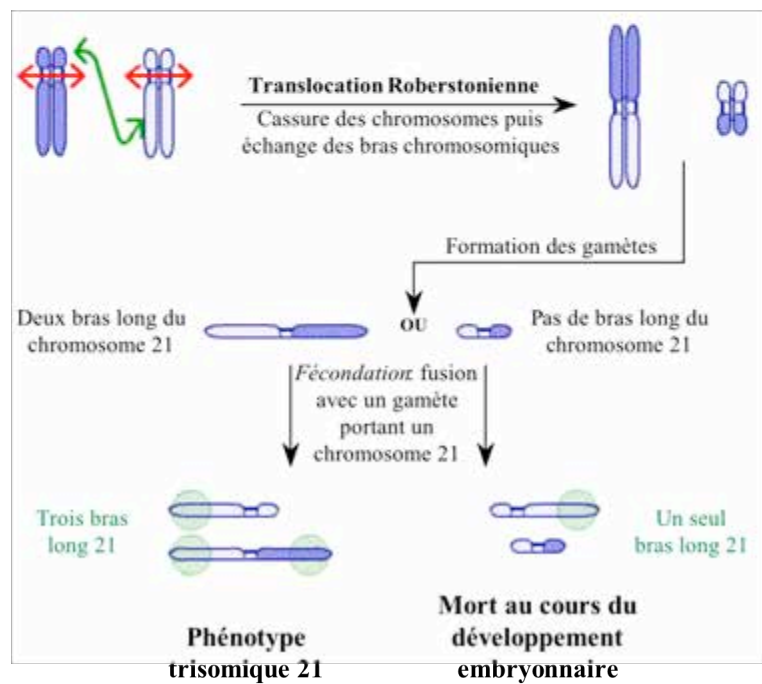


Figure 36: Représentation schématique de la translocation Roberstonienne.

Il s'agit de la cassure et de l'échange des bras chromosomiques des chromosome 21 chez un des parents, anomalie que l'on retrouve au niveau des gamètes.

### 1.1.1. La trisomie 21 libre et homogène.

Elle représente à elle seule la plupart des trisomies 21, soient 92,5 à 94%. On retrouve alors dans toutes les cellules de l'organisme, 47 chromosomes au lieu de 46, l'élément surnuméraire étant un chromosome 21 d'apparence normale (**Figure 35**). Elle résulte d'une non-disjonction des chromosomes en première ou en deuxième divisions de méiose, ou lors de la première division cellulaire. 1/3 de ces trisomies 21 sont dues à une non-disjonction paternelle.

### 1.1.2. La trisomie 21 par translocation (translocation Robertsonienne).

Elle représente 4,8% des trisomies 21. Il s'agit de la translocation de la totalité ou d'une partie du chromosome 21 sur un chromosome court (généralement sur le chromosome 14, mais aussi sur le 21 ou le 22) (**Figure 36**). Cette translocation peut survenir *de novo* chez des parents (50% des cas), dont le caryotype est normal. Le caryotype présentant dans ce cas 46 chromosomes, mais un examen attentif montre qu'il existe bien trois chromosomes 21: deux libres et le troisième fixé à un autre chromosome (**Figure 37**). Une étude a porté sur la détermination du fragment surnuméraire transloqué le plus petit et dont la présence est associée aux caractéristiques du syndrome de Down, il a été alors possible de circonscrire une région soupçonnée d'abriter les gènes à l'origine des anomalies observées. Celle-ci ne comporte que 33 gènes et se nomme "région critique du syndrome de Down" (DSCR) (on parle alors de trisomie 21 partielle).

### 1.1.3. La trisomie 21 en mosaïque.

Elle ne représente que 2,7% des trisomies 21. L'erreur de distribution des chromosomes 21 survient au cours de la deuxième, voire de la troisième division cellulaire. L'enfant possède alors deux types de cellules, les unes normales (avec 46 chromosomes) et les autres trisomiques 21 (avec 47 chromosomes dont 3 chromosomes 21). L'importance relative des deux clones varie en fonction de la date de l'accident qui est toujours mitotique post zygotique.

## 1.2. Epidémiologie.

La trisomie 21 est l'anomalie chromosomique autosomique viable la plus fréquente et la cause majeure de retard mental congénital. Les aneuploïdies les plus fréquentes après la trisomie 21 sont la trisomie 13 et la trisomie 18. Le diagnostic anténatal indique qu'un fœtus sur 1000 porte cette

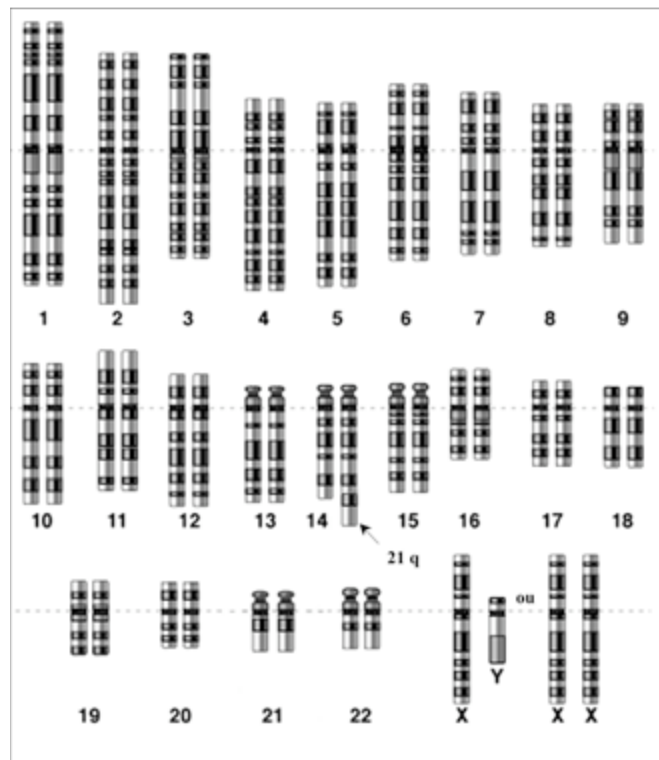


Figure 37: Représentation schématique d'un caryotype de trisomie 21 suite à une translocation Robertsonienne du 21q sur le chromosome 14.

anomalie, mais l'élimination spontanée du fœtus trisomique avant terme (environ 23% des fœtus trisomiques 21 diagnostiqués *in utero* à 16 semaines de grossesse sont éliminés spontanément) conduirait à une fréquence d'une naissance sur 700 si aucun diagnostic n'était effectué. On estime ainsi à 1000 le nombre de naissances d'enfants trisomiques chaque année en France. Le sexe ratio est de 6 garçons pour 2 filles.

Au retard mental, s'associent d'importantes anomalies morphologiques qui sont à l'origine d'un taux important de fausses couches spontanées précoces ou tardives. Le seul facteur de risque connu est l'âge maternel. En effet, le risque de donner naissance à un enfant trisomique 21 augmente avec l'âge maternel. Il existe plusieurs tables évaluant le risque de T21 en fonction de l'âge, la table de Hook (Hecht and Hook, 1994) proposé en 1994 évalue le risque de trisomie 21 à terme et en fonction de l'âge maternel (**figure 38**).

### **1.3. Phénotype associé à la trisomie 21.**

La présence d'un chromosome 21 surnuméraire induit l'expression d'un phénotype plus ou moins marqué.

A la naissance, on constate une hypotonie qui se confirme au cours de la croissance. Le retard psychomoteur est constant. D'un point de vue morphologique, la tête d'un enfant trisomique est plus petite que la normale, le visage est rond et plat, le nez est petit, les yeux légèrement bridés, les mains comme les pieds, sont larges et trapus, avec des doigts plus courts que la normale, on note de plus des plis palmaires.

Par ailleurs, de graves malformations viscérales sont associées à la trisomie 21. Ces malformations peuvent être dépistées par échographie au deuxième trimestre durant la grossesse et constituent les signes majeurs d'appel échographique (SAE). Les malformations les plus fréquentes sont des malformations cardiaques: 46% des fœtus trisomiques en sont porteurs, à des degrés divers. Ces cardiopathies, très sévères, sont le plus souvent fatales dans la première année de vie. On note aussi des malformations digestives, ainsi que des anomalies osseuses (anomalie du bassin, des doigts notamment).

De plus, il est à noter des anomalies mentales. En effet, l'acquisition du langage se fait très tardivement; l'apprentissage de la lecture et de l'écriture ne se fait que dans de très rares cas. Le quotient intellectuel se situe généralement aux environs de 50 à l'âge de cinq ans mais décroît par la suite.

Globalement, 50% des naissances survenant à terme ont au moins une anomalie congénitale grave associée au retard mental; 20% des enfants présentant une malformation cardiaque mourront avant l'âge d'un an; 10% des enfants trisomiques ont un QI inférieur à 20, 70% se situent entre 20 et 50 et

âge maternel	risque T21 à terme
15	1/1587
16	1/1562
17	1/1562
18	1/1562
19	1/1538
20	1/1538
21	1/1515
22	1/1492
23	1/1449
24	1/1408
25	1/1351
26	1/1282
27	1/1204
28	1/1123
29	1/1020
30	1/909
31	1/793
32	1/680
33	1/571
34	1/471
35	1/381
36	1/304
37	1/240
38	1/187
39	1/145
40	1/111
41	1/085
42	1/064
43	1/049
44	1/037
45	1/028
46	1/021
47	1/016
48	1/012
49	1/009
50	1/007

**Figure 38: Table montrant le rapport entre l'âge maternel et le risque d'une grossesse associée à une trisomie 21. (d'après HECHT, 1994)**

20% dépassent 50; 2% d'entre eux développeront une leucémie; 20% des trisomiques meurent avant cinq ans, 44% survivent jusqu'à 60 ans; leur espérance de vie moyenne est de 50 ans.

## 2. LE DÉPISTAGE DE LA TRISOMIE 21

(voir **figure 39**)

### 2.1. Dépistage échographique.

L'échographie morphologique du deuxième trimestre va permettre de déceler l'ensemble des anomalies morphologiques liées à la trisomie 21 avec principalement les malformations cardiaques entre autre, les malformations du canal atrio-ventriculaire, représentant un risque de trisomie 21 de 40%, les malformations digestives (avec la sténose duodénale, représentant un risque de trisomie 21 de 30%). L'épaisseur de la nuque (>6 mm) est un signe d'appel de la trisomie 21.

Le fémur et l'humérus court peuvent constituer un signe d'appel avec une diminution du rapport longueur du fémur sur longueur du pied qui est normalement égal à 1. Les anomalies rénales, surtout si elles sont associées à un signe échographique mineur de trisomie 21 (*cf ci-dessous*), doivent être prises en compte. Le retard de croissance intra utérin peut s'observer mais demande à être interprété en tenant compte des autres causes possibles (vasculaires, familiales, géniques, ...), s'il est "idiopathique" (de cause non déterminée), il peut être évocateur de trisomie 21.

Les signes mineurs de la trisomie 21 sont le plus souvent des malformations de la face ou des extrémités (mains).

À partir des années 1990, il a été démontré l'intérêt de la mesure échographique de l'épaisseur de la nuque fœtale (clarté nucale) entre 10 et 14 semaines d'aménorrhée (au premier trimestre). En effet, si à cette date l'épaisseur de la nuque du fœtus est supérieure à 3 mm, cette anomalie signe le risque d'être en présence d'un fœtus trisomique avec une probabilité de 73%, avec un seuil de faux positif de 5%, cependant il est difficile de mesurer la taille de la nuque correctement. La clarté nucale correspond à un œdème dû au retard d'apparition du système lymphatique qui empêche le drainage de l'eau.

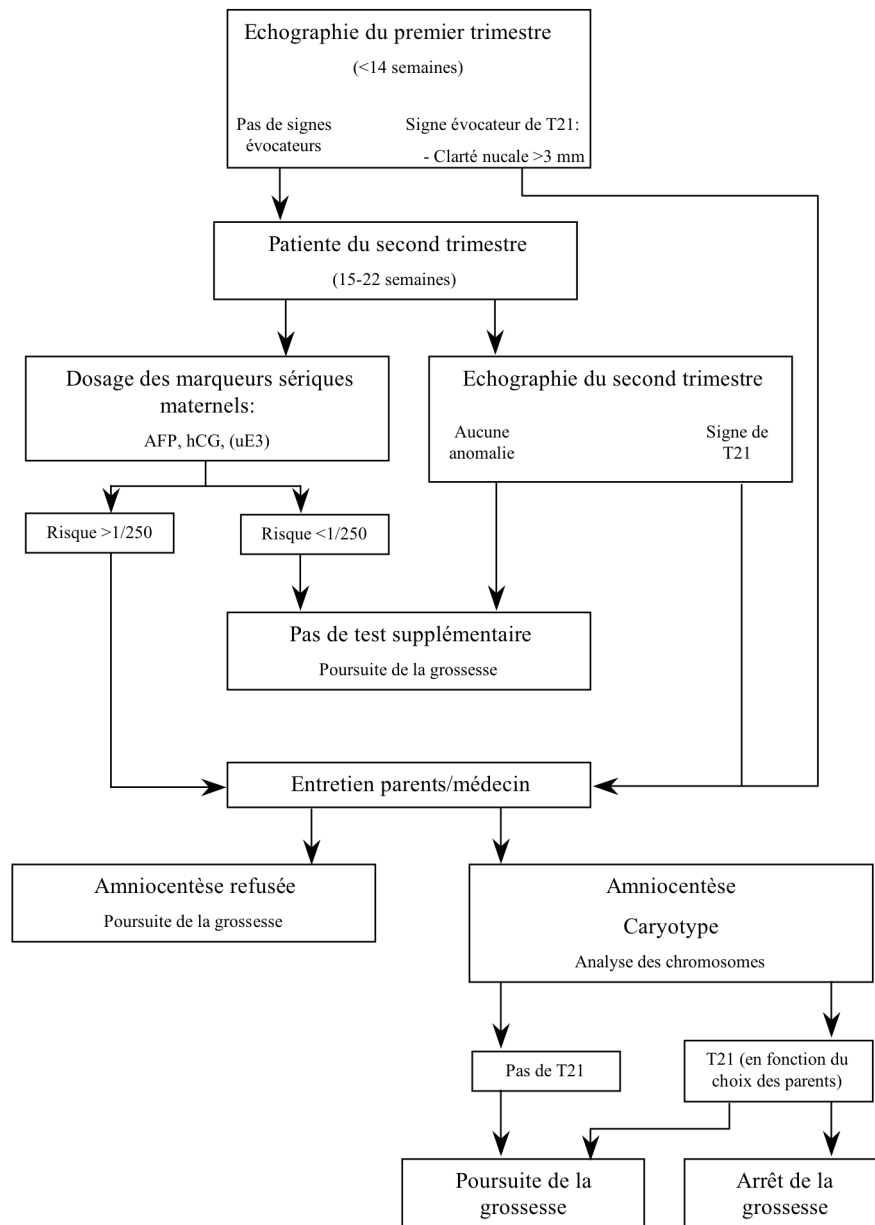


Figure 39: Protocole classique du diagnostic et du dépistage de la trisomie 21 en France.

## 2.2. Dépistage biologique.

### 2.2.1. L'âge maternel.

Dans le passé, il n'existait qu'un seul moyen de dépistage anténatal de la trisomie 21. Les patientes étaient simplement détectées après un prélèvement de liquide amniotique (amniocentèse, choriocentèse c'est à dire un prélèvement de villosités choriales). Le risque était évalué en fonction de l'âge de la patiente ou des antécédents familiaux ayant donné lieu à la naissance d'un enfant trisomique. Le problème qui se posait alors était de placer un seuil adéquat à l'âge maternel permettant l'accès à ce diagnostic. L'âge gestationnel au moment du dépistage est important puisque l'on sait que 50% des diagnostics de trisomie 21 effectués sur un prélèvement de villosités choriales va interrompre spontanément la grossesse et que 25% des fœtus découverts après amniocentèses ne pourront poursuivre leur développement et seront également éliminés. En France, le seuil choisi a été celui de 38 ans (correspondant au risque de 1/250 d'avoir une grossesse associée à trisomie 21) (Hecht and Hook, 1994).

### 2.2.2. Au premier trimestre.

Si aujourd'hui en France, la loi fixe de manière très stricte les dates de prélèvements sanguins en vue du dépistage de la trisomie 21 (entre la 14<sup>ème</sup> et la 18<sup>ème</sup> SA), dans d'autres pays on accède au dépistage dès le premier trimestre par la mesure échographique de la clarté nucale combinée ou non au dosage des marqueurs sériques du premier trimestre, tels que la sous-unité  $\beta$  libre de l'hCG et de la Protéine A plasmatique associée à la grossesse (PAPP-A) (Muller et al., 2003).

- La sous-unité  $\beta$  de l'hCG.

Dès 1987, Bogart (Bogart et al., 1987) note une corrélation entre l'augmentation des concentrations sériques maternelles en hCG et les grossesses associées à une trisomie 21. En 1990, Macri (Macri et al., 1990) montre que l'utilisation de la fraction libre de la sous-unité  $\beta$  de l'hCG est un bon paramètre de dépistage de la trisomie 21 au premier trimestre surtout s'il est associé au dosage de la protéine PAPP-A.



- La PAPP-A.

La PAPP-A est une glycoprotéine hétérotétramérique. Elle circule dans le sang maternel à 99% sous forme d'un complexe lié avec le précurseur de la protéine basique majeure du polynucléaire éosinophile (ProMBP). Elle est synthétisée principalement par le syncytiotrophoblaste et la cellule déciduale (Kristensen et al., 1994). En cas de trisomie 21, il y aurait des anomalies de la glycosylation de cette molécule, associées à une perturbation de son transfert placentaire et de sa sécrétion ainsi qu'une diminution de sa stabilité, entraînant un effondrement des concentrations plasmatiques maternelles.

- Les tests combinés.

Le principal inconvénient des déductions faites à partir du dosage des marqueurs sériques ( $\beta$  hCG libre et PAPP-A), quand ils sont utilisés isolément, est un manque de discrimination individuel. Mais comme ces marqueurs varient de façon indépendante l'un par rapport à l'autre dans le risque de trisomie 21, leur association permet de dépister 60% de trisomie 21 pour un taux de faux positifs de 5%. Quant à l'association des facteurs: âge, clarté nucale et marqueurs sériques, elle permet de dépister 87% de trisomie 21 pour un taux d'amniocentèse limité à 5%.

### 2.2.3. Au deuxième trimestre.

- L' $\alpha$  fœto-protéine (AFP).

En 1976 est mis en place en Grande-Bretagne un dépistage de masse des anomalies de fermeture du tube neural (Spina Bifida) grâce au dosage sérique maternel de l'AFP ( $\alpha$  fœto-protéine) à partir de la 15<sup>ème</sup> SA. L'AFP synthétisée par le foie et l'intestin fœtal, se retrouve augmentée dans le sang maternel.

À partir des résultats observés par Merkatz (Merkatz et al., 1984) chez une patiente ayant accouché d'un enfant trisomique 18 et présentant en parallèle un taux d'AFP fortement diminué au cours de sa grossesse, il a été recherché activement les relations pouvant exister entre les marqueurs sériques maternels et les anomalies chromosomiques. Dans l'étude de Merkatz, 25% des fœtus trisomiques 21 auraient été dépistés par un dosage isolé d'AFP diminué dans les grossesses associées à une trisomie 21.

- L'hCG et la sous-unité  $\beta$ .

Bogart, en 1987 (Bogart et al., 1987) a mis en évidence l'intérêt du dosage de l'hCG comme marqueur sérique maternel de la trisomie 21 fœtale. En cas de trisomie 21 fœtale, les taux d'hCG ou de la sous-unité  $\beta$ , sont augmentés dans le sang maternel (**figure 40**). L'association de l'AFP et de l'hCG permet de dépister 59% des trisomie 21 fœtale.

Des travaux récents, mettent en évidence des glycoformes de l'hCG sériques dans la trisomie 21 fœtale (Cole et al., 1998) (Frendo et al., 2004), laissant supposer qu'il serait intéressant d'effectuer une analyse fine visant à mettre en évidence d'éventuelles modifications post-traductionnelles caractéristiques de ces marqueurs en relation avec la trisomie 21.

- L'œstriol non conjugué (uE3).

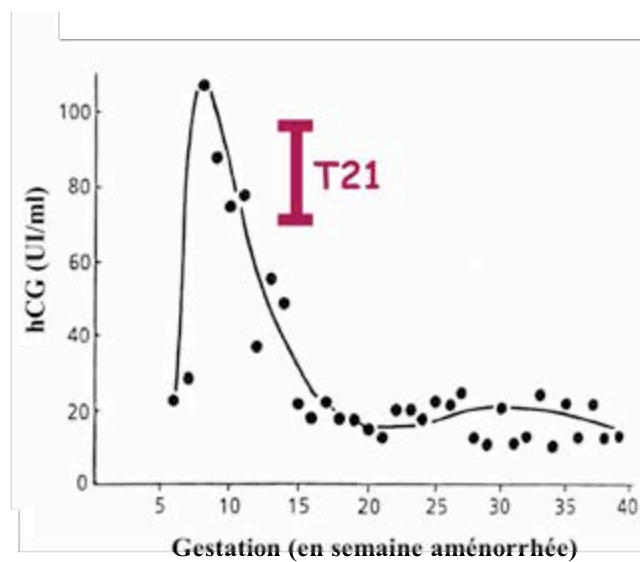
Canick (Canick et al., 1988) en 1988 a mis l'accent sur l'intérêt du dosage de l'œstriol non-conjugué (uE3) pour le dépistage de la trisomie 21. L'œstriol est une hormone stéroïde synthétisée par l'unité fœto-placentaire. Le taux sérique maternel s'élève dès la 12<sup>ème</sup> semaine de grossesse. Les taux décrits dans la littérature chez les femmes attendant un enfant atteint de trisomie 21 sont diminués.

- Les tests combinés.

En 1988 Wald (Wald et al., 1988) a utilisé conjointement les trois marqueurs sériques (AFP, hCG et uE3) associés à l'âge maternel: ces 4 variables sont statistiquement indépendantes et sont plus ou moins discriminantes dans le dépistage de la trisomie 21 fœtale. La combinaison de l'âge maternel avec l'AFP, l'hCG avec ou sans l'uE3 permet de dépister 69% des trisomies 21 pour 5-6% de faux positifs. La combinaison de l'âge maternel, de l'AFP de la sous-unité  $\beta$  de l'hCG et de l'uE3 permet de dépister 73% des trisomies 21 pour 6% de faux positifs.

Pour le dépistage de la trisomie 21, l'âge de la mère étant le premier facteur à prendre en compte, on peut classer par ordre croissant de sensibilité les marqueurs, âge, AFP, œstriol, hCG. Wald a alors proposé un calcul statistique intégré dans un logiciel permettant de définir pour chaque patiente un risque chiffré prenant en compte les résultats des 3 dosages de l'AFP, de l'œstriol et de l'hCG d'une part et d'autres part, les données cliniques (âge de la mère, terme de la grossesse).

La prise en compte de plusieurs facteurs: marqueurs biologiques et âge maternel qui présentent une sensibilité et des spécificités différentes a permis d'augmenter les performances du dépistage, on détermine alors un seuil de risque au-delà duquel l'amniocentèse sera proposée à la mère.



**Figure 40: Profil de sécrétion de l'hCG dans le sang maternel au cours de la grossesse.**  
 En rose est représenté le taux d'hCG sérique maternel en cas de T21 dosé à la 15<sup>ème</sup> semaine.

- Le calcul du risque d'une grossesse associée à une trisomie 21.

Grâce à un logiciel d'algorithme qui tient compte de différents facteurs (âge maternel, signe d'appel échographique, résultats analytiques des dosages biologiques), il est possible de déterminer le risque d'attendre un enfant trisomique 21 pour chaque grossesse. En France, le seuil de risques a été déterminé à 1/250 au moment de l'analyse (qui correspond au risque d'avoir une grossesse associée à une trisomie 21 pour une femme âgée de 38 ans).

Si le calcul de risques est inférieur à 1/250, la patiente est classée dans un groupe à risque éloigné, qui ne justifie pas a priori la nécessité de pratiquer une amniocentèse.

Si ce risque est trouvé supérieur ou égal à 1/250, une amniocentèse, ou une autre méthode de diagnostic sera proposée au couple après vérification des informations cliniques et des données échographiques.

### **2.3. Les méthodes de diagnostic de la trisomie 21.**

Parmi les différentes méthodes proposées dans le cadre du diagnostic des anomalies chromosomiques, l'amniocentèse au second trimestre de la grossesse est de loin, l'examen le plus souvent réalisé dans le cadre de la démarche de dépistage de la trisomie 21, les autres examens tels que la biopsie de trophoblaste, l'amniocentèse au premier trimestre ou enfin la ponction de sang fœtal sont, dans ce contexte précis, bien moins souvent réalisés.

#### 2.3.1. L'amniocentèse.

L'amniocentèse est une procédure qui permet la ponction de liquide amniotique à partir de la cavité amniotique, elle s'effectue le plus souvent au second trimestre de la grossesse (15-16 semaines), mais le liquide amniotique peut être prélevé dès la 13ème semaine jusqu'au terme de la grossesse. L'amniocentèse va permettre de réaliser le caryotype fœtal, puisqu'on retrouve des cellules fœtales dans le liquide amniotique. Les cellules présentes dans le liquide amniotique après centrifugation sont mises en culture et peuvent faire l'objet selon les cas, d'études chromosomiques par FISH (Fluorescent *In Situ* Hybridization, hybridation du chromosome 21 sur les noyaux des cellules grâce à des sondes spécifiques) ou moléculaires par PCR (avec des amorces spécifiques de gènes présents sur le chromosome 21). La mort fœtale causée par une amniocentèse oscille entre 0,3 et 1,5%.

### 2.3.2. La choriocentèse (ou biopsie de trophoblaste).

La choriocentèse est pratiquée dès la 10<sup>ème</sup> SA, elle consiste à réaliser une biopsie de trophoblaste, qui va permettre de réaliser le caryotype fœtal (soit directement, soit après une mise en culture des cellules trophoblastiques). En effet, le placenta et le fœtus possèdent le même caryotype (à l'exception des rares cas de trisomies mosaïques). Les techniques utilisées sont les mêmes que pour l'amniocentèse (FISH et PCR). La mort fœtale entraînée par une choriocentèse est de 1,5 à 2%, mais présente 10% de faux positifs et 1/1000 de faux négatifs.

### 2.3.3. La ponction de sang fœtal.

Il s'agit de réaliser un prélèvement de sang fœtal par ponction de sang du cordon ombilical, près de son insertion au niveau du placenta. Il se pratique après la 18ème semaine de grossesse. Le risque de fausse-couche est évalué aujourd'hui dans des mains expertes aux alentours de 1,3%. Il est utilisé pour étudier un caryotype sur des grossesses déjà avancées puisque le résultat est obtenu en 72 heures.

## **2.4. L'hCG hyperglycosylée: un nouveau marqueur sérique de la trisomie 21 ?**

Actuellement de nombreux articles portent sur l'intérêt potentiel d'une nouvelle forme de l'hCG: une hCG anormalement glycosylée, dite hyperglycosylée ou Invasive Trophoblast Antigen (ITA), circulant dans le sang des femmes portant un enfant trisomique.

En 1997, Elliott décrit l'apparition de formes anormalement glycosylées de l'hCG dans les urines de patientes atteintes de choriocarcinomes (Elliott et al., 1997). Il montre que les N-glycannes produits en relation avec le choriocarcinome présentent un taux élevé de fucosylations, et note également la disparition des structures biantennés classiques au profit de structure triantennés ainsi qu'une augmentation du taux d'acides sialiques terminaux.

Des anticorps monoclonaux spécifiques ont été produits contre les structures de l'ITA (Cole et al., 1998). Des échantillons urinaires de femmes enceintes (second trimestre) ont été mis en présence avec ces anticorps afin de vérifier la pertinence de leur utilisation dans le cadre d'un diagnostic de trisomie 21 fœtale (Cole et al., 1999). Les chiffres annoncés dans ces articles sont de 80% à 90% de détection pour 5% de faux positifs. Parallèlement, d'autres auteurs ont montré qu'en utilisant les mêmes anticorps, ils obtiennent 45% de détection pour un taux de faux positifs identiques. Ces résultats ont été vivement critiqués par Cole.

Au laboratoire, nous avons pu observer que l'ITA n'est pas la forme d'hCG majoritairement sécrétée *in vitro* dans le milieu de culture, par le syncytiotrophoblaste de trisomie 21 (résultat non publié).

Finalement, de nombreuses études, majoritairement menées par Cole, basées sur un diagnostic de la trisomie 21 par des anticorps spécifiques de structures produites par des choriocarcinomes ont été réalisées. Mais aujourd'hui, aucune structure précise relative à la trisomie 21 n'a été décrite.

L'anticorps anti-ITA n'est pas convaincant comme outil de dépistage de la trisomie 21, cependant la présence d'une hCG hyperglycosylée dans l'urines des femmes enceintes d'un enfant trisomique 21 est une réalité.

### 3. TRISOMIE 21 ET PLACENTA

Le développement du placenta humain dans la trisomie 21 est très mal connu. De rares études anatomo-pathologiques et histologiques soulignent l'existence d'un retard de maturation placentaire et d'un amincissement du syncytiotrophoblaste (Oberweiss et al., 1983) (Roberts et al., 2000). Peu d'études moléculaires ou cellulaires ont été menées. Elles sont principalement focalisées sur l'expression de l'hCG et mettent en évidence des résultats contradictoires concernant sa sécrétion dans la trisomie 21 du fait notamment, des méthodologies employées (Brizot et al., 1995) (Eldar-Geva et al., 1995) (Frendo et al., 2000).

#### 3.1. Anomalie de la différenciation morphologique et fonctionnelle du cytotrophoblaste villositaire dans la trisomie 21.

En dehors des rares cas de mosaïcisme placentaire, le caryotype placentaire est le même que le caryotype fœtal et la cellule trophoblastique est donc aneuploïde pour le chromosome 21.

*In vitro*, les cytotrophoblastes isolés de placenta de trisomie 21 restent agrégés et ne fusionnent que faiblement ou avec un retard, comparativement aux cytotrophoblastes normaux. Ce défaut de différenciation morphologique s'accompagne d'un défaut de différenciation fonctionnelle. En effet, il y a une diminution de la synthèse des deux sous-unités de l'hCG ainsi qu'une diminution de la sécrétion d'hCG au cours de la différenciation des cytotrophoblastes en syncytium (**figure 41**). Ce phénomène affecte également d'autres hormones placentaires (hPL, pGH, leptine). *In vivo*, l'expression des hormones syncytiales est diminuée dans le placenta de trisomie 21, attestant d'une altération de la masse syncytiale (Frendo et al., 2000) (Massin et al., 2001), cette diminution de la production d'hCG est donc en contradiction avec les concentrations circulantes élevées d'hCG observées dans la circulation des mères dont le fœtus est atteint de trisomie 21.



### 3.2. Trisomie 21 et stress-oxydant.

Des radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques tels que la stimulation cellulaire par des hormones, des facteurs de croissances, ou l'action des cytokines. Ces radicaux libres sont utiles pour l'organisme à dose modérée puisqu'ils peuvent agir comme seconds messagers dans la cellule et ainsi activer la prolifération cellulaire ou la différenciation (Schreck and Bauerle, 1991) (Finkel, 1998).

Le stress oxydant qui résulte d'une production excessive de radicaux libres peut avoir comme conséquence l'induction de phénomènes toxiques pour la cellule, obligeant celle-ci à mettre au point différents systèmes antioxydants.

Les radicaux libres primaires proviennent de l'oxygène, suite à des réductions à électron, il va donner naissance notamment à l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) et au peroxyde d'hydrogène (Irani et al., 1997) (Fridovich, 1997). L'anion superoxyde va, sous l'action de deux metalloenzyme, la Cu/Zn-SOD (SOD1, ou cuivre/zinc superoxyde dismutase 1) et la Mn-SOD (SOD2, ou manganèse superoxide dismutase), être transformé en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) (Fridovich, 1997). La catalase et la glutathion peroxydase (GPX) sont deux enzymes qui vont être responsables ensuite de la transformation de l' $H_2O_2$  en eau ( $H_2O$ ) et oxygène ( $O_2$ ) (Forman and Fisher, 1982).

Nous avons vu précédemment (dans le chapitre I 2.2) que le statut oxydatif joue un rôle important dans la régulation de la fusion et de la différenciation des cytotrophoblastes en syncytiotrophoblaste (Frendo et al., 2000) (Frendo et al., 2002). Par ailleurs, le gène de la SOD1, étant sur le chromosome 21, en position q22.1 (Sinet et al., 1976) (**Figure 42**), nous avons étudié l'expression de la SOD1 dans les cellules trisomiques. L'activité enzymatique de la SOD1 se trouve augmentée de 50% dans différentes cellules mises en culture, provenant d'individu trisomique 21 telles que les fibroblastes, les lymphocytes, les globules rouges. Frendo et al, en 2001 (Frendo et al., 2001), ont montré que l'augmentation d'activité de 50% de la SOD1 se retrouvait également dans les cellules trophoblastiques issues de placentas de trisomies 21 par rapport aux trophoblastes issus de placentas normaux. Ils ont montré de plus, que l'augmentation de l'activité de la SOD1 pouvait être responsable en partie, du défaut de fusion et de la formation du syncytiotrophoblaste dans les trophoblastes issus de trisomie 21. En effet, la sur-expression de la SOD1 dans des cytotrophoblastes normaux s'accompagne d'un défaut de différenciation et de formation du syncytiotrophoblaste (Frendo et al., 2001).

Par ailleurs, nous avons étudié l'expression de la GPX et de la catalase, qui sont deux enzymes impliqués dans le maintien du statut oxydatif (Pidoux et al., 2004). Nous avons mis en évidence que dans les trophoblastes en culture, issus de placenta trisomique, l'expression de la catalase est augmentée, alors qu'aucunes différences n'est observable dans l'expression de la GPX. Il semble que les cellules trophoblastiques trisomiques ne soient pas capables de rétablir l'équilibre de la balance du



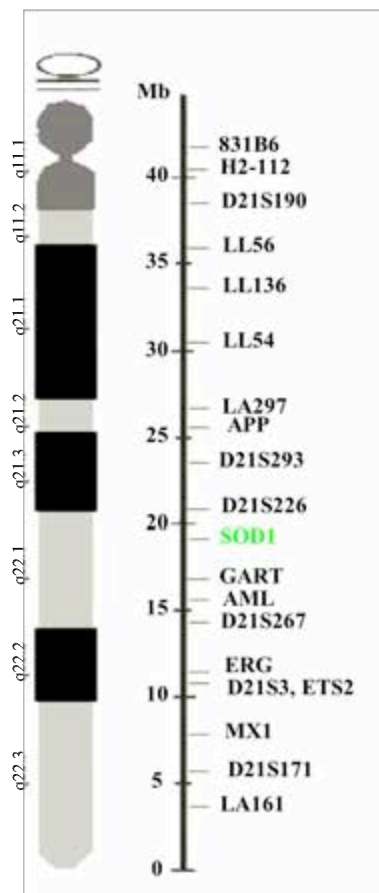


Figure 42: Représentation schématique du chromosome 21 avec la localisation des principaux gènes.

statut oxydatif (déséquilibre dû à la surexpression de la SOD1). Un équilibre qui pourrait être notamment atteint ici avec une augmentation de l'expression de la catalase et de la GPX.

Chez les individus atteints de trisomie 21, on note une augmentation du stress-oxydant dans différents types cellulaires et notamment dans le cerveau (de Haan et al., 1997) (Jovanovic et al., 1998). D'autre part, il faut noter que l'augmentation d'expression de la SOD1 observée chez les individus trisomiques 21 et notamment au niveau des trophoblastes, est responsable en partie, du défaut de fusion des cytotrophoblastes et de la formation du syncytium préalablement observés dans la trisomie 21 (Frendo et al., 2000) (Evain-Brion et al., 2000).

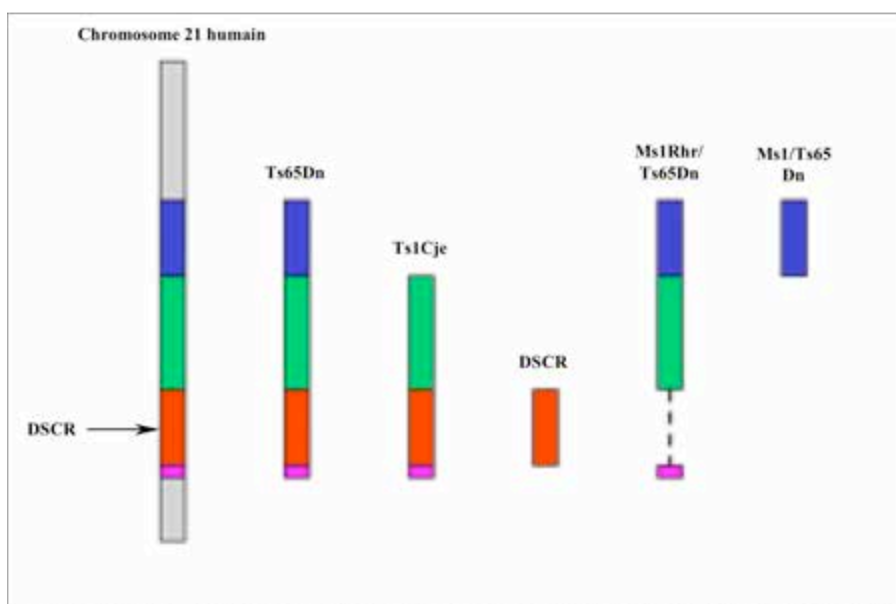
## **4. LES DIFFÉRENTS MODÈLES D'ÉTUDE DE LA TRISOMIE 21**

### **4.1. Les modèles murins**

La trisomie 21 se manifeste de façon plus ou moins sévère selon les individus, mais s'accompagne toujours des mêmes caractéristiques: anomalies du développement cranio-facial et retard mental. Des études menées récemment chez la souris ont permis d'apporter de nouvelles informations sur la compréhension de la pathologie.

Chez la souris, les orthologues du chromosome 21 humain sont répartis sur trois chromosomes: le 10, le 16 et le 17. Le chromosome 16 porte la majorité des gènes communs avec le chromosome 21 humain, cependant, il héberge aussi des gènes qui, lorsqu'ils se trouvent tripliqués, conduisent à la mort de l'animal. La région du chromosome 21 humain comprenant la région du centromère à la position 21q22.3 (gène *ZNF295*) et qui possède 240 gènes est orthologue avec la région télomérique du chromosome 16 de la souris. Une autre région de 1,5 Mb du chromosome 21 humain contenant approximativement 20 gènes est orthologue avec la région centromérique du chromosome 17 murin. La région télomérique de 1,5 Mb du chromosome 21 humain, contenant approximativement 70 gènes est orthologue avec un segment interne du chromosome 10 de la souris.

Le premier modèle de souris trisomique a été utilisé dans les années 1970. C'est un modèle possédant une triple copie du chromosome 16 murin contenant 80% des gènes retrouvés sur le chromosome 21 humain. Ce modèle est appelé Ts16. Malheureusement ces souris n'étaient pas viables à la naissance, excluant toute étude touchant au développement, aux fonctions du système nerveux et aux processus de vieillissement. De plus, ces souris possèdent d'autres gènes qui ne se trouvent pas sur le chromosome 21 humain rendant le modèle des souris Ts16 que très peu satisfaisant pour l'étude de la trisomie 21.



**Figure 43: Représentation des différentes constructions chromosomiques ayant servies à la construction de souris transgéniques trisomiques.**

(d'après <http://dsresearch.stanford.edu/community/index2005q1.html>) DSCR: région critique du syndrome de Down, les régions orthologues sont représentées par la même couleur.

Il y a quelques années, la première souris permettant réellement une étude de la trisomie 21 a été développée par le laboratoire du Dr. M. Davisson (Davisson et al., 1990) (Davisson et al., 1993), cette souris est appelée: Ts65Dn (**Figure 43**). Les souris Ts65Dn possèdent les copies triplées de la majeure partie du chromosome 16 murin (allant du groupe multigénique *Gabpa/App* à la partie télomérique du chromosome) orthologue du chromosome 21 humain, les souris possèdent donc la région critique du syndrome de Down (DSCR). La région DSCR comporte plusieurs gènes, qui lorsqu'ils sont en triple copies sont responsables en grande partie du phénotype observé dans la trisomie 21.

Un autre modèle de souris trisomique a été développé, les souris Ts1Cje. Ces souris sont trisomiques sur la région allant de la partie distale du chromosome 16 correspondant au gène *SODI* (sans l'inclure) jusqu'à la région télomérique (Sago et al., 1998) (**Figure 43**).

Ces deux modèles présentent des phénotypes semblables (Richtsmeier et al., 2000) (Richtsmeier et al., 2002) et maints aspects de la trisomie 21 humaine. Les animaux présentent des modifications affectant les os du crâne, de la face et de la mâchoire. De même, il est à noter une diminution de la densité des granules contenus dans les neurones du cervelet. Ce caractère, d'abord mis en évidence chez les souris trisomiques (particulièrement chez les Ts65Dn) (Reeves, 2001), a ensuite été retrouvé chez l'homme trisomique 21.

Selon les gènes que l'on souhaite étudier, on choisira l'un ou l'autre de ces deux modèles, qui se révèlent être performants pour l'étude de la trisomie 21, et de son phénotype associé.

Deux autres modèles de souris trisomiques ont été récemment mis en place afin d'étudier l'implication majeure de la DSCR dans la trisomie 21 il s'agit des souris Ts1Rhr (qui possèdent le domaine DSCR en triple copie) et les souris Ms1Rhr/Ts65Dn (qui possèdent la même construction chromosomique que les Ts65Dn avec la partie DSCR délétée). L'étude de ces deux modèles n'a pas conduit à la conclusion que la DSCR est responsable du phénotype observé dans la trisomie 21 (**Figure 43**).

D'autres modèles de souris trisomiques sont à l'étude, notamment les souris Ms1/Ts65Dn qui ne possèdent qu'une petite région du chromosome 16 en triple. Ce modèle permet d'étudier l'implication de l'expression d'une petite quantité de gène en trois copies. Les scientifiques cherchent actuellement à construire un nouveau modèle murin d'étude de la trisomie 21 humaine, en triplant l'ensemble des gènes orthologues du 21 humain présent sur les chromosomes 10, 16 et 17 de la souris. Les modèles animaux murins ont permis et permettent encore de mieux comprendre les liens qui existent entre les régions chromosomiques modifiées et les symptômes observés dans la trisomie 21.

Toutefois, l'élaboration de nouveaux modèles d'étude utilisant la culture cellulaire, semble particulièrement intéressante, car ils permettent d'élargir les connaissances mais surtout de mieux

comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en cause dans la trisomie 21 chez l'homme.

#### **4.2. Le modèle de culture cellulaire humaine**

Très peu de modèles cellulaires de la trisomie 21 sont utilisés et bien développés à ce jour. Mis à part des cultures de cellules trisomiques réalisées à partir de biopsie, seul le modèle proposé par Frenedo et *al* (Frenedo et al., 2000) et portant sur la mise en culture des cytotrophoblastes issus de placenta de trisomie 21 est bien étayé. Ces cytotrophoblastes, issus de placenta de trisomie 21, sont trisomiques puisque le placenta possède le même caryotype que le fœtus.

### **5. LES AUTRES ANEUPLOÏDIÉS**

Il existe d'autres formes de trisomies, qui sont le résultat d'une translocation d'une partie d'un chromosome fixée sur un autre chromosome. Ces trisomies peuvent toucher tous les chromosomes et sont difficilement répertoriables. En revanche deux autres trisomies libres et homogènes existent et sont en partie connues, il s'agit de la trisomie 13 et de la trisomie 18.

#### **5.1. La trisomie 13.**

La trisomie 13 est une anomalie chromosomique qui fait référence à la présence d'un chromosome supplémentaire sur la paire 13; c'est le syndrome de Patau décrit initialement en 1960. Certaines des malformations cardiaques ou du système nerveux central sont létales, expliquant le taux de mortalité périnatale élevé et les 97% de décès avant l'âge de 6 mois. Les enfants ont un poids de naissance normal et sont souvent hypotoniques. Ils présentent diverses anomalies ophtalmiques, des troubles neurologiques et diverses malformations. La prévalence moyenne enregistrée en Europe pour la trisomie 13 est 1,5 sur 10.000 naissances.

#### **5.2. La trisomie 18.**

La trisomie 18 est une anomalie chromosomique qui fait référence à la présence d'un chromosome supplémentaire sur la paire 18 ; c'est le syndrome d'Edwards décrit initialement en 1960. La prévalence moyenne enregistrée en Europe pour la trisomie 18 est 3,7 sur 10.000 naissances. Les

enfants ont un poids de naissance bas et sont hypertoniques. Ils présentent eux aussi des troubles neurologiques, ainsi que de multiples malformations.

Ces deux trisomies étant relativement rares, nous ne possédons aucune donnée fiable et établie sur le comportement des cytotrophoblastes en culture dans le cas de ces anomalies. Il n'existe pas non plus, à ce jour, de modèle d'étude de ces deux autres trisomies.



## V. Objectifs du travail

Le diagnostic prénatal de la trisomie 21 repose sur l'établissement du caryotype fœtal obtenu le plus souvent après amniocentèse. L'amniocentèse est proposée aux femmes enceintes selon trois critères: l'âge maternel, la mise en évidence d'anomalies fœtales par l'échographie et/ou des taux des marqueurs sériques maternels anormaux. Les marqueurs actuellement utilisés manquent à la fois de spécificité (faux positifs, associés à un caryotype normal) et de sensibilité (faux négatifs, trisomie 21 non détectées). Ils reposent sur le dosage, dans le sérum maternel, de la diminution de l' $\alpha$ -fœtoprotéine et de l'œstriol et de l'augmentation de l'hormone chorionique gonadotrophine (hCG) et de sa fraction  $\beta$  libre. Il est maintenant bien établi que lorsque le fœtus se révèle affecté par une trisomie 21, l'hCG ou sa sous-unité  $\beta$  libre sont augmentées dans le sérum maternel. Cependant, en dépit de son utilisation clinique, la physiopathologie de cette augmentation demeure en grande partie inconnue, tout comme la modification du profil hormonal sérique maternel des autres marqueurs utilisés.

*In vivo*, l'expression des hormones syncytiales (hPL ou *hormone lactogène placentaire*, pGH ou *hormone de croissance placentaire* et leptine) est diminuée dans le placenta de trisomie 21, attestant d'une altération de la masse syncytiale.

*In vitro*, les cellules trophoblastiques trisomiques s'agrègent normalement mais fusionnent peu ou avec du retard. Ce défaut de différenciation morphologique s'accompagne d'un défaut de différenciation fonctionnelle, qui se caractérise par une diminution de la synthèse et de la sécrétion des hormones de la grossesse et notamment de l'hCG.

En résumé, lors de grossesses associées à une trisomie 21, le placenta présente des anomalies morphologiques et fonctionnelles, se traduisant par une diminution de la masse syncytiale et par une diminution de la production des hormones associées à la grossesse. Par conséquent, chez les femmes enceintes, porteuses d'un fœtus trisomique, il y a une discordance entre les taux d'hCG trouvés anormalement élevés dans le sérum maternel et le faible taux de synthèse placentaire de l'hCG.

Afin de trouver une explication à ce paradoxe, nous nous sommes naturellement orientés dans un premier temps, vers une étude comparative de la sécrétion d'hCG par des trophoblastes mis en culture et provenant de placenta de fœtus normaux ou de fœtus trisomiques. Nous avons donc procédé à une étude quantitative et qualitative de l'hCG, sécrétée par les cellules normales et par les cellules trophoblastiques trisomiques. Ces études ont été réalisées afin de comprendre si la différence paradoxale de sécrétion observée entre *in vivo* et *in vitro* serait due à la présence d'une hCG de nature différente dans le cas de la trisomie.



En parallèle, nous avons étudié l'expression du récepteur à l'hCG. Car étudier l'hormone sans son récepteur n'apporte que des résultats incomplets. Pour cela nos objectifs ont été d'une part, de caractériser le R-LH/CG dans le placenta humain et plus précisément au niveau des cytotrophoblastes et du syncytiotrophoblaste et d'autre part, d'établir son implication dans la différenciation du trophoblaste humain.

Enfin nous avons procédé à une étude qualitative et quantitative du R-LH/CG dans les cellules trophoblastiques trisomiques comparativement aux cellules normales, afin d'expliquer si le paradoxe des taux de sécrétion de l'hCG sérique et trophoblastique dans le cas de la trisomie 21, relèverait d'un problème d'expression ou de fonctionnement du récepteur (R-LH/CG).

Nous avons regroupé et analysé l'ensemble des informations obtenues sur l'hCG et son récepteur, dans les cellules trophoblastiques trisomiques et les cellules issues de placenta normal. Ces données nous ont permis de mieux comprendre le défaut de différenciation observé dans les cellules trophoblastiques trisomiques et de proposer un modèle permettant d'expliquer les taux élevés d'hCG dans le sang maternel en cas de grossesse associée à une trisomie 21 malgré sa production diminuée au niveau des cellules trophoblastiques trisomiques.

## CHAPITRE B : MATÉRIEL ET MÉTHODES





## **I. BIOLOGIE CELLULAIRE**

### **1.1. Extraits totaux de placenta humain.**

Des biopsies placentaires sont prélevées du côté maternel. Les extraits sont lavés dans de l'HBSS afin d'éliminer toute trace de sang, et ensuite refroidis et congelés dans les vapeurs d'azote liquide avant d'être placés à  $-80^{\circ}\text{C}$ , pour des études ultérieures (extraction d'ARN et de protéines).

### **1.2. Inconvénient des études sur des extraits totaux de placenta.**

Des extraits totaux de placenta sont souvent utilisés en clinique ou en recherche fondamentale pour étudier notamment les échanges fœtaux maternels ou les fonctions hormonales du placenta. Cependant, le placenta est un organe très hétérogène dans sa structure et dans sa composition cellulaire. Selon l'endroit où les échantillons seront prélevés, les résultats obtenus vont refléter cette variabilité. Nous avons étudié l'expression ainsi que la distribution des ARN messagers des hormones (hCG, hPL et PGH) produites par le syncytiotrophoblaste, de la cytokératine 7 (exprimée par le trophoblaste), ainsi que du PPAR $\gamma$  et RXR $\alpha$ , qui sont des récepteurs nucléaires. Cette étude a été réalisée sur plusieurs placentas (étude inter-placentaire), mais aussi au sein d'un même placenta (étude intra-placentaire). Pour chacune de ces études, plusieurs villosités totales ont donc été prélevées. Les ARN totaux extraits, sont quantifiés par RT-PCR (Transcription Inverse suivie d'une Réaction en Chaîne par Polymérase) quantitative en temps réel.

Nous avons pu observer une très grande variabilité dans l'expression des différents transcrits, à la fois sur l'étude intra-placentaire mais aussi sur l'étude inter-placentaire. Ces différences peuvent être expliquées en partie par le fait que dans le placenta total il existe une très grande hétérogénéité cellulaire. En effet, les extraits placentaires contiennent des fibroblastes, des cellules musculaires lisses, des cellules endothéliales, provenant du mésenchyme de la villosité, des cytotrophoblastes, des syncytiotrophoblastes, mais aussi des cellules sanguines maternelles. Ces observations nous montrent qu'il faut être prudent lorsque des études sur des extraits de placenta total sont réalisées. Cependant des études sur des extraits totaux sont exploitables à condition de réaliser un grand nombre d'échantillons au sein d'un même placenta, mais il est souhaitable de réaliser ces études à partir de prélèvements obtenus sur plusieurs placentas. Pour éviter toutes ces contraintes, il est également possible de travailler sur un modèle de culture primaire des cytotrophoblastes basé sur la purification de ces cellules à partir du placenta humain (Kliman et al., 1986).



## **Article :**

### **Large variability of trophoblast gene expression within and between human normal term placentae**

G. Pidoux, P. Gerbaud, I. Laurendeau, J. Guibourdenche, G. Bertin, M. Vidaud,  
D. Evain-Brion and J-L. Frendo,  
Placenta, 2004, 25 (2), 469-473.



## SHORT COMMUNICATION

## Large Variability of Trophoblast Gene Expression Within and Between Human Normal Term Placentae

G. Pidoux<sup>a</sup>, P. Gerbaud<sup>a</sup>, I. Laurendeau<sup>c</sup>, J. Guibourdenche<sup>b</sup>, G. Bertin<sup>a</sup>, M. Vidaud<sup>c</sup>, D. Evain-Brion<sup>a</sup> and J.-L. Frendo<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, INSERM U427, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université René Descartes, 4, avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France; <sup>b</sup> Service de biochimie hormonologie, hôpital Robert Debré, 48 boulevard Sérurier, 75019 Paris, France; <sup>c</sup> Laboratoire de Génétique Moléculaire, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université René Descartes, 4, avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France

Paper accepted 24 October 2003

Human placenta extracts are widely used in clinical and fundamental research, particularly to study the hormonal and exchange functions of the placenta. However, very little is known about the distribution of the main hormone mRNAs in the placenta as a whole. Total placenta extracts are heterogeneous in their cellular components, as they contain material of both fetal and maternal origin, and in their structure. Results vary greatly depending upon the location of the biopsy and the number of biopsies performed. We used real-time quantitative RT-PCR to determine whether transcripts corresponding to the main hormones secreted by the human placenta (e.g. hCG, HPL and PGH) are equally distributed within and between term placentae. We also measured cytokeratin 7 transcripts, which are specifically expressed in the trophoblast, and transcripts corresponding to nuclear receptors PPAR $\gamma$  and RXR $\alpha$ . A comparison of the results obtained with 12 different samples from each of four normal term placentae revealed that the amounts of transcripts differ considerably within and between each placenta. This emphasizes the need to study large numbers of samples when looking for significant differences in gene expression.

Placenta (2003), 00, 1–5

© 2003 Published by Elsevier Ltd.

## INTRODUCTION

During recent years, powerful molecular biology tools have opened new possibilities for studying the placenta. Variations in the expression of a large number of genes can now be studied by macro- or microarray analysis and by real-time quantitative RT-PCR [1]. Real-time quantitative RT-PCR is now widely used as it can rapidly compare the relative amounts of transcripts present in different samples.

The placenta at term is a complex organ that includes numerous cellular components of both fetal and maternal origin. Total placental extracts contain fibroblasts, smooth muscle cells, endothelial cells from the mesenchymal core of the villi, the villous trophoblast with the cytotrophoblastic and syncytiotrophoblastic layers, but also maternal blood cells and components of the maternal decidua [2]. The cellular composition of total placenta extracts reflect the localization of the biopsy.

The placenta is also very heterogenous morphologically. The trophoblast is a continuously renewing epithelium. Key molecular and morphological changes occur in the trophoblast during spatiotemporally coordinated phases of proliferation, fusion, functional differentiation, terminal differentiation and extrusion [3,4]. For example, the cyto- and syncytiotrophoblastic layers are renewed constantly [5] and levels of angiogenesis, vascularization and capillarization vary [6]. This suggests that the relative and absolute volumes and surface areas of trophoblast domains change during gestation. Stereological methods were recently used to estimate directly the absolute sizes of trophoblast compartments (volume, surface, number of nuclei) and these data have been used to assess epithelial steady states in normal and complicated pregnancies [4,7–9].

Many studies on human placenta hormone and exchange functions involve a small number of samples and details are rarely given about the exact site of sampling and whether the factors studied are equally distributed throughout the placenta. The present study was performed to investigate whether transcripts corresponding to the main hormones produced in the syncytiotrophoblast are equally distributed across the human placenta in each of several placentae. We used real-time

\* To whom correspondence should be addressed. Tel.: +33-1-44-07-39-91; Fax: +33-1-44-07-39-92; E-mail: jlfrendo@pharmacie.univ-paris5.fr



quantitative RT-PCR to measure the levels of several mRNAs from genes involved in, and/or specific to, syncytiotrophoblast formation in placenta samples. These genes included hCG, hPL, PGH [10–14], cytokeratin 7 (CYT7), which is specifically expressed in the trophoblast [15,16] and the nuclear receptors PPAR $\gamma$ , which is mainly trophoblastic [17,18] and RXR $\alpha$ , which is widely expressed [17,19]. The aim of this study was to provide information about the variability of trophoblast gene expression within the same normal placenta by illustrating the results obtained with a large number of samples (10 placentae in total, with 12 biopsies were taken from each of four).

## MATERIALS AND METHODS

### Placental tissue collection

Term placentae were obtained immediately after iterative Caesarean from healthy mothers with uncomplicated pregnancies. The terms of the pregnancies were 35 weeks of amenorrhea (wa):  $n=1$ ; 38 wa:  $n=1$  and 39 wa:  $n=8$ ).

One sample was first taken from each of ten placentae. Biopsy samples (small cubes of 75 mm<sup>3</sup>) from each placenta were collected in the placenta (the maternal side facing upwards), half distance from the edge and the insertion of the cord blood, at a depth of 1.5 cm to avoid a sampling contamination by decidua. These 10 samples were used to test inter-individual variation.

Seven samples were then taken from each of four of the placentae (matched for gestational age, sex and weight) at 2.5 cm intervals throughout the whole diameter of the placenta at a depth of 1 cm from the maternal side; and five samples were also collected at different depths from the maternal side to the fetal side. Therefore, we collected 12 samples from each of the four placentae.

Placenta samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . The study was approved by our local ethics committee.

### RNA isolation and analysis

Total RNA was extracted from frozen placental samples by means of the single-step guanidium-phenol-chloroform method described by Chomczynski and Sacchi [20]. Total RNA concentration was determined by measuring absorbance at 260 nm and its integrity was monitored by 1 per cent agarose gel electrophoresis.

### Quantification of transcripts by real-time RT-PCR

The relative mRNA levels of the different genes of interest were measured by quantitative RT-PCR, essentially as described in [21], using the ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Perkin-Elmer Applied Biosystems) and the

SYBR Green PCR Core Reagents kit (Perkin-Elmer Applied Biosystems). The nucleotide sequences of the primers have been previously published [22,23]: hCG $\alpha$  (+) 5'-TCCCACTCCACTAAGGTCCAA-3' and hCG $\alpha$  (-) 5'-CCCCATTA CTGTGACCCTGTT-3'; hPL (+) 5'-GCATGACTCCCA GACCTCCTT-3' and hPL (-) 5'-TGCGGAGCAGCTCT AGATTGG-3'; PGH (+) 5'-AGAACCCCCAGACCTCC CT-3' and PGH (-) 5'-TGCGGAGCAGCTCTAGGTT AG-3' CYT7 (+) 5'-GGACATCGAGATCGCCACCT-3' and CYT7 (-) 5'-ACCGCCACTGCTACTGCCA-3'; PPAR $\gamma$  (+) 5'-AGTGGGGATGTCTCATAATGCC-3' and PPAR $\gamma$  (-) 5'-AGGTCAGCGGACTCTGGATTC-3'; RXR $\alpha$  (+) 5'-CCTTTCTCGGTCATCAGCTC-3' and RXR $\alpha$  (-) 5'-CTCGCAGCTGTACTCCAT-3'; PPIA (+) 5'-GTCAACCCACCGTGTCTT-3' and PPIA (-) 5'-CTGCTGTCTTTGGGACCTTGT-3'.

To avoid amplifying contaminating genomic DNA, one of the two primers covered the junction between two exons, if possible. In general, amplicons were between 90 and 170 nucleotides long. Gel electrophoresis was used to verify the specificity of PCR amplicons. For each primer pair, we performed no-template control and no reverse transcriptase control (RT negative) assays, which produced negligible signals (usually  $>40$  in Ct value), suggesting that primer-dimer formation and genomic DNA contamination effects were negligible.

Each sample was analysed in duplicate. Comparison of Ct values for duplicate samples revealed minimal variation as assessed from the standard deviation, and the coefficient of variance was less than 1 per cent. A calibration curve was run in parallel for each analysis. The level of transcripts of the PPIA gene encoding human peptidylprolyl isomerase A (also known as cyclophilin A), which encodes a constitutive house-keeping protein, was quantified in each sample to control for sample-to-sample differences in RNA concentration and quality. The PCR data are thus reported as the number of transcripts per cyclophilin A molecule.

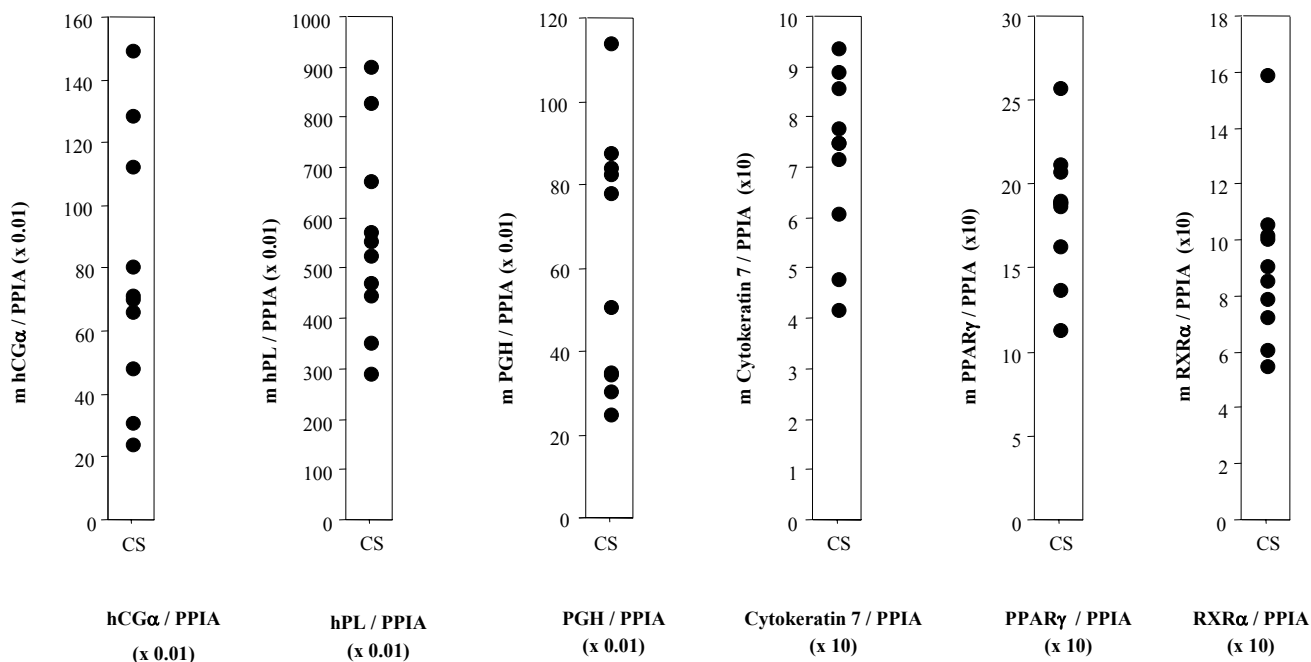
### Statistical tests

Statistical analysis was performed using the StatView F-4.5 software package (Abacus Concepts, Inc. Berkeley, CA, USA). ANOVA was used to identify significant differences ( $P<0.05$ ). Values are shown as mean  $\pm$  SEM. To test if there is a significant difference between medians and mean  $\pm$  SEM corresponding to the 12 biopsies for the four placentae, we used the non parametric Kruskal-Wallis (Anova) test for multiple comparisons and the Mann-Whitney U test for two groups comparisons.  $P$  values below 0.05 were considered significant.

## RESULTS

### Comparison of mRNA levels in 10 term placentae

We measured concomitantly, by real-time quantitative RT-PCR, transcript levels of hCG $\alpha$ , hPL, PGH, cytokeratin 7,



**Figure 1.** Comparison of mRNA expression in 10 term placentae. Levels of hCGα, hPL, PGH, cytokeratin 7, PPARγ and RXRα transcripts were measured by real-time quantitative RT-PCR from one biopsy (●) from each of ten different placentae at term (CS). Graphs show the levels of these six transcripts normalized with respect to PPIA (arbitrary units). The table presents the median, range, coefficient of variance and mean ± SEM of the 10 biopsies.

PPARγ and RXRα (Figure 1). The levels of each of the transcripts, normalized to PPIA varied greatly from one placenta to another. This shows a large inter-individual variation as illustrated by the variance coefficient and the range presented in the table at the bottom of the Figure 1.

### Comparison of mRNA levels within and between four term placentae

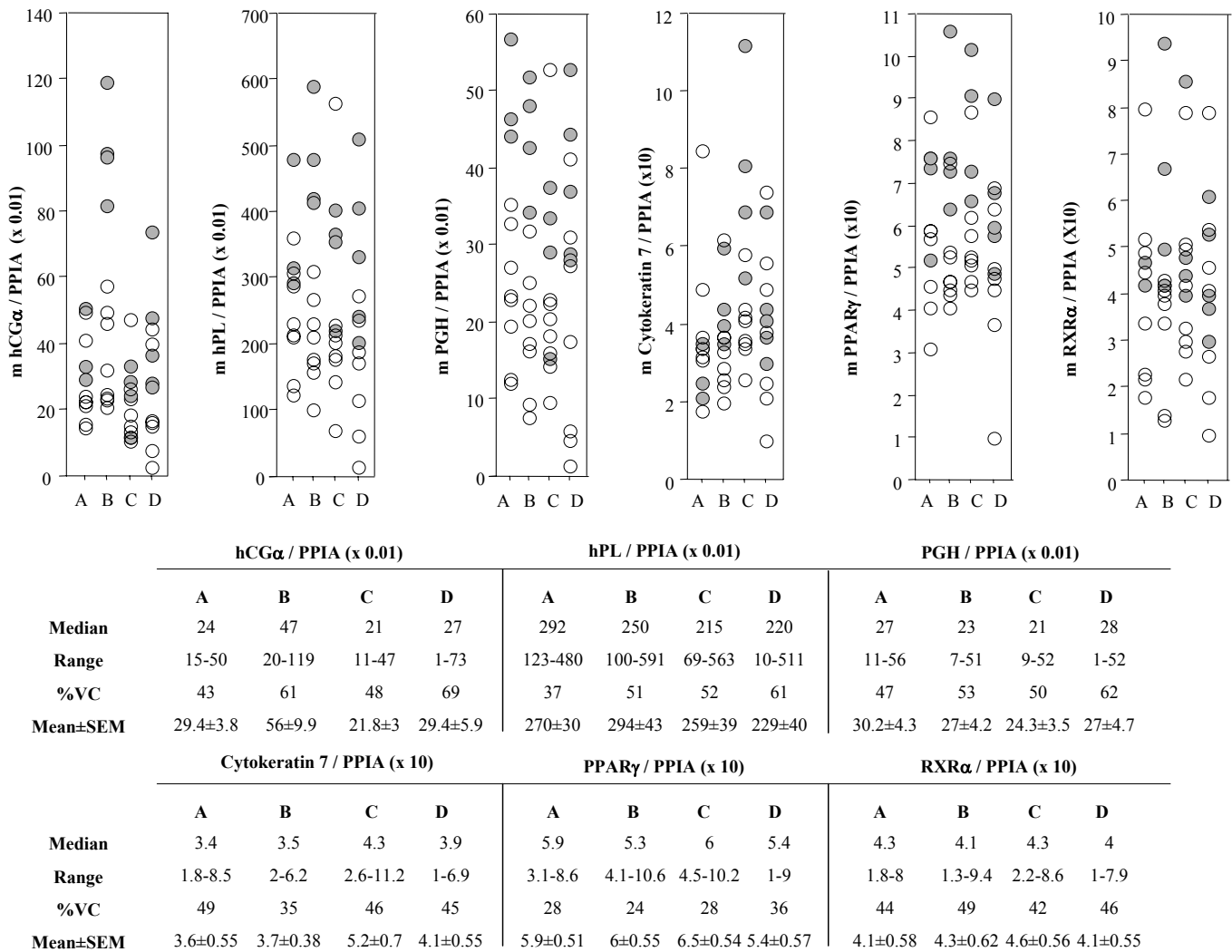
We then took 12 biopsies from each of four placentae (A, B, C and D) to assess the within placenta variability.

All the biopsies from the same placenta contained different amounts of the six mRNAs tested (Figure 2). However, despite this high level of within placenta variability, the medians and mean ± SEM of the 12 biopsies for each placenta were very similar. There was no significant difference between the amounts of any of the mRNAs in any of the placentae except for hCGα (hCGα:  $P < 0.0226$ ; hPL:  $P < 0.78$ ; PGH:  $P < 0.79$ ; CYT7:  $P < 0.12$ ; RXRα:  $P < 0.96$  and PPARγ:  $P < 0.53$ ; Kruskal–Wallis test;  $P < 0.05$  was considered significant).

### DISCUSSION

This study only included term placentae obtained after Caesarean sections after normal pregnancies. All of the

placentae used were of similar weights. Samples were immediately frozen to avoid any variation related to the quality of sampling. We focused on three genes encoding pregnancy-specific hormones that are mainly expressed in the syncytiotrophoblast, which covers the chorionic villi: hCG, hPL and PGH. We also measured levels of Cyt 7 and PPARγ transcripts, which are uniquely and mainly present in the trophoblast respectively, and thus reflect the presence of trophoblast tissue in the samples. We observed a great variability in the levels of all six transcripts in homogenized placenta samples. The levels of these transcripts in 10 total tissue extracts from normal term human placentae differed significantly (Figure 1). This variability may be partly due to individual variability (genetic component) and partly due to the heterogeneous composition of the placenta. Total placenta extracts are heterogeneous in their cellular components, as they contain both fetal and maternal material, and in their structure [2]. Moreover, the cytotrophoblast and syncytiotrophoblast only make up a small percentage of the cell population of the placenta [24] and trophoblast compartments are not homogeneous in size or composition due to their continuous renewal [2–4]. Therefore, findings may vary greatly depending upon the location of the biopsy. This is particularly true in pathological situations where infarction and/or tissue necrosis are frequent.



**Figure 2.** Comparison of mRNA levels within and between four term placentae. Levels of hCG $\alpha$ , hPL, PGH, cytokeatin 7, PPAR $\gamma$  and RXR $\alpha$  transcripts were measured by real-time quantitative RT-PCR. Twelve biopsies were collected from each of four placentae (A, B, C and D): seven biopsies were collected from sites across the whole diameter of the maternal side of the placenta (○) and five biopsies were collected in the placental depth (●). Graphs show the levels of these six transcripts normalized with respect to PPIA (arbitrary units). Table presents the median, the range, the coefficient of variance (%) and the mean  $\pm$  SEM levels of hCG $\alpha$ , hPL, PGH, cytokeatin 7, PPAR $\gamma$  and RXR $\alpha$  mRNA per placenta.

To verify this hypothesis, we collected 12 samples from each of four placentae and analysed intra-placental variability. We found a high level of within placenta variability, indicating that the distribution of all the species measured was heterogeneous throughout the placenta.

This intra-placenta variability, associated with the site of sampling, may partly explain the observed inter-placenta variability.

However, despite this great variability within the same placenta, the median and mean  $\pm$  SEM levels of the six mRNAs were very similar in all placentae. With a larger number of sampling sites, no significant differences in levels were found between the four placentae, except for hCG $\alpha$  ( $P < 0.0226$ ). The levels of hCG $\alpha$  were particularly high in placenta B (median and mean  $\pm$  SEM  $>2$ -fold higher than in the other three placentae), which may explain this result. However, this discrepancy cannot be due to differences in storage or homogenizing of

placental tissue because the levels of the five other mRNAs tested were similar in all four placentae.

We quantified *PPIA* gene transcripts, coding for human peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A), as an endogenous RNA control, and normalized each sample with respect to *PPIA* content. To avoid variations due to the *PPIA* gene, we also normalized mRNA levels to those of two other constitutive housekeeping genes: ribosomal protein large P0 (RPL P0) and TATA box-binding protein (TBP). Similar results were obtained whatever the reference gene used (data not shown). Moreover, the ratio between the different reference genes (*PPIA*, P0 and TBP) used to normalize the target gene expression was similar for all samples (data not shown).

Raijmakers et al. recently studied the distribution of components of the glutathione detoxification system in the human placenta [25]. They concluded that when a large number of biopsies were used ( $n=12$ ), the distribution of all

variables measured was homogeneous throughout the placenta. However, they also pointed out that all the variables examined showed a large intra-individual variation.

These findings show that investigators must be very cautious when performing experiments on total placenta homogenates. Our results show that even in normal pregnancies, the levels of transcripts in a biopsy vary greatly from

one placenta to another as well as between different locations in the same placenta. Thus, it is essential to study either a large number of samples (in the present study, we have used 12 samples) from each of a small number of different placentae or if a large series of different placentae is available, only a smaller number of samples from each is required.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the obstetrics departments of Robert Debré and Saint Vincent de Paul hospitals for providing us with the placentae. This work was supported by grants from the Association Française pour la Recherche sur la Trisomie 21 (AFRT), from the Caisse d'Assurance Maladie des Professions Libérales de Province and from INSERM (projet Avenir).

## REFERENCES

- [1] Gibson U, Heid C, Williams P. A novel method for real-time quantitative RT-PCR. *Genome Res* 1996;6:995-1001.
- [2] Benirschke K, Kaufmann P. *Pathology of the human placenta*. 4th ed New York: Springer, 2000.
- [3] Huppertz B, Frank H, Kingdom J, Reister F, Kaufmann P. Villous cytotrophoblast regulation of the syncytial apoptotic cascade in the human placenta. *Histochem Cell Biol* 1998;110:495-508.
- [4] Mayhew T, Leach L, McGee R, Ismail W, Myklebust R, Lammiman M. Proliferation, differentiation and apoptosis in villous trophoblast at 13-41 weeks of gestation (including observations on annulate lamellae and nuclear pore complexes). *Placenta* 1999;20:407-22.
- [5] Mayhew T. Villous trophoblast of human placenta: a coherent view of its turnover, repair and contributions to villous development and maturation. *Histol Histopathol* 2001;16:1213-24.
- [6] Burton G, Reshetnikova O, Milovanov A, Teleshova O. Stereological evaluation of vascular adaptations in human placental villi to differing forms of hypoxic stress. *Placenta* 1996;17:49-55.
- [7] Mayhew T, Barker B. Villous trophoblast: morphometric perspectives on growth, differentiation, turnover and deposition of fibrin-type fibrinoid during gestation. *Placenta* 2001;22:628-38.
- [8] Mayhew T, Bowles C, Yucel F. Hypobaric hypoxia and villous trophoblast: evidence that human pregnancy at high altitude (3600 m) perturbs epithelial turnover and coagulation-fibrinolysis in the intervillous space. *Placenta* 2002;23:154-62.
- [9] Simpson R, Mayhew T, Barnes P. From 13 weeks to term, the trophoblast of human placenta grows by the continuous recruitment of new proliferative units: a study of nuclear number using the disector. *Placenta* 1992;13:501-12.
- [10] Muyan M, Boime I. Secretion of chorionic gonadotropin from human trophoblasts. *Placenta* 1997;18:237-41.
- [11] Yang M, Lei Z, Rao C. The central role of human chorionic gonadotropin in the formation of human placental syncytium. *Endocrinology* 2003;144:1108-20.
- [12] Handwerger S. The physiology of placental lactogen in human pregnancy. *Endocrinology* 1991;12:329-36.
- [13] Alsat E, Guibourdenche J, Luton D, Frankenne F, Evain-Brion D. Human placental growth hormone. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177:1526-34.
- [14] Lacroix M-C, Guibourdenche J, Frenedo J-L, Muller F, Evain-Brion D. Human placental growth hormone—a review. *Placenta* 2002;23(Suppl A):87-94.
- [15] Blaschitz A, Weiss U, Dohr G, Desoye G. Antibody reaction patterns in first trimester placenta: implications for trophoblast isolation and purity screening. *Placenta* 2000;21:733-41.
- [16] Frank H, Genbacev O, Blaschitz A, Chen C, Clarson L, Evain-Brion D et al. Cell culture models of human trophoblast—primary culture of trophoblast—a workshop report. *Placenta* 2000;21(Suppl A):S120-2.
- [17] Tarrade A, Schoonjans K, Guibourdenche J, Bidart J, Vidaud M, Auwerx J et al. PPAR gamma/RXR alpha heterodimers are involved in human CG beta synthesis and human trophoblast differentiation. *Endocrinology* 2001a;142:4504-14.
- [18] Wang Q, Fujii H, Knipp G. Expression of PPAR and RXR isoforms in the developing rat and human term placentas. *Placenta* 2002;23:661-71.
- [19] Tarrade A, Rochette-Egly C, Guibourdenche J, Evain-Brion D. The expression of nuclear retinoid receptors in human implantation. *Placenta* 2000;21:703-10.
- [20] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-9.
- [21] Frenedo J-L, Thérond P, Guibourdenche J, Bidart J-M, Vidaud M, Evain-Brion D. Modulation of copper/zinc superoxide dismutase expression and activity with *in vitro* differentiation of human villous cytotrophoblast. *Placenta* 2000a;21:773-81.
- [22] Frenedo J-L, Vidaud M, Guibourdenche J, Luton D, Muller F, Bellet D et al. Defect of villous cytotrophoblast differentiation into syncytiotrophoblast in Down syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2000b;85:3700-7.
- [23] Tarrade A, Schoonjans K, Pavan L, Auwerx J, Rochette-Egly C, Evain-Brion D et al. PPARgamma/RXRalpha heterodimers control human trophoblast invasion. *J Clin Endocrinol Metab* 2001b;86:5017-24.
- [24] Sen D, Kaufmann P, Schweikhart G. Classification of human placental villi. II. Morphometry. *Cell Tissue Res* 1979;200:425-34.
- [25] Raijmakers M, Bruggeman S, Steegers E, Peters W. Distribution of components of the glutathione detoxification system across the human placenta after uncomplicated vaginal deliveries. *Placenta* 2002;23:490-6.



### **1.3. Culture primaire trophoblastique (cytotrophoblastes vilieux).**

L'isolement des cytotrophoblastes vilieux a été mis au point à partir de placenta à terme (Kliman et al., 1986) et du deuxième trimestre (Alsat et al., 1991). Après une dissection du placenta, les villosités choriales récupérées sont traitées par une solution de Trypsine (0,5%) afin d'extraire l'ensemble des cellules qui les composent. Les cellules obtenues sont ensuite purifiées sur gradient de Percoll (permettant de trier les cellules en fonction de leur densité), puis les cytotrophoblastes vilieux sont ensemencés dans des boîtes de culture ( $2,7 \times 10^6$  cellules par boîte de 60mm). Les cytotrophoblastes sont cultivés dans un milieu de culture, du DMEM contenant 4,5g de glucose, en présence de Glutamine et de 10% de sérum de veau fœtal (SVF). Les cytotrophoblastes vilieux sont des cellules adhérentes. Cultivées sur plastique, les cytotrophoblastes vilieux s'agrègent dans les vingt-quatre premières heures de culture puis fusionnent : le syncytium ainsi formé est fonctionnel au niveau endocrine (sécrétion d'hCG) et structural (polarisation) (Kliman et al., 1986). Des différences quantitatives de comportement endocrine selon les termes des placentas sont observées par exemple : les cultures cellulaires de placenta de 2<sup>ème</sup> trimestre produisent plus d'hCG que réalisées à partir d'un placenta à terme (Frendo et al., 2000).

### **1.4. Lignées tumorales.**

Les choriocarcinomes sont des tumeurs malignes d'origine trophoblastique (Benirschke and Kaufmann, 2000). Elles sécrètent généralement des taux élevés d'hCG. Ces tumeurs sont constituées de cytotrophoblastes actifs au niveau mitotique, avec des degrés de différenciation modérés (Ringler and Strauss, 1990).

Des lignées cellulaires de choriocarcinomes ont été établies. Ces cellules ont gardé des caractéristiques trophoblastiques, mais elles ont en plus acquis un caractère prolifératif, et sont couramment utilisées comme modèle d'étude des trophoblastes, au niveau endocrine mais aussi pour leurs caractéristiques de cellules tumorales (Ringler and Strauss, 1990).

Trois lignées de choriocarcinomes sont couramment utilisées : les BeWo, les JEG-3, et les JAR. Ces cellules sécrètent certaines des hormones trophoblastiques, dont l'hCG et la progestérone. Elles présentent des différences au niveau de leur croissance et des taux de base de sécrétions hormonales (Ringler and Strauss, 1990). Les BeWo et les JEG-3 sont des cellules mononuclées en culture (Ringler and Strauss, 1990). Stimulées par l'AMPc, les BeWo fusionnent et forment un syncytium (Wice et al., 1990). Les JAR ont été obtenues par mise en culture directe de cellules obtenues à partir d'une biopsie de choriocarcinome (Ringler and Strauss, 1990).

Les MA-10 sont des cellules de Leydig tumorales murines qui possèdent le récepteur LH/CG humain (Ascoli, 1981); elles ont la particularité de synthétiser des stéroïdes (progestérone et testostérone) en réponse à des doses stimulantes d'hCG ou de LH. À l'origine, ces cellules exprimaient un récepteur LH/CG endogène, mais au cours des divisions cellulaires successives les MA-10 perdent l'expression de ce dernier, il est donc indispensable de transfecter ces cellules, afin qu'elles expriment le récepteur recombinant LH/CG humain (Hirakawa et al., 2002).

Les MA-10 sont des cellules qui se cultivent sur gélatine, avec du milieu de culture RPMI 1640, en présence de Glutamine et de 10% de SVF.

## II. BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

### 2.1. Extraction d'ARN totaux.

Les ARN totaux sont extraits par une technique utilisant le Trizol (Gibco-BRL) dérivée de la méthode de Chomczynski (Chomczynski and Sacchi, 1987), qui repose sur la solubilité différentielle de l'ADN et de l'ARN. La solution de Trizol, contenant du thiocyanate de guanidium et du phénol permet, d'une part, la formation d'un complexe entre l'ARN, le guanidium et les molécules d'eau, et supprime d'autre part, les interactions hydrophiles avec l'ADN et les protéines. Les cellules (culot sec stocké à  $-80^{\circ}\text{C}$ ) sont reprises dans du Trizol ( $1\text{ ml}/10^6$  cellules), après incubation quelques minutes à température ambiante, on ajoute  $0,2\text{ ml}$  de chloroforme. Le mélange est vigoureusement agité pendant  $15$  secondes puis placé dans la glace pendant  $5$  minutes. Le mélange est ensuite centrifugé  $15$  minutes à  $12000\text{g}$ , et à  $4^{\circ}\text{C}$ . Après centrifugation, les ARN totaux sont contenus dans la phase aqueuse supérieure, l'ADN et les protéines se retrouvant dans la phase organique inférieure. Après prélèvement de la phase aqueuse, un volume égal d'isopropanol froid lui est ajouté afin de précipiter les ARN. L'échantillon est placé  $5$  minutes dans la glace avant d'être centrifugé  $15$  minutes à  $12000\text{g}$ , à  $4^{\circ}\text{C}$ . Le culot, après élimination du surnageant, est lavé avec de l'éthanol  $75\%$ , agité puis centrifugé  $10$  minutes à  $7500\text{g}$  à  $4^{\circ}\text{C}$ . Après évaporation de l'éthanol  $75\%$ , les ARN sont solubilisés dans de l'eau ultra-pure et prête à l'emploi.

### 2.2. Transcription inverse et réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR).

Pour obtenir l'ADNc nécessaire pour réaliser la polymérisation en chaîne, il est nécessaire de réaliser tout d'abord la transcription inverse à partir de  $5\text{ }\mu\text{g}$  d'ARN totaux dans un volume final de  $20\text{ }\mu\text{l}$ . Après dénaturation des ARN à  $70^{\circ}\text{C}$  pendant  $10$  minutes dans un volume de  $10\text{ }\mu\text{l}$  contenant des "random primers" (solution-mère à  $500\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ ) et de l'eau "RNase free", on complète le volume à  $20\text{ }\mu\text{l}$  avec une solution de mélange réactionnel contenant :  $2\text{ }\mu\text{l}$  d'un mélange de dNTP ( $10\text{mM}$ ),  $1\text{ }\mu\text{l}$  de RNasin,  $2\text{ }\mu\text{l}$  de DTT ( $0,1\text{ M}$ ),  $0,5\text{ }\mu\text{l}$  ( $50\text{ pM}$ ) d'oligo (dT),  $4\text{ }\mu\text{l}$  de tampon  $5\text{X}$  ( $250\text{ mM}$  Tris-HCl,  $375\text{ mM}$  KCl,  $15\text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$ ) et l'enzyme: la transcriptase inverse utilisée à  $1\text{ }\mu\text{l}$  ( $200\text{ U}$ ) (Superscript II/Gibco-BRL).

Le mélange réactionnel est tout d'abord incubé  $10$  minutes à  $25^{\circ}\text{C}$ , puis à  $42^{\circ}\text{C}$  pendant  $50$  minutes, et enfin à  $95^{\circ}\text{C}$  pendant  $5$  minutes pour inactiver l'enzyme.

La réaction de polymérisation en chaîne est alors réalisée dans un volume final de  $50\text{ }\mu\text{l}$  à partir de  $5\text{ }\mu\text{l}$  d'ADNc ( $500\text{ ng}$  dans les  $5\text{ }\mu\text{l}$ ) auxquels sont ajoutés  $45\text{ }\mu\text{l}$  d'une solution de PCR



contenant du tampon 10X [KCl (500 mM), Tris HCl pH 8,4 (200 mM), MgCl<sub>2</sub> (50 mM)]; 0,1 U de Taq DNA Polymérase (5 U/μl); l'oligonucléotide sens (25 pmoles); l'oligonucléotide anti-sens (25 pmoles); les dNTP (0,25 mM); du MgCl<sub>2</sub> (50 mM) et de l'eau stérile. Le déroulement de la PCR se fait en plusieurs étapes : elle débute par une dénaturation initiale à 94°C pendant 4 minutes. Cette première étape est suivie de 40 cycles composés chacun de 3 séquences successives à 94°C 1min, à x°C 1min (où x diffère en fonction des couples d'oligonucléotides choisis), et enfin à 72°C pendant 1min. Tous ces cycles d'amplifications sont suivis d'une élongation terminale de 10 min à 72°C.

Les oligonucléotides choisis pour les différentes études réalisées au cours de ce travail sont les suivants (de 5' à 3') :

Gènes	Primers 5'-3'
LH/CG-R START	ATG AAG CAG CGG TTC TCG GCG CTG
LH/CG-R STOP	ACA CTC TGT GTA GCG AGT CTT GTC
LH/CG-R UNTRANSLATED Sens	CAG ACA CTG GCA AGC CGC AGA AGC
LH/CG-R UNTRANSLATED Anti-sens	GTG GCA GTG GTC ATA GAC TAC AC
LH/CG-R LIN1 Sens	GCA TCT GTA ACA CAG GCA TC
LH/CG-R LIN1 Anti-sens	CAT CTG GTT CAG GAG CAC AT
LH/CG-R LH Sens	CAA GCT TTC AGA GGA CTT AAT GAG
LH/CG-R LH Anti-sens	AAA GCA CAG CAG TGG CTG GGG TA
LH/CG-R Xantho Sens	CAG ACT TTT GCA TGG GGC TC
LH/CG-R Xantho Anti-sens	ATC GGT GAA GAT GAG GAT TGC
LH/CG-R Exon 1-5 Sens	TCG ACT ATC ACT TGC CTA CC
LH/CG-R Exon 1-5 Anti-sens	GGA GAA GAC CTT CGT AAC AT
LH/CG-R Ohtnax Anti-sens	CAG CCC CAT GCA AAA GTC TG
LH/CG-R 1Nil Sens	ATG TGC TCC TGA ACC AGA TG
LH/CG-R 1Nil Anti-sens	GAT GCC TGT GTT ACA GAT GC
LH/CG-R HL Sens	TAC CCC AGC CAC TGC TGT GCT TT
LH/CG-R HL Anti-sens	GAC CTC ATT AAG TCC TCT GAA AG
Actine Sens	GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA
Actine Anti-sens	CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC

### 2.3. Quantification des ARN messagers par RT-PCR quantitative en temps réel.

Les amorces des gènes cibles et des gènes de référence sont choisies grâce à des logiciels informatiques: Oligo 4.0 (National Biosciences) et Primer Express (Perkin-Elmer Applied

Biosystems). Les séquences choisies des gènes cibles sont ensuite testées sur les banques de données informatiques pour s'assurer de la spécificité de la séquence nucléotidique, et de l'absence de polymorphisme. Pour s'assurer que l'amplification ne soit pas contaminée par de l'ADN génomique, les primers sont choisis sur des exons différents.

Les couples de primers utilisés pour la RT-PCR quantitative en temps réel sont les suivants :

Gènes	Primers 5'-3'	Taille	Protéines
CGA	(+) TCC CAC TCC ACT AAG GTC CAA (-) CCC CAT TAC TGT GAC CCT GTT	106 pb	hCG $\alpha$
CGB	(+) GCT ACT GCC CCA CCA TGA CC (-) ATG GAC TCG AAG CGC ACA TC	94 pb	hCG $\beta$
PPIA	(+) GTC AAC CCC ACC GTG TTC TT (-) CTG CTG TCT TTG GGA CCT TGT	97 pb	Cyclophiline A
hPL	(+) GCA TGA CTC CCA GAC CTC CTT (-) TGC GGA GCA GCT CTA GAT TGG	157 pb	hPL
pGH	(+) AGA ACC CCC AGA CCT CCC T (-) TGC GGA GCA GCT CTA GGT TAG	50 pb	GH placentaire
CYT7	(+) GGA CAT CGA GAT CGC CAC CT (-) ACC GCC ACT GCT ACT GCC A	123 pb	Cytokératine 7
PPAR $\gamma$	(+) AGT GGG GAT GTC TCA TAA TGC (-) AGG TCA GCG GAC TCT GGA TTC	235 pb	PPAR $\gamma$
RXR $\alpha$	(+) CCT TTC TCG GTC ATC AGC TC (-) CTC GCA GCT GTA CAC TCC AT	269 pb	RXR $\alpha$
LHCG-R exon 1-5	(+) TCG ACT ATC ACT TGC CTA CC (-) GGA GAA GAC CTT CGT AAC AT	291 pb	LHCG-R
RPL P0	(+) GGC GAC CTG GAA GTC CAA CT (-) CCA TCA GCA CCA CAG CCT TC	149 pb	Ribosomal protéine large P0
$\beta_2$ N	(+) ACC CCC ACT GAA AAA GAT GAG (-) GGC ATC TTC AAA CCT CCA TGA	116 pb	$\beta_2$ microglobuline

Pour réaliser la RT-PCR quantitative en temps réel, l'ARN obtenu précédemment (1  $\mu$ g) subit ensuite une transcription inverse dans un volume final de 20  $\mu$ l, contenant du 1X buffer (contenant: 500 mM de chaque dNTP, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 75 mM KCl, 50 mM Tris-HCl pH 8,3), 10 unités d'inhibiteur de ribonucléase (Promega), 10 mM de DTT, 50 unités de reverse transcriptase: superscript II RNase H<sup>-</sup> (Invitrogen), 1,5 mM de random primer. Les échantillons sont donc incubés pendant 10 min à 20°C, ensuite 30 min à 42°C, puis la reverse transcription est inactivée en chauffant à 99°C

pendant 5 min, enfin les échantillons sont placés à 4°C pendant 5 min, avant de subir une réaction de polymérisation en chaîne.

Les PCR sont réalisées en utilisant un appareil ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Perkin-Elmer Applied Biosystems). Après une étape de dénaturation à 95°C pendant 10min, l'amplification des échantillons est réalisée durant 50 cycles à 95°C de 15 sec et à 65°C pendant 1 min. À chaque cycle, des dNTP fluorescents sont incorporés à l'ADN néo-synthétisé. La fluorescence est utilisée comme système rapporteur pour quantifier l'augmentation de la quantité d'ADN synthétisée au cours de la PCR et enregistrée à chaque fin de cycle SyBRGreen®.

#### **2.4. Clonage et séquençage du R-LH/CG.**

Les produits de PCR obtenus (ADN de R-LH/CG et actine) sont visualisés sur gel d'agarose 1,8%. Les bandes correspondant aux différents ADN sont purifiées à l'aide d'un kit (Macherey Nagel kit : NucleoSpin Extract II). Chaque fragment d'ADN, une fois purifié a été cloné dans le vecteur pCRII-TOPO (TOPO-Cloning, Invitrogen), puis ce plasmide a ensuite été introduit dans des bactéries (TOP10, Invitrogen) pour permettre l'amplification du plasmide contenant le fragment d'intérêt. Après extraction et purification des plasmides, les fragments d'intérêt sont séquencés (Genome express) pour vérification.

#### **2.5. Hybridation des produits d'amplification par une sonde radio-marquée.**

Les produits de PCR obtenus (ADN de R-LH/CG et actine) sont séparés sur gel d'agarose 1,8%. Après migration, le gel est plongé dans une solution d'HCl (0,25N) pendant 10 min, puis dans d'une solution de soude (0,4N) pendant 15 min. Les ADN sont transférés sur une membrane de nylon (gene screen) par capillarité dans de la soude (0,4N) pendant une nuit. Les produits d'amplification sont fixés par exposition aux UV (5 min face ADN vers les UV à 1800 kJ/min).

Les membranes sur lesquelles sont fixées les différents ADN sont ensuite hybridées avec une sonde radiomarquée. Quatre sondes ont été synthétisées au laboratoire : une sonde de 540 pb spécifique de l'actine, une sonde appelée Lin1 (de 660 pb), une sonde appelée LH (de 647 pb) et une sonde appelée Xantho (de 524pb) spécifiques du récepteur LH/CG. Les sondes sont marquées au <sup>32</sup>P par "random priming" en utilisant un kit (Prime a gene labeling system, Promega). Cette technique de multi-amorçage au hasard consiste à fabriquer un brin d'ADN à l'aide d'une ADN polymérase (DNA Polymerase I Large (Klenow) Fragment) en présence d'un mélange d'oligonucléotides dATP, dGTP, dTTP froid et de dCTP marqué au <sup>32</sup>P. La sonde ainsi synthétisée est purifiée sur colonne (Macherey Nagel kit : NucleoSpin Extract II).

Les membranes réalisées à partir des gels d'agarose obtenues précédemment sont pré-hybridées pendant 1h minimum à 65°C dans un tampon d'hybridation (MicroHyb, Invitrogen, 50% formamide désionisé, 1% SDS, 2 x SSC, 10% sulfate dextran) contenant du sperme de saumon (10mg/ml). L'hybridation est faite dans la même solution additionnée de la sonde radiomarquée préalablement dénaturée pendant 5min à 100°C. L'incubation se fait sur la nuit à 55°C sous rotation. Après hybridation, les membranes sont lavées deux fois 15min à 55°C avec un tampon de faible stringence contenant 2x SSC et 0,1% SDS (1x SSC = 0,15 M NaCl, 15 mM citrate de sodium), puis lavées deux fois 15min à 55°C avec un tampon de forte stringence contenant 0,1x SSC et 0,1% SDS.

La radioactivité fixée sur les membranes est quantifiée sous CycloneImager (storage phosphor system, Hewlett Packard. France).

## **2.6. ARN interférence.**

Le principe de l'ARN interférence est d'inhiber rapidement et spécifiquement un gène d'une cellule cible grâce à l'action de petits fragments d'ARN double brin spécifiques de ce gène. Pour les expériences d'ARN interférence, nous avons utilisé un "Smartpool" provenant de chez Dharmacon. C'est à dire un mélange de quatre séquences différentes d'ARN double brin. Les RNAi utilisés sont spécifiques du récepteur LH/CG (M-003681). 5 µl (20 µM) de RNAi dirigés contre le récepteur LH/CG, et un témoin de transfection : "scrambled" (46-2629, Invitrogen) sont dilués dans 245 µl d'OPTI-MEM (Invitrogen). 4 µl d'agent transfectant (DharmaFECT 2, Dharmacon) sont dilués dans 245 µl d'OPTI-MEM. Ces deux solutions sont incubées, séparément à température ambiante pendant 5 min. Les deux solutions sont ensuite mélangées et incubées 20min à température ambiante. Le mélange est alors ajouté aux cellules à 24h de culture ( $2.0 \times 10^6$  cellules par boîtes) qui contiennent préalablement 1,5 ml d'OPTI-MEM, l'ensemble est alors incubé pendant 48h à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>. Après la transfection, le milieu de culture est prélevé pour doser l'hCG. Les cellules de chaque groupe (RNAi et témoin transfection : "scrambled") sont récupérées et les protéines sont extraites afin de réaliser des western-blot.

### III. BIOCHIMIE

#### 3.1. Extraction et dosage de protéines.

Les culots cellulaires (cytotrophoblastes, syncytiotrophoblaste, MA-10 et extraits de placenta total) sont placés dans du tampon RIPA (300 µl de RIPA pour  $5 \times 10^6$  cellules) (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% Triton x100, 1% Deoxycholate, 0,1% SDS, pH: 8) avec des inhibiteurs de protéases (Calbiochem, contenant: anti-sérine protéases, anti-estérases, anti-cystéine protéases, anti-métalloprotéases, anti-trypsin-like protéases). Les échantillons sont ensuite soniqués: 30 sec (1 pulse par seconde) dans de la glace, puis centrifugés 5 min à 10000g pour éliminer tous les débris cellulaires.

La concentration en protéines de chaque échantillon est déterminée par la méthode de Bradford (Bradford, 1976) par lecture au spectrophotomètre à 595 nm de longueur d'onde. L'albumine de sérum bovin est utilisée comme standard.

#### 3.2. Western-blot et immunodétection.

Les échantillons (entre 50 à 100µg de protéines) sont suspendus dans du tampon de Laemmli (Tris/HCl 62,5mM; pH 6,8; 2% SDS; 10% DTT; 10% glycérol; et 0,2% bleu de bromophénol), et dénaturés à 100°C pendant 4min (sauf pour les études du LH/CG-R: 60°C pendant 10min) puis refroidis rapidement à 4°C. Les échantillons sont déposés sur un gel de polyacrylamide 7,5% (ou à gradient 4-12%). La migration se fait dans du tampon 1X Nupage/Mops ou Nupage/MES (Invitrogen). Une fois la migration sur gel réalisée, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose. Le tampon de transfert 1X Nupage (Invitrogen) est additionné de méthanol (20%) et de SDS (0,1%) (pour faciliter le transfert des protéines).

La membrane est ensuite saturée pendant 1h à température ambiante, dans du PBS/tween 20 (0,05%) contenant 5% de lait en poudre écrémé. La membrane est ensuite incubée 1h à température ambiante avec l'anticorps primaire, préalablement dilué dans du PBS/Tween. Après être lavée plusieurs fois dans du PBS/Tween, la membrane est incubée à nouveau 45 min à température ambiante avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase dilué au 1/15000 dans du PBS/Tween. La révélation de la membrane se fait par le système *West Pico Pierce chemiluminescence* qui met en présence le substrat de la peroxydase présente sur l'anticorps secondaire. La quantification du signal émis est réalisée par impression sur un film photographique.

Les anticorps primaires utilisés pour la réalisation des différentes études sont résumés dans le tableau ci-dessous:

Anticorps	WB	IH	IC	IP	Isotype	Référence	Fournisseur	PM
LHR (H50)	1/200	2µg/ml	1/100	2µg/ml	Rabbit IgG	SC-25828	Santa Cruz	75/90 kDA
LHR (K15)	1/200	2µg/ml	1/100	20µg/ml	Goat IgG	SC-26341	Santa Cruz	75/90 kDA
hCG	1/500	2µg/ml	1/100	-	Rabbit IgG	A0231	Dako	38 kDA
hPL	1/500	-	1/100	-	Rabbit IgG	A0137	Dako	21 kDA
Cytokératine 7	1/500	1µg/ml	1/100	-	Mouse IgG	M7018	Dako	54 kDA
Actine	1/1000	-	-	-	Rabbit IgG	A5060	Sigma	42 kDA
Desmoplakine	-	-	1/100	-	Rabbit IgG	AHP320	Serotec	210/250 kDA

**WB:** Western Blot **IH:** Immunohistochimie **IC:** Immunocytochimie **IP:** Immunoprécipitation

Liste des anticorps secondaires utilisés :

Anticorps	Couplé	Type	WB	IC	Référence	Fournisseur
Donkey Anti-Goat	HRP	Horse-Radish Peroxidase	1/40000	-	705035147	Jackson ImmunoResearch
Goat Anti-Rabbit	HRP	Horse-Radish Peroxidase	1/40000	-	111035046	Jackson ImmunoResearch
Goat Anti-Mouse	HRP	Horse-Radish Peroxidase	1/40000	-	115035071	Jackson ImmunoResearch
Rabbit Anti-Goat	FITC	Fluorescein Isothiocyanate	-	1/150	305095003	Jackson ImmunoResearch
Goat Anti-Rabbit	FITC	Fluorescein Isothiocyanate	-	1/150	111095046	Jackson ImmunoResearch
Donkey Anti-Mouse	FITC	Fluorescein Isothiocyanate	-	1/150	715095150	Jackson ImmunoResearch
Goat Anti-Rabbit	Cy <sup>TM3</sup>	Cyanine Cy3	-	1/150	111095046	Jackson ImmunoResearch
Donkey Anti-Mouse	Cy <sup>TM3</sup>	Cyanine Cy3	-	1/150	715165150	Jackson ImmunoResearch

### **3.3. Ligand blot.**

Le principe du ligand blot est la fixation d'un ligand radioactif sur des protéines présentes sur une membrane de nitrocellulose. Après migration, les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose (comme décrit précédemment). Les sites non spécifiques de la membrane sont saturés pendant 1 heure avec une solution de PBS/Tween 20 (0,05%) contenant 5% de lait en poudre non gras. La membrane est incubée en présence de  $10^{-6}$  M d' $^{125}$ I-hCG (Perkin-Elmer) pendant 16 heures à 4°C. La membrane est ensuite lavée dix fois avec du PBS/Tween 20, puis séchée et soumise soit à un CycloneImager (storage phosphor system, Hewlett Packard. France), soit à une autoradiographie classique.

### **3.4. Immunoprécipitation.**

L'immunoprécipitation est une technique où les protéines vont réagir spécifiquement avec un anticorps, et le complexe anticorps-antigène ainsi formé va être purifié et analysé par western-blot. De la protéine G Plus-Agarose (bille d'agarose qui peut fixer la partie Fc des anticorps, Santa Cruz) est mise en présence ou non pour le témoin d'un anticorps polyclonal anti LHCG-R (K15 ou H50, Santa Cruz).  $10^6$  cellules trophoblastiques sont ensemencées dans des plaques 6 puits et cultivées comme décrit précédemment. Après 24 heures de culture, les cellules sont lavées avec du PBS puis "grattées" dans du tampon RIPA froid (supplémenté en antiprotéases). Après sonication, les extraits cellulaires sont centrifugés à 10000g à 4°C, afin de séparer les débris cellulaires. Le surnageant est mis à incuber avec le complexe protéine G en présence ou non de l'anticorps anti-LHCG-R, pendant 18 heures sous agitation à 4°C. Les extraits cellulaires sont ensuite lavés plusieurs fois dans du tampon RIPA. Les protéines sont ensuite éluées en chauffant le complexe à 60°C pendant 10 min dans du tampon 1X d'électrophorèse (BioRad) contenant du DTT (10%). Les échantillons sont ensuite soumis à un gel d'électrophorèse SDS-PAGE à 7,5% puis transférés sur une membrane de nitrocellulose. La membrane est alors traitée avec différents anticorps comme décrit précédemment.

### **3.5. Crosslinking et immunoprécipitation.**

Le DTSSP (3,3'-Dithiobis sulfosuccinimidylpropionate) est un agent cross linkant, qui va réaliser une liaison covalente entre les amines réactives des protéines et le groupement NHS-ester du DTSSP, formant une liaison amide et relarguant du N-hydroxysuccinimide. La liaison covalente formée est "clivable" en présence de 10-50 mM de DTT chauffé à 37°C pendant 30 min.  $10^6$  cellules trophoblastiques sont ensemencées dans des plaques 6 puits et cultivées comme décrit précédemment.

Du DTSSP dilué (à 25mM) dans de l'eau *milliQ* est ajouté au milieu de culture des cellules trophoblastiques (à 2 mM final) et incubé 30 min à température ambiante. Le DTSSP va ainsi créer des liaisons covalentes entre l'hCG présente dans le milieu et le LHCG-R présent à la surface des cellules. Une solution de Tris/Glycine (20 mM, pH 7,5) est ajoutée pendant 15 min à température ambiante pour arrêter la réaction de cross link. Le milieu de culture contenant le DTSSP et le Tris/Glycine est retiré, et les cellules sont lavées avec du PBS froid, puis "grattées" dans du tampon RIPA froid (supplémenté en antiprotéases). Après sonication à 4°C, l'ensemble des extraits cellulaires est ensuite mis à incuber avec le complexe Protéine G/anticorps anti LHCG-R, comme décrit précédemment. Les protéines sont ensuite éluées en chauffant le complexe à 60°C pendant 10 min dans du tampon 1X d'électrophorèse (BioRad) contenant, ou non du DTT (10%) (le DTT permet de cliver la liaison covalente préalablement réalisée par le DTSSP). Les échantillons sont ensuite soumis à un gel d'électrophorèse SDS-PAGE à 7,5% puis transférés sur une membrane de nitrocellulose. La membrane est alors traitée avec différents anticorps (anti LHCG-R, et anti hCG) comme décrit précédemment.

### **3.6. Immunohistochimie.**

Des extraits de placenta total sont prélevés sur des placentas du second trimestre (provenant d'IMG et de T21) et des placentas à terme. Les échantillons sont fixés en les incubant dans du formaldéhyde (4%) pendant 4 à 12h à température ambiante, puis inclus dans de la paraffine. Des coupes sont ensuite réalisées à partir des blocs de paraffine ainsi obtenus. Les coupes sont plongées dans du xylène et réhydratées dans un mélange d'éthanol/eau. L'immuno-marquage est réalisé grâce à un kit: streptavidin-peroxydase immunostaining (Dako). Les sites non spécifiques sont bloqués en incubant les coupes pendant 5 min dans une solution contenant 3% d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puis pendant 30 min dans une solution de PBS contenant 3% de BSA. Les coupes sont ensuite incubées avec un anticorps primaire (voir tableau des anticorps) pendant 1h à température ambiante. Après lavage dans du PBS, les coupes sont incubées pendant 15 min avec un deuxième anticorps biotinilé. Les coupes sont lavées trois fois en PBS avant d'être incubées pendant 15 min en présence de streptavidine couplée à la HRP (horse-radish peroxydase). L'immuno-marquage est détecté par incubation des coupes pendant 30 sec avec du DAB (3,3'- diaminobenzidine) chromogène. Les coupes contrôles sont incubées en présence d'IgG non spécifique à la même concentration que l'anticorps primaire préalablement utilisé.



### **3.7. immunocytochimie.**

Les cellules en culture provenant de placenta (du second trimestre de gestation et à terme) sont lavées avec du PBS, avant d'être fixées et perméabilisées avec du méthanol pendant 8 min à -20°C. Les cellules en culture subissent une première incubation en présence d'un anticorps primaire (voir tableau) pendant 1h à température ambiante suivie d'une nouvelle incubation avec un anticorps secondaire couplé FITC (fluorescein isothiocyanate), ou de la Cy<sup>TM3</sup> (cyanine 3) pendant 45 min dans le noir à température ambiante. Du liquide de montage (Vectashield®, Biovalley) contenant du DAPI (colorant nucléaire) est ajouté aux cellules. Les cellules sont ensuite observées au microscope à fluorescence. Les contrôles sont réalisés en incubant les cellules avec des IgG non spécifiques du même isotype que l'anticorps primaire utilisé.

### **3.8. Dosage d'AMPc.**

Des cellules ( $10^6$ ) provenant de placentas du second trimestre ou à terme, sontensemencées dans des plaques 6 puits et cultivées comme décrit précédemment. Après 24h ou 72h les cellules sont lavées 5 fois, puis placées en milieu sans sérum pendant 2h afin de d'éliminer l'hCG endogène sécrétée dans le milieu de culture. Les cellules sont placées en milieu sans sérum et en présence de 10 mM d'IBMX (3-Isobutyl-1-méthylxanthine, à 10 mM, solution permettant de bloquer la dégradation de l'AMPc) pendant 1h, puis elles sont ensuite stimulées avec différentes concentrations d'hCG pendant 20 min ( $10^{-12}$ M et  $10^{-6}$ M, C6322, Sigma). Pour doser et extraire l'AMPc, les trophoblastes sont repris dans de l'éthanol 65% et refroidis à 4°C. Les extraits cellulaires sont lyophilisés et placés à -20°C. La concentration en AMPc est déterminée après acétylation des échantillons, avec le "kit" (Amersham Bioscience). Ce "kit" est basé sur la compétition entre de l'AMPc non marqué (présent dans les échantillons) et de l'AMPc marqué à l'<sup>125</sup>I reconnu par un anticorps spécifique de l'AMPc. Le premier anticorps est reconnu par un deuxième anticorps (Amerlex<sup>TM</sup>-M) qui est couplé avec des particules magnétiques. La séparation entre l'AMPc reconnu par l'anticorps et la fraction libre est réalisée par décantation grâce à un portoir magnétique qui va attirer les particules magnétiques couplées d'AMPc, le surnageant est alors éliminé et la concentration d'AMPc non marqué est déterminée par interpolation avec une gamme standard.

### **3.9. Marquage d'affinité.**

Après 24h ou 72h les cellules ( $10^6$  cellules/puit) sont lavées 5 fois en PBS, puis placées en milieu sans sérum pendant 2h afin d'éliminer l'hCG endogène présente dans le milieu de culture. Les

cellules sont lavées 2 fois en milieu sans sérum contenant de la BSA 1%, puis placées en milieu sans sérum, BSA 1%, Hepes 1 mM, et anti-protéase 1X. On ajoute ensuite au milieu de culture 0,5 nM d'<sup>125</sup>I-hCG en présence ou non d'hCG froide à différentes concentrations (de 10<sup>-14</sup>M à 10<sup>-6</sup>M, C6322, Sigma) pendant 30 min à température ambiante sous agitation. Le milieu de culture est alors aspiré, les cellules lavées avec du PBS, et "grattées" dans de la soude 0,5 N. La radioactivité fixée par les cellules est déterminée par comptage au compteur gamma.

### **3.10. Marquage de l'hCG à l'I<sup>125</sup>.**

L'hCG marquée à l'iode-I<sup>125</sup> a été préparée en utilisant de la chloramine-T comme oxidant (HUNTER and GREENWOOD, 1962). Dans un volume final de 20 µl, de l'hCG (5 µg; 4,4 µM) est ajoutée à 0,5 mCi de Na-I<sup>125</sup> (Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences, MA, USA; 17,4 Ci/mg, 11,5 µM) neutralisé avec 0,1 M de Mops (acide 4-Morpholino-propane-sulfonic) et PEG 1000 (poly éthylène glycol 1%). La réaction chimique a lieu dans un tampon Mops (25 mM, pH 7,2) et démarre en ajoutant 100 µM de chloramine-T pendant 3 min à température ambiante. La réaction est arrêtée en ajoutant 120 µM de sodium bisulfite pendant 3 min puis 2 mM de Na-I pendant 1 min. Le volume est ensuite ajusté à 0,5 ml avec une solution tamponnée de Mops (20 mM Mops, 130 mM NaCl, pH 7,2) contenant 1 mg/ml de BSA (sérum albumine de bœuf). L'hCG marquée à l'iode (I<sup>125</sup>) est récupérée après passage sur une colonne PD10 Sephadex G25-M. L'activité spécifique de l'hCG-I<sup>125</sup> est de 2,1-2,4 Ci/µmole correspondant à un atome d'iode par molécule d'hCG.

### **3.11. Dosages hormonaux.**

La concentration d'hCG est déterminée dans les milieux de culture à 24h et 72h, ainsi que dans les sérums maternels en utilisant l'ACS180SE (Bayer, Fernwald, Allemagne) et une technique d'ELISA. La limite de détection est de 2 mUI/ml.

Les concentrations d'hPL ont été déterminé en utilisant une technique de RIA (Amerlex IRMA, Amersham Pharmacia biotech) avec une limite de détection de 0,5 µg/ml.



## CHAPITRE C : RÉSULTATS





## **I. Article 1 :**

### **Trophoblast production of a weakly bioactive human chorionic gonadotropin in trisomy 21-affected pregnancy**

J-L. Frenco, J. Guibourdenche, G. Pidoux, M. Vidaud, D. Luton, Y. Giovangrandi, D.  
Porquet, F. Muller and D. Evain-Brion  
J Clin Endocrinol Metab, 2004, 89 (2), 727-732.

## 1. Introduction.

Les placentas issus de grossesses associées à une trisomie 21 présentent des anomalies morphologiques et fonctionnelles, qui ont pour conséquences une diminution de la production et de la sécrétion des hormones synthétisées par le syncytiotrophoblaste. Ces résultats sont en contradiction avec le fait que l'on retrouve l'hCG augmentée dans le sang maternel en cas de grossesse associée à une trisomie 21.

L'objectif de ce premier article a été de vérifier ou d'infirmer les différentes hypothèses émises afin d'expliquer la discordance observée *in vitro* et *in vivo* au niveau de la production et de la sécrétion d'hCG lors d'une grossesse associée à une trisomie 21. En effet, nous avons voulu savoir dans un premier temps si lors d'une grossesse associée à une trisomie 21, l'hCG était retrouvée augmentée dans le sang maternel tout au long de la grossesse, ou si au moment du dosage des marqueurs sériques maternels (15<sup>ème</sup> SA), il n'y aurait pas un décalage du pic de sécrétion de l'hCG, normalement observé à la 8<sup>ème</sup> SA.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à la clairance maternelle de l'hCG. Nous avons cherché à savoir si la demi-vie plasmatique de l'hCG présente chez les femmes ayant une grossesse associée à une trisomie 21 n'était pas plus longue que celle de l'hCG plasmatique retrouvée chez les femmes ayant une grossesse normale.

Enfin, nous avons caractérisé l'hCG synthétisée et sécrétée lors de grossesse associée à une trisomie 21. Nous avons voulu savoir si des modifications post-traductionnelles pouvaient être à l'origine du paradoxe observé. Pour cela nous avons utilisé différentes lectines ainsi que l'iso-électrofocalisation mettant alors en évidence l'existence d'une hCG hyperglycosylée dans la trisomie 21.

Nous avons ensuite montré en utilisant le test de fonctionnalité de l'hCG (cellules MA-10) que l'hormone hyperglycosylée retrouvée dans la trisomie 21 est moins active pour stimuler son récepteur.

## 2. Résultats.

### 2.1. Concentration d'hCG dans les sérums maternels.

La première figure de l'article (ci-après) compare les concentrations d'hCG dans les sérums maternels tout au long de la gestation, à partir d'une large cohorte de grossesses normales ( $n = 894$ ) et de grossesses affectées par une trisomie 21 ( $n = 499$ ). Nous avons observé que dans les 499 sérums issus de grossesses associées à une trisomie 21, les niveaux d'hCG sont augmentés. Il est intéressant de noter que cette augmentation se poursuit tout au long de la grossesse et est constante quel que soit le terme. De plus, nous avons observé que le pic de sécrétion d'hCG se retrouve toujours entre la 8<sup>ème</sup> et la 10<sup>ème</sup> SA à la fois dans les grossesses normales et celles associées à une trisomie 21.

### 2.2. Concentration d'hCG dans les milieux de culture des cellules trophoblastiques.

Nous avons étudié sur un grand nombre de cultures primaires, la diminution significative ( $p = 0,003$ ) de la sécrétion d'hCG dans les milieux de culture de cellules trophoblastiques isolées à partir de placentas de trisomie 21 ( $337 \pm 62$  UI/l;  $n = 29$ ) ou de placentas témoins au même âge gestationnel ( $930 \pm 246$  UI/l;  $n = 13$ ). Nous avons confirmé cette observation en mesurant par RT-PCR quantitative en temps réel, les transcrits de la sous-unité  $\beta$  de l'hCG. Les taux de transcrits sont significativement diminués ( $p < 0,01$ ) dans les cellules issues de placentas trisomiques ( $4139 \pm 1554$  en unité arbitraire, UA) comparés à ceux des cellules issues de placentas témoins ( $19494 \pm 5812$  UA). En revanche, le niveau d'hCG dans le sérum maternel correspondant à ces placentas se révèle significativement plus élevé ( $p < 0,0001$ ) dans les grossesses affectées par une trisomie 21 que dans les grossesses témoins.

### 2.3. Cinétique d'élimination de l'hCG dans le sérum maternel après la délivrance.

Une des raisons de l'augmentation de l'hCG dans le sérum maternel et dans les milieux de culture de cellules trisomiques pourrait être l'augmentation de la demi-vie de l'hCG. Nous avons alors étudié la cinétique de disparition de l'hCG dans le sérum maternel après la délivrance et l'expulsion du placenta. Le pourcentage d'hCG restant dans la circulation maternelle, à différent temps après la délivrance (Table 1 de l'article 1) n'est pas significativement différent entre les grossesses normales ou celles associées à une trisomie 21.



#### 2.4. Bioactivité de l'hCG.

Nous avons ensuite utilisé le test fonctionnel des cellules de Leydig (MA-10). Ces cellules expriment le récepteur de l'hCG (R-LH/CG) et produisent de la progestérone en réponse à une stimulation par l'hCG. L'utilisation de ce test nous a permis de comparer la capacité de l'hCG issue des milieux de culture normaux et trisomiques à stimuler la production de progestérone par les cellules MA-10. À concentration égale ( $10^{-10}$ M), l'hCG présente dans les milieux de trophoblastes trisomiques est significativement moins active (38% du témoin,  $p < 0,0008$ ) pour stimuler la sécrétion de progestérone par les cellules MA-10 (Figure 2 de l'article 1).

#### 2.5. Glycosylation de l'hCG.

Dans le but de déterminer quelles anomalies de glycosylation pouvaient être responsables de la nette diminution de la bioactivité de l'hormone, nous avons quantifié par RT-PCR quantitative le niveau des transcrits de deux enzymes impliquées dans la voie de glycosylation de l'hCG: la sialyl-transférase-1 (SIAT-1, qui ajoute un groupement sialyl aux structures antennées) et la fucosyl-transférase-1 (FUT-1, qui ajoute un groupement fucose au premier N-acétyl-glucosamine des glycoprotéines). Les ARNm de ces deux enzymes sont significativement plus élevés ( $p < 0,05$ ) dans les cytotrophoblastes trisomiques ( $n = 5$ ) comparés aux cytotrophoblastes normaux ( $n = 5$ ) ( $27 \pm 15$  UA vs  $2,5 \pm 1$  UA pour la SIAT-1 et  $9 \pm 3$  UA vs  $3 \pm 1$  UA pour la FUT-1). L'utilisation de lectines spécifiques de plusieurs groupements glycosylés a montré que l'hCG sécrétée par les cytotrophoblastes trisomiques est différemment glycosylée par rapport à celle présente dans les milieux de culture normaux (tableau 2 de l'article 1). L'IEF (iso-électrofocalisation) et le western-blot (figure 3 de l'article 1) montrent que l'hCG présente dans les milieux de culture de trophoblastes normaux s'équilibre aux alentours d'un point isoélectrique égal à 7,3 tandis que dans les milieux de culture de trisomie 21, l'hCG est caractérisée par un point isoélectrique plus acide ( $pHi = 4,5$ ).

### 3. Conclusion.

Le défaut de différenciation trophoblastique et le retard de maturation placentaire observés dans la trisomie 21, nous a incité à penser que l'augmentation de l'hCG observée pourrait être liée à un décalage du pic de la sécrétion de l'hormone dans le sang maternel. Lors de grossesses normales, la concentration d'hCG sécrétée dans le sang maternel augmente rapidement pour atteindre un pic entre la 8<sup>ème</sup> et la 10<sup>ème</sup> SA, cette augmentation est suivie d'une chute rapide, les taux d'hCG restent alors constants tout le long de la grossesse dans le sang maternel. Les facteurs responsables de ce pic de sécrétion d'hCG restent actuellement inconnus. Lors de grossesses associées à une trisomie 21, le pic de sécrétion d'hCG dans le sang maternel est observé au même moment que celui observé lors de grossesses normales (entre la 8<sup>ème</sup> et la 10<sup>ème</sup> SA). Cependant, l'hCG est retrouvée augmentée dans le sang maternel tout le long d'une grossesse associée à une trisomie 21. Le décalage du pic de sécrétion ne peut donc pas être retenu comme l'hypothèse expliquant le paradoxe des sécrétions d'hCG. Une nouvelle hypothèse, concernant des modifications de la clairance de l'hCG, a été vérifiée dans cet article afin d'expliquer la discordance entre une synthèse d'hCG placentaire diminuée et un taux maternel élevé. L'élimination de l'hCG sérique maternel dépend de son catabolisme hépatique, de son élimination rénale et de sa captation par le placenta et les ovaires. Dans cette étude, nous avons montré que la disparition de l'hCG présente dans le sang maternel après expulsion du placenta, est la même entre des grossesses normales et celles associées à une trisomie 21. L'hypothèse d'une clairance différentielle en l'absence de placenta entre une hCG dite "normale" et "trisomique 21" n'est pas valable. Cependant l'hypothèse d'une clairance différentielle au niveau du placenta n'est pas à exclure.

Nous avons étudié de manière qualitative et fonctionnelle, l'hCG sécrétée par les trophoblastes en culture issus de placentas de trisomie 21 comparées à ceux issus de placentas normaux. Nous avons montré pour la première fois, grâce à différentes techniques (IEF et utilisations de lectines, étude des messagers des enzymes impliqués dans la glycosylation), que l'hCG produite par les cellules trophoblastiques trisomiques est anormalement glycosylée. Les cellules trophoblastiques trisomiques produisent une hCG plus acide (pHi de 4,5) due à une augmentation des résidus d'acide sialique, mais aussi une hCG plus fucosylée par rapport à l'hCG synthétisée et sécrétée par les cellules trophoblastiques normales. Nous avons alors regardé quel pouvait être l'impact de cette glycosylation anormale sur la bioactivité de l'hormone.

Nous avons pu mettre en évidence, grâce au test de bioactivité réalisé sur des cellules de Leydig (Ascoli, 1981), que l'hCG produite par les trophoblastes trisomiques est biologiquement moins active que l'hCG produite par des trophoblastes normaux. L'hCG produite par les cellules trophoblastiques trisomiques stimule moins bien le récepteur LH/CG au niveau des organes cibles et par conséquent au niveau du placenta, qu'une hCG produite par des cellules trophoblastiques normales. Le placenta est

un organe qui possède un grand nombre de récepteurs LH/CG (Licht et al., 1993) et il est maintenant bien établi que l'hCG joue un rôle autocrine important dans la différenciation trophoblastique (Cronier et al., 1994) (Yang et al., 2003). Il existe une re-capture de l'hCG par les cellules trophoblastiques.

Dans cette étude, nous n'avons pas pu expliquer le paradoxe de l'hCG, les hypothèses qui avaient été émises se sont révélées infructueuses. Cependant cette étude nous a permis de mettre en évidence la présence d'une hCG anormalement glycosylée, sécrétée par les cellules trophoblastiques trisomiques. Nous avons pu montrer de même, que cette hCG anormalement glycosylée est biologiquement moins active. Ceci nous a amené à proposer de nouvelles hypothèses afin d'expliquer le paradoxe de l'hCG. En effet, l'augmentation de l'hCG sérique maternelle retrouvé lors d'une grossesse associée à une trisomie 21 pourrait être due:

- À une diminution du nombre de récepteurs LH/CG au niveau des cellules trophoblastiques trisomiques, ou à la présence d'un récepteur anormal.
- À une diminution de fixation sur son récepteur et/ou d'internalisation de l'hCG anormalement glycosylée et biologiquement moins active, sécrétée par les cellules trophoblastiques trisomiques.

# Trophoblast Production of a Weakly Bioactive Human Chorionic Gonadotropin in Trisomy 21-Affected Pregnancy

J.-L. FRENDU, J. GUIBOURDENCHE, G. PIDOUX, M. VIDAUD, D. LUTON, Y. GIOVANGRANDI, D. PORQUET, F. MULLER, AND D. EVAIN-BRION

*Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U 427 (J.-L.F., J.G., G.P., D.E.-B.), Laboratoire de Génétique Moléculaire (Y.G., M.V.), Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université René Descartes, 75270 Paris, France; and Service de Gynécologie Obstétrique (D.L.) and Service d'Endocrinologie (J.G., D.P., F.M.), Hôpital Robert Debré, 75019 Paris, France*

**Total human chorionic gonadotropin (hCG) is high in maternal serum at 14–18 wk of trisomy 21 (T21)-affected pregnancy, despite low placental hCG synthesis. We sought an explanation for this paradox. We first observed that, in T21-affected pregnancies, maternal serum hCG levels peaked at around 10 wk and then followed the same pattern throughout pregnancy as in controls, albeit at a higher (2.2-fold) level. After delivery, hCG clearance was not significantly different from that in controls. We isolated cytotrophoblasts from 29 T21-affected placentas (12–25 wk) and 13 gestational age-matched control placentas and cultured them for 3 d. In this large series, we confirmed that, in the culture medium of trophoblasts isolated from T21 placentas, hCG secretion was significantly**

**lower ( $P < 0.003$ ) than in controls, in contrast to the high hCG in maternal serum of the same patients. In T21 cultured trophoblasts, transcripts of sialyltransferase-1 and fucosyltransferase-1 were abnormally high. In corresponding culture medium, hCG was abnormally glycosylated; highly acidic [isoelectric points (pHi) = 4.5] as shown by isoelectric focusing, immunoblotting, and lectin binding; and weakly bioactive (46% of control) as determined using the Leydig cell model. In conclusion, T21 trophoblast cells produced hCG that was weakly bioactive and abnormally glycosylated but whose maternal clearance was unaltered. (*J Clin Endocrinol Metab* 89: 727–732, 2004)**

**T**RISOMY OF CHROMOSOME 21 (T21), which causes the phenotype known as Down syndrome, is the major known genetic cause of mental retardation and is found in around 1:800 live births. Screening strategies to identify women at increased risk of bearing a T21-fetus are based on maternal age, ultrasound signs (1), and maternal serum marker (2–5). Some of these markers, such as human chorionic gonadotropin (hCG), are of placental origin.

When the fetus is T21-affected, it is now well established that total hCG or its free  $\beta$ -subunit are raised [2–2.2 multiples of the median (MoM)] in maternal serum at 14–18 wk of pregnancy. However, despite its widespread clinical use, the pathophysiology of this increase remains largely unknown.

hCG is composed of two subunits: one  $\alpha$  common to all glycoprotein hormones (FSH, LH, and TSH), and one specific  $\beta$ -subunit. The  $\alpha$ -subunit is a 92-amino-acid polypeptide with two N-linked oligosaccharides. The specific  $\beta$ -subunit is a 145-amino-acid polypeptide with two N-linked oligosaccharides and four O-linked oligosaccharides (6).

hCG is synthesized by the trophoblast, mainly by the syncytiotrophoblast, the outer layer of the chorionic villus (7). The syncytiotrophoblast is a very active endocrine unit, which secretes the vast majority of its hormonal products into the ma-

ternal circulation. The syncytiotrophoblast arises *in vivo* (8) and *in vitro* (9) from differentiation of cytotrophoblasts.

In T21, we recently confirmed previous observations by Eldar-Geva (10) that cultured cytotrophoblasts, isolated from T21-affected placentas, aggregate but fuse poorly or tardily (11). This is in agreement with previous macroscopic and histological observations pointing to an increase in the cytotrophoblast layer in T21 placentas (12–14). In addition, we demonstrated that this *in vitro* defect or delay in syncytiotrophoblast formation and function is characterized by a dramatic decrease in the synthesis and secretion of syncytiotrophoblastic pregnancy-associated hormones such as hCG, human placental lactogen, and human placental GH (11, 15). Similarly, we observed a significant decrease in mRNA levels of these hormones in T21 total placenta extracts, indicating a decrease in functional syncytiotrophoblast mass in T21-affected placenta (11).

In summary, T21-affected placenta presents morphological and functional anomalies, which result in a decrease in pregnancy-associated hormone production by the syncytiotrophoblast. Therefore, there is a discrepancy between the abnormally high maternal serum hCG values and the low placental rate of hCG synthesis. The aim of this study was to find an explanation for this paradox.

## Materials and Methods

### Maternal sera and placental tissue collection

Since 1988, maternal serum samples have been collected at the Hôpital Ambroise Paré from women included in second-trimester T21

Abbreviations: hCG, Human chorionic gonadotropin; IEF, isoelectrofocusing; MoM, multiples of the median; pHi, isoelectric point; T21, trisomy of chromosome 21.

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

maternal serum screening. In addition, all pregnant women in France undergo first-trimester maternal serum screening for toxoplasmosis. During the third trimester, blood samples were taken in the case of abnormal ultrasound findings. The resulting serum samples were stored frozen at  $-30^{\circ}\text{C}$ . Moreover, since 1996, maternal serum samples have been collected from women before termination of T21-affected pregnancy. French law allows termination of pregnancy with no gestational age limit when severe fetal abnormalities are observed. T21 was diagnosed by karyotyping. The indications for chorionic villus sampling, amniocentesis, or fetal blood sampling were advanced maternal age, ultrasound abnormalities, or abnormal maternal serum markers. Demographic and pregnancy-related information (maternal age, weight, and gestational age at sampling) were entered in a database.

Samples of placental tissues were collected at the time of termination of pregnancy at 12–25 wk of gestation (in weeks of amenorrhea) in T21-affected pregnancies and gestational age-matched control cases. Gestational age was confirmed by ultrasound measurement of crown-rump length at 8–12 wk of gestation. Fetal Down syndrome was diagnosed by karyotyping of amniotic fluid cells, chorionic villi, or fetal blood cells. Termination of pregnancy was performed in control cases affected by severe bilateral or low obstructive uropathy or major cardiac abnormalities. The karyotype of placental cells was checked in all cases (free T21 or normal).

For maternal serum hCG clearance, maternal blood samples were taken at the indicated times after delivery (placental expulsion) in nine T21 pregnancies (free T21) and in eight gestational age-matched controls (second trimester of pregnancy, fetus with severe bilateral uropathy or major cardiac abnormalities and normal karyotype). Informed consent was obtained in all cases. The resulting serum samples were stored frozen at  $-30^{\circ}\text{C}$ .

#### Trophoblast cell culture

Villous cytotrophoblast culture was undertaken as previously described (11). Cytotrophoblasts were isolated from gestational age-matched controls (second trimester) and T21-affected placentas and cultured for 3 d. For each culture, cells were plated on three dishes. The culture medium of each dish was changed every 24 h, collected, and assayed for hormonal concentrations. The mean value of triplicates was calculated and was representative of hCG secretion at 72 h. This was done for the 29 T21 cultures and the 13 control cultures.

#### RNA isolation and analysis

Total RNA was extracted from placental tissues and cultured cells following the procedure of QIAGEN (Courtabeuf, France). The total RNA concentration was determined at 260 nm, and its integrity was monitored by 1% agarose gel electrophoresis.

$\beta$  hCG transcript levels were quantified in total placental homogenates as previously described (16). Sialyl-transferase mRNA and fucosyl-transferase mRNA levels were measured in cultured cells. Three dishes were pooled for each determination by quantitative RT-PCR assay as previously described (16). The nucleotide sequences of the primers are the following: available on request (mvidaud@teaser.fr). The levels of transcripts were normalized using the RPLP0 gene (also known as 36B4) encoding human acidic ribosomal phosphoprotein P0 as an endogenous RNA control. The 24-h conditioned culture medium was collected at d 3 and frozen.

#### Affinity chromatographies

Lectin-affinity chromatographies were used to analyze glycosylation of total hCG in culture medium: 1) *Triticum vulgare*, which recognizes the *N*-acetyl glucose and sialyl groups of glycoproteins; 2) *Tetragonolobus purpureus*, which recognizes  $\alpha$ -fucosyl groups; 3) *Ricinus communis*, which recognizes  $\beta$ -galactosyl groups; 4) Concanavalin A, a lectin that recognizes biantennary structures but neither tri- or tetra-antennary structures nor biantennary structures of glycoproteins. Samples were applied to 0.5-ml columns of lectin (10 ml/h, room temperature) as described by Baenziger and Fiets (17). The first fraction, not bound by the lectin, was eluted in the starting buffer and the second fraction (lectin-bound) with starting buffer supplemented with 0.2 M lectin-specific osse. hCG was assayed in each fraction.

Isoelectrofocusing (IEF) was performed as previously described (18) using a monoclonal antibody against free  $\beta$ -hCG (Ab FBT10, generous gift of Pr. J.-M. Bidart, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France) (19).

#### Hormone assay

Total hCG was measured in culture media and maternal serum using the ACS180SE instrument (Bayer, Fernwald, Germany).

#### hCG biological activity assay

Biological activity of secreted hCG was tested on Leydig cells (MA.10 cells, generous gift of Pr. M. Ascoli, University of Iowa, Iowa City, IA) as previously described (20). hCG levels were first assayed in the culture medium of trophoblasts. Different amounts of culture medium were added for 4 h to  $2.10^6$  MA-10 cells cultured on gelatin-coated 30-mm dishes. Progesterone was then assayed in the MA-10 cell incubation medium. Results were expressed as progesterone concentration per number of cells for each tested concentration of hCG present in the control and T21 trophoblast culture medium. Progesterone was assayed using the ACS180SE instrument (Bayer).

#### Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the Statview F4.5 software package (Abacus Concept, Inc; Berkeley, CA). Values are presented as the mean  $\pm$  SEM. Comparisons were performed using Student's *t* test.  $P < 0.05$  was considered significant.

## Results

#### Maternal serum hCG levels

Maternal serum hCG levels were analyzed throughout pregnancy in a large cohort of control and T21-affected pregnancies (Fig. 1). We confirmed that, in T21 cases, hCG levels were increased during the periods 7–13 wk and 14–18 wk. In addition, we observed that the hCG levels peaked around 10 wk in both T21 and control cases, with no gap between the two peaks. Moreover, we noted that this increase continued during the third trimester. The discrepancies between MoMs in normal (1 MoM) and T21-affected cases (2.16 MoM) were approximately constant throughout gestation.

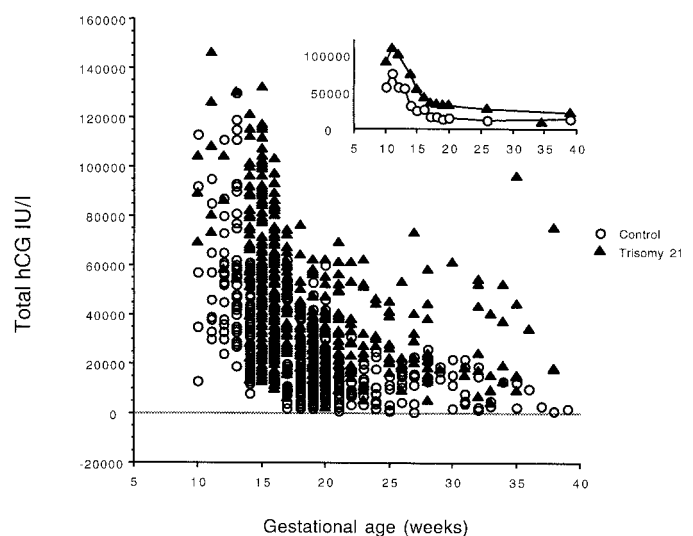


FIG. 1. Transversal study of maternal serum levels as a function of gestational age of total hCG (control cases,  $n = 894$ ; T21,  $n = 499$ ). Empty circle, Controls; black triangle, T21-affected pregnancy. Each point represents a single measurement for one patient. Inset, Median values.

**Trophoblast culture**

We confirmed in a large series of primary cultures the significant ( $P = 0.003$ ) decrease in hCG secretion in the culture medium of trophoblast cells isolated from T21 placentas ( $n = 29$ ; mean  $\pm$  SEM,  $337 \pm 62$  IU/liter) compared with gestational age-matched control placentas ( $n = 13$ ; mean  $\pm$  SEM,  $930 \pm 246$ ). Likewise, as previously described (11), we confirmed, in this series, that in the total homogenates of the corresponding placentas the transcript levels of  $\beta$  hCG measured by real-time quantitative RT-PCR were significantly decreased ( $P < 0.01$ ) in T21-affected placentas (mean  $\pm$  SEM,  $4139 \pm 1554$ ) compared with controls (mean  $\pm$  SEM,  $19494 \pm 5812$ ). In contrast, hCG levels in maternal serum corresponding to these placentas were significantly higher ( $P < 0.0001$ ) in T21-affected pregnancies (median of MoM, 2.3) than in control pregnancies (median MoM, 1.0).

**Maternal serum hCG clearance**

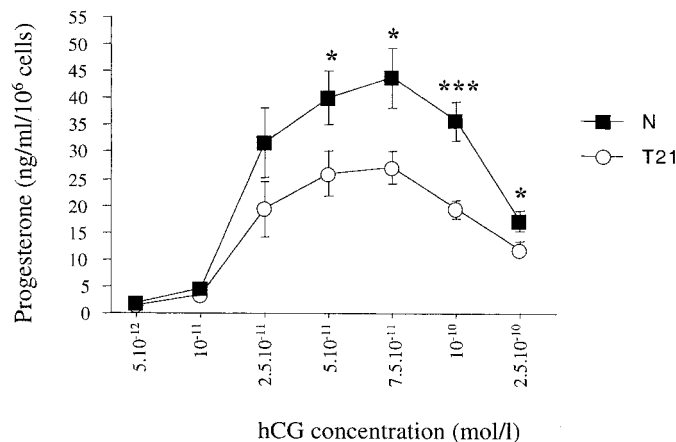
We studied the disappearance of hCG in the maternal serum after delivery and therefore after expulsion of the placenta. The percentage of hCG remaining in maternal circulation at different times after delivery (Table 1) was not significantly different between normal and T21-affected pregnancies.

**hCG bioactivity**

We tested the ability of culture medium from normal and T21 trophoblasts to stimulate steroid production in Leydig

**TABLE 1.** Percentage of hCG in maternal sera at different times after delivery as compared to the values observed 24 h before expulsion

Hours	Control	T21
3	63 $\pm$ 11% (n = 3)	48 $\pm$ 9% (n = 3)
6	51 $\pm$ 17% (n = 5)	45 $\pm$ 0.03% (n = 3)
12	37 $\pm$ 12% (n = 8)	28 $\pm$ 6% (n = 9)
24	22 $\pm$ 9% (n = 7)	17 $\pm$ 5% (n = 9)



**FIG. 2.** Bioactivity of hCG secreted by normal and T21 trophoblast cells. hCG produced by trophoblast cells was measured by immunoassay in conditioned media from cultures of normal (N) ( $n = 5$ ) and T21 trophoblasts ( $n = 5$ ). Different volumes of these media corresponding to the indicated concentrations of hCG were added to MA-10 Leydig cell culture. Progesterone was assayed in MA-10 culture media 3 h later. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$

cells possessing LH receptors, which bind hCG. At equal concentration of hCG in the culture medium ( $10^{-10}$  M), the ability of culture media of T21 trophoblasts to stimulate Leydig cell progesterone secretion was significantly ( $P < 0.0008$ ) decreased (Fig. 2).

**Trophoblast glycosylation activity**

mRNA levels of two enzymes involved in the glycosylation pathway, sialyl-transferase-1 (which adds a sialyl group to antennary structures) and fucosyl-transferase-1 (which adds a fucose to the first N-acetyl-glucosamine of glycoproteins), were significantly higher ( $P < 0.05$ ) in cultured trophoblasts isolated from T21 placenta ( $n = 5$ ) than in control cases ( $n = 5$ ) (mean  $\pm$  SEM,  $27 \pm 15$  vs.  $2.5 \pm 1$  and  $9 \pm 3$  vs.  $3 \pm 1$ , respectively). Lectin binding differed between hCG secreted by normal and T21 trophoblast cultures (Table 2). IEF and immunoblotting (Fig. 3) of hCG present in culture medium from normal trophoblasts revealed a band with an isoelectric point (pHi) at 7.3; whereas in culture medium from T21 trophoblast, a more acid band (pHi = 4.5) was present.

**Discussion**

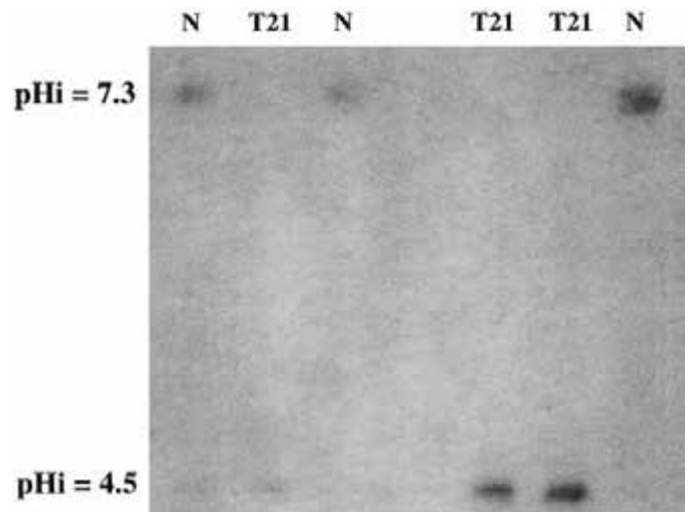
The major endocrine component of human placenta is the villous trophoblast and mainly the syncytiotrophoblast, which arises *in vivo* and *in vitro* from fusion of mononucleated cytotrophoblasts. We previously demonstrated *in vitro*

**TABLE 2.** Glycosylation analysis of hCG in culture medium of five different 72-h trophoblast cell cultures

Lectin	Control	Trisomy 21
Triticum vulgaris	89.5 $\pm$ 4.8%	93.9 $\pm$ 3.5%
Tetragonolobus purpurea	1.4 $\pm$ 0.5%	7.7 $\pm$ 3.6% <sup>a</sup>
Ricinus communis	5.7 $\pm$ 1.4%	18.8 $\pm$ 6.5% <sup>a</sup>
Concanavalin A	96.8 $\pm$ 1.8%	81.6 $\pm$ 2% <sup>a</sup>

Lectin-bound fractions are expressed as a percent of the total fraction (mean  $\pm$  SD).

<sup>a</sup>  $P < 0.05$ .



**FIG. 3.** hCG isoforms secreted by normal (N) ( $n = 3$ ) and T21 trophoblast cells ( $n = 3$ ) as revealed by isofocusing and immunoblot.

(11, 15), and confirmed in the present study in a large number of primary trophoblast cultures ( $n = 29$ ), that in T21-affected placenta, formation of syncytiotrophoblast is defective or delayed. The genetic overexpression of copper-zinc superoxide dismutase is involved in this abnormal trophoblast fusion and differentiation (16). These results are in agreement with previous macroscopic and histological observations of T21-affected placentas that reveal delayed maturation of chorionic villi and syncytiotrophoblastic hypoplasia with a persistent cytotrophoblastic layer in the third trimester (12, 14). They point to a decrease in the syncytiotrophoblast mass in T21-affected placentas and therefore to a decrease in hCG synthesis. We confirmed in this study our previous observation of a significant decrease in hCG transcript levels in total placental homogenates from T21-affected placentas compared with gestational age-matched controls. These results do not agree with previous observations of different authors describing increased or no change in hCG transcript levels or protein levels. Eldar-Geva (10) reported an increase in hCG $\alpha$  and hCG $\beta$  mRNA in trophoblast cells of T21-affected placenta. This was based on a Northern analysis performed with cells cultured for 24 h. In this study, the secretion of hCG at 24 h is extremely variable from one T21 cell culture to another one. In addition the secretion of hCG at 24 h in normal cells or in T21 cells is higher than the one observed at 72 h and 96 h. This suggests a contamination of cytotrophoblast cell cultures by fragments of syncytiotrophoblast, which explains the highest transcript levels of hCG. Indeed it is now well established that hCG transcript levels and hCG secretion are higher in the syncytiotrophoblast compared with the cytotrophoblasts (9, 21–24). Jauniaux *et al.* (25) and Newby *et al.* (26) have compared the levels of hCG and/or of its free subunits, detected by immunoassay in placental total homogenate extracts. This is a different methodological approach, focused on the protein levels and thereby depending on the specificity of the antibodies. In addition, total placental extracts are contaminated by maternal blood, which may lead to artifactual increase in hCG levels and therefore do not directly reflect the trophoblast synthesis of hCG. In addition, Newby *et al.*, did not find an increase in hCG by immunohistochemistry.

The defect in trophoblast differentiation pointing to a delayed placental maturation in T21 prompted us first to check that the increased hCG levels observed during first- and second-trimester maternal screening are not related to a delay in the physiological peak of hCG in the maternal circulation. In normal pregnancies, hCG concentrations rise rapidly in maternal serum, peaking at 9–10 wk of gestation, followed by a fall during the second trimester. The factors involved in the peak of hCG during pregnancy are widely debated and remain to be elucidated (see Ref. 27 for review). Maternal serum hCG peaked in T21-affected pregnancies at exactly the same time (10 wk) as in normal pregnancies, and these high levels of hCG persisted throughout pregnancy in the case of T21.

The discrepancy between decreased placental hCG production and high maternal serum levels in T21-affected pregnancies points to an abnormal clearance of this hormone in the maternal-placental compartment. Maternal serum hCG clearance depends on maternal hepatic catabolism, renal ex-

cretion, ovarian uptake, and placental uptake. In this study, we observed that after placental expulsion, the disappearance of hCG in the maternal serum was similar in normal and T21-affected pregnancies. This suggested that in the absence of placenta, the clearance of hCG in the maternal compartment was the same. Therefore, this pointed to an abnormal placental hCG clearance in T21-affected pregnancies. In addition, we observed, for the first time, that hCG produced by T21-affected trophoblasts had a low bioactivity, as shown by the well-established Leydig cell assay (20). Therefore, hCG produced by T21-affected trophoblasts will have little ability to stimulate the LH/hCG receptors in its main target organs, and therefore in the placenta. Indeed, the placenta is an organ that possesses a large number of hCG receptors (28), and hCG plays a major role via an autocrine process in trophoblastic differentiation (29–31). Furthermore, the placenta presents a large surface of exchange due to the presence of microvilli at the surface of the syncytiotrophoblast bathing in the maternal blood. This favors the capture of circulating maternal hCG by trophoblast receptors (13). Therefore, the increased maternal hCG levels observed in T21-affected pregnancies might be related to different abnormalities: 1) a decreased number of hCG receptors in T21-affected placentas or an abnormality of these receptors (hCG receptors in T21-affected placentas are poorly known; however, an increase in receptor gene expression has been described in these placentas) (25); 2) a decreased binding and/or internalization of this low bioactive hCG secreted by T21-affected trophoblast.

hCG is a complex glycoprotein hormone whose molecular size and carbohydrate content change in physiological processes (gestation) or in pathological conditions such as choriocarcinoma (32–35). Based on the use of a monoclonal antibody (B152 hCG) raised against the hyperglycosylated choriocarcinoma hCG, a hyperglycosylated isoform produced by the first-trimester cytotrophoblast cells (but not syncytiotrophoblast) can be detected in the maternal blood and urine only during the first 6–7 wk of pregnancy (36–38). Cole *et al.* (39–44) investigated the composition of the N-linked and O-linked oligosaccharide side chains in hCG. In Down syndrome pregnancies, hyperglycosylated hCG, also called invasive trophoblast antigen, was found in maternal serum and urine in higher proportion than in controls, and its measurement was proposed as a potential alternative to hCG in Down syndrome screening during the first or second trimester.

In the present work, for the first time, hCG glycosylation was studied comparatively at the source of hormone production, *i.e.* cultured trophoblast cells from age-matched second-trimester control and T21-affected placentas. The demonstration of an abnormally glycosylated hCG synthesized by T21 placental cells was based on: 1) fucosyl-transferase-1 and sialyl-transferase-1 transcript increases in T21 trophoblast cells; 2) different binding of the secreted hCG to different lectins; 3) detection by IEF of a highly acidic form of hCG in the T21 cell culture medium. The IEF pattern reflects the heterogeneity of the charged sugar (sialic acid), which varies with the multiantennarity and/or moiety of the N- or O-oligosaccharide chains in which sialic acid is the terminal sugar (45). Glycosylation modification of polypeptide hormones is known to modulate their activity on target cells.

Interestingly, this T21-hCG had a low bioactivity compared with hCG secreted by gestational age control trophoblasts.

In conclusion, due to the pleiotropic role of this hormone in human pregnancy, maintenance of corpus luteum, trophoblast differentiation, endometrium vascularization, and other factors (7, 46), these results suggest that this abnormal highly glycosylated weakly bioactive hCG might be implicated in the highly frequent spontaneous abortion observed in this aneuploidy.

### Acknowledgments

We thank Dr. Fanny Lewin and the staff of the Saint-Vincent-de-Paul obstetrics department for their friendly support. We also thank Pr. Philippe Blot for helpful discussions.

Received April 16, 2003. Accepted October 21, 2003.

Address all correspondence and requests for reprints to: Danièle Evain-Brion, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U 427, Faculté de Pharmacie, 4, Avenue de l'Observatoire, 75270 Paris, France. E-mail: evain@pharmacie.univ-paris5.fr.

This work was supported by la Caisse d'Assurance Maladie des Professions Libérales Province, l'Association Française pour la Recherche sur la Trisomie 21, la Fondation pour la Recherche Médicale (ARS 2000), and by a grant from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Projet Avenir).

J.-L.F. and J.G. contributed equally to this work.

### References

- Pandya PP, Snijders RJM, Johnson SP, Brizot M, Nicolaides KH 1995 Screening for fetal trisomies by maternal age and fetal nuchal translucency thickness at 10 to 14 weeks of gestation. *Br J Obstet Gynaecol* 102:957–962
- Merkatz I, Nitowsky H, Macri JN, Johnson W 1984 An association between low maternal serum  $\alpha$  fetoprotein and fetal chromosome abnormalities. *Am J Obstet Gynecol* 148:886–891
- Bogart MH, Pandian MR, Jones OW 1987 Abnormal maternal serum chorionic gonadotropin levels in pregnancies with fetal chromosome abnormalities. *Prenat Diagn* 9:623–630
- Wald NJ, Cuckle H, Densem J, Nanchahal K, Royston P, Chard T, Haddow JE, Knight GJ, Palomaki GE, Canick JA 1988 Maternal serum screening for Down's syndrome in early pregnancy. *Br Med J* 297:883–887
- Wald NJ, Watt HC, Hackshaw AK 1999 Integrated screening for Down's syndrome based on tests performed during the first and second trimesters. *N Engl J Med* 341:461–467
- O'Connor JF, Birken S, Lustbader JW, Krichevski A, Chen Y, Canfield R 1994 Recent advances in the chemistry and immunochemistry of human chorionic gonadotropin: impact on clinical measurements. *Endocr Rev* 5:650–683
- Muyan M, Boime I 1997 Secretion of chorionic gonadotropin from human trophoblasts. *Placenta* 18:237–241
- Bernischke R, Kaufmann P 1993 Basic structure of the villous trees. In: *Pathology of the human placenta*. Berlin: Springer-Verlag; 22–70
- Kliman HJ, Nestler JE, Sermasi E, Sanger JM, Strauss JF 1986 Purification, characterization, and *in vitro* differentiation of cytotrophoblast from human term placentae. *Endocrinology* 118:1567–1582
- Eldar-Geva T, Hochberg A, de Groot N, Weinstein D 1995 High maternal serum chorionic gonadotropin level in Down's syndrome pregnancies is caused by elevation of both subunits' messenger ribonucleic acid level in trophoblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 80:3528–3531
- Frendo JL, Vidaud M, Guibourdenche J, Luton D, Muller F, Bellet D, Giovangrandi Y, Tarrade A, Porquet D, Blot P, Evain-Brion D 2000 Defect of villous cytotrophoblast differentiation into syncytiotrophoblast in Down's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 85:3700–3707
- Oberweiss D, Gillerot Y, Koullischer L, Hustin J, Philippe E 1983 Le placenta des trisomies 21 dans le dernier trimestre de la gestation. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 12:345–349
- Bernischke R, Kaufmann P 1993 Abortion, placenta of trisomies, and immunological considerations of recurrent reproductive failure. *Pathology of the human placenta*. Berlin: Springer-Verlag; 754–781
- Roberts L, Sebire NJ, Fowler D, Nicolaides KH 2000 Histomorphological features of chorionic villi at 10–14 weeks of gestation in trisomic and chromosomally normal pregnancies. *Placenta* 7:678–683
- Massin N, Frendo JL, Guibourdenche J, Luton D, Vidaud M, Anderson WB, Evain-Brion D 2001 Defect of syncytiotrophoblast formation and human chorionic gonadotropin expression in Down's syndrome. *Placenta* 22:S93–S97
- Frendo JL, Théron P, Bird T, Massin N, Muller F, Guibourdenche J, Luton D, Vidaud M, Anderson WB, Evain-Brion D 2001 Overexpression of copper zinc superoxide dismutase impairs human trophoblast cell fusion and differentiation. *Endocrinology* 142:3638–3648
- Baezinger JU, Fiete D 1979 Structural determinants of concanavalin A specificity for oligosaccharides *in vitro*. *J Biol Chem* 254:2400–2407
- Birken S, Berger P, Bidart JM, Weber M, Bristow A, Norman R, Sturgeon C, Stenman UH 2003 Preparation and characterization of new WHO reference reagents for human chorionic gonadotropin and metabolites. *Clin Chem* 49:144–154
- Bidart JM, Troalen F, Lazar V, Berger P, Marcillac L, Lhomme C, Droz JP, Bellet D 1992 Monoclonal antibodies to the free  $\beta$ -subunit of human chorionic gonadotropin define three distinct antigenic domains and distinguish between intact and nicked molecules. *Endocrinology* 131:1832–1840
- Ascoli M 1981 Characterization of several clonal lines of cultured Leydig tumor cells: gonadotropin receptors and steroidogenic responses. *Endocrinology* 108:88–95
- Frendo J-L, Olivier D, Blond J-L, Evain-Brion D, Mallet F 2003 Direct involvement of HERV-W env glycoprotein in human trophoblast cell fusion and differentiation. *Mol Cell Biol* 23:3566–3574
- Shi Q, Lei Z, Rao C, Lin J 1993 Novel role of human chorionic gonadotropin in differentiation of human cytotrophoblasts. *Endocrinology* 132:1387–1395
- Debieve F, Pampfer S, Thomas K 2000 Inhibin and activin production and subunit expression in human placental cells cultured *in vitro*. *Mol Hum Reprod* 6:743–749
- Richards RG, Hartman SM, Handwerger S 1994 Human cytotrophoblast cells cultured in maternal serum progress to a differentiated syncytial phenotype expressing both human chorionic gonadotropin and human placental lactogen. *Endocrinology* 135:321–329
- Jauniaux E, Bao S, Eblen A, Li X, Lei ZM, Mewis S, Rao CV 2000 HCG concentration and receptor gene expression in placental tissue from trisomy 18 and 21. *Mol Hum Reprod* 6:5–10
- Newby D, Aitken DA, Crossley JA, Howatson AG, Macri JN, Connor JM 1997 Biochemical markers of trisomy 21 and the pathophysiology of Down's syndrome pregnancies. *Prenat Diagn* 17:941–951
- Malassiné A, Frendo JL, Evain-Brion D, A comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model. *Hum Reprod Update*, in press
- Licht P, Cao H, Lei Z, Rao CV, R, Merz WE 1993 Novel self regulation of human chorionic gonadotropin biosynthesis in term pregnancy human placenta. *Endocrinology* 133:3014–3025
- Cronier L, Bastide B, Hervé J-C, Delèze J, Malassiné A 1994 Gap junctional communication during human trophoblast differentiation: influence of human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 135:402–408
- Yang M, Lei ZM, Rao CV 2003 The central role of human chorionic gonadotropin in the formation of human placental syncytium. *Endocrinology* 144:1108–1120
- Eliot MM, Kardana A, Lustbader JW, Cole LA 1997 Carbohydrate and peptide structure of  $\alpha$  and  $\beta$ -subunits of chorionic gonadotropin from normal and aberrant pregnancy and choriocarcinoma. *Endocrine* 7:15–32
- Wide L, Hobson B 1987 Some qualitative differences of hCG in serum from early and late pregnancies and trophoblastic diseases. *Acta Endocrinol* 116:465–472
- Skarulis MC, Wehmann RE, Nisula BC, Blithe DL 1992 Glycosylation changes in human chorionic gonadotropin and free  $\alpha$  subunit as gestation progresses. *J Clin Endocrinol Metab* 75:91–96
- Mock P, Kovalevskaya G, O'Connor JF, Campana A 2000C horiocarcinoma-like human chorionic gonadotropin (HCG) and HCG bioactivity during the first trimester of pregnancy. *Hum Reprod* 15:2209–2214
- Kovalevskaya G, Birken S, Kakuma T, O'Connor JF 1999 Early pregnancy human chorionic gonadotropin (hCG) isoforms measured by an immunometric assay for choriocarcinoma-like hCG. *J Endocrinol* 161:99–106
- Kovalevskaya G, Genbacev O, Fisher SJ, Caceres E, O'Connor JF 2002 Trophoblast origin of hCG isoforms: cytotrophoblasts are the primary source of choriocarcinoma-like hCG. *Mol Cell Endocrinol* 194:147–155
- Kovalevskaya G, Birken S, Kakuma T, Ozaki N, Sauer M, Lindheim S, Cohen M, Kelly A, Schlatterer J, O'Connor JF 2002 Differential expression of human chorionic gonadotropin (hCG) glycosylation isoforms in failing and continuing pregnancies: preliminary characterization of the hyperglycosylated hCG epitope. *J Endocrinol* 172:497–506
- Cole LA, Cermik D, Bahado-Singh RO 1997 Oligosaccharide variants of hCG-related molecules: potential screening markers for Down syndrome. *Prenat Diagn* 17:1188–1190
- Cole LA, Omrani A, Cermik D, Bahado Singh R, Mahoney M 1998 Hyperglycosylated hCG, a potential alternative to hCG in Down syndrome screening. *Prenat Diagn* 18:926–933
- Cole L, Rinne K, Mahajan S, Oz UA, Shahabi S, Mahoney MJ, Bahado-Singh RO 1999 Urinary screening tests for fetal Down syndrome: I. Fresh  $\beta$ -core fragment. *Prenat Diagn* 19:340–350
- Cole LA, Shahabi S, Oz UA, Bahado-Singh RO, Mahoney MJ 1999 Hyper-



- glycosylated chorionic gonadotropin (invasive trophoblast antigen) immunoassay: a new bases for gestational Down syndrome screening. *Clin Chem* 45:2109–2119
42. Cole L, Shahabi S, Oz U, Rinne K, Omrani A, Bahado-Singh R 1999 Urinary screening tests for fetal Down syndrome: II. Hyperglycosylated hCG. *Prenat Diagn* 19:351–359
  43. Cuckle H, Shahabi S, Sehmi I, Jones R, Cole L 1999 Maternal urine hyperglycosylated hCG in pregnancies with Down syndrome. *Prenat Diagn* 19:918–920
  44. Weinans M, Butler S, Mantingh A, Cole L 2000 Urinary hyperglycosylated hCG in first trimester screening for chromosomal abnormalities. *Prenat Diagn* 20:976–978
  45. Abushoufa RA, Talbot JA, Brownbill K, Rafferty B, Kane JW, Robertson WR 2000 The development of a sialic acid specific lectin-immunoassay for the measurement of human chorionic gonadotrophin glycoforms in serum and its application in normal and Down's syndrome pregnancies. *Clin Endocrinol (Oxf)* 52:499–508
  46. Kurtzman JT, Wilson H, Rao CV 2001 A proposed role for hCG in clinical obstetrics. *Semin Reprod Med* 19:63–68

---

### Erratum

In the article "Pharmacokinetics and Dose Finding of a Potent Aromatase Inhibitor, Aromasin (Exemestane), in Young Males" by Nelly Mauras, John Lima, Deval Patel, Annie Rini, Enrico di Salle, Ambrose Kwok, and Barbara Lippe (*The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 88:5951–5956), there is an error in the affiliations line. Drs. di Salle, Kwok, and Lippe are affiliated with Pharmacia Corp. (now Pfizer Inc.), not with Amersham Pharmacia Biotech. There is also an error in the Acknowledgments section. The work was supported by a grant from Pharmacia Corp./Pfizer Inc. (not by a grant from Amersham Pharmacia Biotech). *The printer regrets the errors.*

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

## **II. Article 2 :**

### **Biochemical characterization and modulation of LH/CG-receptor during human trophoblast differentiation**

G. Pidoux, P. Gerbaud, V. Tsatsaris, O. Marpeau, F. Ferreira, G. Meduri, J. Guibourdenche, J.  
Badet, D. Evain-Brion and J-L. Frendo.  
J Cell Physiol, article sous-presse

## 1. Introduction.

Dans l'article précédent, nous avons mis en évidence une forme d'hCG hyperglycosylée et biologiquement moins active. Ceci nous a amené à formuler de nouvelles hypothèses afin d'expliquer le fait que l'on retrouve l'hCG augmentée dans le sang maternel lors d'une grossesse associée à une trisomie 21, alors que sa production trophoblastique est diminuée.

Une de ces hypothèses a été de suggérer que l'augmentation de l'hCG sérique maternelle lors de grossesse associée à une trisomie 21, pourrait être due à une anomalie quantitative et/ou qualitative du R-LH/CG dans les cellules trophoblastiques trisomiques. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons cherché à caractériser l'expression du R-LH/CG au cours de la différenciation trophoblastiques. Peu de données sont disponibles sur ce sujet. Nous avons donc, dans un premier temps focalisé notre étude sur le modèle de différenciation des cytotrophoblastes normaux.

Nous avons montré par western-blot et immunoprécipitation que l'expression du R-LH/CG décroît au fur et à mesure de la fusion et de la différenciation trophoblastique, alors que les hormones hCG et hPL (spécifiques de la formation syncytiale) augmentent. Nous avons confirmé ces résultats par une analyse de Scatchard en démontrant que la forme mature du récepteur, exprimée à la surface des cellules trophoblastiques et fixant l'hCG- $^{125}$ I, est fortement moins exprimée par le syncytiotrophoblaste que par les cytotrophoblastes. De plus, sous stimulation par une hCG recombinante, le syncytiotrophoblaste produit moins d'AMPc que le cytotrophoblaste.

## 2. Résultats.

### 2.1. Différenciation *in vitro* des trophoblastes humains.

La figure 1 (de l'article 2) présente les cultures à 24h de cytotrophoblastes purifiés et isolés à partir de placenta et le syncytiotrophoblaste formé à 72h. La formation du syncytiotrophoblaste est associée à une augmentation significative du taux d'hPL et d'hCG dans les milieux de culture (Figure 1I de l'article 2). Parallèlement, les immunomarquages de l'hCG (figure 1A et 1B de l'article 2) et de l'hPL (figure 1F et 1H de l'article de 2) présentent une augmentation de leur intensité *in vitro* durant la formation du syncytiotrophoblaste. L'hPL, qui est exprimée seulement par le syncytiotrophoblaste (Handwerger, 1991), est détectée par immunomarquage à 72h (figure 1D et 1H de l'article 2), alors qu'aucun marquage n'est observable à 24h (figure 1C et 1F de l'article 2). L'immunomarquage de la cytokératine 7, qui est exprimée par les cellules trophoblastiques (Blaschitz et al., 2000) est observable à 24h (figure 1C et 1E de l'article 2) et à 72h (figure 1D et 1G de l'article 2). La différenciation des cytotrophoblastes en syncytiotrophoblaste est associée avec une augmentation de l'expression et de la sécrétion de l'hCG et de l'hPL.

2.2. Diminution *in vitro* de l'expression de la protéine du R-LH/CG pendant la différenciation trophoblastique.

La figure 2A et 2B (de l'article 2) montre que le R-LH/CG est exprimé dans les cultures de cytotrophoblastes. Le R-LH/CG est exprimé par les cytotrophoblastes (à 24h) et le syncytiotrophoblaste (à 72h) et se présente de manière ponctiforme. L'immunomarquage semble être plus fort dans le cytotrophoblaste que dans le syncytiotrophoblaste. Pour valider cette observation, nous avons procédé à une analyse par western-blot sur des extraits cellulaires de cytotrophoblastes (à 24h) et de syncytiotrophoblaste (à 72h) (figure 2C de l'article 2). A 24h et 72h de culture, deux bandes majeures de poids moléculaires différents: 65-75 kDa et 85-95 kDa sont observées. Dans la littérature la bande correspondant à la taille 85-95 kDa a été décrite comme étant la forme mature du récepteur présent à la surface des cellules. La taille 65-75 kDa correspond au précurseur de la forme mature du récepteur, présente à la surface cellulaire (Ascoli et al., 2002).

Nos résultats montrent que l'expression de la forme mature du récepteur LH/CG et de son précurseur (respectivement marqué m et p dans la figure 2C de l'article 2) sont diminués pendant la différenciation des cytotrophoblastes en syncytiotrophoblaste, contrairement à l'actine, dont l'expression reste constante tout au long du processus de différenciation. La normalisation de l'expression de la forme mature du R-LH/CG par l'expression de l'actine montre une diminution

significative ( $58,6 \pm 6,7\%$  ;  $p < 0,0001$ ) de la forme présente à la surface des cellules. Dans les mêmes extraits cellulaires, la diminution de l'expression de la forme mature et du précurseur du R-LH/CG coïncide avec une augmentation de l'expression de l'hCG et de l'hPL (figure 2C de l'article 2).

Pour mieux caractériser l'expression du R-LH/CG pendant la différenciation trophoblastique, nous avons réalisé une immuno-précipitation (IP) avec un anticorps dirigé contre la partie transmembranaire du récepteur LH/CG humain (K15). Une bande de 90 kDa correspondant à la forme mature du R-LH/CG (m) et une bande de 75 kDa correspondant au précurseur (p) ont ainsi été mises en évidence. Afin de déterminer la forme du récepteur fixant l'hCG, nous avons utilisé de l'hCG-I<sup>125</sup> dans des expériences de ligand-blot (figure 2D de l'article 2). L'incubation d'hCG-I<sup>125</sup> ( $10^{-11}$ M) avec la membrane de l'IP révèle une bande majeure pour 90 kDa. Cette bande est absente lorsque la membrane de l'IP est incubée en présence d'un excès d'hCG froide ( $10^{-6}$ M) et avec de l'hCG-I<sup>125</sup> ( $10^{-11}$ M). La quantité d'hCG-I<sup>125</sup> fixé sur la bande à 90 kDa est plus importante dans les cytotrophoblastes que dans le syncytiotrophoblaste.

2.3. Diminution *in vitro* de l'expression de l'ARNm du R-LH/CG pendant la différenciation trophoblastique.

Nous avons procédé à des RT-PCR semi quantitatives en utilisant deux couples d'oligonucléotides (P1 et P2) (leur position est indiquée sur la figure 3A de l'article 2). Pour exclure toute contamination par de l'ADN génomique, chaque oligonucléotide est localisé sur des exons différents et les échantillons d'ARN ont été prétraités avec de la DNase I. La figure 3B (de l'article 2) montre que les amplifications de 647-pb et de 282-pb (obtenues avec P1 et P2 respectivement) spécifique de l'ARNm du R-LH/CG sont plus abondantes dans les cytotrophoblastes (24h) que dans le syncytiotrophoblaste (72h). Aucune différence significative n'est observable pour l'expression de l'ARNm de l'actine. Les fragments de 647-pb et de 282-pb ont été clonés et séquencés, confirmant qu'il s'agit bien du R-LH/CG humain. La normalisation de l'expression de l'ARNm du R-LH/CG par l'expression de l'ARNm de l'actine après RT-PCR montre une diminution significative de l'expression de l'ARNm du R-LH/CG lors de la différenciation des cytotrophoblastes en syncytiotrophoblaste (figure 3C de l'article 2). Avec P1, on observe une diminution allant de  $0,332 \pm 0,014$  UA à 24h à  $0,132 \pm 0,013$  UA à 72h ( $p < 0,0001$ ). Une diminution similaire est observable avec P2, allant de  $0,817 \pm 0,018$  UA à 24h à  $0,356 \pm 0,011$  UA à 72h ( $p < 0,0001$ ).

2.4. Diminution *in vitro* de la fixation d'hCG-I<sup>125</sup> sur le R-LH/CG pendant la différenciation trophoblastique.

Pour confirmer la diminution de l'expression du R-LH/CG observée au niveau de la protéine et des messagers, nous avons réalisé des expériences de liaison, (comprenant des études de saturation et de compétition) avec de l'hCG radiomarquée dans les culture à 24h et 72h (figure 4 de l'article 2). Les analyses de Scatchard montrent que le nombre de molécules radiomarquées fixées à la membrane est supérieur ( $p = 0,042$ ) dans les cytotrophoblastes ( $3511 \pm 693$  molécules fixées/cellules ensemencée) que dans le syncytiotrophoblaste ( $929 \pm 583$  molécules fixées/cellules ensemencée). Aucune différence dans l'affinité de l'hormone (Kd) n'est observable entre les cellules à 24h ( $0,5 \pm 0,09$  nM) et à 72h ( $0,4 \pm 0,13$  nM).

2.5. Stimulation *in vitro* du R-LH/CG pendant la différenciation trophoblastique.

Pour confirmer la diminution de l'expression de la forme mature du récepteur LH/CG observé dans le syncytiotrophoblaste par rapport aux cytotrophoblastes, nous avons mesuré la production d'AMPc en réponse à une stimulation d'hCG biosynthétique (figure 5 de l'article 2). Nous pouvons observer que la production et l'accumulation d'AMPc sous stimulation d'hCG est supérieure ( $p = 0,0021$ ) dans les cytotrophoblaste que dans le syncytiotrophoblaste. À 24h, la stimulation d'hCG ( $10^{-8}$ M) induit une production d'AMPc deux fois plus forte que les cytotrophoblastes non stimulés ( $p = 0,0016$ ), alors que la stimulation avec  $10^{-8}$ M d'hCG n'induit pas de production d'AMPc détectable sur le syncytiotrophoblaste ( $p = 0,7644$ ). Il est important de noter que la stimulation par l'épinéphrine (utilisée comme témoin positif) entraîne une augmentation similaire d'AMPc dans les cytotrophoblastes et les syncytiotrophoblastes, ceci suggérant que la voie de l'AMPc est bien fonctionnelle dans les deux types cellulaires.

2.6. Immunolocalisation du R-LH/CG sur des coupes de placentas.

Nous avons confirmé les précédents résultats observés *in vitro*, en examinant *in situ* l'expression du R-LH/CG sur des coupes de placentas de premier trimestre. Nous avons choisi de travailler sur des coupes de placentas issus du premier trimestre car la couche de cellules trophoblastiques est plus abondante qu'à terme et constitue une couche continue. L'expression du R-LH/CG est retrouvé à la fois dans les cytotrophoblastes et le syncytiotrophoblaste. La figure 6A (de l'article 2) montre que l'expression du récepteur est plus importante dans le cytotrophoblaste que dans le syncytiotrophoblaste. Le R-LH/CG est aussi exprimé dans les cellules périvasculaires (VC) de la

villosité chorale (figure 6A de l'article 2). Aucun marquage n'est observable sur les coupes contrôles (figure 6D de l'article 2). Un fort marquage de l'hCG est observé au niveau du syncytiotrophoblaste (figure 6B de l'article 2), tandis que le marquage de la cytokératine 7 est principalement localisé dans la couche de cytotrophoblastes (figure 6C de l'article 2).

### 3. Conclusion.

L'hCG, qui est produite en grande quantité par le syncytiotrophoblaste, joue un rôle clef dans la différenciation du cytotrophoblaste en syncytiotrophoblaste. De nombreuses études se sont intéressées au rôle central de l'hCG et de son récepteur dans le mécanisme de différenciation trophoblastique. L'inhibition de l'expression du R-LH/CG par l'utilisation d'anti-sens spécifiques pendant la culture de cytotrophoblastes a pour conséquence d'entraîner une inhibition de la différenciation trophoblastique, montrant que l'hCG, *via* son récepteur est un régulateur autocrine et paracrine de la formation du syncytiotrophoblaste (Yang et al., 2003). Plusieurs auteurs ont décrit un phénomène de "down regulation" du récepteur LH/CG en présence de forte concentration d'hCG. Ce phénomène est caractérisé par une diminution du nombre de récepteurs LH/CG présents à la surface de la membrane cellulaire, corrélée à une diminution des transcrits du R-LH/CG (Segaloff et al., 1990) (LaPolt et al., 1990) (Hoffman et al., 1991) (Peegel et al., 1994).

En utilisant différentes méthodes biochimiques, nous avons clairement démontré dans cette étude, une diminution des transcrits et de la protéine du récepteur LH/CG dans le syncytiotrophoblaste comparativement aux cytotrophoblastes. La diminution de la forme mature du récepteur LH/CG présent à la surface de la membrane cellulaire a été confirmée dans notre étude par une nette diminution de la production d'AMPc après stimulation par une hCG recombinante dans le syncytiotrophoblaste par rapport aux cytotrophoblastes. La diminution de la production d'AMPc dans le syncytiotrophoblaste n'est pas due à une diminution de l'affinité de l'hCG pour son récepteur, puisque la constante de dissociation de l'hormone pour son récepteur (Kd) est la même dans les cytotrophoblastes et le syncytiotrophoblaste. De plus, les études de Scatchard ont permis de confirmer la diminution du nombre de récepteurs présents à la surface cellulaire, par la diminution significative du nombre de molécules radiomarquées fixées à la membrane du syncytiotrophoblaste comparativement aux cytotrophoblastes. Par ailleurs, la diminution de l'expression du récepteur LH/CG dans le syncytiotrophoblaste par rapport aux cytotrophoblastes a de plus, été confirmée *in situ*. Le processus de découplage du R-LH/CG est un phénomène qui empêche temporairement l'interaction des protéines G avec le R-LH/CG, inhibant ainsi toute production d'AMPc. Ce phénomène a lieu lorsque le récepteur est soumis à de très fortes concentrations d'hCG ou à une longue exposition du récepteur avec son ligand (Segaloff et al., 1990). La perte de réponse et de production d'AMPc observée dans le syncytiotrophoblaste en présence d'une hCG recombinante peut être due en partie au découplage des récepteurs présents à la surface de la membrane cellulaire.

Dans cette étude, nous avons caractérisé de manière biochimique et pour la première fois dans un modèle physiologique humain, le récepteur LH/CG. Nous avons ainsi démontré que le R-LH/CG est exprimé par les cytotrophoblastes et en quantité moindre, par le syncytiotrophoblaste. L'expression du R-LH/CG semble être régulée durant la différenciation des trophoblastes villosités et cette régulation



peut faire intervenir un phénomène de régulation négative du récepteur par son ligand. Phénomène qui permet la diminution du nombre de récepteurs présents à la surface membranaire cellulaire, par internalisation et dégradation du R-LH/CG. Ce processus se produit lorsque la cellule est en présence d'une grande quantité de ligand ou lors d'une exposition prolongée du R-LH/CG avec son ligand. Une régulation anormale de ce processus pourrait être impliquée dans les grossesses associées à une trisomie 21, pour lesquelles nous avons précédemment démontré la présence d'une hCG anormalement glycosylée et biologiquement moins active, entraînant à un retard de formation du syncytiotrophoblaste (Frendo et al., 2000) (Frendo et al., 2004).

**BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION AND MODULATION OF LH/CG -  
RECEPTOR DURING HUMAN TROPHOBLAST DIFFERENTIATION.**

**Guillaume Pidoux<sup>1§</sup>, Pascale Gerbaud<sup>1§</sup>, Vassilis Tsatsaris<sup>1,4</sup>, Olivier Marpeau<sup>1</sup>, Fatima  
Ferreira<sup>1</sup>, Geri Meduri<sup>2</sup>, Jean Guibourdenche<sup>1,3</sup>, Josette Badet<sup>1</sup>, Danièle Evain-Brion<sup>1</sup> and  
Jean-Louis Frendo<sup>1,5\*</sup>.**

<sup>1</sup>INSERM, U767, Université Paris 5, Paris, F-75006 France; <sup>2</sup>INSERM, U693, Le Kremlin-Bicêtre, F-  
94276 France; <sup>3</sup> CHU Paris, Hôpital Robert Debré, Service d'Hormonologie, Paris, F-75019 France;

<sup>4</sup> AP-HP, Hôpital Cochin, Maternité Port-Royal, Paris, F-75014 France; <sup>5</sup> CNRS, Paris, F-75006

France.

§ These two authors contributed equally to the work.

Correspondence to: Jean-Louis Frendo, INSERM U767, Faculté de Pharmacie, 4 Avenue de  
l'Observatoire, 75270 Paris, France. E-mail: [jean-louis.frendo@univ-paris5.fr](mailto:jean-louis.frendo@univ-paris5.fr)

Running title: LH/CG-R in human trophoblast differentiation.

**Key words: hCG, hPL, placenta, cytotrophoblast, syncytiotrophoblast, cell fusion.**

6 text figures and 1 table

## ABSTRACT

Due to the key role of the human chorionic gonadotropin hormone (hCG) in placental development, the aim of this study was to characterize the human trophoblastic luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor (LH/CG-R) and to investigate its expression using the *in vitro* model of human cytotrophoblast differentiation into syncytiotrophoblast. We confirmed by *in situ* immunocytochemistry and in cultured cells, that LH/CG-R is expressed in both villous cytotrophoblasts and syncytiotrophoblasts. However, LH/CG-R expression decreased during trophoblast fusion and differentiation, while the expression of hCG and hPL (specific markers of syncytiotrophoblast formation) increased. A decrease in LH/CG-R mRNA during trophoblast differentiation was observed by means of semi-quantitative RT-PCR with two sets of primers. A corresponding decrease (~ 60%) in LH/CG-R protein content was shown by western-blot and immunoprecipitation experiments. The amount of the mature form of LH/CG-R, detected as a 90-kDa band specifically binding  $^{125}\text{I}$ -hCG, was lower in syncytiotrophoblasts than in cytotrophoblasts. This was confirmed by Scatchard analysis of binding data on cultured cells. Maximum binding at the cell surface decreased from 3511 to about 929 molecules/seeded cells with a  $K_d$  of 0.4 - 0.5 nM. Moreover, on stimulation by recombinant hCG, the syncytiotrophoblast produced less cyclic AMP than cytotrophoblasts, indicating that LH/CG-R expression is regulated during human villous trophoblast differentiation.

## INTRODUCTION

Human chorionic gonadotropin (hCG) belongs to a family of glycoprotein hormones, which includes lutropin (LH), thyrotropin (TSH) and follitropin (FSH). These hormones composed of two non-covalently linked subunits, alpha ( $\alpha$ ) and beta ( $\beta$ ), are active on bivalent form. The  $\alpha$ -subunit is common to all glycoprotein hormones, whereas the  $\beta$ -subunits confer the hormonal specificity (Pierce and Parsons, 1981). Alpha hCG is encoded by a single gene and  $\beta$ hCG by six genes, one of which, *CG $\beta$ 5*, is predominantly expressed in the placenta (Bo and Boime, 1992). HCG is essential for the initiation and maintenance of early pregnancy. After implantation, hCG is produced by the placenta and mainly by the trophoblast (Hoshina et al., 1985; Kliman et al., 1986; Muyan and Boime, 1997, Handschuh et al., 2006). It is used as a diagnostic marker of pregnancy.

The human placenta is characterized by extensive invasion of the trophoblast in the maternal uterus, creating direct trophoblast contact with maternal blood (haemochorial placentation). In early pregnancy, mononuclear cytotrophoblasts (CT) proliferate and invade the maternal endometrium to form the anchoring villi. (Aplin, 1991). Cytotrophoblasts also differentiate into a multinucleated continuous layer known as the syncytiotrophoblast (ST). This cell layer, which covers the chorionic villi, is bathed by maternal blood in the intervillous spaces from early gestation (Richard, 1961; Midgley et al., 1963; Boyd and Hamilton, 1970; Benirschke and Kaufmann, 2000). This syncytiotrophoblast is multifunctional, but its primary functions are exchange of oxygen, nutrients, removal of waste products and hormone production. The syncytiotrophoblast secretes hCG in large amounts, directly into the maternal blood bathing the chorionic villi in the intervillous space.

The mechanisms underlying villous trophoblast differentiation remain largely to be explored. Syncytiotrophoblast formation *in vivo* and *in vitro* arises from villous cytotrophoblast fusion and differentiation. Several factors modulate villous trophoblast differentiation, including EGF (epidermal growth factor) and EGF receptor expression (Morrish et al., 1987; Alsat et al., 1993), hypoxia (Alsat et al., 1996), cAMP-dependent protein kinase (PKA) (Keryer et al., 1998), granulocyte-macrophage stimulating factor (Garcia-Lloret et al., 1994), transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) (Morrish et al., 1991) and oxidative stress due to overexpression of copper zinc superoxide dismutase (Frendo et al.,

2000a, 2001). The molecular mechanisms underlying trophoblast membrane fusion are poorly understood. Proteins involved in cell adhesion (cadherin 11) (Getsios and MacCalman, 2003) and cell-cell communication (connexin 43) (Frendo et al., 2003a) are known to be directly involved. We recently demonstrated the direct involvement of syncytin I, a human endogenous retroviral envelope glycoprotein (Frendo et al., 2003b), and the presence of syncytin 2, restricted to some villous cytotrophoblasts (Malassiné et al, 2006).

Several studies suggest that hCG stimulates villous trophoblast differentiation by acting on the LH/CG-R (Shi et al., 1993; Cronier et al., 1994; Yang et al., 2003). This receptor, which has seven transmembrane domains, belongs to the superfamily of G protein-coupled receptors (Pierce and Parsons, 1981; Loosfelt et al., 1989; McFarland et al., 1989; Minegishi et al., 1990). The LH/CG receptor gene has been cloned in pig, mouse, rat and human; in humans it is composed of 11 exons and 10 introns, and its coding region is over 60 kb long (Segaloff and Ascoli, 1993). HCG binding to its receptor activates adenylate cyclase, phospholipase C and ion channels, which in turn control cellular cAMP, inositol phosphates,  $Ca^{2+}$  and other secondary messengers (Gudermann et al., 1992; Hipkin et al., 1992).

The presence of LH/CG-R in human placenta was first described by Alsat (Alsat and Cedar, 1974) and has since been confirmed by other authors (Reshef et al., 1990; Lei and Rao, 1992). Inhibition of LH/CG-R expression by specific antisense oligodeoxynucleotides during cytotrophoblast culture results in time- and concentration-dependent inhibition of cytotrophoblast differentiation, showing that hCG, *via* its receptor, is an autocrine and paracrine regulator of human placental syncytiotrophoblast formation (Yang et al., 2003).

Most of the studies actually done, have used transfected cells with cDNA from LH/CG-receptor in rat or mouse models. In human, the characterization and the modulation of LH/CG-R expression during syncytiotrophoblast formation is poorly documented. Here we used the physiological model of cultured primary human trophoblasts (Kliman et al., 1986; Frendo et al., 2000b), in which isolated mononuclear cytotrophoblasts differentiate and fuse to form a syncytiotrophoblast, which secretes large amounts of hCG and other pregnancy-related hormones. We used various methodological approaches to characterize the hCG/LH receptor, and observed its down-

regulation during villous trophoblast differentiation. This was confirmed by *in situ* immunolocalisation of the hCG receptor in sections of human placenta.

## MATERIALS AND METHODS

### ***Placental tissue collection and trophoblast cell culture***

These studies were performed in agreement with our local ethics committee and with written informed consent of patients. Third trimester placentas were obtained immediately after iterative Caesarian section from healthy mothers delivered at 35-39 weeks of amenorrhea. First trimester placentas (7-12 weeks of gestation) were collected following legal voluntary interruption of pregnancy from women who gave their written informed consent. Cytotrophoblasts were isolated as previously described (Alsat et al., 1993). After sequential trypsin (0.25%)/DNase I digestion followed by Percoll gradient centrifugation (Frendo et al., 2003a), the cells were further purified by negative selection to obtain a trophoblast preparation not contaminated by other cells, by using a monoclonal anti-human leukocytic antigen A, B and C antibodies (W6-32HL, Sera Lab, Crawley Down, UK) according to a published method (Schmon et al., 1991; Cronier et al., 2002). This antibody reacts with most cell types (e.g. macrophages, fibroblasts, extravillous trophoblasts) but not with villous cyto- or syncytiotrophoblast. Cytotrophoblasts were diluted to a final density of  $2.7 \times 10^6$  cells in 3 ml of minimum essential medium (MEM) containing 10% fetal calf serum (FCS). Cells were plated in 60-mm plastic dishes (TPP, Trasadingen, Switzerland) and incubated at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Cytokeratin 7 immunocytochemistry was performed to confirm the cytotrophoblastic nature of the attached cells: about 95-98% of the cells were positively stained.

### ***Hormone assay***

The hCG concentration was determined in culture medium after 24 and 72 hours of culture by using an enzyme-linked fluorescence assay (Vidas System, BioMerieux, Marcy l'Etoile, France) with a detection limit of 2 mU/ml. The hPL concentration was determined in 4-fold-concentrated conditioned

medium by using a method (Amerlex IRMA, Amersham Pharmacia Biotech) with a detection limit of 0.5 µg/ml. All reported values are means ± SEM of triplicate determinations.

### ***Immunohistochemistry***

Placental samples were obtained after first-trimester abortion. They were fixed by incubation in 4% formalin for 4 to 12 h at room temperature and then embedded in paraffin, dewaxed in xylene and rehydrated in ethanol/water. Immunostaining was performed with a universal streptavidin-peroxidase immunostaining kit (Peroxidase, Dako LSAB®+Kit, DAKO®, Glostrup, Denmark). Non-specific binding was blocked by incubation for 5 min in a blocking reagent containing 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and then in 3% serum albumin in PBS for 30 min. The sections were incubated with the primary antibody for 30 min at room temperature. The primary antibodies (table 1) were polyclonal anti-human LH/CG-R (LHR-K15, Santa Cruz Biotechnology Inc, CA, USA, at 2 µg/ml), monoclonal anti-cytokeratin 7 (M7018, DAKO®, Glostrup, Denmark, at 1 µg/ml), and polyclonal anti-hCG (A0231 against the beta subunit of hCG, DAKO®, Glostrup, Denmark, at 2 µg/ml). Sections were washed in PBS and incubated with a biotinylated secondary antibody for 15 min. They were then washed three times in PBS and incubated with streptavidin conjugated to horseradish peroxidase for 15 min. The sections were washed in PBS and staining was detected by incubation for 30 seconds with the DAB (3,3'-diaminobenzidine) chromogen. Controls were performed by incubating the sections with nonspecific IgG at the same concentration as the primary antibody. Successive pre-adsorptions of LH/CG-R antibody with trophoblastic cells in culture abrogate LH/CG-R immunodetection.

### ***Immunocytochemistry***

To detect desmoplakin, LH/CG-R, hCG, cytokeratin 7 and hPL, cultured cells were rinsed with PBS, fixed and permeabilized in methanol at -20°C for 8 min. Alternatively, cultured cells were fixed with 4% paraformaldehyde at 4°C for 20 min. After washing once with PBS, the remaining free aldehyde groups were blocked by adding 50mM NH<sub>4</sub>Cl for 10 min. A polyclonal anti-desmoplakin (AHP320, Serotec, Oxford, UK at 2.5 µg/ml), two polyclonal anti-LH/CGR (LHR-K15 and LHR-H50, Santa Cruz Biotechnology Inc, CA, USA, at 2 µg/ml), two polyclonal anti-hCG (A0231, DAKO®, Glostrup,

Denmark at 2 µg/ml and SC-7821, Santa Cruz Biotechnology Inc, CA, USA at 2µg/µl), a monoclonal anti-cytokeratin 7 (M7018, DAKO<sup>®</sup>, Glostrup, Denmark, at 2.6 µg/ml), or a polyclonal anti-hPL (A0137, DAKO<sup>®</sup>, Glostrup, Denmark, at 1.6 µg/ml) was then applied (table 1), followed by fluorescein isothiocyanate-labeled goat anti-mouse IgG, or fluorescein isothiocyanate-labeled goat anti-rabbit IgG (Jackson Immuno Research, Baltimore, USA at 1:150), or Alexa 488-labeled donkey anti rabbit (Molecular probes Inc, OR, USA at 1:400), or Texas red labeled donkey anti goat (Jackson Immuno Research, Baltimore, USA at 1:400), or Cy<sup>TM3</sup> goat anti-rabbit IgG, as previously described (Frendo et al., 2001). The controls, which consisted of omitting the primary antibody or applying the non specific IgG of the same isotype, were all negative.

### ***Immunoblotting***

Cell extracts were prepared as previously described (Alsat et al., 1996). Protein (70 µg) was solubilized in RIPA (radioimmunoprecipitation) buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% Triton X100, 1% deoxycholate, 0.1% SDS, pH: 8), and stained markers were submitted to 7.5% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose sheets. Membranes were immunoblotted with two polyclonal antibodies against LH/CG-R, LHR-K15 (goat anti human, Santa Cruz Biotechnology Inc, CA, USA) and LHR-H50 (rabbit anti human, Santa Cruz Biotechnology Inc, CA, USA) at 2 µg/ml each, and the specific band was revealed by chemiluminescence (West Pico Chemiluminescent, Pierce, Rockford, IL, USA) after incubation with an anti-goat or anti-rabbit peroxidase-coupled antibody (Jackson Immuno Research, Baltimore, USA). To detect actin, cytokeratin 7, hCG and hPL, we proceeded as described above, except that proteins were immunoblotted with rabbit polyclonal antibody at 0.7 µg/ml for actin (Sigma-Aldrich, MO, USA), rabbit polyclonal antibody at 0.4 µg/ml for hCG and 0.32 µg/ml for hPL (DAKO<sup>®</sup>, Glostrup, Denmark) and mouse monoclonal antibody at 0.5 µg/ml for cytokeratin 7 (DAKO<sup>®</sup>, Glostrup, Denmark). Successive pre-adsorptions of LH/CG-R antibody with trophoblastic cells in culture abrogate LH/CG-R immunodetection in western-blot analysis.



### ***Immunoprecipitation and ligand blotting***

Protein G Plus-Agarose (Immuno precipitation Reagent, Santa Cruz Biotechnology Inc, CA, USA) was pre-mixed with a polyclonal antibody against human LHCG-R (K15, Santa Cruz Biotechnology Inc, CA, USA), or without antibody. Cells ( $1.0 \times 10^6$ /well) were seeded in six-well plates and cultured as previously described. After 24 hours of culture, cells were washed with PBS and scraped free in ice-cold RIPA buffer. After sonication, the cellular lysate and debris were separated by centrifugation at 10000 g for 10 min at 4°C. The supernatant was transferred to the protein G-anti-human LHCG-R immunocomplex and incubated overnight at 4°C on a rocker platform, followed by four washes in RIPA buffer. Protein was eluted by heating at 60°C for 10 min in 1X electrophoresis sample buffer (Bio-Rad laboratories, CA, USA). Aliquots were submitted to 7.5% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were exposed to antibody as previously described, or the blots were incubated with  $^{125}\text{I}$ -hCG at  $10^{-11}$  M (PerkinElmer Life and Analytical Sciences Inc. MA, USA) for 16 h at 4°C in the absence or presence of excess unlabeled hCG at  $10^{-6}$  M (Organon SA, Puteaux, France). The blots were washed with PBS containing 0.1% Tween 20, then dried. Bound  $^{125}\text{I}$ -hCG was visualized by autoradiography and analyzed by Cyclone (Storage phosphorImaging System, Hewlett Packard, France).

### ***RNA extraction***

Total RNA was extracted from trophoblastic cells after 24 or 72 hours of culture by using the Trizol reagent (Invitrogen Life Technologies, CA, USA) and was stored at -80°C or at -20°C in 75% ethanol until use. The total RNA concentration was determined at 260 nm and RNA integrity was checked in 1% agarose gel. The relative LH/CG-R mRNA levels were determined by semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). The transcript level was normalized to the actin mRNA level (endogenous control).

### ***RT-polymerase chain reaction***

RNA samples were pretreated with DNase I using the RQ1 RNase-Free DNase kit (Promega Inc, WI, USA). Briefly, we used 5 units of RQ1 RNase-free DNase per 5 micrograms of RNA, we then added

RQ1 RNase-free 10x reaction buffer and TE buffer. Mixture was incubated at 37°C for 30 min and the digestion was terminated by the RQ1 DNase stop solution. DNase was then inactivated by heating at 65°C for 10 min.

Complementary DNA was synthesized from 5 µg of total RNA. The reaction mixture had a final volume of 20 µl and contained 375 mM KCl, 250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 M DTT, 40 U of RNAsin®, 200 U of reverse transcriptase Superscript II (Invitrogen Life Technologies, CA, USA), 10 mM each dNTP and 200 ng of random primers (Invitrogen Life Technologies, CA, USA). Mixture of total RNA, DTT and random primers was heat at 65°C for 5 min. Annealing was run for 10 min at 25°C and primer extension for 50 min at 42°C. An aliquot of the reaction mixture (5 µl) was then made up to 45 µl with Taq polymerase buffer containing 1 unit of Taq polymerase Platinum (Invitrogen Life Technologies, CA, USA). Before heating to 94°C (hot-start), 50 pmol of each specific primer was added. Amplification was run for 40 cycles for LH/CG-R and for 20 cycles for actin, consisting of 1 min at 94°C (denaturation), 1 min at 55°C (annealing) and 1 min at 72°C (extension). Oligonucleotide primers specific for the coding sequence of LH/CG-R (NM\_000233) were used (Fig. 3A): P1 (+): 5'-CAAGCTTTCAGAGGACTTAATGAGGTC-3'; P1 (-): 5'-AAAGCACAGCAGTGGCTGGGGTA-3'; P2 (+): 5'-TCGACTATCACTTGCCCTACC-3'; P2 (-): 5'-GGAGAAGACCTTCGTAACAT-3'; Actin (NM\_001101) (+): 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3'; Actin (-): 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTTC-3'. Amplified products were analyzed by electrophoresis on 1.8% agarose gels and visualized by ethidium bromide staining.

#### ***Cloning and DNA sequencing of LH/CG-R from trophoblastic cells***

PCR products were eluted from agarose gel by using the Macherey Nagel kit (NucleoSpin Extract II, MN, Hoerd, France) and purified DNA fragments were cloned into the pCRII-TOPO vector by using the TOPO-TA Cloning kit (Invitrogen Life Technologies, CA, USA). Positive clones were selected by PCR and were sequenced by Genome Express (Meylan, France). Both strands of DNA fragments were sequenced, using M13 reverse and M13 forward primers.

### ***Intracellular cAMP determination***

Cells ( $1.0 \times 10^6$ /well) were seeded in six-well plates and cultured as described above. After 24 h or 72 h, cells were preincubated with 10mM IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine) for 1 hour to prevent cAMP degradation and were stimulated for 20 min with  $10^{-8}$  M hCG (C6322, Sigma-Aldrich, MO, USA). Cells were frozen on dry ice and cAMP was extracted with ice-cold 65% ethanol. The extracts were dried and kept at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use. Cyclic AMP was assayed after acetylation by using a method (Amersham Biosciences, NJ, USA) based on the competition between unlabelled cAMP and a fixed quantity of  $^{125}\text{I}$ -labelled cAMP for binding to a cAMP-specific antibody. Bound antibody was separated from free fraction by magnetic separation with a second antibody Amerlex<sup>TM</sup>-M preparation that is bound to magnetizable polymer particles. Separation of the antibody bound fraction is effected either by magnetic separation of the Amerlex<sup>TM</sup>-M suspension or decantation of the supernatant. The concentration of unlabelled cAMP in the sample was then determined by interpolation from a standard curve.

### ***Binding assay and Scatchard analyses***

Trophoblastic cells ( $1.0 \times 10^6$ /well) were seeded in six-well plates and cultured as described above. After 24 h or 72 h of culture the cells were washed five times and cultured in DMEM, 0.1% BSA for 2 hours to dissociate any bound endogenous hCG. The cells were then washed and placed in 1 ml of DMEM containing 0.1% BSA and 1 mM HEPES, pH 7.3. Cells were incubated for 30 min at room temperature with 0.5 nM  $^{125}\text{I}$ -hCG and an increasing concentration of unlabelled hCG (from  $10^{-12}$  M to  $10^{-8}$  M, C6322, Sigma-Aldrich, MO, USA) on a shaker platform at 50 cycles/min. At the end of the incubation period the cells were washed and scraped free, and bound radioactivity was counted. Each assay was performed in triplicate. Data were analyzed by using the LIGAND fitting program (version 4.97) (Munson and Rodbard, 1980). For Scatchard analysis, the results showing the number of labeled molecules associated with the cellular membrane were expressed in a number of molecule associated per seeded cells. For comparison between CT and ST experiments, nuclei were counted at 24h and 72h of culture after staining with DAPI, as previously described in the immunocytochemistry section.

We did not observe difference between the number of nuclei at 24h and 72h of culture (CT are non proliferative cells and apoptosis or cellular loss account for about 4% (data not shown).

<sup>125</sup>I-labeled hCG was prepared using chloramine T as oxidant (Hunter and Greenwood, 1962). In a final volume of 20  $\mu$ l, hCG (5  $\mu$ g, 4.4  $\mu$ M) was added to 0.5 mCi of Na<sup>125</sup>I (Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences, MA, USA; 17.4 Ci/mg, 11.5  $\mu$ M) neutralized with 0.1 M Mops and poly(ethylene glycol) 1000 (1%). The reaction in 25 mM Mops buffer pH 7.2 was started by adding 100  $\mu$ M chloramine-T for 3 min at room temperature and was stopped by adding 120  $\mu$ M sodium bisulfite for 3 min and 2 mM NaI for 1 min. The volume was then adjusted to 0.5 ml with Mops-buffered saline (20 mM Mops, 130 mM NaCl, pH 7.2) containing 1 mg/ml BSA. Iodinated-hCG was desalted on a PD10 Sephadex G25-M column in the same buffer. Specific activity of <sup>125</sup>I-hCG was 2.1-2.4 Ci/ $\mu$ mole corresponding to about 1 atom of iodine per molecule hCG.

### ***Statistical analysis***

We used the StatView F-4.5 software package (Abacus Concepts, Inc., CA, USA). Values are reported as means  $\pm$  SEM. Significant differences ( $p < 0.05$ ) were identified by analysis of variance (ANOVA).

## RESULTS

### ***Human villous trophoblast differentiation in vitro***

We used the primary cell culture model of villous cytotrophoblasts isolated from term placenta (Kliman et al., 1986; Alsat et al., 1991). Figure 1 shows purified cytotrophoblasts cultured on plastic dishes for 24 and 72 hours. Mononuclear cytotrophoblasts fused and formed multinucleated syncytiotrophoblasts, 72 hours after plating (Kliman et al., 1986). Syncytiotrophoblast formation was associated with a significant increase in hCG and hPL levels in the culture medium (Fig. 1 I). Concomitantly, immunostaining for hCG (Fig. 1 A and B) and hPL (Fig. 1 F and H) showed an increase in intensity during *in vitro* syncytiotrophoblast formation. HPL, expressed mainly by the syncytiotrophoblast (Handwerger, 1991), was detected by immunostaining at 72 h (Fig. 1 D and H)

but not at 24 h (Fig. 1 C and F). Immunostaining of cytokeratin 7, expressed by trophoblastic cells (Blaschitz et al., 2000), was positive at 24 h (Fig. 1 C and E) and 72 h (Fig. 1 D and G).

These results showed that differentiation of isolated cytotrophoblasts into a syncytiotrophoblast is associated with an increase in the expression and secretion of hCG and hPL, hormones mainly synthesized by the syncytiotrophoblast.

### ***Decrease in LH/CG-R protein levels during in vitro trophoblast differentiation***

As shown in figures 2 A and B, LH/CG-R was expressed by cultured cytotrophoblasts. The LH/CG-R immunostaining shown in this figure was obtained with the polyclonal antibody LHR-K15. Another antibody (LHR-H50) gave the same results (data not shown). LH/CG-R was expressed in both cytotrophoblasts (24 h) and syncytiotrophoblasts (72 h), with punctuate immunolabeling. LH/CG-R immunostaining appeared stronger in cytotrophoblasts than in syncytiotrophoblasts. Double immunostaining for LH/CG-R (LHR-50) and hCG (C-20) of trophoblasts cultured for 48 hours (Fig. 2 C and D respectively, merge Fig. 2 E) illustrated the dynamics of the process. A mononucleated cytotrophoblast (Fig. 2 C arrow head) expressed LH/CG-R, whereas aggregated trophoblasts showed and heterogenous immunostaining of both LH/CG-R and hCG (Fig. 2 E). To validate this observation, western-blot analysis was performed on extracts of cytotrophoblasts (24 h) and syncytiotrophoblasts (72 h) (Fig. 3 A). At 24 h and 72 h of culture, two major bands with molecular masses (estimated from SDS gels) of 65-75 kDa and 85-95 kDa were observed, as described in other cellular models and in mammalian cells transfected with LH/CG-R cDNA. In the literature, the 85-95 kDa band corresponds to the mature LH/CG-R present at the cell surface, and the 65-75 kDa band is the precursor of the cell-surface receptor (for review see Ascoli et al., 2002).

Our results show that the expression of the mature LH/CG-R and its precursor (respectively designated m and p in Fig. 3 A) decreases during cytotrophoblast differentiation. At the same time, actin expression remains constant. Normalization of mature LH/CG-R protein expression to actin expression showed a significant decrease ( $58.6 \pm 6.7\%$ ;  $p < 0.0001$ ) in cell-surface receptor expression. We obtained similar results with the two antibodies used (LHR-K15 and LHR-H50).

Interestingly, in the same cellular extracts, the decrease in precursor and mature LH/CG-R expression coincided with an increase in hCG and hPL expression (Fig. 3 A).

To further characterize LH/CG-R expression during trophoblast differentiation, we performed immunoprecipitation (IP) with anti-human LH/CG-R antibody (K15). Cellular extracts were purified by immobilized anti-receptor antibody (IP) and eluates were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting using the receptor-specific antibody (K15). A 90 kDa band corresponded to the mature form of LH/CG-R (m), and a major band of 75 kDa corresponded to the precursor (p).

To determine which molecular form of the receptor bound the hormone, we used  $^{125}\text{I}$ -hCG in ligand-blot experiments (Fig. 3 B). Incubation of the IP blot with  $^{125}\text{I}$ -hCG ( $10^{-11}\text{M}$ ) revealed a major band of 90 kDa. This band was absent when the blot was incubated with an excess of unlabeled hCG ( $10^{-6}\text{M}$ ), showing that the 90-kDa LH/CG-R specifically binds the hormone. In these conditions,  $^{125}\text{I}$ -hCG binding to the mature form of the receptor (90 kDa) was lower in the syncytiotrophoblast than in cytotrophoblasts.

#### ***Decrease in LH/CG-R mRNA expression during in vitro trophoblast differentiation***

We conducted semi-quantitative RT-PCR experiments with two different sets of primers (P1 and P2) (for primer positions see Fig. 4 A). To avoid contamination by genomic DNA, each primer was located on a separate exon and RNA extracts were pretreated with DNase I.

As shown in figure 4 B, amplification of the 647-bp and 282-bp fragments, obtained with primers P1 and P2 respectively, indicated that LH/CG-R mRNA was significantly less abundant in the syncytiotrophoblast (72 h) than in cytotrophoblasts (24 h). No significant difference was noted in the actin mRNA level. We obtained similar results with the two sets of primers. The amplification products were then purified from the agarose gel and cloned into the pCRII-TOPO vector. Sequencing confirmed that both the 647-bp and 282-bp fragments were part of the human LH/CG receptor. Normalization of LH/CG-R mRNA to actin mRNA after RT-PCR with primer sets P1 and P2 showed a significant decrease in LH/CG-R mRNA levels during differentiation (Fig. 4 C). With the P1 primers, LH/CG-R mRNA levels fell from  $0.33 \pm 0.01$  at 24 h to  $0.13 \pm 0.01$  at 72 h ( $p < 0.0001$ ). A similar decrease was observed with the P2 primers (from  $0.82 \pm 0.02$  at 24 h to  $0.36 \pm 0.01$  at 72 h;  $p <$

0.0001). Although the amplification product obtained with primers P2 appeared to be at least twice as abundant as that obtained with primers P1 (probably because the P2 amplicon is about half the length of the P1 amplicon), the size of the decrease in LH/CG-R levels at 72 h was similar with the two primer sets (respectively 2.5- and 2.3-fold).

#### ***Decrease in <sup>125</sup>I-hCG binding to cell-surface LH/CG-R during in vitro trophoblast differentiation***

To confirm the decrease in LH/CG-R mRNA and protein levels, we performed binding saturation experiments with iodinated hCG at 24 h and 72 h of culture (Fig. 5). Scatchard analysis of binding data showed that the number of molecules bound per seeded cell at 24 h of culture (cytotrophoblasts) was 3511±693. After differentiation, at 72 h of culture, this number fell significantly (p=0.02) to 929±583. No significant difference in K<sub>d</sub> values was observed between 24 h (0.5±0.1 nM) and 72 h (0.4±0.1 nM).

#### ***LH/CG-R stimulation during in vitro trophoblast differentiation***

In order to confirm the reduction in functional mature hCG receptor expression at the syncytiotrophoblast surface compared to the cytotrophoblast surface, we determined cAMP production in response to an effective hCG concentration for 20 min (Fig. 6). As cAMP is a second messenger for hCG signaling in trophoblastic cells, the decrease in LH/CG-R transcript and protein levels ought to be associated with a decrease in cAMP production. Determination of the most effective hCG concentration was carried out by stimulating trophoblasts with 10<sup>-12</sup> M to 10<sup>-6</sup> M hCG; 10<sup>-8</sup> M hCG was the most effective concentration (data not shown). As shown in figure 6, hCG-stimulated cAMP production by trophoblasts was higher at 24 h than at 72 h of culture (p= 0.0021). Trophoblast stimulation by hCG (10<sup>-8</sup> M) at 24 h of culture induced at least a 2-fold increase in cAMP production compared to the basal level (p= 0.0016), but did not induce detectable cAMP production at 72 h of culture (p= 0.7644). In contrast, epinephrine (which stimulates cAMP production and is used as a positive control) induced similar cAMP production at 24 h and 72 h of culture, indicating that the cells were functional and that the decrease in cAMP production observed at 72 h was not due to a defective cAMP pathway.

### ***Immunolocalization of LH/CG-R in villous sections***

These *in vitro* findings were confirmed by examining placental LH/CG-R expression *in situ*, on villous sections. First-trimester placenta was chosen because cytotrophoblasts are more abundant than at other stages of pregnancy and form a continuous layer.

LH/CG-R was detected in villous cytotrophoblasts and syncytiotrophoblasts. Use of a polyclonal antibody raised against the extracellular domain of human LH/CG-R showed that LH/CG-R is mainly expressed by the cytotrophoblast layer (Fig. 7 A). Weaker staining was observed in the syncytiotrophoblast (ST). LH/CG-R was also expressed by perivascular cells (VC) of the villous core. We obtained similar results with two other monoclonal antibodies (LHR 29 and LHR 1055) which recognize two different epitopes of the extracellular domain of LH/CG-R (Vuhai et al., 1990; Méduri et al. 1997) (data not shown). No staining was detected in negative control sections (Fig. 7 D). Interestingly, strong hCG immunostaining was observed in the syncytiotrophoblast (Fig. 7 B) while cytokeratin 7 was mainly located in the cytotrophoblast layer (Fig. 7 C).

Taken together, these results strongly suggest that the expression of a functional cell-surface LH/CG-R decreases during cytotrophoblast differentiation into a syncytiotrophoblast.

## DISCUSSION

By using several complementary methods and a well-characterized *in vitro* model of human villous trophoblast differentiation, we clearly observed that LH/CG-R mRNA and protein expression is lower in syncytiotrophoblasts than in cytotrophoblasts and that this down-regulation is associated with an apparent decrease of receptor activation by its specific hormone. These results differ from those of two previous studies published by CV. Rao, who described stronger expression of LH/CG-R in syncytiotrophoblasts than in cytotrophoblasts (Reshef et al., 1990; Lei and Rao, 1992). This divergence may come from the use of different tools. Anti-human LH/CG-R antibodies were not available in the early 1990s, and most immunohistochemical and western-blotting studies used



antibodies raised against the N-terminal part of the rat LH/CG receptor. The amino acid sequence identity between the rat and human receptors is 85%, with the strongest similitude in the transmembrane portion of the molecule and not in the N-terminal region (Segaloff and Ascoli, 1993). Moreover, experiments involving radiolabeled probes, such as northern blotting and *in situ* hybridization, used porcine cDNA with 88% sequence identity to the human sequence. In this study, we cloned PCR fragments of the human hCG/LH receptor from villous cytotrophoblasts and used antibodies specific for the human receptor.

HCG, which is produced in large amounts by the syncytiotrophoblast, plays an important role in cytotrophoblast differentiation into syncytiotrophoblast. An increasing number of studies have investigated the central role of hCG and its receptor in the trophoblastic differentiation process. Many authors have described down-regulation of LH/CG-R expression by increasing concentrations of hCG. Indeed, exposure of ovarian or testicular cells expressing the endogenous LH/CG-R to a high concentration of hCG down-regulates cell-surface receptor expression. This coincides with a decrease in the abundance of LH/CG-R transcripts (Segaloff et al., 1990; Peegel et al., 1994; Hoffman et al., 1991; LaPolt et al., 1990; Hu et al., 1990). It is noteworthy in this respect that hCG is secreted in large amounts during syncytiotrophoblast formation. The decrease in cell-surface receptor expression was confirmed in our study by the clear decrease in cAMP production by the syncytiotrophoblast after stimulation by recombinant hCG. Interestingly, the decrease in cAMP production by the syncytiotrophoblast was not due to a loss of affinity or to weak binding between the receptor and its hormone, as we found no difference in LH/CG-R K<sub>d</sub> values between 24 h and 72 h of culture. Moreover, Scatchard plots clearly showed that the maximum number of hCG molecules bound per seeded cell was significantly lower at 72 h of culture than at 24 h (~74%). This result confirms the decrease of LH/CG-R (~60%) observed by western-blot analysis. The difference in LH/CG-R decrease (60% *versus* 74%) may be due to the technical approaches used for the purpose. By western-blot analysis, we quantified the mature form of the LH/CG-R in proteins from total cellular extracts. In binding experiments, we used living cells, meaning that only the mature form of the LH/CG-R present at the cell surface was quantified. Some mature forms internalized or present in the endosome might not be accessible to <sup>125</sup>I-hCG.

LH/CG-R desensitization has been described in rat ovary and is accompanied by a transient loss of responsiveness to LH, the receptor being temporarily uncoupled from its Gs protein (Segaloff et al., 1990). We observed here that syncytiotrophoblast stimulation by recombinant hCG ( $10^{-8}$  M) did not induce detectable cAMP production although the cAMP pathway was functional as shown by epinephrine stimulation. This loss of responsiveness to recombinant hCG may thus be due in part to cell-surface receptor desensitization.

Western blotting showed that two major species of LH/CG-R with molecular masses of 65-75 kDa and 85-95 kDa were expressed by cytotrophoblasts and by syncytiotrophoblasts. Immunoprecipitation experiments and ligand blot analysis confirmed that the 65-75 kDa band was the intracellular precursor of the cell-surface receptor and that the 85-95 kDa band corresponded to mature LH/CG-R present at the cell surface, as shown by its ability to bind specifically labeled  $^{125}\text{I}$ -hCG. Our results show that the expression of the mature LH/CG-R and its intracellular precursor decreased during cytotrophoblast differentiation. Furthermore, the precursor form seemed to be more strongly expressed than the mature form in trophoblastic cells. Most studies of these two forms of LH/CG-R have used mammalian cells transfected with the cDNA for the porcine, rat or human receptor (for review see Ascoli and al., 2002), but as shown here, primary cultured human trophoblasts may be an excellent model for studying the maturation of the intracellular precursor into the mature cell-surface protein. Recently, Pietila et al using transfection models have shown that regulation of the immature form into the mature form might be considered important in LH/CG-R expression (Pietila et al., 2005).

In this study, we characterized for the first time, in a human physiological model, the expression and regulation of LH/CG-receptor. We demonstrate, both *in situ* and *in vitro*, that LH/CG-R is expressed by human cytotrophoblasts and, albeit to a lesser extent, by the syncytiotrophoblast. LH/CG-R expression thus seems to be regulated during villous trophoblast differentiation, and this regulation may involve down-regulation of the receptor by its ligand. Abnormal regulation of this process might be involved in trisomy 21-associated pregnancies, in which we recently observed an abnormal glycosylated form of hCG associated with defective syncytiotrophoblast formation (Frendo et al., 2000b, 2004). Abnormal syncytiotrophoblast formation might lead to complications such as preeclampsia and intrauterine growth retardation.

## REFERENCES

- Alsat E, Cedar L. 1974. Mise en évidence d'une fixation spécifique de gonadotrophine chorionique humaine radio-iodée dans les tranches de placentas humains. *C. R. Acad. Sc. Paris* 278:2665-2668.
- Alsat E, Haziza J, Evain-Brion D. 1993. Increase in epidermal growth factor receptor and its messenger ribonucleic acid levels with differentiation of human trophoblast cells in culture. *J Cell Physiol* 154:122-128.
- Alsat E, Mirlesse V, Fondacci C, Dodeur M, Evain-Brion D 1991. Parathyroid hormone increases epidermal growth factor receptors in cultured human trophoblastic cells from early and term placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 73:288-294.
- Alsat E, Wyplosz P, Malassiné A, Guibourdenche J, Porquet D, Nessmann C, Evain-Brion D 1996. Hypoxia impairs cell fusion and differentiation process in human cytotrophoblast, in vitro. *J Cell Physiol* 168:346-353.
- Aplin J. 1991. Implantation, trophoblast differentiation and haemochorial placentation: mechanistic evidence in vivo and in vitro. *J Cell Sci* 99:681-692.
- Ascoli M, Fanelli F, Segaloff DL. 2002. The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective. *Endocr Rev* 23:141-174.
- Benirschke K, Kaufmann P. 2000. *Pathology of the human placenta*. New-York: Springer-Verlag.
- Blaschitz A, Weiss U, Dohr G, Desoye G. 2000. Antibody reaction patterns in first trimester placenta: implications for trophoblast isolation and purity screening. *Placenta* 21:733-741.
- Bo M, Boime I 1992. Identification of the transcriptionnally active genes of the chorionic gonadotrophin beta gene cluster in vivo. *J Biol Chem* 267:3179-3184.
- Boyd J, Hamilton W. 1970. *The human placenta*. Heffer and Sons, Cambridge.
- Cronier L, Bastide B, Herve JC, Deleze J, Malassine A. 1994. Gap junctional communication during human trophoblast differentiation: influence of human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 135:402-408.

- Cronier L, Defamie N, Dupays L, Theveniau-Ruissy M, Goffin F, Pointis F, Malassiné A. 2002. Connexin expression and gap junctional intercellular communication in human first trimester trophoblast. *Mol Hum Reprod* 8:1005-1013.
- Feinman MA, Kliman HJ, Caltabiano S, Strauss JF 3rd. 1986. 8-Bromo-3',5'-adenosine monophosphate stimulates the endocrine activity of human cytotrophoblasts in culture. *J Clin Endocrinol Metab* 63:1211-1217.
- Frendo J-L, Cronier L, Bertin G, Guibourdenche J, Vidaud M, Evain-Brion D, Malassine A. 2003a. Involvement of connexin 43 in human trophoblast cell fusion and differentiation. *J Cell Sci* 116:3413-3421.
- Frendo J-L, Olivier D, Cheynet V, Blond J-L, Vidaud M, Rabreau M, Evain-Brion D, Mallet F. 2003b. Direct involvement of HERV-W Env glycoprotein in human trophoblast cell fusion and differentiation. *Mol Cell Biol* 23:3566-3574.
- Frendo J-L, Guibourdenche J, Pidoux G, Vidaud M, Luton D, Giovangrandi Y, Porquet D, Muller F, Evain-Brion D. 2004. Trophoblast production of a weakly bioactive human chorionic gonadotropin in trisomy 21-affected pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 89:727-732.
- Frendo J-L, Théron P, Bird T, Massin N, Muller F, Guibourdenche J, Luton D, Vidaud M, Anderson WB, Evain-Brion D. 2001. Overexpression of copper zinc superoxide dismutase impairs human trophoblast cell fusion and differentiation. *Endocrinology* 142:3638-3648.
- Frendo J-L, Théron P, Guibourdenche J, Bidart J-M, Vidaud M, Evain-Brion D. 2000a. Modulation of copper/zinc Superoxide Dismutase expression and activity with in vitro differentiation of human villous cytotrophoblast. *Placenta* 21:773-781.
- Frendo J-L, Vidaud M, Guibourdenche J, Luton D, Muller F, Bellet D, Giovagranti Y, Tarrade A, Porquet D, Blot P, Evain-Brion D. 2000b. Defect of villous cytotrophoblast differentiation into syncytiotrophoblast in Down's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 85:3700-3707.
- Garcia-Lloret MI, Morrish DW, Wegmann TG, Honore L, Turner AR, Guilbert LJ. 1994. Demonstration of functional cytokine-placental interactions: CSF-1 and GM-CSF stimulate human cytotrophoblast differentiation and peptide hormone secretion. *Exp Cell Res* 214:46-54.

- Getsios S, MacCalman CD. 2003. Cadherin-11 modulates the terminal differentiation and fusion of human trophoblastic cells in vitro. *Dev Biol* 257:41-54.
- Gudermann T, Birnbaumer M, Birnbaumer L. 1992. Evidence for dual coupling of the murine luteinizing hormone receptor to adenylyl cyclase and phosphoinositide breakdown and Ca<sup>2+</sup> mobilization. Studies with the cloned murine luteinizing hormone receptor expressed in L cells. *J Biol Chem* 267:4479-4488.
- Handsuh K, Guibourdenche J, Tsatsaris V, Guesnon M, Laurendeau I, Evain-Brion D, Fournier T. 2006. Human Chorionic Gonadotropin expression in human trophoblasts from early placenta: comparative study between villous and extravillous trophoblastic cells. *Placenta* in press.
- Handwerger S. 1991. The physiology of placental lactogen in human pregnancy. *Endocrinology* 12:329-336.
- Hipkin RW, Sanchez-Yague J, Ascoli M. 1992. Identification and characterization of a luteinizing hormone/chorionic gonadotropin (LH/CG) receptor precursor in a human kidney cell line stably transfected with the rat luteal LH/CG-R complementary DNA. *Mol Endocrinol* 6:2210-2218.
- Hoffman YM, Peegel H, Sprock MJ, Zhang QY, Menon KM. 1991. Evidence that human chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptor down-regulation involves decreased levels of receptor messenger ribonucleic acid. *Endocrinology* 128:388-393.
- Hoshina M, Boothby M, Hussa R, Pattillo R, Camel HM, Boime I. 1985. Linkage of human chorionic gonadotrophin and placental lactogen biosynthesis to trophoblast differentiation and tumorigenesis. *Placenta* 6:163-172.
- Hu ZZ, Tsai-Morris CH, Buczko E, Dufau ML. 1990. Hormonal regulation of LH receptor mRNA and expression in the rat ovary. *FEBS Lett* 274:181-184.
- Hunter WM, Greenwood FC. 1962. Preparation of iodine-131 labeled human growth hormone of high specific activity. *Nature* 194:495-496.
- Keryer G, Alsat E, Tasken K, Evain-Brion D. 1998. Cyclic AMP-dependent protein kinases and human trophoblast cell differentiation in vitro. *J Cell Sci* 111:995-1004.

- Kliman H, Nestler J, Sermasi E, Sanger J, Strauss III J. 1986. Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinology* 118:1567-1582.
- LaPolt PS, Oikawa M, Jia XC, Dargan C, Hsueh AJ. 1990. Gonadotropin-induced up- and down-regulation of rat ovarian LH receptor message levels during follicular growth, ovulation and luteinization. *Endocrinology* 126:3277-3279.
- Lei ZM, Rao CV. 1992. Gonadotropin receptors in human fetoplacental unit: implications for hCG as an intracrine, paracrine and endocrine regulator of human fetoplacental function. *Troph. Res* 6:213-224.
- Loosfelt H, Misrahi M, Atger M, Salesse R, Vu Hai-Luu Thi MT, Jolivet A, Guiochon-Mantel A, Sar S, Jallal B, Garnier J, et al. 1989. Cloning and sequencing of porcine LH-hCG receptor cDNA: variants lacking transmembrane domain. *Science* 245:525-8.
- Lu DL, Peegel H, Mosier SM, Menon KM. 1993. Loss of lutropin/human choriogonadotropin receptor messenger ribonucleic acid during ligand-induced down-regulation occurs post transcriptionally. *Endocrinology* 132:235-40.
- Malassine A, Blaise S, Handschuh K, Lalucque H, Dupressoir A, Evain-Brion D, Heidmann T. 2006. Expression of the Fusogenic HERV-FRD Env Glycoprotein (Syncytin 2) in Human Placenta is Restricted to Villous Cytotrophoblastic Cells. *Placenta* in press.
- McFarland KC, Sprengel R, Phillips HS, Kohler M, Roseblit N, Nikolics K, Segaloff DL, Seeburg PH. 1989. Lutropin-choriogonadotropin receptor: an unusual member of the G protein-coupled receptor family. *Science* 245:494-9.
- Méduri G, Charnaux N, Loosfelt H, Jolivet A, Spyrtatos F, Brailly S, Milgrom E. 1997. Luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptors in breast cancer. *Cancer Res.* 57:857-864.
- Midgley AR, Pierce GB, Denau GA, Gosling JR. 1963. Morphogenesis of syncytiotrophoblast in vivo: an autoradiographic demonstration. *Science* 141:350-351.
- Minegishi T, Nakamura K, Takakura Y, Miyamoto K, Hasegawa Y, Ibuki Y, Igarashi M. 1990. Cloning and sequencing of human LH/hCG receptor cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* 172:1049-1054.

- Morrish DW, Bhardwaj D, Dabbagh LK, Marusyk H, Siy O. 1987. Epidermal growth factor induces differentiation and secretion of human chorionic gonadotropin and placental lactogen in normal human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 65:1282-1290.
- Morrish DW, Bhardwaj D, Paras MT. 1991. Transforming growth factor beta 1 inhibits placental differentiation and human chorionic gonadotropin and human placental lactogen secretion.. *Endocrinology* 129:22-26.
- Munson PJ, Rodbard D. 1980. LIGAND: A versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems. *Anal Biochem* 107:220-239.
- Muyan M, Boime I. 1997. Secretion of chorionic gonadotropin from human trophoblasts. *Placenta* 18:237-241.
- Peechel H, Randolph J Jr, Midgley AR, Menon KM. 1994. In situ hybridization of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor messenger ribonucleic acid during hormone-induced down-regulation and the subsequent recovery in rat corpus luteum. *Endocrinology* 135:1044-1051.
- Pierce JG, Parsons TF. 1981. Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu Rev Biochem* 50:465-495.
- Pietila EM, Tuusa JT, Apaja PM, Aatsinki JT, Hakalahti AE, Rajaniemi HJ, Petaja-Repo UE. 2005. Inefficient maturation of the rat luteinizing hormone receptor. A putative way to regulate receptor numbers at the cell surface. *J Biol Chem* 280:26622-26629.
- Reshef E, Lei ZM, Rao CV, Pridham DD, Chegini N, Luborsky JL. 1990. The presence of gonadotropin receptors in nonpregnant human uterus, human placenta, fetal membranes, and decidua. *J Clin Endocrinol Metab* 70:421-430.
- Richard R. 1961. Studies of placental morphogenesis I. Radioautographic studies of human placenta utilizing tritiated thymidine. *Proc Soc Exp Biol Med* 106:829-831.
- Schmon B, Hartmann M, Jones CJ, Desoye G. 1991. Insulin and glucose do not affect the glycogen content in isolated and cultured trophoblast cells of human term placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 73, 888-893.

- Segaloff DL, Ascoli M. 1993. The lutropin/choriogonadotropin receptor ... 4 years later. *Endocr Rev* 14:324-347.
- Segaloff DL, Wang HY, Richards JS. 1990. Hormonal regulation of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor mRNA in rat ovarian cells during follicular development and luteinization. *Mol Endocrinol* 4:1856-1865.
- Shi QJ, Lei ZM, Rao CV, Lin J. 1993. Novel role of human chorionic gonadotropin in differentiation of human cytotrophoblasts. *Endocrinology* 132:1387-1395.
- Vuhai-Luuthi MT, Jolivet A, Jallal B, Salesse R, Bidart JM, Houllier A, Guiochon-Mantel A, Garnier J, Milgrom E. 1990. Monoclonal antibodies against luteinizing hormone receptor. Immunochemical characterization of the receptor. *Endocrinology* 127:2090-2098.
- Yang M, Lei ZM, Rao ChV. 2003. The central role of human chorionic gonadotropin in the formation of human placental syncytium. *Endocrinology* 144:1108-1120.

#### FOOTNOTES

§ These two authors contributed equally to the work.

\* Corresponding author

We thank Dr Fanny Lewin for her support and the staff of the Saint Vincent de Paul Obstetrics Department for providing us with placentas. This work was supported by la Caisse d'Assurance Maladie des Professions Libérales Province. GP was supported by a fellowship from Conseil Regional d'Ile-de-France, and J-LF by a grant from INSERM (Projet Avenir).



## FIGURE LEGENDS

Fig. 1 ***In vitro* human villous trophoblast differentiation.** (A) and (B): hCG immunodetection after 24 and 72 hours of culture of villous cytotrophoblasts isolated from term placentas. At 24 hours the cells are sparse or aggregated (A). At 72 hours, they have fused to form the syncytiotrophoblast, characterized by multiple nuclei and a strong positive immunofluorescent staining for hCG (B). Nuclei were labeled with DAPI (blue fluorescence). (C) and (D): co-immunolocalization of cytokeratin 7 (in green) and hPL (in red) at 24 hours (C) and 72 hours of culture (D). Nuclei are stained blue with DAPI. HPL, known to be expressed mainly by the syncytiotrophoblast, was detected by immunostaining at 72 h (H) but not at 24 h of culture (F). Cytokeratin 7 immunostaining, was positive at 24 h (E) and 72 h (G). (I): levels of hCG and hPL (expressed respectively in milli-international units per milliliter and micrograms per milliliter of medium) secreted into the culture medium at the indicated times. Since cells were plated in triplicate (see Experimental procedures), hCG and hPL levels were determined for each plate. ND: non detectable. Results are means  $\pm$  SEM of the three culture dishes. This figure illustrates one experiment representative of three. Scale for pictures A-D: 1 cm = 30  $\mu$ m. Scale for pictures E-H: 0.5 cm = 30  $\mu$ m.

Fig. 2 **LH/CG-R immunodetection during *in vitro* trophoblast differentiation.** (A) and (B): immunostaining for LH/CG-R by using the polyclonal antibody LHR-K15 raised against the human LH/CG receptor. LH/CG-R was expressed in both cyto- (A; 24h) and syncytiotrophoblasts (B; 72h), albeit more strongly in cytotrophoblasts. (E): co-immunodetection of LH/CG-R and hCG by using the polyclonal antibodies LHR-H50 (C; in green) and hCG-C20 (D; in red) respectively at 48 hours of culture. Single trophoblast (arrowed) was stained for LH/CG-R and aggregated trophoblasts were stained for both LH/CG-R and hCG. Nuclei were labeled with DAPI (blue fluorescence). Scale for pictures A and B: 0.5 cm = 30  $\mu$ m; scale for pictures C-E: 1 cm = 15  $\mu$ m.

Fig. 3 **LH/CG-R protein expression during *in vitro* trophoblast differentiation.** (A) and (B): Western-blot analyses (A) were performed using the same antibody on extracts from cytotrophoblasts

(24 h) and syncytiotrophoblasts (72 h). At 24 h and 72 h of culture, two major bands with molecular masses of 65-75 kDa, corresponding to the precursor (p) of the cell-surface receptor and 85-95 kDa, corresponding to the mature LH/CG-R (m) present at the cell surface, were observed. The histogram presents the normalization of mature LH/CG-R protein expression (m) by actin expression (43kDa) (\*\*\*:  $p < 0.0001$ ). Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM of three culture dishes. In the same cellular extracts, decrease in precursor and mature LH/CG-R expression was concomitant with an increase in hCG (38kDa) and hPL (22 kDa) expression. **(B):** immuno-precipitation and ligand-blot analysis. Cellular extracts were purified by immobilized anti-receptor antibody. Eluates were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting using the receptor-specific antibody. A 90 kDa band corresponding to the mature form of LH/CG-R (m) and a major band with a molecular mass of 75 kDa corresponding to the precursor (p) were observed. Incubation of the IP blot with labeled  $^{125}\text{I}$ -hCG ( $10^{-11}\text{M}$ ) revealed a major radioactive band at a molecular weight of 90 kDa, which was not detected when the blot was incubated with an excess of unlabeled hCG ( $10^{-6}\text{M}$ ). Figures A and B illustrate one experiment representative of five.

**Fig. 4 LH/CG-R mRNA expression during *in vitro* trophoblast differentiation. (A):** diagram showing the seven transmembrane domains of the LH/CG-receptor and the location of the primers sets used in this study. The two sets of primers (P1 and P2) are located on the extracellular domain. P1 amplifies a fragment of 647-bp in the exons 2-9 and P2 amplifies a fragment of 282-bp in the exons 1-5. **(B):** Ethidium bromide-staining gel of one representative of five independent experiments. Semi-quantitative RT-PCR experiments with both the primers P1 and P2 shows respectively a 647-bp and a 282-bp amplified fragment. RT-PCR products were separated on 1.8% agarose gel and analysed by densitometry. Sequencing confirmed that both the 647-bp and the 282-bp fragments are part of the LH/CG receptor. **(C):** histograms represent the normalization of LH/CG-R mRNA by actin mRNA after RT-PCR with primers sets P1 (upper histogram) and P2 (lower histogram). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of five independent experiments similar to the one shown in B. bp: base pairs; \*\*\*:  $p < 0.0001$ .

**Fig. 5 Scatchard analyses of  $^{125}\text{I}$ -hCG binding to trophoblasts during *in vitro* differentiation.** Binding was performed for 30 minutes at room temperature, on cells at 24 hours ( $\square$ ) or 72 hours ( $\bullet$ ) of culture. The apparent dissociation constants (Kd) and the maximum number of molecules bound per mg of protein at 24 hours and 72 hours of culture were calculated by the LIGAND program (lower table). Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM of three experiments.

**Fig. 6 Intracellular cAMP production after LH/CG-R stimulation during *in vitro* trophoblasts differentiation.** Stimulation of cells at 24 hours and 72 hours of culture was performed with  $10^{-8}$  M of hCG or with epinephrine (used as a positive control) for 20 min and compared to non stimulated cells (0). \*\*:  $p < 0.005$  and \*\*\*:  $p < 0.0001$

**Fig. 7 Immunolocalization of LH/CG-R, hCG and cytokeratin 7 in villous sections. (A):** immunohistochemical staining of LH/CG-R, using the polyclonal antibody (H50) raised against the extracellular domain. Villous cytotrophoblasts (CT), syncytiotrophoblast (ST) and perivascular cells (VC) of the villous core were positively stained. **(B):** a strong immunostaining of hCG was observed in the syncytiotrophoblast. **(C):** immunostaining of cytokeratin 7 was mainly located in cytotrophoblasts layer. **(D):** No staining was observed in control sections treated with non specific isotypic immunoglobulins.

Figure 1

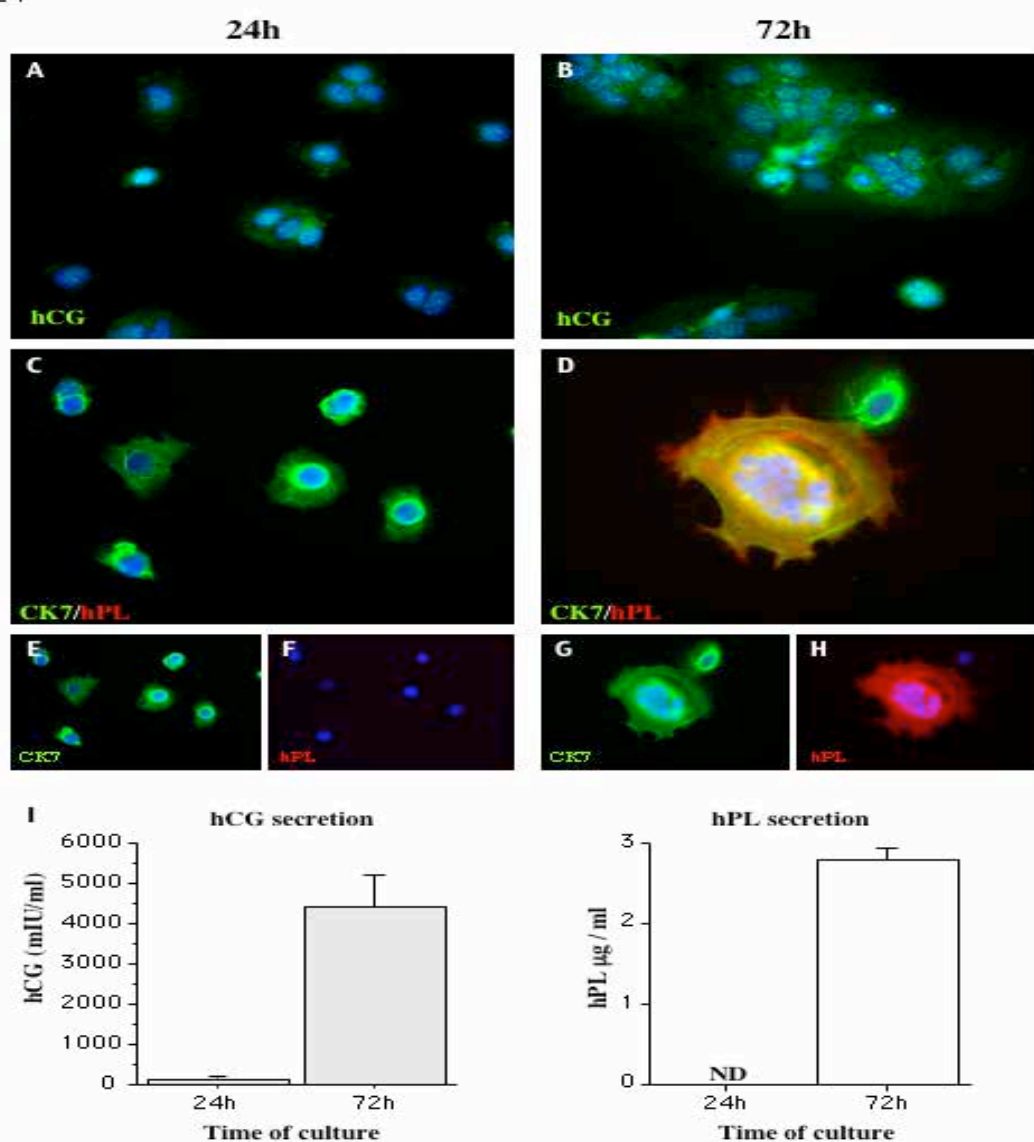


Figure 2

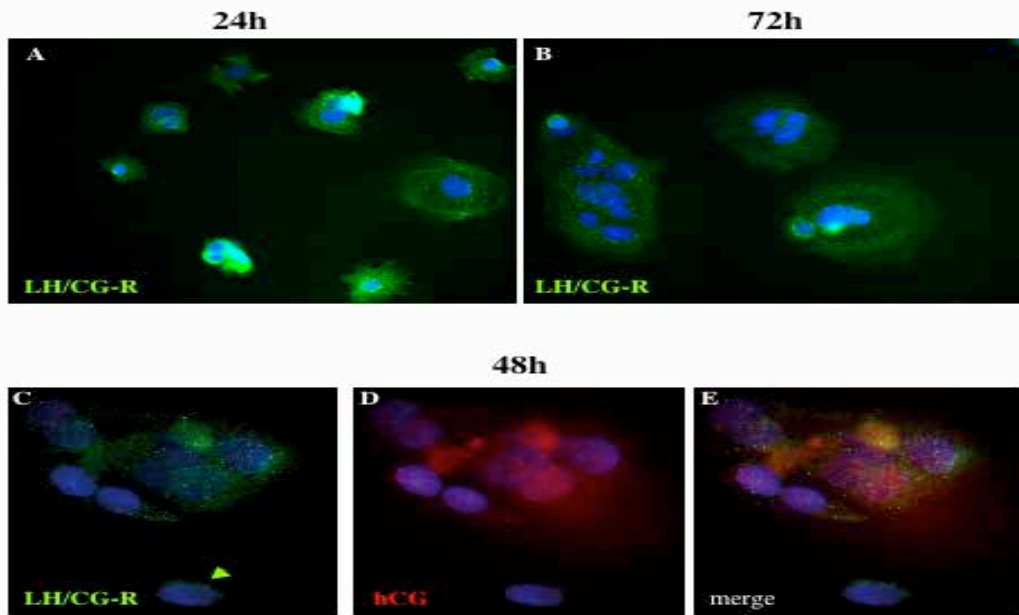


Figure 3

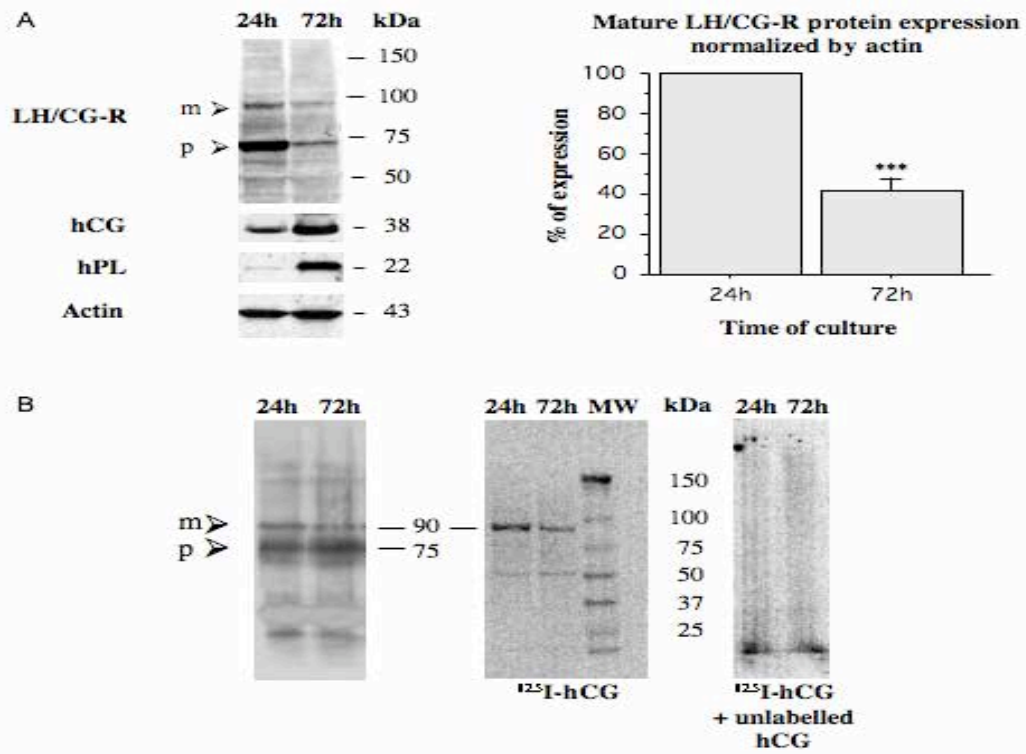


Figure 4

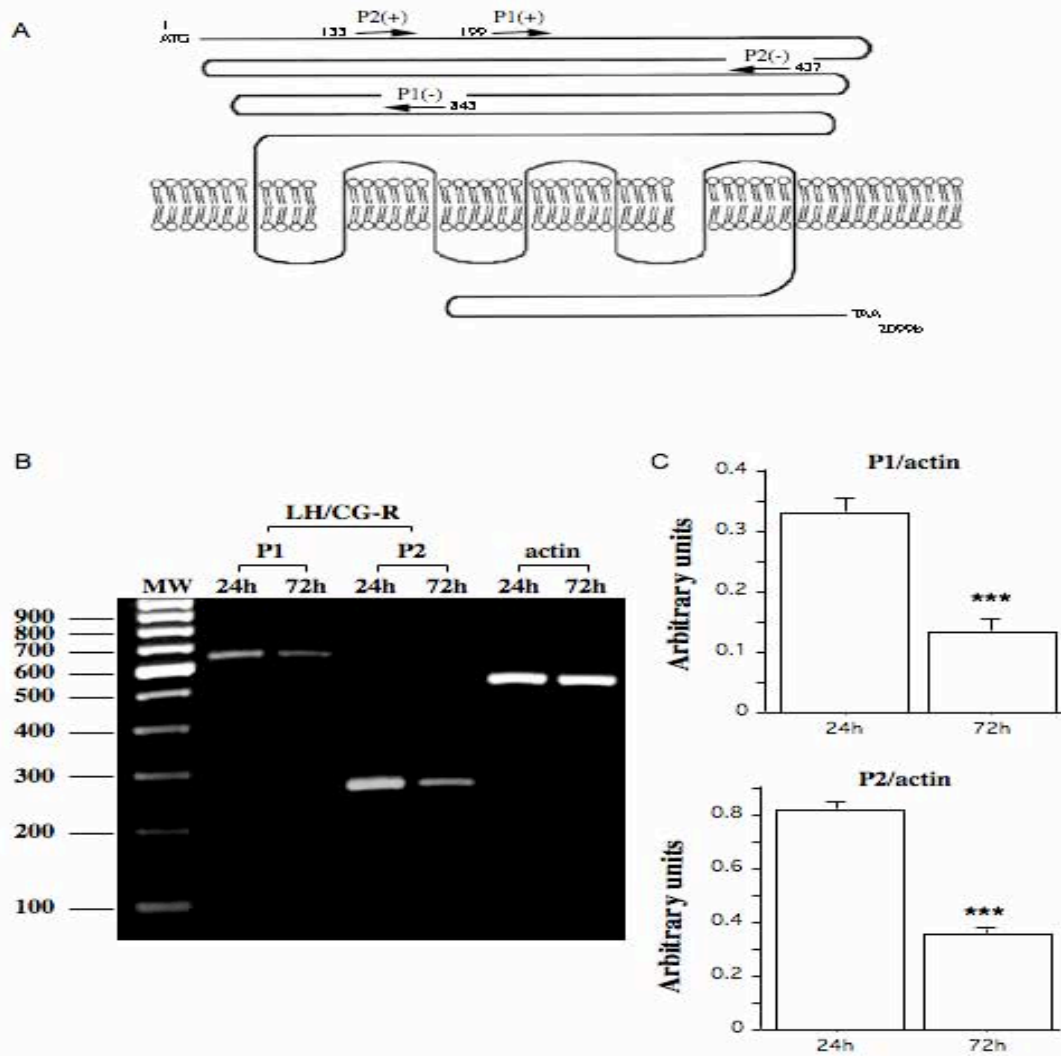
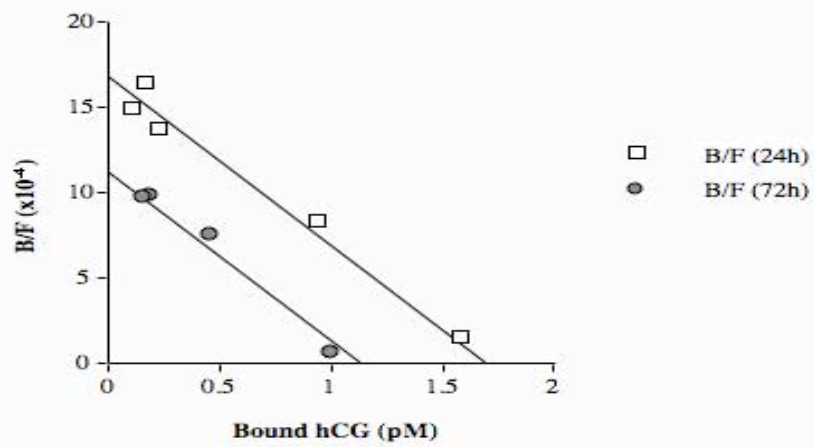


Figure 5



	<b>Kd (nM) ± SEM</b>	<b>Number of molecule associated per seeded cell ± SEM</b>
<b>24h</b>	0.5 ± 0.23	3511 ± 693
<b>72h</b>	0.4 ± 0.13	929 ± 583



Figure 6

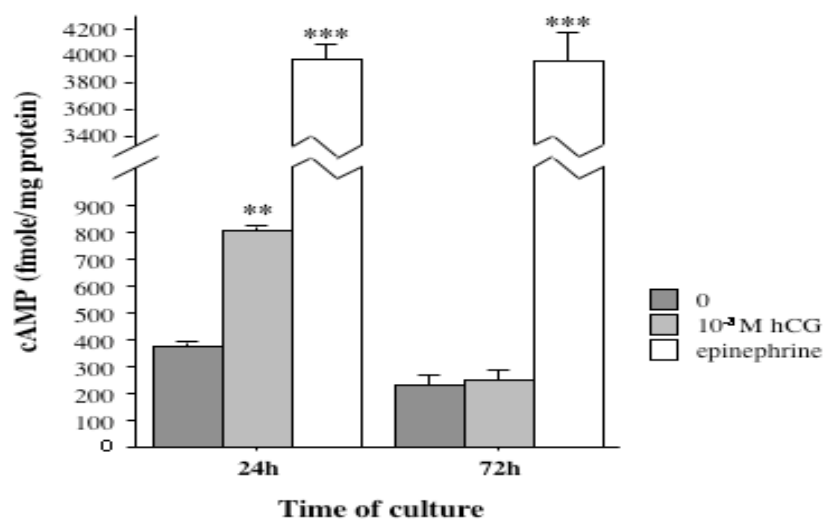


Figure 7

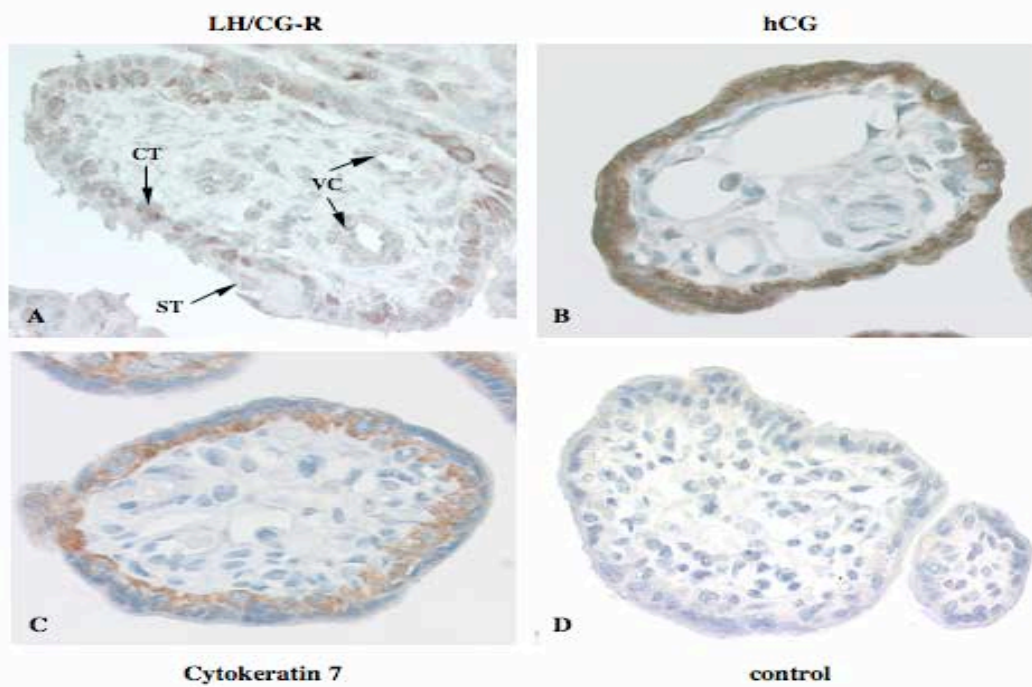


Table 1  
Antibodies used for immunohistochemistry, immunocytochemistry and Western-blot

<b>Antibody</b>	<b>Antigen</b>	<b>Isotype</b>	<b>Species</b>	<b>Source</b>
<b>M7018</b>	Cytokeratin 7	IgG1 $\kappa$	Mouse	Dako
<b>A0231</b>	$\beta$ hCG and total hCG	Polyclonal	Rabbit	Dako
<b>A0137</b>	hPL	Polyclonal	Rabbit	Dako
<b>SC-25828</b>	LHR (H50) extracellular domain 28-77	Polyclonal	Rabbit	Santa Cruz
<b>SC-26341</b>	LHR (K15) internal region	Polyclonal	Goat	Santa Cruz
<b>AHP320</b>	Desmoplakin	Polyclonal	Rabbit	Serotec
<b>A5060</b>	Actin	Polyclonal	Rabbit	Sigma-Aldrich

### **III. Article 3 :**

#### **Trisomie 21 is associated with abnormal autocrine hCG signaling impairing trophoblast fusion and differentiation**

G. Pidoux, P. Gerbaud, O. Marpeau, J. Guibourdenche, F. Ferreira, G. Meduri, J. Badet, D.  
Evain-Brion, and J-L. Frendo

Article en préparation

## 1. Introduction.

Dans le placenta issu de grossesse associée à une trisomie 21, les cytotrophoblastes s'agrègent normalement, mais fusionnent peu ou avec retard (Frendo et al., 2000), ce défaut de différenciation morphologique est associé à un défaut de différenciation fonctionnelle, avec notamment une diminution de la synthèse et de la sécrétion d'hCG (Frendo et al., 2000) (Massin et al., 2001). De plus, nous avons montré que l'hCG produite par les cellules trophoblastiques trisomiques est anormalement glycosylée et biologiquement moins active (Frendo et al., 2004).

L'action de l'hCG dans la stimulation de la fusion et de la différenciation des cytotrophoblastes en syncytiotrophoblaste passe par l'activation du récepteur LH/CG. Nous avons démontré dans l'article précédent, que l'expression du R-LH/CG est modulée au cours de la fusion et de la différenciation des cytotrophoblastes (Pidoux et al., 2006). Pour mieux comprendre le défaut de formation du syncytiotrophoblaste observé *in vivo*, comme *in vitro* sur les cellules trophoblastiques trisomiques, nous nous sommes intéressés à la relation du couple hormone/récepteur (hCG-récepteur LH/CG) dans les trophoblastes issus de placenta associée à une trisomie 21. Nous avons étudié la fonctionnalité et l'interaction de l'hCG anormalement glycosylée et biologiquement moins active sur le R-LH/CG, produite par les cellules trophoblastiques trisomiques et de l'implication du R-LH/CG dans le processus de différenciation cellulaire.

Cette étude va aussi nous permettre de vérifier les hypothèses précédemment établies concernant le paradoxe de l'hCG. Hypothèses qui suggéraient que l'augmentation de l'hCG sérique maternel retrouvée lors de grossesse associée à une trisomie 21 pourrait être due à une anomalie quantitative et/ou qualitative du R-LH/CG dans les cellules trophoblastiques trisomiques.

## 2. Résultats.

2.1. Le défaut de différenciation morphologique observé dans les cellules trophoblastiques trisomiques est réversible en présence d'une hCG recombinante.

Comme illustré sur la figure 1A (de l'article 3), les cytotrophoblastes (CT) isolés de placentas normaux s'agrègent à 24h et fusionnent à 72h de culture pour former le syncytiotrophoblaste (ST). Par contre, les cytotrophoblastes isolés de placentas issus de grossesses associées à une trisomie 21 s'agrègent normalement à 24h, mais fusionnent peu ou faiblement à 3 jours de cultures. Ce défaut de différenciation morphologique s'accompagne d'un défaut de différenciation fonctionnelle dans les cellules trophoblastiques trisomiques. En effet, comme représenté sur la figure 1B (de l'article 3) la différenciation et la fusion des cellules isolées à partir de placentas normaux s'accompagnent d'une augmentation de la sécrétion d'hCG dans le milieu de culture ( $7,4 \pm 2,3$  mUI/ml/ $10^6$  cellules à 24h et  $891,8 \pm 9,5$  mUI/ml/ $10^6$  cellules à 72h;  $n = 3$ ). Dans les cellules isolées à partir de placentas trisomiques, le défaut de formation syncytiale est associé à une très nette diminution ( $p < 0,0001$ ) de la sécrétion d'hCG dans le milieu de culture ( $16,8 \pm 9,5$  à  $366,7 \pm 28,9$  mUI d'hCG/ml/ $10^6$  cellules;  $n = 3$ ) (figure 1B de l'article 3). Ces résultats suggèrent que dans les placentas trisomiques, il existe un défaut et/ou un retard dans la fusion et la différenciation des cytotrophoblastes en syncytiotrophoblaste. Ce défaut de différenciation morphologique est associé à un défaut de différenciation fonctionnelle, se traduisant par la diminution de la sécrétion d'hCG. Nous avons décidé de stimuler la fusion et la différenciation des cytotrophoblastes issus de placentas trisomiques par l'utilisation d'une hCG recombinante. Nous avons ajouté  $10^{-8}$ M d'une hCG recombinante dans les milieux de cultures de cellules trophoblastiques trisomiques et nous avons observé la formation de syncytium. Le nombre de noyaux a été déterminé par marquage au DAPI dans les cellules mononucléées et dans les cellules syncytialisées. Les syncytia ont été déterminés par marquage des pourtours cellulaires par la desmoplakine. À 24h de culture et avant l'ajout d'une hCG recombinante, les cellules normales et trisomiques sont agrégées (figure 1A de l'article 3). À 72h de culture, en présence ou non d'une hCG recombinante, les cellules normales ont fusionnées et forment de larges syncytia (figure 1C de l'article 3). Comme illustré dans l'histogramme de la figure 1C (de l'article 3), le pourcentage de cellules mononucléaires, après traitement ou non avec une hCG recombinante reste du même ordre (respectivement  $15,8\% \pm 1,16$  et  $17,2\% \pm 0,44$ ). Cependant l'addition d'une hCG recombinante stimule la fusion des syncytia déjà formés pour former des syncytia encore plus grands (figure 1C de l'article 3). Le pourcentage de syncytia contenant 100 noyaux et plus est significativement plus important dans les cellules traitées que dans les cellules contrôles ( $p < 0,0001$ ). Dans les cytotrophoblastes issus de placentas trisomiques, à 72h de culture et en absence de traitement, nous avons observé une faible formation de syncytium (figure 1A de l'article 3). En présence de l'hCG recombinante ( $10^{-8}$ M), les cellules trisomiques sont capables de fusionner et de

former de larges syncytia (figure 1C de l'article 3). Le comptage des cellules mononucléées trisomiques traitées ou non par l'hCG recombinante, indique que les cellules mononucléées dans les cultures contrôles ( $76,17\% \pm 0,6$ ) sont deux fois plus nombreuses que dans les cellules traitées ( $39,33\% \pm 0,88$ ;  $p < 0,0001$ ). De plus, le traitement par une hCG recombinante induit la fusion et la différenciation de 60% des cellules trisomiques, alors que l'on retrouve seulement 23% de cellules fusionnées dans les cellules trisomiques non traitées (figure 1C de l'article 3). Plus précisément, le pourcentage de syncytia contenant 10 à 50 noyaux est de  $1,56\% \pm 0,29$  dans les cellules trisomiques non traitées et de  $13\% \pm 1,7$  dans les cellules trisomiques traitées avec de l'hCG recombinante ( $p < 0,0029$ ). Cependant, contrairement aux cellules normales, aucun syncytium contenant plus de 50 noyaux ( $> 50$ ) n'est observable dans les cellules trisomiques traitées ou non.

Ces résultats montrent que les cellules trisomiques sont capables de fusionner lorsqu'elles sont stimulées par une hCG recombinante, indiquant que le défaut de fusion et de différenciation observé dans les cellules trophoblastiques trisomiques semble être réversible.

2.2. La diminution du R-LH/CG est directement impliquée dans le défaut de différenciation des cytotrophoblastes.

Nous avons ensuite évalué l'incidence d'une diminution du R-LH/CG sur la fusion et la différenciation des cytotrophoblastes en syncytiotrophoblaste. Dans cette étude, les cellules trophoblastiques issues de placentas normaux sont incubées avec des siRNA spécifiques du R-LH/CG. L'importance et le nombre des syncytia ont été déterminés après immuno-marquage de la desmoplakine et en déterminant le nombre de noyaux dans les cellules mononucléées ou dans les cellules multinucléées avec le DAPI (figure 2A de l'article 3). Le western-blot de la figure 2B (de l'article 3) montre que les siRNA spécifiques du R-LH/CG diminuent bien l'expression du récepteur. L'utilisation de ces siRNA entraînent une diminution de 74,2% ( $8,03 \pm 0,07$  UA vs  $2,07 \pm 0,05$  UA;  $p < 0,0025$ ) de l'expression du R-LH/CG dans les cytotrophoblastes transfectés avec les siRNA comparé aux cytotrophoblastes traités avec le siRNA témoin ("scrambled"). On observe des résultats similaires avec des cellules non transfectées comparées aux cellules transfectées avec les siRNA spécifiques du R-LH/CG, avec 78,4% d'inhibition et un  $p < 0,002$ ). Aucune différence significative n'est observable entre les cellules non transfectées et celles transfectées avec le siRNA témoin ("scrambled"), suggérant que la transfection n'a pas d'effet sur la diminution de l'expression du récepteur LH/CG.

L'inhibition spécifique de l'expression du R-LH/CG par l'utilisation des siRNA est associée à une forte diminution de la fusion et de la différenciation, comme illustré dans la figure 2A (de l'article 3). L'histogramme de la figure 2A (de l'article 3) montre que les cellules en présence de siRNA spécifique du R-LH/CG sont majoritairement mononucléées ( $p < 0,0054$ ;  $58,5\% \pm 0,15$  de cellules

mononuclées) par rapport au témoin (“scrambled”) ( $32,5\% \pm 0,1$  de cellules mononuclées). L’index de fusion, qui est le reflet de la fusion totale montre que le processus de fusion est diminué ( $p < 0,0166$ ) en présence de siRNA spécifiques du R-LH/CG, avec seulement  $25\% \pm 0,57$  de cellules fusionnées par rapport au témoin (“scrambled”) où la fusion touche  $53,3\% \pm 7,12$  des cellules. La diminution de la fusion observée en présence des siRNA spécifique du R-LH/CG, a pour conséquence une diminution significative ( $p < 0,0001$ ) de  $59,6\%$  de la sécrétion d’hCG dans les milieux de cultures par rapport au témoin (“scrambled”). On observe des résultats similaires par comparaison avec le témoin non transfecté (diminution de  $66\%$  de la sécrétion d’hCG;  $p < 0,0131$ ). On observe aucune différence entre la sécrétion d’hCG du témoin transfecté (“scrambled”) et du témoin non transfecté, suggérant que la diminution de la sécrétion d’hCG observée en présence de siRNA spécifique du R-LH/CG n’est pas due à une augmentation de la mort cellulaire après la transfection.

L’utilisation de siRNA spécifiques du R-LH/CG dans les cytotrophoblastes issus de grossesses normales semble mimer ce qu’on observe dans les cultures de cellules trophoblastiques trisomiques: une diminution de la sécrétion d’hCG et une diminution de la fusion des cytotrophoblastes. Ces résultats montrant que le R-LH/CG est directement impliqué dans le processus de fusion et de différenciation cellulaire, nous nous sommes alors intéressés à l’étude de l’expression du R-LH/CG dans les cellules trophoblastiques trisomiques.

### 2.3. Diminution de l’expression du messager du R-LH/CG dans les cellules trophoblastiques trisomiques.

Nous avons dans un premier temps, étudié l’expression de l’ARNm du R-LH/CG dans les cytotrophoblastes normaux et trisomiques à 24h de culture. Nous avons réalisé des RT-PCR semi-quantitatives en utilisant trois couples d’amorces (P1, P2, et P3) (les positions sont indiquées sur la figure 3A de l’article 3). Comme présenté sur la figure 3B (de l’article 3), les fragments de 800-pb, 660-pb et 647-pb obtenus respectivement avec les amorces P1, P2 et P3, indiquent que l’expression de l’ARNm du R-LH/CG est significativement plus faible dans les cytotrophoblastes issus de grossesses associées à une trisomie 21 que dans les cytotrophoblastes normaux. Aucune différence significative n’est observable dans le niveau d’expression de l’ARNm de l’actine. Nous avons obtenu les mêmes types de résultats avec les trois couples d’amorces. Pour confirmer la spécificité les résultats obtenus par RT-PCR, les produits d’amplifications ont été transférés sur membrane de nylon et hybridés avec des sondes radiomarquées au  $P^{32}$ , spécifiques du R-LH/CG. Nous avons utilisé trois sondes différentes, spécifiques du domaine extracellulaire, trans-membranaire et intracellulaire du R-LH/CG. Les résultats d’hybridation montre une diminution nette de l’expression de l’ARNm du R-LH/CG dans les cytotrophoblastes trisomiques par rapport aux cellules normales, alors qu’aucune variation d’expression n’a été observée avec une sonde spécifique de l’actine (résultats non montrés).



La normalisation de l'ARNm du R-LH/CG par l'ARNm de l'actine confirme les précédant résultats, avec une diminution du niveau d'ARNm du R-LH/CG dans les cellules trophoblastiques trisomiques (figure 3C de l'article 3). En utilisant le couple d'amorce P1, le niveau d'ARNm du R-LH/CG diminue de  $1,234 \pm 0,264$  (en unité arbitraire) dans les cellules normales à  $0,62 \pm 0,094$  dans les cellules trophoblastiques trisomiques ( $p < 0,0132$ ). Une diminution similaire est observable avec le couple d'amorce P2 ( $1,199 \pm 0,262$  pour les cytotrophoblastes normaux et  $0,349 \pm 0,057$  pour les cytotrophoblastes trisomiques,  $p < 0,0341$ ) et avec le couple d'amorce P3 ( $1,425 \pm 0,122$  pour les cellules normales et  $0,542 \pm 0,276$  pour les cellules trisomiques,  $p < 0,0431$ ). La diminution du niveau d'ARNm du R-LH/CG dans les cellules trophoblastiques trisomiques est similaire avec les trois couples d'amorces (avec respectivement 2-, 3,4 et 2,6 fois).

#### 2.4. Diminution de l'expression protéique du R-LH/CG dans les cellules trophoblastiques trisomiques.

Nous avons décrit la diminution du niveau d'ARNm du R-LH/CG entre les cytotrophoblastes normaux et les cytotrophoblastes trisomiques. Pour confirmer ces résultats, nous avons analysé le niveau d'expression protéique du R-LH/CG dans des extraits cellulaires totaux de cytotrophoblastes normaux et des cytotrophoblastes trisomiques par western blot, en utilisant un anticorps polyclonal le LHR-H50 (figure 4A de l'article 3). Les deux bandes majeures, déjà décrites dans l'article 2 à 65-75 kDa et 85-95 kDa sont observées.

La figure 4A (de l'article 3) montre que la forme mature du R-LH/CG est très nettement diminuée dans les cellules trophoblastiques trisomiques par comparaison aux cellules normales, alors qu'aucune différence dans l'expression de l'actine n'a pu être observée. La normalisation de la forme mature du R-LH/CG par l'expression de l'actine (tableau de la figure 4A de l'article 3) montre une diminution significative (de 68%) dans les cytotrophoblastes normaux comparé aux cellules trophoblastiques trisomiques ( $p < 0,0038$ ).

Pour confirmer la diminution de l'expression de l'ARNm et de la protéine du R-LH/CG dans les cellules trophoblastiques trisomiques, nous avons procédé à des expériences de marquage d'affinité avec de l'hCG-I<sup>125</sup> sur des cellules normales et trisomiques en culture à 24h (figure 4B de l'article 3). Les analyses de Scatchard montrent que le nombre de molécules radiomarquées fixées à la membrane est supérieure ( $p < 0,0407$ ) dans les cytotrophoblastes ( $3511 \pm 693$  molécules fixées/cellulesensemencée) que dans les cytotrophoblastes issus de grossesse associée à une trisomie 21 ( $1124 \pm 350$  molécules fixées/cellulesensemencée). Cependant, aucune différence significative n'a été observé dans la valeur du Kd (constante de dissociation) entre les cytotrophoblastes normaux et trisomiques. Les résultats de la figure 4B (de l'article 3) indiquent que dans les cellules trophoblastiques trisomiques, l'expression du récepteur LH/CG est 3 fois plus faible que dans les cellules normales.

Cependant malgré une diminution du nombre de récepteur LH/CG, l'hCG-I<sup>125</sup> se fixe aux récepteurs (de cytotrophoblastes normaux et trisomiques) avec la même affinité.

Pour confirmer la diminution d'expression de la forme mature du R-LH/CG présent à la surface des cellules trophoblastiques trisomiques, nous avons mesuré le taux de production d'AMPc en réponse à une hCG recombinante (rhCG) à 24h de culture. La diminution du R-LH/CG observée au niveau des ARNm et de la protéine doit être associée à une diminution de production d'AMPc. Dans la figure 4C (de l'article 3) on peut voir que pour une concentration équivalente en rhCG ( $10^{-10}$ M), la production d'AMPc est plus faible dans les cellules trophoblastiques trisomiques ( $p < 0,0066$ ) que dans les cellules normales. La production d'AMPc normalisée par la concentration en protéine des cellules trophoblastiques stimulées par  $10^{-10}$ M d'hCG recombinante diminue de  $221,9 \pm 2,2$  fmol/mg de protéine dans les cytotrophoblastes normaux à  $163,7 \pm 10,1$  fmol/mg de protéine dans les cytotrophoblastes issus de grossesses associées à une trisomie 21. Dans les cellules trophoblastiques normales, le taux basal d'AMPc est de  $79,7 \pm 8,1$  fmol/mg de protéine et augmente jusqu'à  $221,9 \pm 2,2$  fmol/mg de protéine (soit une augmentation de 2,8 fois) après stimulation par de l'hCG recombinante à  $10^{-10}$ M ( $p < 0,0013$ ). Dans les cellules trophoblastiques trisomiques, le taux basal d'AMPc ( $107,4 \pm 8,1$  fmol/mg de protéine) n'est pas significativement différent du taux basal observé dans les cytotrophoblastes normaux, mais l'augmentation de production d'AMPc (1,5 fois) après stimulation par de l'hCG recombinante à  $10^{-10}$ M est plus faible ( $p < 0,049$ ) que dans les cellules normales. La stimulation avec de l'épinéphrine (utilisée comme témoin positif, figure 4C de l'article 3), induit dans les cellules trophoblastiques trisomiques la même accumulation d'AMPc intracellulaire que dans les cellules normales, suggérant que les cellules trisomiques sont bien vivantes et que la diminution de production d'AMPc observée dans les cellules trisomiques par rapport aux cellules normales n'est pas dû à une augmentation de l'apoptose dans les cellules issues de placentas de trisomie 21, ou à un défaut de fonctionnement de la voie de l'AMPc. L'accumulation intracellulaire d'AMPc observée est bien spécifique de l'action de l'hCG recombinante, car l'incubation de la rhCG (à  $10^{-10}$ M et  $10^{-8}$ M) avec des anticorps bloquant dirigés contre l'hCG ou contre le R-LH/CG (résultats non présentés) inhibe toute accumulation et production d'AMPc.

Les résultats montrent que la diminution de production d'AMPc pourrait être dû à une diminution de l'expression de la forme mature du R-LH/CG présent à la surface des cellules trophoblastiques trisomiques.

## 2.5. Le récepteur LH/CG peut fixer une hCG anormale et biologiquement moins active.

Nous avons voulu savoir si l'hCG hyperglycosylée (voir article 1) sécrétée par les cellules trophoblastiques trisomiques est capable de se fixer sur son récepteur LH/CG, présent à la surface des cytotrophoblastes. Nous avons donc utilisé des cytotrophoblastes normaux et trisomiques en cultures

pour fixer de manière covalente (“cross link”) l’hCG présente dans les milieux de cultures sur leurs récepteurs pour former des complexes hCG-récepteur LH/CG. Ces complexes sont ensuite immuno-précipités (figure 5A de l’article 3) en utilisant un anticorps polyclonal dirigé contre le R-LH/CG (le LHR-H50), puis les complexes sont incubés en présence ou en absence de DTT. Nous avons utilisé le DTSSP comme agent “cross-linkant”. Il possède la caractéristique intéressante d’être réversible en présence de DTT. La figure 5A (de l’article 3) présente les complexes immuno-précipités et révélés avec l’anticorps spécifique du R-LH/CG. En l’absence d’agent réducteur (- DTT), nous pouvons observer un complexe de masse moléculaire de 130 kDa correspondant à l’hCG liée à son récepteur LH/CG. Lorsque nous ajoutons l’agent réducteur (+ DTT), le complexe hormone-récepteur est dissocié et le complexe de 130 kDa disparaît, laissant la place à une bande de 90 kDa dans les cellules normales et trisomiques. Pour être sûr que la bande de 130 kDa corresponde bien au complexe hCG-récepteur LH/CG, nous avons utilisé un anticorps polyclonal spécifique de l’hCG sur les complexes immuno-précipités (figure 5A de l’article 3). Dans les conditions non dénaturantes, une bande de 130 kDa correspondant à l’hCG fixé sur son récepteur et une bande plus basse de 40 kDa correspondant à l’hCG sont observées dans les cellules normales et trisomiques. Dans les conditions dénaturantes, seule la bande à 40 kDa est observable, correspondant à l’hCG total. Aucune bande à 130 kDa n’est observable et le complexe hCG-récepteur LH/CG est dissocié. Les interactions et les complexes observés dans cette expérience sont spécifiques, car aucune bande n’est révélée dans les différents contrôles réalisés. Nous avons visualisé pour la première fois que l’hCG synthétisée et sécrétée par les cellules trophoblastiques trisomiques est capable de se fixer sur son récepteur.

Pour tester si la forme d’hCG plus acide, retrouvée dans les milieux de culture de cellules trisomiques est fonctionnelle, nous avons quantifié la production intracellulaire d’AMPc dans les cellules de Leydig après stimulation avec de l’hCG synthétisée par des cellules normales (n = 3) et par des cellules trophoblastiques trisomiques (n = 3). La figure 3B (de l’article 3) montre que l’hCG sécrétée à 72h par les cellules trophoblastiques trisomiques stimule significativement moins (3 fois moins,  $p < 0,0001$ ) la production d’AMPc ( $509,6 \pm 63,6$  fmol/mg de protéine) que l’hCG sécrétée à 72h par les cellules trophoblastiques normales ( $1535,2 \pm 61$  fmol/mg de protéine). Nous avons obtenu les mêmes résultats en utilisant des milieux de cultures issus de cellules trophoblastiques normales et trisomiques à 24h (résultats non présentés).

### 3. Conclusion.

Peu de cellules humaines sont capables de fusionner et de se différencier en une masse cytoplasmique multinucléée, ou syncytium. Ce processus est retrouvé seulement pour les ostéoclastes (Zamboni Zallone et al., 1984), les myoblastes qui forment les myotubes (Wakelam, 1985) et les cytotrophoblastes qui fusionnent en syncytiotrophoblaste (Midgley et al., 1963). Le syncytiotrophoblaste joue un rôle clef dans la placentation humaine puisqu'il est à l'origine des échanges d'oxygène et de nutriments entre la mère et le fœtus ainsi que de la production hormonale dont la plus grande majorité est sécrétée dans le sang maternel. Le phénomène de fusion cellulaire observé dans le syncytiotrophoblaste est très peu connu.

Dans cette étude, nous montrons que le défaut de différenciation et de formation du syncytiotrophoblaste observé dans les cellules trophoblastiques trisomiques pourrait être dû à une diminution du nombre à la surface de la membrane cellulaire, de récepteurs LH/CG matures couplé à l'action d'une hCG anormalement glycosylée et biologiquement moins active. L'hCG hyperglycosylée et biologiquement moins active, sécrétée par les cellules trophoblastiques trisomiques est capable de se lier à son récepteur LH/CG. Par différentes approches méthodologiques, nous avons pu montrer que la forme mature du récepteur présent à la surface des cellules se retrouve diminuée (ARNm, protéines et immunohistologie) dans les cellules trophoblastiques trisomiques en comparaison avec des trophoblastes normaux. Cette diminution a été confirmée par différentes approches complémentaires, en utilisant le modèle *in vitro* de différenciation des trophoblastes humains.

La diminution de la forme mature du récepteur dans les cellules trophoblastiques trisomiques a été confirmée par la diminution de la production d'AMPc sous stimulation d'une hCG recombinante. La diminution de la production d'AMPc observée par les cellules trophoblastiques trisomiques n'est pas due à une diminution de l'affinité de l'hormone pour son récepteur, en effet aucune différence pour les valeurs de  $K_d$  n'a été observée entre les cytotrophoblastes normaux et les cytotrophoblastes trisomiques. Cette diminution de la production d'AMPc n'est pas due à des mutations du récepteur dans la région de reconnaissance des protéines G, puisque nous montrons que la séquence du R-LH/CG dans les cellules trophoblastiques trisomiques est normale. De plus, les analyses de Scatchard nous ont permis de montrer que le nombre de molécules radiomarquées fixées aux cellules trophoblastiques trisomiques est nettement diminué par rapport aux cellules normales, ceci pouvant expliquer la diminution de production d'AMPc.

Le récepteur LH/CG est donc directement impliqué dans le processus de fusion et de différenciation trophoblastique. En effet, l'inhibition spécifique de l'expression du récepteur LH/CG par l'intermédiaire de siRNA inhibe la fusion et la différenciation trophoblastique. Nous sommes en mesure de dire que l'hCG et son récepteur sont impliqués dans la différenciation des cytotrophoblastes en syncytiotrophoblaste. Dans cette étude, nous montrons pour la première fois, que le phénotype des

cytotrophoblastes trisomiques (défaut de fusion cellulaire et diminution de sécrétion d'hCG) est réversible après stimulation par une hCG recombinante. Ceci suggère que les cytotrophoblastes trisomiques possèdent toute la machinerie nécessaire à la fusion cellulaire et que cette dernière est fonctionnelle. Par ailleurs, le fait de remplacer l'hCG anormale retrouvée dans la trisomie 21, par une hCG recombinante totalement fonctionnelle, ré-induit le processus de fusion chez les cytotrophoblastes trisomiques, suggérant que l'hormone anormale semble être la cause du défaut de fusion et de différenciation observée dans la trisomie 21.

## Figure legends

### Figure 1

*Abnormal T21 trophoblastic cells differentiation is reversed by biosynthetic hCG.* (A): Differentiation is followed under electronic microscopy at 24h and 72h of culture, in normal cells (N) and T21 affected cells. Villous cytotrophoblasts (CT), syncytiotrophoblast (ST). After 24h and 72h of culture, cells were immunostained with an anti-desmoplakin monoclonal antibody, and nuclei were counterstained with DAPI. At 24h of culture, normal and T21-affected trophoblastic cells were aggregated. Aggregated cells were also observed at 72h of culture, normal trophoblastic cells have fused to form a large cytoplasmic mass delimited by the cytoplasmic membrane. The syncytium contains many nuclei. During the same time of culture, trisomic cytotrophoblast haven't fused and are still aggregated. (B): levels of hCG (expressed in milli-international units per milliliter of medium and per number of cells) secreted into the culture medium at the indicated times, from normal (N) and T21-affected cell cultures. Since cells were plated in triplicate (see materials and methods), hCG level was determined for each plate. Results are means  $\pm$  SEM of three culture dishes. This figure illustrates one experiment representative of three. \*\*\*:  $p < 0.0001$ . (C): Normal (N) and trisomic (T21) cytotrophoblasts were cultivated during 24h or 72h in presence (+ recombinant hCG (rhCG)) or not (control) of recombinant hCG ( $10^{-8}$ M). Mononuclear cells were counted and nuclei distribution was evaluated as followed: 100 syncytia were scored after desmoplakin staining, and nuclei were counted in each syncytium. Datas (from one representative experiment among five) are expressed as the distribution of syncytia as a function of the number of nuclei per syncytium. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM. \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ ; ND: non detectable.

### Figure 2

*Specific inhibition of the LH/CG-R expression by siRNA in normal trophoblasts impairs syncytiotrophoblast formation.* (A): Normal cytotrophoblasts were transfected with scrambled or LH/CG-R specific siRNA. After 72h of culture, cells were immunostained with anti-desmoplakin monoclonal antibody, and nuclei were counterstained with DAPI. Mononuclear cells were counted

and the fusion index was determined as  $(N - S)/T$ , where  $N$  is the number of nuclei in the syncytia,  $S$  is the number of syncytia, and  $T$  is the total number of nuclei counted. Results are expressed as percentages of fusion index. Larger syncytia were observed in cells treated by random siRNA (scrambled) compared to cells treated with LH/CG-R siRNA. Datas are one representative experiment among five. **(B)**: Western blot analysis of LH/CG-R expression in cell lysates from non transfected cells (lane: control) or transfected cells with scrambled (lane: scrambled) and LH/CG-R (lane: LH/CG-R siRNA) siRNA. Detection was done with a polyclonal antibody LHR-H50 raised against the human LH/CG receptor and standardization using an anti-actin polyclonal antibody. Histogram presents the normalization of the LH/CG-R protein expression by actin expression. **(C)**: hCG titration in non transfected cells (control), in the absence (scrambled) or presence of LH/CG-R specific siRNA. Levels of hCG (expressed in milli-international units per milliliter of medium and per number of cells) secreted into the culture medium at 72h of culture. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM, \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; ND: non detectable. Figure 9 illustrates one experiment representative of four.

### Figure 3

*LH/CG-R mRNA expression in T21-affected trophoblast is decreased compare to normal cytotrophoblasts.* **(A)**: Schematic representation of LH/CG-receptor seven transmembrane domains and location of primers sets used for this study. Primer sets (P2 and P3) are located on the extracellular domain and the pair of primer P1 is located in the transmembrane domain to the intracellular domain. P1 amplifies a fragment of 800-bp, P2 amplifies a fragment of 660-bp and P3 amplifies a fragment of 647-bp. **(B)**: Ethidium bromide-staining gel after RT-PCR. Products were separated on 1.8% agarose gel and analyzed by densitometry. Semi-quantitative RT-PCR experiments with the primers P1, P2 and P3 shows respectively an 800-bp, 660-bp, and 647-bp amplified fragments. Hybridization with specific probes confirmed that amplified fragments are part of the LH/CG-R. RT-PCR experiments were done with total mRNA extracted from normal (N) and trisomic (T21) cytotrophoblasts obtained from 3 different individus (N:  $n = 3$ ; T21:  $n = 3$ ). **(C)**: Histograms represent the normalization of LH/CG-R mRNA by actin mRNA after RT-PCR with primers sets P1, P2, and P3. Data are expressed

as mean  $\pm$  SEM of five independent experiments similar to the one shown in B. bp: base pairs. \*:  $p < 0.05$ .

#### Figure 4

*LH/CG-R protein expression in T21-affected trophoblast is decreased compare to normal cytotrophoblasts.* (A): western-blot analyses were performed with normal and T21-affected trophoblast cell extrats. By using the polyclonal antibody LHR-H50 raised against the human LH/CG receptor, two major bands were visualized after SDS-PAGE analysis. One band presents a molecular masses of 65-75 kDa, corresponding to the LH/CG-R precursor (p) and the other band presents a 85-95 kDa, corresponding to the mature LH/CG-R (m) present at the cell surface. The table shows the normalization of mature LH/CG-R protein expression (m) by actin expression (43 kDa). Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM of five culture dishes. Figure 5 illustrates one experiment representative of five. \*\*:  $p < 0.01$ . (B): Scatchard analyses of  $^{125}\text{I}$ -hCG binding in vitro between normal and T21-affected trophoblasts. Binding was performed for 30 minutes at room temperature, at 24 hours of culture, on T21-affected cells (■) and normal trophoblasts (○). The apparent dissociation constants (Kd) and the maximum number of molecules bound per cell between normal cells and T21 affected cells were calculated by LIGAND program (lower table). Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM of three experiments. (C): Intracellular cAMP production after LH/CG-R stimulation in vitro between normal and T21-affected trophoblasts. Stimulation of T21-affected cells (■) and normal trophoblasts (○) was performed with an exogenous hCG ( $10^{-12}$  M to  $10^{-6}$  M) or with epinephrin ( $10^{-3}$  M, used as a positive control) and compared to non stimulated cells (0). Figure 7 illustrates one experiment representative of three. \*\*:  $p < 0.01$ .

#### Figure 5

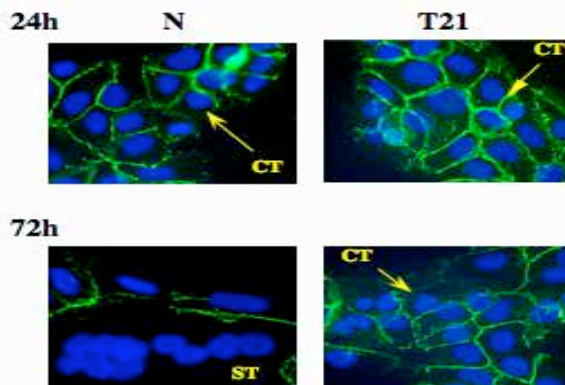
*LH/CG receptor binds an abnormal low bioactivity hCG.* (A): Abnormal hCG produced by T21-affected trophoblasts can bind its LH/CG receptor. Endogenous hCG from normal (N) and trisomic (T21) cultures was cross-linking on its receptor by using DTSSP. This cross-linker agent is reversible and cleavable under reducing conditions. Cellular extracts were purified by immobilized LH/CG-R



antibody (LHR H50) on protein G Plus-agarose. LH/CG-R – hCG complexes were analyzed by SDS-PAGE under reducing condition using DTT (+) or not (-), and probed with LH/CG-R antibody (LH/CG-R Ab +) or hCG antibody (hCG Ab +). LH/CG-R antibody was used as the probe. Under non reducing agent (-), cells extracts from normal (N) and T21-affected cells present a 130 kDa band corresponding to the complex hormone/receptor. Under reducing condition (+), the complex hormone/receptor is disrupted and a 90 kDa band corresponding to the LH/CG-R was observed in cells extracts from normal and T21-affected cells. HCG antibody was used to probe the immuno-blot. Under non reducing agent (-), cell extracts from normal (N) and T21-affected cells present a 130 kDa band corresponding to the complex hormone/receptor. A band with a molecular mass of 40 kDa, corresponding the hCG total, is detectable. Under reducing condition (+), the complex hormone/receptor is disrupted and a 40 kDa band corresponding to the total hCG was observed in cells extracts from normal and T21 affected cells. **(B)**: T21-affected trophoblasts produce an abnormal and weakly bioactive hCG. hCG isoforms secreted by normal (N) and trisomic trophoblast (T21) cells as revealed by isofocusing and immunoblot (as we can see on the left panel). One culture medium from normal cytotrophoblast (N) and two from trisomic cells (T21) were analyzed. Right panel: hCG produced by trophoblastic cells was measured by immuno-assay in conditioned media from cultures of normal (N) (n = 3) and T21 trophoblasts (n = 3). MA-10 Leydig cell were stimulated with hCG coming from normal (N) and T21 culture media. Different volumes of these media corresponding to the indicated concentrations of hCG were added to MA-10 Leydig cell culture. Progesterone was assayed in MA-10 culture media 3h later. Level of progesterone was expressed in nanograms per milliliter of medium and per number of cells. Under pannel: hCG produced by trophoblast cells in culture media was used to stimulate MA-10 cells. Three culture medium from normal (n = 3) and T21 (n = 3) cells were used. Different volumes of these media corresponding to the indicated concentrations of hCG were added to MA-10 cell culture. Level of cAMP production was expressed in fento-mol per milligrams of protein. To show the specificity of the stimulation by hCG, we have used an anti-hCG (Ab-hCG) and an anti-LH/CG-R (Ab LH/CG-R) blocking antibodies. \*: p< 0.05; \*\*: p< 0.01; \*\*\*: p< 0.001.

**Figure 1**

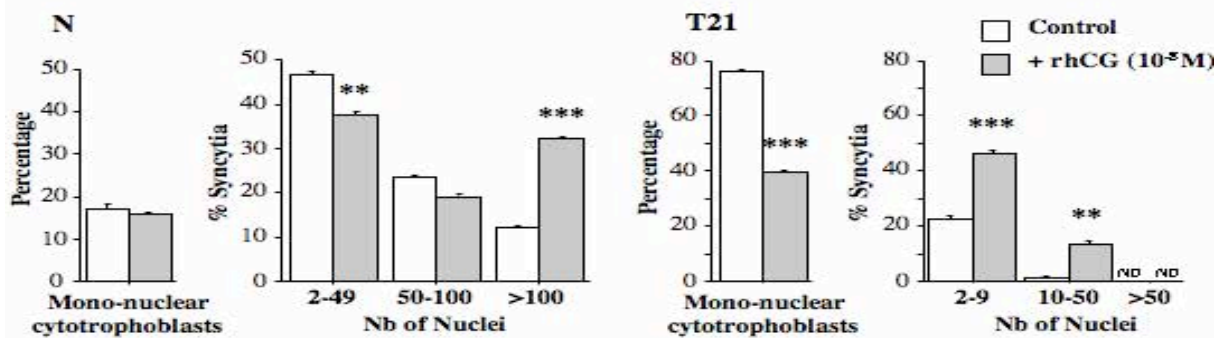
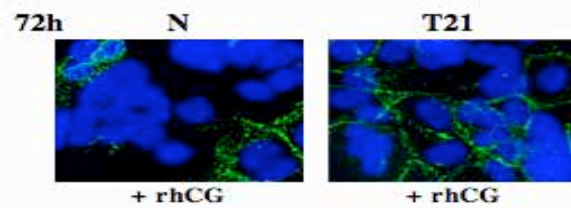
**A: Differentiation of CT into ST in cell culture**



**B: hCG secretion into the culture medium**

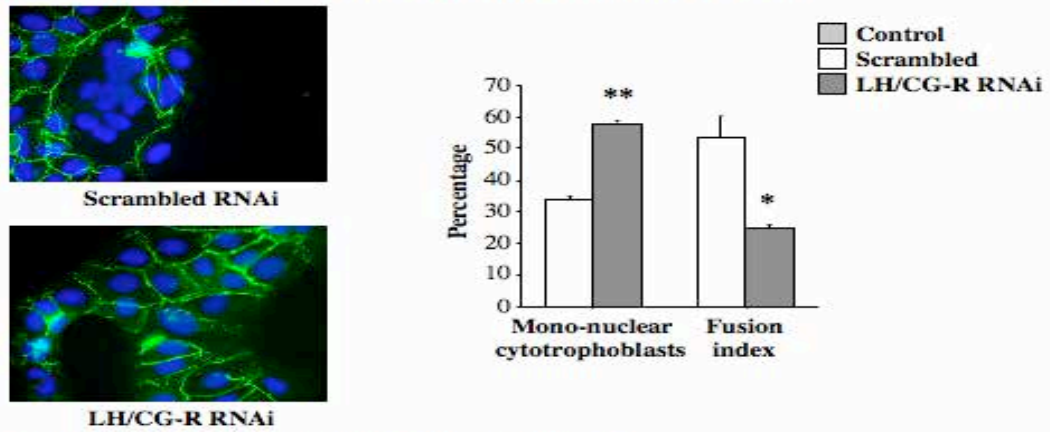
Time of culture	hCG secretion in mUI/ml/10 <sup>5</sup> cells		
	N (n = 3)	T21 (n = 3)	
24	7.4 ± 2.3	16.8 ± 9.5	p = 0.37
48	334 ± 28.4	85.4 ± 23.3	***, p < 0.0001
72	1089 ± 60.8	366.7 ± 29.0	***, p < 0.0001

**C: Stimulation of fusion with recombinant hCG (rhCG)**

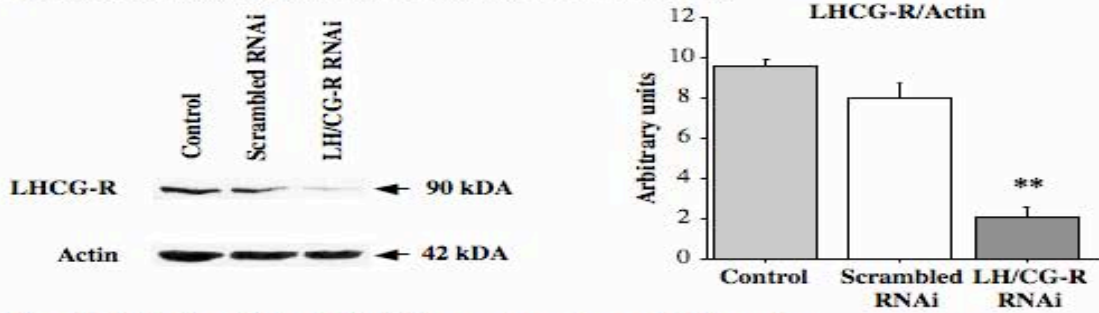


**Figure 2**

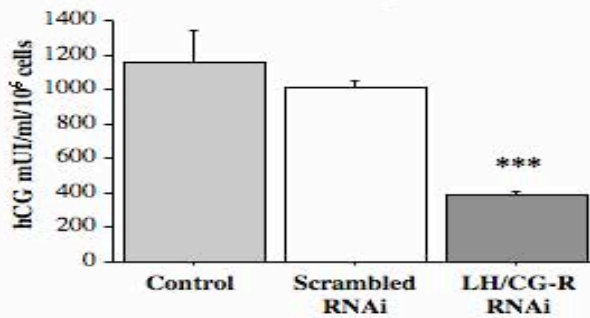
**A: Specific inhibition of the LH/CG-R expression reduces syncytium formation.**



**B: Western blot analysis after specific inhibition of the LH/CG-R.**

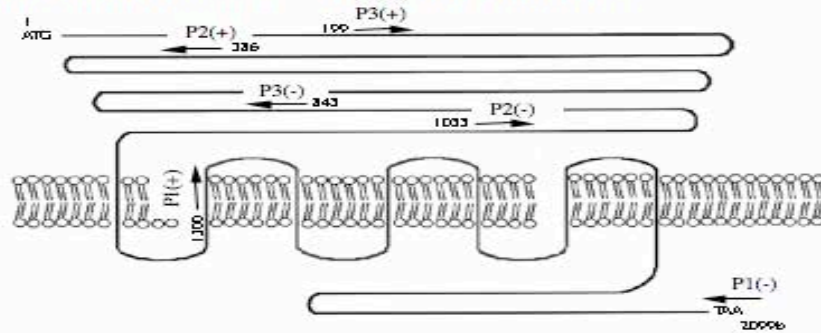


**C: Specific inhibition of the LH/CG-R expression reduces hCG secretion.**

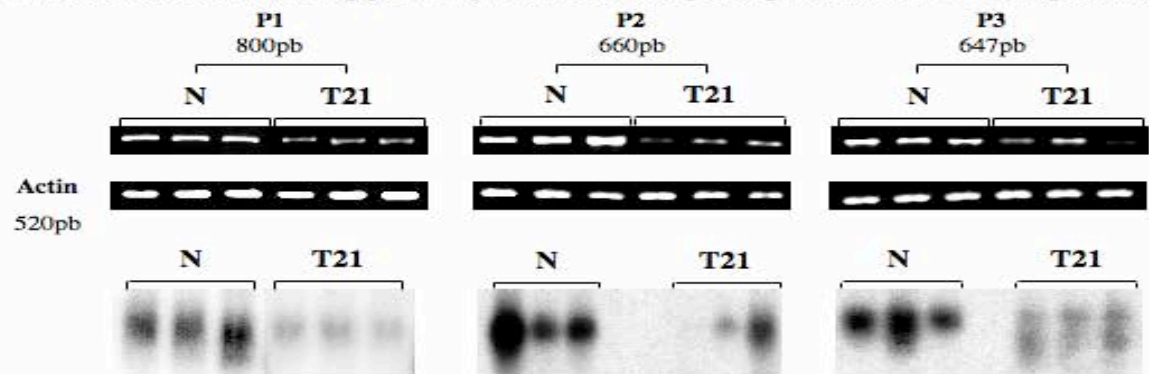


**Figure 3**

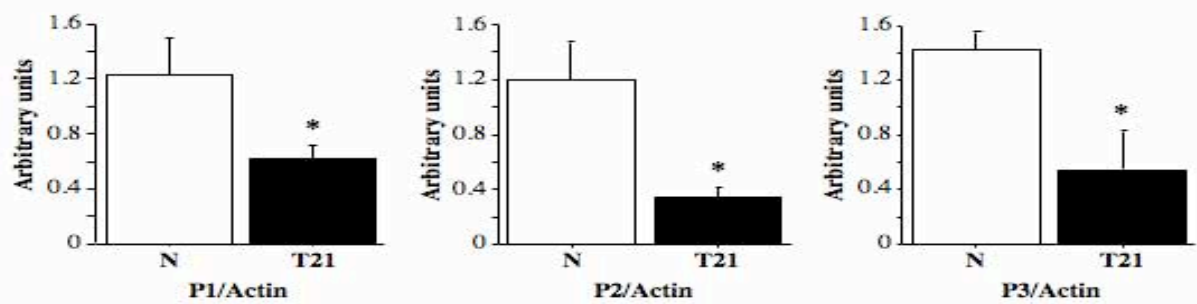
**A: Schematic representation of LH/CG-R and location of primers sets.**



**B: Ethidium bromide-staining gel and hybridization with specific probes after RT-PCR experiments.**



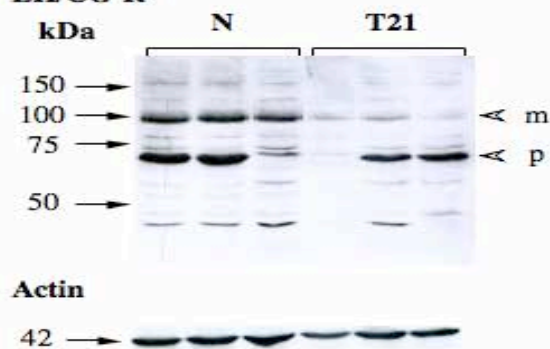
**C: Normalization of LH/CG-R mRNA by actin mRNA after RT-PCR.**



**Figure 4**

**A: LH/CG-R protein expression.**

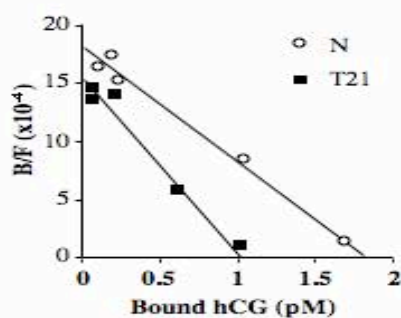
**LH/CG-R**



	Normalization of LH/CG-R by Actin $\pm$ SEM	
<b>N</b>	9.2 $\pm$ 0.75	n = 5
<b>T21</b>	2.9 $\pm$ 1.40	n = 5

\*\**p* < 0.0038

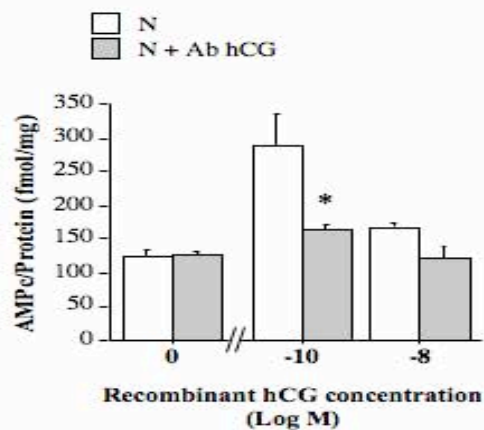
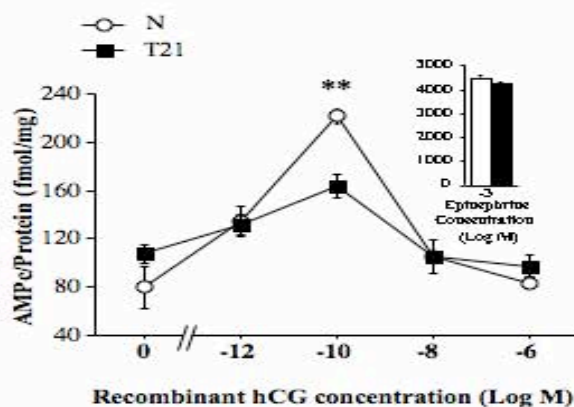
**B: Scatchard analysis of <sup>125</sup>I-hCG binding.**



	Kd (nM) $\pm$ SEM	Number of molecule associated per cells $\pm$ SEM	
<b>N</b>	0.5 $\pm$ 0.23	3511 $\pm$ 693	n = 5
<b>T21</b>	0.4 $\pm$ 0.16	1124 $\pm$ 350	n = 5

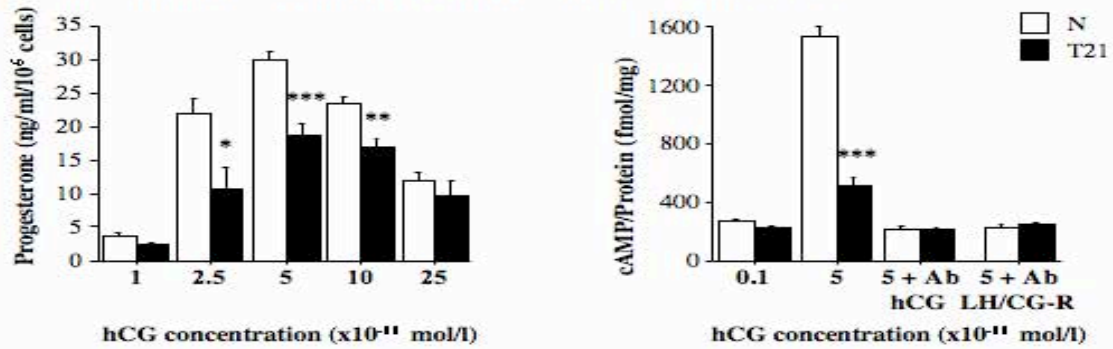
\**p* < 0.0407

**C: Intracellulaire cAMP production after LH/CG-R stimulation.**

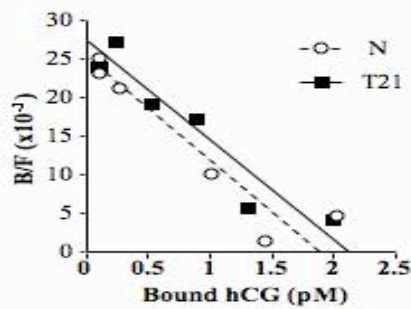


**Figure 5**

**A: T21-affected trophoblasts produce an abnormal and weakly bioactive hCG.**

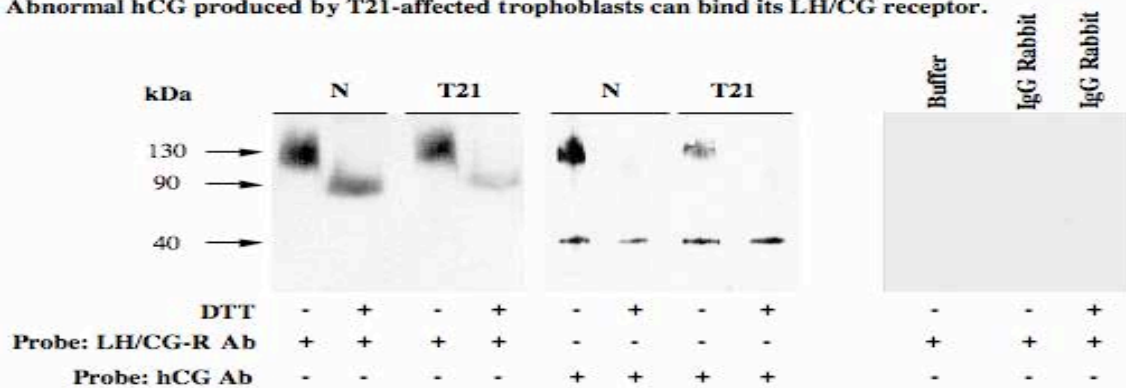


**B: Abnormal hCG produced by T21-affected trophoblasts can bind to a normal LH/CG receptor.**



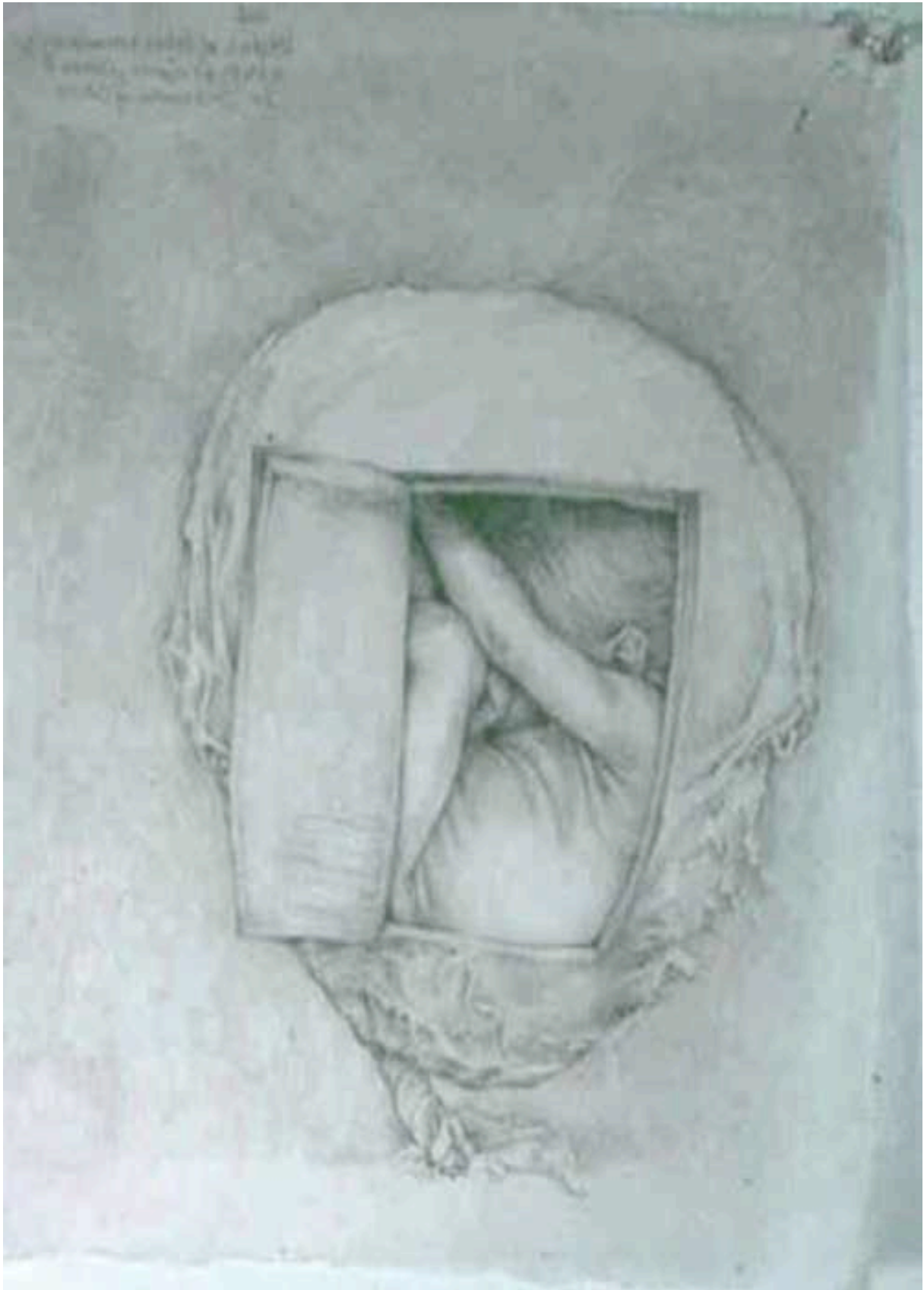
	Kd (nM) ± SEM	Number of molecule associated per mg of protein ± SEM	
N	0.15 ± 0.73	668 ± 141	n = 6
T21	0.13 ± 0.17	696 ± 108	n = 6

**C: Abnormal hCG produced by T21-affected trophoblasts can bind its LH/CG receptor.**





## CHAPITRE D : DISCUSSION



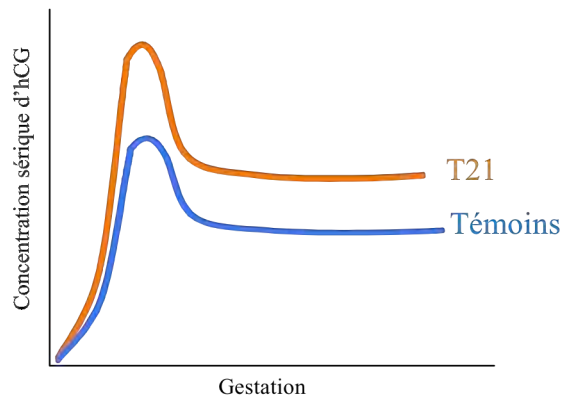




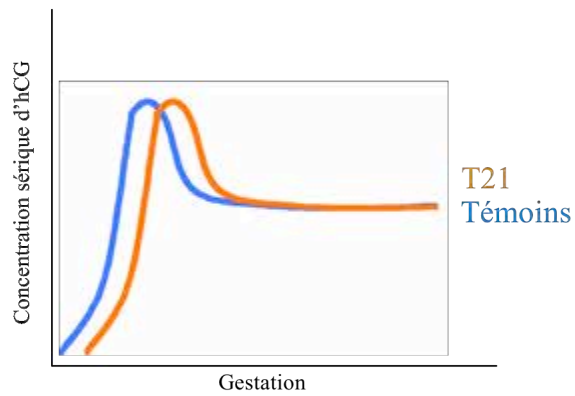
**L**e syncytiotrophoblaste, tissu spécifique du placenta, est localisé au niveau de la couche externe de la villosité choriale. Le syncytiotrophoblaste se forme *in vivo* et *in vitro*, par fusion cellulaire à partir des cytotrophoblastes, qui sont les cellules mononucléées sous-jacentes du syncytiotrophoblaste. Ce processus se déroule tout le long de la grossesse et assure le renouvellement du syncytiotrophoblaste. Il s'agit d'un épithélium polarisé avec à son pôle apical de nombreuses microvillosités qui se projettent dans l'espace intervilloux, baignant ainsi dans le sang maternel. Le syncytiotrophoblaste joue un rôle essentiel dans le maintien de la grossesse et dans la croissance fœtale, en étant responsable des échanges d'oxygène, de nutriments et de l'élimination des déchets entre la mère et le fœtus. Ces fonctions d'échanges sont réalisées au niveau du placenta par diffusion, transport actif et endocytose. Il assure des fonctions métaboliques indispensables à son développement, ainsi qu'au bon déroulement de la grossesse. Le syncytiotrophoblaste est le siège d'une synthèse importante de stéroïdes, de peptides et de protéines qui sont majoritairement sécrétés dans la chambre intervillieuse et par conséquent dans la circulation maternelle. La plupart sont doués d'activités endocrines nécessaires au maintien de la grossesse, à l'adaptation de l'organisme maternel et au développement fœtoplacentaire. Les mécanismes intervenant dans la différenciation *in vitro* du trophoblaste ont été largement étudiés. Plusieurs facteurs modulent la différenciation trophoblastique incluant notamment l'EGF et son récepteur (Morrish et al., 1987a) (Alsat et al., 1993), l'AMPc (Keryer et al., 1998), le TGF $\beta$  (Caniggia et al., 2000), et l'hCG (Shi et al., 1993) (Cronier et al., 1994).

L'hCG (*hormone chorionique gonadotrope humaine*), qui se présente sous forme d'un hétérodimère constitué par l'association non covalente de deux sous-unités différentes  $\alpha$  et  $\beta$ , est synthétisée par le trophoblaste et principalement par le syncytiotrophoblaste (Muyan and Boime, 1997). La sous-unité  $\alpha$  est commune aux autres glyco-hormones (LH, FSH, et TSH), alors que la sous-unité  $\beta$  est responsable de la spécificité hormonale. La différenciation du cytotrophoblaste en syncytiotrophoblaste est régulée de façon autocrine, paracrine et endocrine notamment par l'hCG (Shi et al., 1993) (Cronier et al., 1994) (Yang et al., 2003).

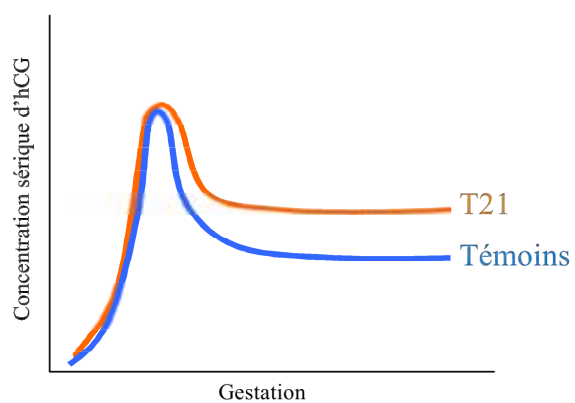
La trisomie 21 est l'anomalie génétique viable la plus fréquente (1 pour 700 naissances) et la cause majeure de retard mental congénital. En dehors des rares cas de mosaïcisme placentaire, le caryotype placentaire est le même que le caryotype fœtal, la cellule trophoblastique est donc aneuploïde. Le dépistage de la trisomie 21 repose sur l'établissement du caryotype fœtal obtenu le plus souvent après amniocentèse. L'amniocentèse est proposée aux patientes sur trois critères: l'âge maternel, la présence d'anomalies fœtales à l'échographie et des marqueurs sériques maternels anormaux. Les marqueurs sériques actuellement utilisés manquent à la fois de spécificité (faux positifs conduisant à un caryotype



**Figure 44 A: 1<sup>ère</sup> hypothèse: production syncytiale augmentée?**



**Figure 44 B: 2<sup>ème</sup> hypothèse: décalage du pic physiologique?**



**Figure 44 C: 3<sup>ème</sup> hypothèse: clairance maternelle anormale?**

normal) et de sensibilité (faux négatifs, trisomies 21 non détectées). Ils reposent sur le dosage, dans le sang maternel, de l'alpha-fœtoprotéine (qui est diminuée), l'œstriol (qui est également diminuée) et l'hCG ou sa fraction  $\beta$  libre (toutes deux sont augmentées). Il est maintenant bien établi que lorsque le fœtus est affecté par une trisomie 21, l'hCG ou sa sous-unité  $\beta$  libre sont augmentées dans le sang maternel entre la 14<sup>ème</sup> et la 18<sup>ème</sup> semaine d'aménorrhée (correspondant au moment du dépistage). *In vitro*, les cytotrophoblastes isolés de placenta de trisomie 21 restent agrégés et ne fusionnent que faiblement ou avec du retard, comparativement aux cytotrophoblastes normaux (Frendo et al., 2000). Il a été montré que ce défaut de différenciation morphologique s'accompagne d'un défaut de différenciation fonctionnelle, en effet il existe une diminution des deux sous-unités de l'hCG ainsi qu'une diminution de la sécrétion d'hCG au cours de la différenciation des cytotrophoblastes en syncytium (Frendo et al., 2000). Ce phénomène affecte également d'autres hormones placentaires (hPL, pGH, leptine). *In vivo*, l'expression des hormones syncytiales est diminuée dans le placenta de trisomie 21, attestant d'une altération de la masse syncytiale (Frendo et al., 2000) (Massin et al., 2001). Des études macroscopiques et histologiques réalisées sur des placentas trisomiques montrent une maturation retardée de la villosité choriale et une hypoplasie du syncytiotrophoblaste associée à la persistance d'une couche de cytotrophoblastes plus importante durant le troisième trimestre de la grossesse (Oberweiss et al., 1983) (Roberts et al., 2000). Ces résultats suggèrent une diminution de la masse syncytiale dans le placenta de trisomie 21.

La diminution de la production d'hCG observée *in vitro*, contraste avec les concentrations circulantes élevées d'hCG observées dans la circulation des mères dont le fœtus est atteint de trisomie 21.

La première hypothèse qui permettait d'expliquer l'augmentation de l'hCG dans le sang maternel suggérait une augmentation de la production et de la sécrétion d'hCG par les cellules trophoblastiques trisomiques (**Figure 44 A**). Grâce aux précédentes observations réalisées par Frendo et al. (Frendo et al., 2000), cette hypothèse a pu être écartée, mais ils ne proposent pas de modèle permettant d'expliquer le paradoxe observé.

Nous nous sommes alors demandés si le niveau d'hCG augmenté dans la circulation maternelle lors du dépistage de la trisomie 21 n'était pas dû au retard de maturation du placenta, entraînant ainsi un décalage du pic physiologique de la sécrétion d'hCG dans la circulation maternelle (**Figure 44 B**). En effet, dans les grossesses normales, il existe un pic de sécrétion d'hCG entre la 8<sup>ème</sup> et la 10<sup>ème</sup> semaine de gestation, puis les taux circulants d'hCG diminuent rapidement pendant le deuxième trimestre. Nous montrons qu'il n'y a pas de décalage du pic de la sécrétion physiologique de l'hCG dans la trisomie 21 (qui survient lui aussi entre la 8<sup>ème</sup> et la 10<sup>ème</sup> SA) mais bien une augmentation constante et continue tout au long de la grossesse du niveau d'hCG circulante dans le sang de la mère. Les facteurs responsables de l'apparition du pic d'hCG pendant la grossesse font l'objet d'un large débat et leur rôle doit encore être expliqué (Malassine et al., 2003).

Le paradoxe entre la diminution de la production d'hCG par le placenta et le niveau élevé auquel on retrouve l'hormone dans le sérum maternel lors d'une grossesse associée à une trisomie 21 oriente

vers une élimination anormale de cette hormone (**Figure 44 C**). La dégradation de l'hCG dans le sérum maternel dépend du catabolisme hépatique maternel, de la filtration rénale, et de la capture de l'hormone par le placenta. Nous avons observé qu'après l'accouchement et l'expulsion du placenta, la cinétique de disparition de l'hCG dans le sérum maternel est similaire dans les grossesses normales ou associées à un fœtus trisomique. Cela suggère qu'en l'absence de placenta, la dégradation de l'hormone dans le compartiment maternel est la même. Il semblerait donc qu'il existe une élimination anormale de l'hCG par le placenta dans les grossesses affectées par une trisomie 21. En plus, nous avons observé pour la première fois que l'hCG produite par les trophoblastes trisomiques a une bioactivité diminuée. Donc, l'hCG produite par les trophoblastes de trisomie 21 a une capacité moindre à stimuler les récepteurs LH/CG présents à la surface des organes cibles principaux et en particulier ceux du placenta. En effet, le placenta est un organe qui possède de nombreux récepteurs LH/CG (Licht et al., 1993) et l'hormone joue un rôle majeur dans la différenciation trophoblastique *via* une stimulation autocrine de son récepteur (Cronier et al., 1994) (Yang et al., 2003). De plus, le placenta présente une grande surface d'échange car il possède de très nombreuses microvillosités à la surface du syncytiotrophoblaste baignant dans le sang maternel. Cela favorise la capture de l'hCG maternelle circulante par les récepteurs situés à la surface des trophoblastes (Benirschke and Kaufmann, 1993). Les concentrations d'hCG maternelle trouvées augmentées dans la trisomie 21 pourraient être reliées à un nombre diminué de récepteurs LH/CG dans les placentas trisomiques ou à une anomalie de fonctionnement de ces récepteurs; ou elle pourrait également être reliée à une diminution de la fixation de l'hormone sur son récepteur et/ou une internalisation diminuée de cette hCG moins bioactive sécrétée par les trophoblastes trisomiques.

Les modifications structurales (dues à la glycosylation anormale) et la faible bioactivité de l'hormone dans la trisomie 21 pourraient expliquer que chez les femmes enceintes porteuses d'un fœtus trisomique, il y a une discordance entre les taux d'hCG anormalement élevés dans le sérum maternel et le faible taux de synthèse placentaire de l'hCG. En effet, les modifications de l'hormone pourrait être responsable d'un défaut de capture de l'hCG par son récepteur et donc favoriser une accumulation de l'hormone dans le sang maternel. Par ailleurs, la diminution de la bioactivité de l'hCG pourrait se traduire par une internalisation du complexe hormone-récepteur moins importante. Cela pouvant avoir comme conséquences un recyclage moins effectif du récepteur libre à la surface des cellules et donc de diminuer le nombre de récepteurs libres capables de lier l'hormone.

La plupart des études réalisées sur le récepteur LH/CG ont été faites sur des cellules transfectées avec l'ADNc du R-LH/CG dans des modèles de rats ou de souris principalement. Chez l'homme, la caractérisation et la modulation de l'expression du R-LH/CG pendant le processus de formation du syncytiotrophoblaste sont très peu documentées. Nous avons caractérisé dans un premier temps et pour la première fois dans un modèle physiologique humain *in vitro*, la régulation de l'expression du R-LH/CG au cours de la différenciation du cytotrophoblaste en syncytiotrophoblaste.

Le récepteur LH/CG est un récepteur à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (Pierce and Parsons, 1981) (Loosfelt et al., 1989) (McFarland et al., 1989) (Minegishi et al., 1990), qui est activé par la fixation de la LH ou de l'hCG. La stimulation du récepteur LH/CG par ces agonistes entraîne l'activation de l'adénylate cyclase, de la phospholipase C qui seront responsables de l'augmentation intracellulaire de second messager tels que l'AMPc, IP<sub>3</sub> et le Ca<sup>2+</sup> (Gudermann et al., 1992) (Hipkin et al., 1992).

Nous avons montré, *in vitro* comme *in vivo*, que le syncytiotrophoblaste exprime plus faiblement le R-LH/CG que le cytotrophoblaste. Ces observations ne sont pas en accord avec certains auteurs (Reshef et al., 1990) (Lei and Rao, 1992) qui montrent une expression du récepteur LH/CG plus forte dans le syncytiotrophoblaste que dans le cytotrophoblaste. Cette discordance dans les résultats peut, en partie s'expliquer par le matériel et les techniques utilisés. Par exemple, les anticorps utilisés par les autres groupes sont dirigés contre la partie N-terminale du récepteur LH/CG de rat (qui possède seulement 85% d'homologie dans cette région avec le récepteur humain). Les sondes radiomarquées utilisées ont été réalisées chez le porc (avec 88% d'homologie avec le récepteur humain). Aucune étude n'a jusqu'alors été réalisée sur un modèle physiologique humain en utilisant différents outils spécifiques de l'espèce humaine.

L'expression du R-LH/CG semble être régulé pendant le processus de différenciation et cette régulation pourrait être due à un phénomène de régulation négative du récepteur par son ligand. En effet, il a été démontré par différents auteurs qu'une exposition longue avec de fortes concentrations en hCG sur des cellules (ovariennes et testiculaires) est responsable d'un processus de régulation négative qui a pour conséquence, une diminution de l'expression du récepteur LH/CG à la membrane cellulaire, ainsi qu'une diminution de la transcription et du nombre de transcrits du R-LH/CG (Segaloff et al., 1990) (Hu et al., 1990) (LaPolt et al., 1990) (Hoffman et al., 1991) (Peegel et al., 1994). Dans le système de différenciation trophoblastique, c'est le syncytiotrophoblaste qui est responsable de la synthèse et de la sécrétion en grande quantité de l'hCG. *In vivo*, comme *in vitro*, le syncytiotrophoblaste baigne dans de fortes concentrations d'hCG. En réponse à de trop fortes concentrations en hCG, le syncytiotrophoblaste va mettre en place différents moyens pour éviter une activation systématique et continue du R-LH/CG. Le récepteur va dans un premier temps subir le phénomène de découplage (mis en place très rapidement) et qui empêche toute interaction du récepteur LH/CG avec les protéines G, le récepteur ne peut donc plus être activé par l'hCG. C'est le phénomène que nous avons observé lors de la stimulation du syncytiotrophoblaste par de l'hCG recombinante, et qui a pour conséquence une diminution de la production d'AMPc.

Dans un deuxième temps, pour répondre à une stimulation persistante de l'hCG, le syncytiotrophoblaste va mettre en place le processus de régulation négative (phénomène plus lent à intervenir), processus qui pourrait être illustré par nos résultats montrant la diminution de la synthèse

et de la transcription des ARNm du R-LH/CG, la diminution de la protéine du récepteur ainsi que du nombre de récepteurs LH/CG présents à la membrane du syncytiotrophoblaste.

Nous avons montré que l'expression du R-LH/CG est majoritaire dans le cytotrophoblaste comparativement au syncytiotrophoblaste. Par ailleurs, dans la trisomie 21, le défaut de différenciation observé ralentit l'obtention d'un syncytiotrophoblaste normalement bien établi à 72h de culture. Il sera donc assez aisé d'étudier le paradoxe de l'hCG en testant les hypothèses portant sur une expression qualitative et/ou quantitative différentielle du R-LH/CG à partir de cytotrophoblastes normaux et trisomiques 21 mis en culture.

Afin d'expliquer les concentrations d'hCG maternelle augmentées dans la trisomie 21, nous avons émis 4 hypothèses. 1: Un nombre diminué de récepteurs LH/CG dans le placenta trisomique; 2: Une anomalie de fonctionnement de ces récepteurs; 3: Une diminution de la fixation de l'hormone sur son récepteur; et 4: Une internalisation diminuée de cette hCG moins bioactive sécrétée par les trophoblastes trisomiques. Pour répondre à ces questions, nous avons d'abord caractérisée pour la première fois le R-LH/CG dans les cytotrophoblastes issus de placentas de grossesses associées à une trisomie 21. Nous avons clairement montré que l'expression de la forme mature du récepteur LH/CG présent à la surface cellulaire des cytotrophoblastes est très nettement diminuée dans les cellules trophoblastiques trisomiques comparativement aux cellules normales. Cette diminution a été mise en évidence *in vitro* et *in vivo*, par différentes approches complémentaires. Elles se traduit par une diminution du nombre des transcrits du récepteur, associée à une diminution de l'expression de la forme mature de la protéine du R-LH/CG présent à la surface des cytotrophoblastes trisomiques. Cette diminution du R-LH/CG est confirmée par la diminution de la production d'AMPc des cytotrophoblastes trisomiques après stimulation par une hCG recombinante comparativement aux cellules normales. Ici, on peut penser que la diminution de la production d'AMPc n'est pas le reflet d'un découplage ou d'une régulation négative, puisque les cytotrophoblastes trisomiques avant d'être stimulés par de l'hCG recombinante ne sont pas soumis à une fortes concentrations d'hCG endogènes. En effet à 24h de culture, la sécrétion d'hCG reste faible.

La diminution du nombre de récepteurs que nous avons mis en évidence dans les cellules trophoblastiques trisomiques est en accord avec une précédente étude publiée par K. Nicolaidis (Banerjee et al., 2005), cependant nos résultats diffèrent de ceux présentés par CV. Rao (Jauniaux et al., 2000), montrant une augmentation du R-LH/CG dans les cellules trophoblastiques trisomiques. Cette divergence peut venir du fait qu'ici encore, ils ont utilisé un anticorps dirigé contre la partie N-terminale du récepteur LH/CG de rat et de l'utilisation d'une sonde radiomarquée pour l'hybridation *in situ* réalisé chez le porc. Dans nos études, nous avons utilisé différents outils (anticorps, sondes radiomarquées) spécifiques de la forme humaine du récepteur LH/CG.

Nous avons montré que le récepteur était indispensable au processus de différenciation trophoblastique. En effet, si on bloque de manière spécifique l'expression du récepteur LH/CG par des

siRNA dans des cytotrophoblastes normaux, on diminue de manière notable la fusion et la différenciation cellulaires. Il a été précédemment démontré par différents auteurs que l'hCG jouait un rôle clef dans la différenciation trophoblastique, en stimulant la fusion et la formation du syncytiotrophoblaste (Shi et al., 1993) (Cronier et al., 1994) (Yang et al., 2003). Il n'est pas illusoire de penser que l'action de l'hCG sur la fusion et la différenciation des cytotrophoblastes en syncytiotrophoblaste se fasse *via* la stimulation et l'activation de son récepteur. L'utilisation de siRNA spécifiques du R-LH/CG dans les cytotrophoblastes normaux mime ce qu'on observe dans les cytotrophoblastes trisomiques. En effet, on observe une diminution de l'expression de la forme mature du récepteur LH/CG, concomitante avec une diminution de la fusion cellulaire. Le défaut de différenciation morphologique observé dans les cellules trophoblastiques trisomiques peut donc être relié en partie à la diminution du nombre de la forme mature du récepteur LH/CG présent à la membrane cellulaire. Même si la diminution du nombre de récepteur peut expliquer le défaut de différenciation morphologique (retard de formation du syncytiotrophoblaste) et par conséquent le défaut de différenciation fonctionnelle (défaut de synthèse et de sécrétion des hormones de la grossesse), il n'explique pas pourquoi le nombre de récepteur LH/CG est retrouvé diminué dans les cellules trophoblastiques trisomiques. En revanche on peut penser que dans les premières étapes de la différenciation le faible taux d'hCG présent à 24h de culture dans les cellules normales soit nécessaire pour induire une augmentation de l'expression du R-LH/CG, afin d'optimiser la réponse et d'orienter les cellules trophoblastiques dans un processus de différenciation et de fusion cellulaire. Une fois le syncytium formé la grande quantité d'hCG sécrétée sera responsable notamment du phénomène de découplage et de la régulation négative ayant pour conséquence une diminution de l'expression de la forme mature du R-LH/CG présent dans le syncytiotrophoblaste.

Le récepteur est important pour induire la différenciation des cytotrophoblastes, mais la qualité de l'hCG est tout aussi primordiale. En effet, sous l'action d'une hCG recombinante fonctionnelle, les cellules trophoblastiques trisomiques, qui jusqu'alors étaient caractérisées par un défaut ou un retard de formation du syncytiotrophoblaste, sont capables de se différencier et de fusionner pour donner naissance à un syncytiotrophoblaste. Le blocage de la différenciation et de la fusion observé dans les cytotrophoblastes trisomiques est un processus réversible si on utilise une hCG fonctionnelle. C'est une donnée importante, qui sous-entend que l'hCG anormalement glycosylée et biologiquement moins active est responsable du défaut de différenciation morphologique et fonctionnelle observée dans les cellules trophoblastiques trisomiques.

Les résultats obtenus au cours de ma thèse, nous permettent de vérifier ou d'infirmer les différentes hypothèses préalablement émises concernant le paradoxe de l'hCG. Les hypothèses émises, afin d'expliquer le fait que l'on retrouve l'hCG augmentée dans le sang maternel lors de grossesse associée à une trisomie 21 alors que sa synthèse est diminuée, sont:



- Un nombre diminué de récepteurs LH/CG dans les placentas trisomiques ou une anomalie de fonctionnement de ces récepteurs.

Nous avons démontré qu'il existe bien une diminution du nombre de récepteur LH/CG mature dans les cellules trophoblastiques trisomiques. En effet par différentes méthodes complémentaires, nous avons confirmé la diminution des transcrits et de la protéine du R-LH/CG dans les cellules trophoblastiques trisomiques. On comprend donc que même si la production d'hCG est diminuée dans la trisomie 21, du fait de l'expression et du nombre de récepteurs LH/CG diminués dans les cellules trophoblastiques trisomiques, la capture de l'hCG par le placenta sera par conséquent diminuée. On pourra alors observer une accumulation de l'hCG dans le compartiment maternel. La diminution du nombre de récepteur pourrait s'expliquer par la diminution de la bioactivité de l'hCG. En effet, cette diminution de la bioactivité pourrait être responsable d'une diminution de la stimulation de l'expression de la forme mature récepteur LH/CG à la membrane cellulaire.

Existe-il une anomalie de fonctionnement des récepteurs LH/CG présents dans les cellules trophoblastiques trisomiques ? Il semble que le récepteur LH/CG présent dans les cellules trophoblastiques trisomiques fonctionne normalement, d'une part parce que le séquençage du R-LH/CG ne montre pas de différence dans la séquence en acides nucléiques entre les cellules trisomiques et les cellules normales, suggérant qu'il n'y a pas de mutation dans les zones responsables de l'activation et de la transmission du signal. D'autre part la stimulation par une hCG recombinante, des cytotrophoblastes issus de placenta de trisomie 21 montrent qu'ils sont capables de fusionner et de former un syncytiotrophoblaste. Cette observation suggère qu'en présence d'une hCG normale le récepteur LH/CG présent dans les cellules trophoblastiques trisomiques fonctionne normalement. De plus, nous avons montré que les deux populations d'hCG synthétisées et sécrétées par les cellules trophoblastiques normales et trisomiques sont capables d'activer le R-LH/CG en stimulant l'augmentation de la production d'AMPC intracellulaire. Même si la production d'AMPC est plus faible dans les cellules trophoblastiques trisomiques que dans les cellules normales, ceci n'est pas le reflet d'une anomalie de fonctionnement du R-LH/CG dans les cellules issues de placenta de grossesses associée à une trisomie 21, mais est le reflet de la diminution du nombre de récepteurs présent à la surface des cellules trophoblastiques trisomiques.

Il semble donc que dans cette première hypothèse seule la diminution du nombre de récepteurs dans les cellules trophoblastiques trisomiques soit valable. Nos résultats confirment que, le récepteur LH/CG semble être tout à fait fonctionnel dans les cellules trisomiques.

- Une diminution de la fixation de l'hormone sur son récepteur et/ou une internalisation diminuée de cette hCG moins bioactive sécrétée par les trophoblastes trisomiques.

Nous avons vu que le paradoxe ne peut pas être expliqué par une diminution de la fixation de l'hormone sur son récepteur, puisque nous avons montré que l'hCG synthétisée par les cellules trophoblastiques normales ou l'hCG anormalement glycosylée et biologiquement moins active synthétisée et sécrétée par les cellules trophoblastiques trisomiques sont toutes deux capables de se fixer de manière équivalente sur leurs R-LH/CG respectifs (même Kd et visualisation de la fixation par cross-link). Par ailleurs, nous avons montré que l'hormone normale avait la même affinité pour un récepteur LH/CG normal et trisomique. Réciproquement, nous avons montré que l'hormone sécrétée par les cellules trophoblastiques trisomiques a la même affinité que l'hCG sécrétée par les cellules normales pour un récepteur normal (résultats non publiés). Dans la mesure où il paraît difficile de tester l'affinité de l'hCG anormalement glycosylée et biologiquement moins active sur les cellules trophoblastiques trisomiques, nous pouvons cependant conclure qu'une diminution de l'affinité de l'hCG pour son récepteur ne semble pas être une réalité.

Existe-il une diminution de l'internalisation de l'hCG sécrétée par les trophoblastes trisomiques ? Pour l'instant nous n'avons aucune preuve directe qui permette d'écarter cette hypothèse. Il faudrait marquer l'hCG avec un traceur (de l'or colloïdale par exemple) et suivre son "routage" intracellulaire dans des cellules trophoblastiques trisomiques et normales. Cependant, nous avons vu que l'hCG synthétisée et sécrétée par les cellules trophoblastiques trisomiques est biologiquement moins active, elle stimule donc moins bien son récepteur que l'hCG sécrétée par les cellules normales. Lors du processus normal d'activation du R-LH/CG, l'hormone se fixe sur le récepteur et active les voies de transduction du signal (adénylate cyclase et phospholipase C), mais il enclenche aussi l'internalisation du complexe hormone/récepteur dans la cellule. Ce phénomène est indispensable pour libérer les sites occupés par l'hormone et recycler les récepteurs libres à la membrane. Si l'hormone sécrétée par les cellules trisomiques active moins bien son récepteur, le processus d'internalisation sera par conséquent diminué lui aussi, le récepteur LH/CG reste donc présent à la membrane cellulaire, avec son site occupé par l'agoniste anormalement glycosylé et biologiquement moins actif. Par conséquent, malgré une synthèse d'hCG diminuée dans les cellules trophoblastiques trisomiques la diminution du processus d'internalisation du complexe hormone/récepteur peut être à l'origine d'une accumulation de l'hCG dans le compartiment sanguin maternel.

Il semble donc que dans cette deuxième hypothèse seule la diminution d'internalisation du récepteur puisse expliquer le paradoxe de l'hCG.

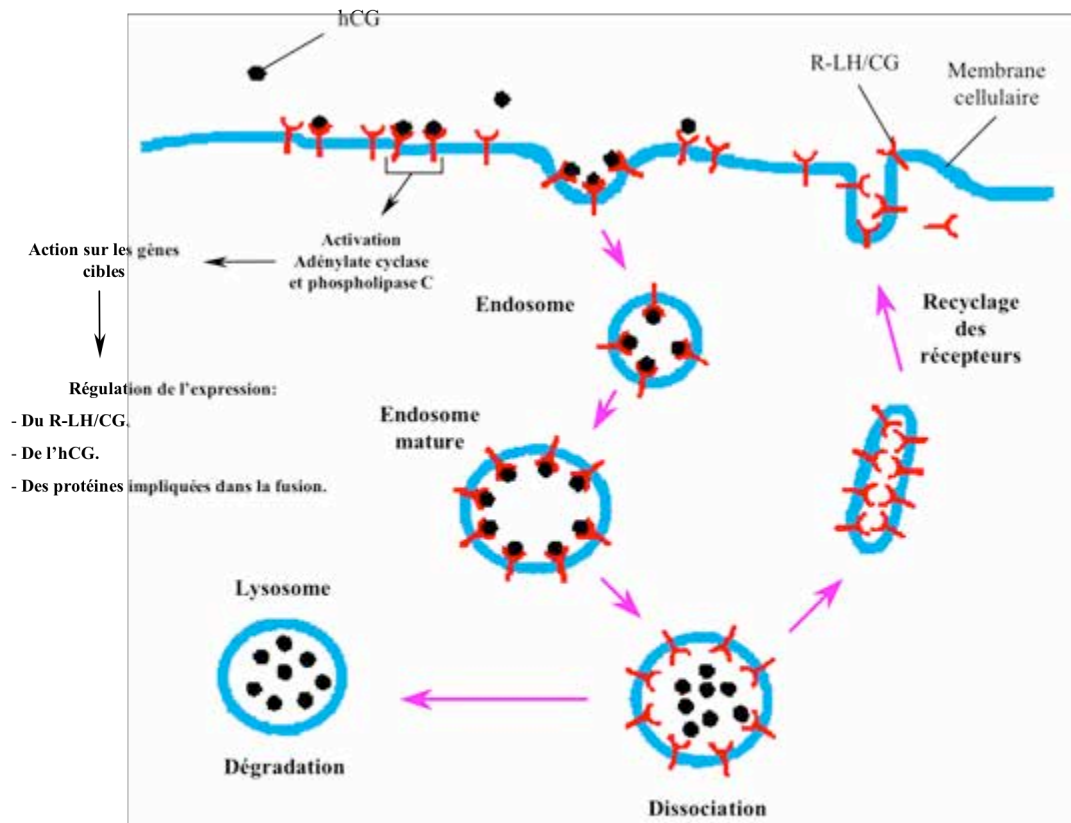


Figure 45 A: Modèle proposé dans les cellules trophoblastiques normales.

En regroupant tous les résultats que nous avons acquis, ainsi que les conclusions que nous avons tirées à partir des vérifications des hypothèses émises, nous proposons un modèle possible expliquant le paradoxe de l'hCG dans les grossesses associées à une trisomie 21 (**Figure 45**).

Dans le processus de différenciation observé à partir de cellules issues de placenta normal (**Figure 45 A**): les faibles taux d'hCG présent à 24h de culture (ou en présence des cytotrophoblastes) vont se fixer sur les R-LH/CG. Cette hCG va être responsable dans un premier temps de l'activation des voies de transduction du signal et des seconds messagers activés vont à leur tour pouvoir activer et/ou réprimer des gènes cibles. L'augmentation de la stimulation des voies de transduction du signal liée au R-LH/CG va avoir pour conséquence l'augmentation de l'expression des protéines impliquées dans la fusion cellulaire et une augmentation de la synthèse et de la sécrétion d'hCG. Ceci conduisant à la formation du syncytiotrophoblaste. La forte concentration d'hCG présente à ce moment-là, va entraîner d'une part la régulation négative du récepteur, conduisant à la diminution de son expression à la membrane ainsi qu'au ralentissement de la synthèse et de la sécrétion d'hCG, et d'autre part à l'augmentation du phénomène d'internalisation du complexe hormone/récepteur. Le phénomène de recyclage et de dégradation de l'hCG qui s'en suit, contrôle sûrement de manière négative l'expression et la sécrétion de l'hCG par le syncytiotrophoblaste (ralentissant ainsi sa sécrétion).

Ce phénomène est un équilibre (entre la synthèse d'hCG et la régulation de l'expression du R-LH/CG) qui assure une expression suffisante du R-LH/CG à la membrane, nécessaire pour permettre le phénomène de recyclage et ainsi contrôler le taux d'hCG tout le long de la grossesse dans la chambre intervillieuse et dans le sang maternel (**Figure 45 A**).

Dans les cellules issues de placenta associée à une trisomie 21 (**Figure 45 B**): les faibles taux d'hCG anormalement glycosylée présents à 24h de culture (ou en présence des cytotrophoblastes) vont se fixer sur les R-LH/CG (présents en faible quantité à la membrane cellulaire). Malheureusement, cette hCG est biologiquement moins active, elle ne va donc pas pouvoir activer de manière optimale les voies de transductions du signal liées au R-LH/CG. Ce phénomène est amplifié par le fait que le R-LH/CG est d'autant moins exprimé à la surface des cytotrophoblastes trisomiques. Ceci se traduisant par une synthèse et une sécrétion d'hCG faible et une expression du R-LH/CG qui reste faible. Il est possible que les protéines impliquées dans la fusion soient elles aussi diminuées par rapport aux cellules trophoblastiques normales, ce qui pourrait avoir comme incidence, le défaut de différenciation morphologique observé dans les placentas trisomiques. Du fait de l'activité biologique diminuée et du nombre de R-LH/CG diminué, le phénomène de recyclage du récepteur est lui aussi diminué. Par conséquent, l'hCG sécrétée s'accumule dans la chambre intervillieuse et dans le sang maternel (**Figure 45 B**).

Nos résultats révèlent que dans les cellules trophoblastiques trisomiques, il existe une anomalie de glycosylation de l'hCG, qui est le résultat d'une augmentation de l'expression et de

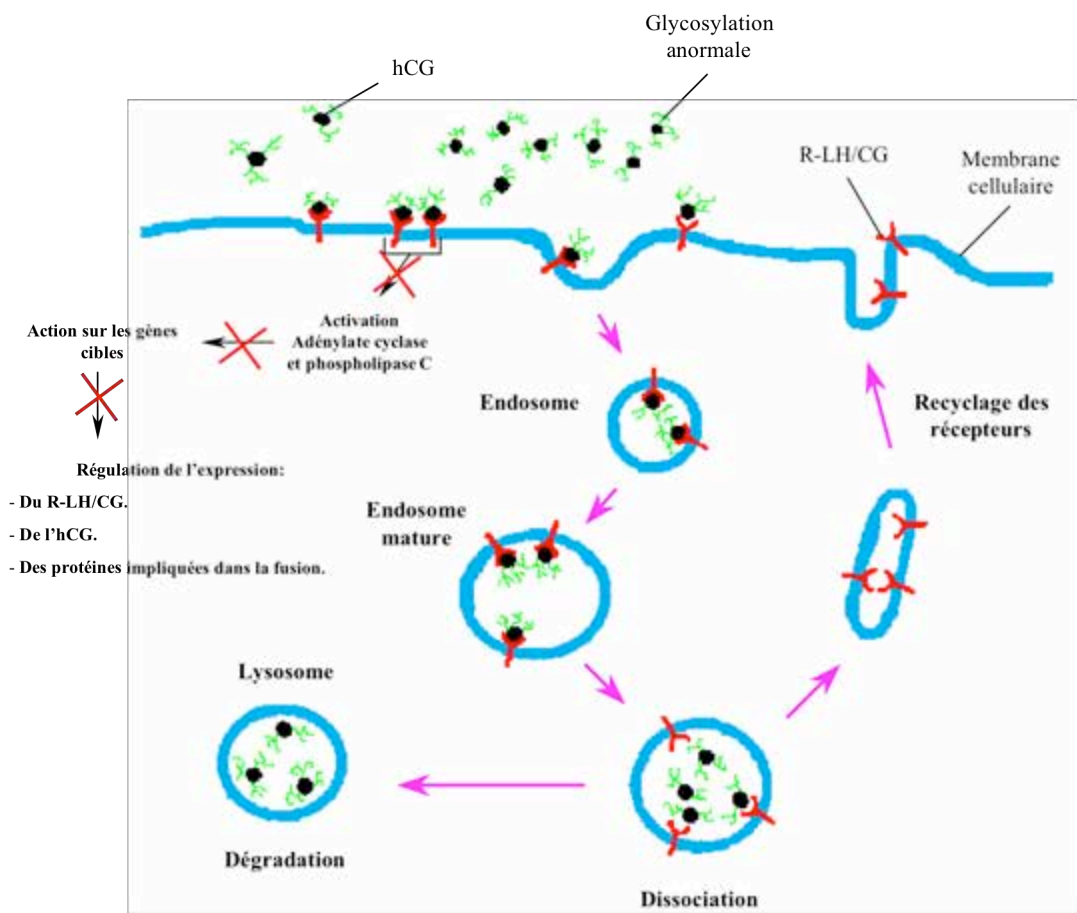


Figure 45 B: Modèle proposé dans les cellules trophoblastiques trisomiques.

l'activité de deux enzymes de la glycosylation, la fucosyl-transférase, et la sialyl-transférase. Il serait intéressant de regarder le profil d'expression d'autres enzymes de la glycosylation dans les cellules trophoblastiques trisomiques, mais aussi de regarder l'expression et l'activité de l'ensemble des enzymes impliqués dans la glycosylation, dans d'autres types cellulaires impliqués dans la synthèse et la sécrétion de protéines ou de glyco-hormones chez les individus trisomiques.

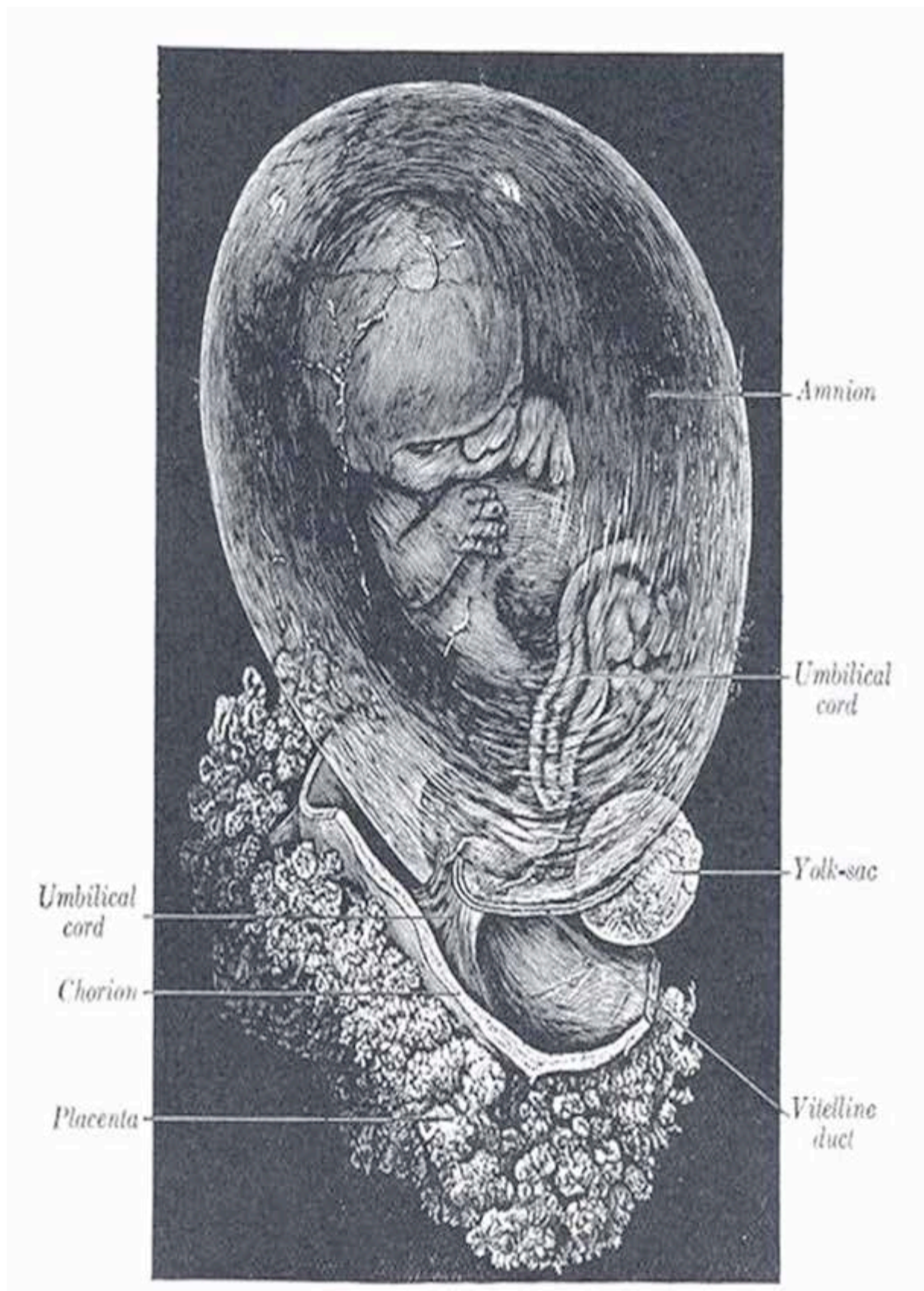
Il est intéressant de noter que toutes les hormones placentaires synthétisées par les cellules trophoblastiques trisomiques (leptine, hPL, pGH, et hCG), présentent des taux d'expression de leurs messagers diminués par rapport au placenta de grossesse normale, ainsi que dans les milieu de cultures (Frendo et al., 2000). Dans les grossesses associées à une trisomie 21, on retrouve une diminution dans le sang maternel de la concentration en leptine et de l'hPL et une augmentation sérique maternelle de la pGH et de l'hCG. Seules la leptine et l'hPL reflètent bien la diminution de la masse syncytiale observée dans les grossesses associées à une trisomie 21. Bien que ces hormones soient totalement différentes, la leptine et l'hPL sont deux hormones non glycosylées, tandis que l'hCG et la pGH sont toutes deux des hormones glycosylées. La glycosylation anormale de l'hCG est responsable de son taux élevé dans le sang maternel, à l'instar de l'hCG, la pGH pourrait être anormalement glycosylée dans les cellules trophoblastiques trisomiques et cette glycosylation anormale pourrait expliquer son taux élevé dans le sang maternel par une activité biologique moindre ou un catabolisme diminué. Cette observation est intéressante, en effet il serait bon de regarder si l'anomalie de glycosylation observée au niveau du placenta peut être étendue et généralisée à toutes les cellules trisomiques responsables de la synthèse et de la sécrétion de glyco-hormones. Au même titre que l'hCG, les autres glyco-hormones (LH, FSH et TSH), pourraient être anormalement glycosylées. Certains auteurs ont montré une augmentation des taux de LH et de FSH chez les individus trisomiques 21, qui pourrait être à l'origine de troubles gonadiques (Hsiang et al., 1987) (Hestnes et al., 1991). D'autres auteurs ont montré une augmentation de la TSH chez les individus trisomiques, cette augmentation est reliée à une hypothyroïdie (Hestnes et al., 1991) (Pueschel et al., 1991). Il serait alors intéressant d'étudier ces hormones, pour voir si elles présentent les mêmes types d'anomalies que l'hCG. Il serait intéressant de savoir si elles sont également biologiquement moins actives; ce qui pourrait peut-être expliquer le phénotype dans certaines pathologies observées chez les individus atteint par la trisomie 21.

Nous savons que l'hCG est impliquée dans le processus de fusion des cytotrophoblastes en syncytiotrophoblaste. Nous ne connaissons pas les mécanismes qui permettent d'induire ce phénomène. Il est possible que l'hCG soit à l'origine du contrôle et de la régulation de l'expression de certaines protéines impliquées dans la fusion des cytotrophoblastes en syncytiotrophoblaste, comme la connexine 43, HERV-W et HERV-FRD. Il serait intéressant de regarder l'expression de ces protéines dans les cellules trophoblastiques trisomiques, pour savoir si la diminution de la bioactivité de l'hCG ne serait pas responsable de la diminution de ces protéines impliquées dans la fusion cellulaire, ce qui pourrait alors expliquer et confirmer le défaut de différenciation morphologique observé dans les

cellules trophoblastiques trisomiques. Afin de confirmer le rôle de l'hCG dans l'expression des protéines impliquées dans la fusion des cytotrophoblastes en syncytiotrophoblaste, il semblerait intéressant de vérifier si les promoteurs de ces protéines possèdent des éléments de réponses sensibles à des facteurs de transcription résultants de l'activation du récepteur par l'hCG

Ce travail a permis, pour la première fois, de mettre en évidence une nouvelle forme d'hCG synthétisée et sécrétée par les cellules trophoblastiques trisomiques. Nous avons caractérisé cette hCG comme étant anormalement glycosylée. Cette anomalie a de graves incidences puisque l'hormone est biologiquement moins active. Nous avons montré en parallèle, qu'il y a une diminution importante de l'expression du R-LH/CG dans les cellules trophoblastiques trisomiques et que ce récepteur joue un rôle important dans le processus de différenciation des cytotrophoblastes en syncytiotrophoblaste. Nous avons montré que le défaut de différenciation morphologique et fonctionnelle observé dans les cellules trophoblastiques trisomiques pouvait être rattaché à la diminution de la bioactivité de l'hCG et à la diminution de l'expression des R-LH/CG. La synergie des deux phénomènes (hCG moins fonctionnelle et diminution du nombre de R-LH/CG à la surface des cytotrophoblastes trisomiques) participe grandement au défaut de différenciation morphologique et fonctionnelle observé dans les cellules trophoblastiques trisomiques. Cependant, nous avons montré que le défaut de différenciation pouvait être réversible. En effet, en présence d'hCG recombinante, la fusion et la différenciation des cytotrophoblastes trisomiques est possible. Ceci suggère que les cytotrophoblastes trisomiques possèdent un récepteur à l'hCG normal et fonctionnel et qu'ils possèdent également toute la machinerie nécessaire à la fusion cellulaire. Ceci nous amène à conclure que dans la trisomie 21, l'anomalie de l'hCG, bien plus que la diminution de l'expression de son récepteur, semble être la principale "responsable" du phénotype observé. À partir de ces résultats, nous avons pu proposer un modèle possible permettant d'expliquer le taux d'hCG sérique maternel élevé lors de grossesse associées à une trisomie 21.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES







- Abell A, Segaloff D. 1997. Evidence for the direct involvement of transmembrane region 6 of the lutropin/choriogonadotropin receptor in activating Gs. *J Biol Chem* 272:14586-14591.
- Albanese C, Kay TW, Troccoli NM, Jameson JL. 1991. Novel cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element in the human chorionic gonadotropin beta-subunit gene. *Mol Endocrinol* 5(5):693-702.
- Albrecht ED, Pepe GJ. 1990. Placental steroid hormone biosynthesis in primate pregnancy. *Endocr Rev* 11:124-150.
- Alsat E, Haziza J, Evain-Brion D. 1993. Increase in epidermal growth factor receptor and its messenger ribonucleic acid levels with differentiation of human trophoblast cells in culture. *J Cell Physiol* 154:122-128.
- Alsat E, Mirlesse V, Fondacci C, Dodeur M, Evain-Brion D. 1991. Parathyroid hormone increases epidermal growth factor receptors in cultured human trophoblastic cells from early and term placenta. *J Clin Endol Metab* 73:288-294.
- Alsat E, Wyplosz P, Malassiné A, Guibourdenche J, Porquet D, Nessmann C, Evain-Brion D. 1996. Hypoxia impairs cell fusion and differentiation process in human cytotrophoblast, in vitro. *J Cell Physiol* 168:346-353.
- Alvarez C, Narayan P, Huang J, Puett D. 1999. Characterization of a region of the lutropin receptor extracellular domain near transmembrane helix 1 that is important in ligand-mediated signaling. *Endocrinology* 140:1775-1782.
- Andersen B, Milsted A, Kennedy G, Nilson J. 1988. Cyclic AMP and phorbol ester interact synergistically to regulate the expression of the chorionic gonadotropin genes. *Endocrinology* 124:1956-1964.
- Aplin J. 1991. Implantation, trophoblast differentiation and haemochorial placentation: mechanistic evidence in vivo and in vitro. *J Cell Sci* 99:681-692.
- Ascoli M. 1981. Characterization of several clonal lines of cultured Leydig tumor cells: gonadotropin receptors and steroidogenic responses. *Endocrinology*:88-95.
- Ascoli M. 1982. Internalization and degradation of receptor-bound human choriogonadotropin in Leydig tumor cells. Fate of the hormone subunits. *J Biol Chem* 257:13306-13311.
- Ascoli M. 1984. Lysosomal accumulation of the hormone-receptor complex during receptor-mediated endocytosis of human choriogonadotropin. *J Cell Biol* 99:1242-1250.
- Ascoli M, Fanelli F, Segaloff D. 2002. The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective. *Endocr Rev*:141-174.
- Ascoli M, Segaloff DL. 1989. On the structure of the luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor. *Endocr Rev* 10(1):27-44.
- Atger M, Misrahi M, Sar S, Le Flem L, Dessen P, Milgrom E. 1995. Structure of human luteinizing hormone-choriogonadotropin receptor gene: unusual promoter and 5' non-coding regions. *Mol Cell Endocrinol*:113-123.
- Bahl O, Marz L, Kessler M. 1978. Isolation and characterization of N- and O- glycosidic carbohydrate units of human chorionic gonadotropin. *Biochem Biophys Res Commun* 84:667-676.
- Banerjee S, Smallwood A, Chambers A, Papageorghiou A, Loosfelt H, Spencer K, Campbell S, Nicolaides K. 2005. A link between high serum levels of human chorionic gonadotrophin and chorionic expression of its mature functional receptor (LHCGR) in Down's syndrome pregnancies. *Reprod Biol Endocrinol* 3:25-39.
- Benirschke K, Kaufmann P. 2000. Pathology of the human placenta. New-York.: Springer-Verlag. 22-70 pp. p.
- Benirschke R, Kaufmann P. 1993. Abortion, placenta of trisomies, and immunological considerations of recurrent reproductive failure. Berlin, Germany: Springer-Verlag. 754-781 p.
- Benzakour O. 1994. Transforming growth factor beta: Structure, effets biologiques et mécanismes d'action. *Bull Cancer* 81:1014-1022.
- Berthezene F, Forest M, Grimaud J, Claustrat B, Mornex R. 1976. Leydig-cell agenesis: a cause of male pseudohermaphroditism. *N Engl J Med* 295:969-972.
- Bhowmick N, Huang J, Puett D, Isaacs N, Laphorn A. 1996. Determination of residues important in hormone binding to the extracellular domain of the luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor by site-directed mutagenesis and modeling. *Mol Endocrinol* 10:1147-1159.

- Bielinska M, Matzuk M, Boime I. 1989. Site-specific processing of the N-linked oligosaccharides of the human chorionic gonadotropin alpha subunit. *J Biol Chem* 264:17113-17118.
- Bischof P, Haenggeli L, Campana A. 1995. Gelatinase and oncofetal fibronectin secretion is dependent on integrin expression on human cytotrophoblasts. *Mol hum reprod* 10:734-742.
- Bischof P, Meisser A, Campana A. 2000. Mechanisms of endometrial control of trophoblast invasion. *J Reprod Fertil Suppl* 55:65-71.
- Blaschitz A, Weiss U, Dohr G, Desoye G. 2000. Antibody reaction patterns in first trimester placenta: implications for trophoblast isolation and purity screening. *Placenta* 21:733-741.
- Blond J-L, Lavillette D, Cheynet V, Bouton O, Oriol G, Chapel-Fernandes S, Mandrand B, Mallet F, Cosset FL. 2000. An envelope glycoprotein of the human endogenous retrovirus HERV-W is expressed in the human placenta and fuses cells expressing the type D mammalian retrovirus receptor. *J Virol* 74:3321-3329.
- Bockaert J, Pin J. 1999. Molecular tinkering protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J* 18:1723-1729.
- Bogart M, Pandian M, Jones O. 1987. Abnormal maternal serum chorionic gonadotropin levels in pregnancies with fetal chromosome abnormalities. *Prenat Diagn* 7:623-630.
- Bradbury F, Kawate N, Foster C, Menon K. 1997. Post-translational processing in the Golgi plays a critical role in the trafficking of the luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor to the cell surface. *J Biol Chem* 272:5921-5926.
- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*:248-254.
- Braun T, Schofield P, Sprengel R. 1991. Amino-terminal leucine-rich repeats in gonadotropin receptors determine hormone selectivity. *EMBO J* 10:1885-1890.
- Braunstein G, Rasor J, Danzer H, Adler D, Wade M. 1976. Serum human chorionic gonadotropin levels throughout normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*:678-681.
- Brizot M, Jauniaux E, Mckie A, Farzaneh F, Nicolaidis K. 1995. Placental expression of alpha and beta subunits of human chorionic gonadotrophin in early pregnancies with Down's syndrome. *Hum Reprod* 10:2506-2509.
- Burton G, Jauniaux E, Watson A. 1999. Maternal arterial connections to the placental intervillous space during the first trimester of human pregnancy: the Boyd collection revisited. *Am J Obstet Gynecol* 181:718-724.
- Canick J, Knight G, Palomaki G, Haddow J, Cuckle H, Wald N. 1988. Low second trimester maternal serum unconjugated oestriol in pregnancies with Down's syndrome. *Br J Obstet Gynaecol* 95:330-333.
- Caniggia I, Mostachfi H, Winter J, Gassmann M, Lye SJ, Kuliszewski M, Post M. 2000. Hypoxia-inducible factor-1 mediates the biological effects of oxygen on human trophoblast differentiation through TGFbeta(3). *J Clin Invest* 105:577-587.
- Chard T, Iles R, Wathen N. 1995. Why is there a peak of human chorionic gonadotropin (hCG) in early pregnancy? *Hum Reprod* 10(7):1837-1840.
- Chomezynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159.
- Cole L, Omrani A, Cermik D, Bahado Singh R, Mahoney M. 1998. Hyperglycosylated hCG, a potential alternative to hCG in Down syndrome screening. *Prenat Diagn* 18:926-933.
- Cole LA, Shahabi S, Oz UA, Bahado-Singh RO, Mahoney MJ. 1999. Hyperglycosylated human chorionic gonadotropin (invasive trophoblast antigen) immunoassay: A new basis for gestational Down syndrome screening. *Clin Chem* 45(12):2109-2119.
- Combarnous Y. 1992. Molecular basis of the specificity of binding of glycoprotein hormones to their receptors. *Endocr Rev* 13(4):670-691.
- Combarnous Y. 1994. *Biochimie des communications cellulaires. Hormones neuromédiateurs cytokines facteurs de croissance.* internationales-Lavoisier Em, editor. Paris.
- Cronier L, Bastide B, Defamie N, Niger C, Pointis G, Gasc J, Malassine A. 2001. Involvement of gap junctional communication and connexin expression in trophoblast differentiation of the human placenta. *Histol Histopathol* 16:285-295.

- Cronier L, Bastide B, Hervé J-C, Delèze J, Malassiné A. 1994. Gap junctional communication during human trophoblast differentiation: influence of human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 135:402-408.
- Cronier L, Frenco J-L, Defamie N, Pidoux G, Bertin G, Guibourdenche J, Pointis G, Malassine A. 2003. Requirement of Gap Junctional Intercellular Communication for Human Villous Trophoblast Differentiation. *Biol Reprod*:in press.
- Cronier L, Guibourdenche J, Niger C, Malassine A. 1999. Oestradiol stimulates morphological and functional differentiation of human villous cytotrophoblast. *Placenta* 20:669-676.
- Davisson MT, Schmidt C, Akeson EC. 1990. Segmental trisomy of murine chromosome 16: a new model system for studying Down syndrome. *Prog Clin Biol Res* 360:263-280.
- Davisson MT, Schmidt C, Reeves RH, Irving NG, Akeson EC, Harris BS, Bronson RT. 1993. Segmental trisomy as a mouse model for Down syndrome. *Prog Clin Biol Res* 384:117-133.
- De Haan J, Wolvetang E, Cristiano F, Iannello R, Bladier C, Kelner M, Kola I. 1997. Reactive oxygen species and their contribution to pathology in Down syndrome. *Adv Pharmacol* 38:379-402.
- Drust DS, Troccoli NM, Jameson JL. 1991. Binding specificity of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-responsive element (CRE)-binding proteins and activating transcription factors to naturally occurring CRE sequence variants. *Mol Endocrinol* 5(10):1541-1551.
- Eldar-Geva T, Hochberg A, deGroot N, Weinstein D. 1995. High maternal serum chorionic gonadotropin level in Down's syndrome pregnancies is caused by elevation of both subunits messenger ribonucleic acid level in trophoblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 80:3528-3531.
- Elliott MM, Kardana A, Lustbader JW, Cole LA. 1997. Carbohydrate and peptide structure of the alpha- and beta-subunits of human chorionic gonadotropin from normal and aberrant pregnancy and choriocarcinoma. *Endocrine* 7(1):15-32.
- Evain-Brion D, Frenco J-L, Vidaud M, Muller F, Porquet D, Blot P. 2000. Defaut de différenciation du trophoblaste dans la trisomie 21. *Bull Acad Natl Med*(184):1033-1047.
- Fabritz J, Ryan S, Ascoli M. 1998. Transfected cells express mostly the intracellular precursor of the lutropin/choriogonadotropin receptor but this binds choriogonadotropin with high affinity. *Biochemistry* 37:664-672.
- Fanelli F, Menziani M, Scheer A, Cotecchia S, SDe Benedetti P. 1999. Theroretical study on the electrostatically driven step of receptor-G protein recognition. *Proteins Struct Funct Genet* 37:145-156.
- Fazel A, Vincenot A, Malassine A, Soncin F, Gaussem P, Alsat E, Evain-Brion D. 1998. Increase in expression and activity of thrombomodulin in term human syncytiotrophoblast microvilli. *Placenta* 4:261-268.
- Feinman M, Kliman H, Caltabiano S, Strauss Jr. 1986. 8 Bromo-3', 5'-adenosine monophosphate stimulates the endocrine activity of human cytotrophoblasts in culture. *J Clin Endocrinol Metab* 63:1211-1217.
- Feng W, Bedows E, Norton S, Ruddon R. 1996. Novel covalent chaperone complexes associated with human chorionic gonadotropin  $\beta$  subunit folding intermediates. *J Biol Chem* 271:18543-18548.
- Ferguson S. 2001. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev* 53:1-24.
- Finkel T. 1998. Oxygen radicals and signaling. *Current Opinion in Cell Biology* 10((2)):248-253.
- Forman H, Fisher A. 1982. Oxygen and living processes: an interdisciplinary approach. New York: Gibert, D.L.
- Freedman N, Lefkowitz R. 1996. Desensitization of G protein-coupled receptors. *Rec Prog Horm Res* 51:319-353.
- Frenco J-L, Cronier L, Bertin G, Guibourdenche J, Vidaud M, Evain-Brion D, Malassine A. 2003a. Involvement of connexin 43 in human trophoblast cell fusion and differentiation. *J Cell Sci* 116:3413-3421.
- Frenco J-L, Guibourdenche J, Pidoux G, Vidaud M, Luton D, Giovangrandi Y, Porquet D, Muller F, Evain-Brion D. 2004. Trophoblast Production of a Weakly Bioactive Human Chorionic Gonadotropin in Trisomy 21-Affected Pregnancy. *J Clin Met Endocrinol* 89:727-732.

- Frendo J-L, Olivier D, Cheynet V, Blond J-L, Vidaud M, Rabreau M, Evain-Brion D, Mallet F. 2003b. Direct involvement of HERV-W Env glycoprotein in human trophoblast cell fusion and differentiation. *Mol Cell Biol* 23:3566-3574.
- Frendo J-L, Therond P, Guibourdenche J, Vidaud M, Evain-Brion D. 2002. Implication of copper zinc superoxide dismutase (SOD-1) in human placenta development. *Ann N Y Acad Sci* 973:297-301.
- Frendo J-L, Théron P, Bird T, Massin N, Muller F, Guibourdenche J, Luton D, Vidaud M, Anderson W, Evain-Brion D. 2001. Overexpression of copper zinc superoxide dismutase impairs human trophoblast cell fusion and differentiation. *Endocrinology* 142:3638-3648.
- Frendo J-L, Vidaud M, Guibourdenche J, Luton D, Muller F, Bellet D, Giovangrandi Y, Tarrade A, Porquet D, Blot P, Evain-Brion D. 2000. Defect of villous cytotrophoblast differentiation into syncytiotrophoblast in Down syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 85:3700-3707.
- Fridovich I. 1997. Superoxide anion radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), superoxide dismutases, and related matters. *Journal of Biological Chemistry* 272:18515-18517.
- Geng Y, Tsai-Morris C, Zhang Y, Dufau M. 1999. The human luteinizing hormone receptor gene promoter: activation by sp1 and sp3 and inhibitory regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 263:366-371.
- Gether U. 2000. Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr Rev* 21:90-113.
- Gharib S, Wierman M, Shupnik M, Chin W. 1990. Molecular biology of pituitary gonadotropins. *Endocr Rev* 11:177-179.
- Ghinea N, Vu Hai-Luu Thi M, Groyer-Picard M, Houllier A, Schoëvaert D, Milgrom E. 1992. Pathways of internalization of the hCG/LH receptor: immunoelectron microscopic studies in Leydig cells and transfected L cells. *J Cell Biol* 118:1347-1358.
- Ghosh D, Ezashi T, Ostrowski MC, Roberts RM. 2003. A central role for Ets-2 in the transcriptional regulation and cyclic adenosine 5'-monophosphate responsiveness of the human chorionic gonadotropin-beta subunit gene. *Mol Endocrinol* 17(1):11-26.
- Gohar J, Mazor M, Leiberman JR. 1996. GnRH in pregnancy. *Arch Gynecol Obstet* 259(1):1-6.
- Green E, Boime I, Baenziger J. 1986. Differential processing of Asn-linked oligosaccharides on pituitary glycoprotein hormones: implications of biologic function. *Mol cell biochem* 72:81-100.
- Gudermann T, Birnbaumer M, Birnbaumer L. 1992. Evidence for dual coupling of the murine luteinizing hormone receptor to adenylyl cyclase and phosphoinositide breakdown and Ca<sup>2+</sup> mobilization. Studies with the cloned murine luteinizing hormone receptor expressed in L cells. *J Biol Chem*:4479-4488.
- Handwerger S. 1991. The physiology of placental lactogen in human pregnancy. *Endocrinology* 12:329-336.
- Hartree A, Renwick A. 1992. molecular structures of glycoprotein hormones and functions of their carbohydrate components. *Biochem J* 287:665-679.
- Hecht CA, Hook EB. 1994. The imprecision in rates of Down syndrome by 1-year maternal age intervals: a critical analysis of rates used in biochemical screening. *Prenat Diagn* 14(8):729-738.
- Herrlich A, Kuhn B, Grosse R, Schmid A, Schultz G, Gudermann T. 1996. Involvement of Gs and Gi proteins in dual coupling of the luteinizing hormone receptor to adenylyl cyclase and phospholipase C. *J Biol Chem* 271:16764-16772.
- Hestnes A, Stovner LJ, Husoy O, Folling I, Fougner KJ, Sjaastad O. 1991. Hormonal and biochemical disturbances in Down's syndrome. *J Ment Defic Res* 35 (Pt 3):179-193.
- Hipkin R, Sanchez-Yague J, Ascoli M. 1992. Identification and characterization of a luteinizing hormone/chorionic (LH/CG) receptor precursor in a human kidney cell line stably transfected with the rat luteal LH/CG receptor complementary DNA. *Mol Endocrinol* 6:2210-2218.
- Hipkin R, Sanchez-Yague J, Ascoli M. 1993. Agonist-induced phosphorylation of the luteinizing hormone/chorionic gonadotropin (LH/CG) receptor expressed in a stably transfected cell line. *Mol Endocrinol* 7:823-832.

- Hipkin R, Wang Z, Ascoli M. 1995. Human chorionic gonadotropin- and phorbol ester stimulated phosphorylation of the LH/CG receptor maps to serine 635, 639, 645, and 652 in the C-terminal cytoplasmic tail. *Mol Endocrinol* 9:151-158.
- Hirakawa T, Galet C, Ascoli M. 2002. MA-10 cells transfected with the human lutropin/choriogonadotropin receptor (hLHR): a novel experimental paradigm to study the functional properties of the hLHR. *Endocrinology*:1026-1035.
- Hoffman Y, Peegel H, Sprock M, Zhang Q-Y, Menon K. 1991. Evidence that human chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptor-down regulation involves decreased levels of receptor messenger ribonucleic acid. *Endocrinology* 128:338-393.
- Hong S, Phang T, Ji I, Ji T. 1998. The amino-terminal region of the luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor contacts both subunits of human choriogonadotropin. I. Mutational analysis. *J Biol Chem* 273:13835-13840.
- Hsiang YH, Berkovitz GD, Bland GL, Migeon CJ, Warren AC. 1987. Gonadal function in patients with Down syndrome. *Am J Med Genet* 27(2):449-458.
- Hu ZZ, Tsai-Morris CH, Buczko E, Dufau ML. 1990. Hormonal regulation of LH receptor mRNA and expression in the rat ovary. *FEBS Lett* 274(1-2):181-184.
- Hunter W, Greenwood F. 1962. Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature*:495-496.
- Huth J, Mountjoy K, Perini F, Bebows E, Ruddon R. 1992. Domain-dependent protein folding is indicated by the intracellular kinetics of disulfide bond formation of human chorionic gonadotropin  $\beta$ -subunit. *J Biol Chem* 267:21396-21403.
- Ilekis J, Benveniste R. 1985. Effects of epidermal growth factor, phorbol myristate acetate, and arachidonic acid on choriogonadotropin secretion by cultured human choriocarcinoma cells. *Endocrinology* 116:2400-2409.
- Iles R, Chard T. 1993. Molecular insights into the structure and function of human chorionic gonadotropin. *J Mol Endo* 10:217-234.
- Irani K, Xia Y, Zweier J, Sollott S, Der C, Fearon E, Sundaresan M, Finkel T, Goldschmidt-Clermont P. 1997. Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science* 275:1649-1652.
- Iwashita M, Watanabe M, Setoyama T, Mimuro T, Nakayama S, Adachi T, Takeda S, Sakamoto S. 1992. Effects of diacylglycerol and gonadotropin-releasing hormone on human chorionic gonadotropin release by cultured trophoblast cells. *Placenta* 13:213-221.
- Jameson J, Lindell C. 1988. Isolation and characterization of the human chorionic gonadotropin  $\beta$  subunit (CG  $\beta$ ) gene cluster: regulation of transcriptionally active CG $\beta$  gene by cyclic AMP. *Mol cell biol* 8:5100-5107.
- Jauniaux E, Bao S, Eblen A, Li X, Lei Z, Meuris S, Rao C. 2000. HCG concentration and receptor gene expression in placental tissue from trisomy 18 and 21. *Mol Hum Reprod* 6:5-10.
- Ji I, Ji T. 1991a. Asp383 in the second transmembrane domain of the lutropin receptor is important for high affinity hormone binding and cAMP production. *J Biol Chem* 266:14953-14957.
- Ji I, Ji T. 1991b. Exons 1-10 of the rat LH receptor encode a high affinity hormone binding site and exon 11 encodes a G-protein modulation and a potential second hormone binding site. *Endocrinology* 128:2648-2650.
- Ji I, Zeng H, Ji T. 1993. Receptor activation of and signal generation by the lutropin/choriogonadotropin receptor. *J Biol Chem* 268:22971-22974.
- Jiang X, Dreano M, Buckler D, Cheng S, Ythier A, Wu H, Hendrickson W, El Tayar N. 1995. Structural predictions for the ligand-binding region of glycoprotein hormone receptors and the nature of hormone-receptor interactions. *Structure* 15:1341-1353.
- Johnson W, Albanese C, Handwerger S, Williams T, Pestell RG, Jameson JL. 1997. Regulation of the human chorionic gonadotropin alpha- and beta-subunit promoters by AP-2. *J Biol Chem* 272(24):15405-15412.
- Jovanovic S, Clements D, MacLeod K. 1998. Biomarkers of oxidative stress are significantly elevated in Down syndrome. *Free Radical Biol Med* 25:1044-1048.
- Kajava A, Vassart G, Wodak S. 1995. Modeling of the three dimensional structure of proteins with the typical leucine rich repeats. *Structure* 3:867-877.

- Kash J, Menon K. 1998. Identification of a hormonally regulated luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor mRNA binding protein. Increased mRNA binding during receptor down-regulation. *J Biol Chem* 273:10658-10664.
- Kash J, Menon K. 1999. Sequence-specific binding of a hormonally regulated mRNA binding protein to cystidine-rich sequences in the lutropin receptor open reading frame. *Biochemistry* 38:16889-16897.
- Kaufmann P, Black S, Huppertz B. 2003. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biol Reprod* 1:1-7.
- Kawate N, Menon K. 1994. Palmitoylation of luteinizing hormone/human choriogonadotropin receptors in transfected cells. *J Biol Chem* 269:664-672.
- Keryer G, Alsat E, Tasken K, Evain-Brion D. 1998. Cyclic AMP-dependent protein kinases and human trophoblast cell differentiation in vitro. *J Cell Sci* 111:995-1004.
- Kessler M, Mise T, Ghai R, Bahl O. 1979. Structure and location of the O-glycosidic carbohydrate units of human chorionic gonadotropin. *J Biol Chem* 254:7909-7914.
- Kishi L, Liu X, Hirakawa T, Reczek D, Bretscher A, Ascoli M. 2001. Identification of two distinct structural motifs that, when added to the C-terminal tail of the rat lutropin receptor, redirect the internalized hormone-receptor complex from a degradation to a recycling pathway. *Mol Endocrinol* 15:1624-1635.
- Kliman H, Nestler J, Sermasi E, Sanger J, Strauss III J. 1986. Purification, characterization, and *in vitro* differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinology* 118:1567-1582.
- Knofler M, Saleh L, Bauer S, Galos B, Rotheneder H, Husslein P, Helmer H. 2004. Transcriptional regulation of the human chorionic gonadotropin beta gene during villous trophoblast differentiation. *Endocrinology* 145(4):1685-1694.
- Knofler M, Saleh L, Bauer S, Vasicek R, Griesinger G, Strohmer H, Helmer H, Husslein P. 2000. Promoter elements and transcription factors involved in differentiation-dependent human chorionic gonadotrophin-alpha messenger ribonucleic acid expression of term villous trophoblasts. *Endocrinology* 141(10):3737-3748.
- Kobata A, Takeuchi M. 1999. Structure, pathology and function of the N-linked sugar chains of human chorionic gonadotropin. *Biochimica et Biophysica Acta* 1455:315-326.
- Kobe B, Deisenhofer J. 1993. Crystal structure of porcine ribonuclease inhibitor, a protein with leucine-rich repeats. *Nature* 366:751-756.
- Konrad M, Merz W. 1994. Regulation of N-glycosylation. long term effect of cyclic AMP mediates enhanced synthesis of the dolichol pyrophosphate core oligosaccharide. *J Biol Chem* 269:8659-8666.
- Kosugi S, Van Dop C, Geffner M, Rabl W, Carel J, Chaussain J, Mori T, Merendino JJ, Shenker A. 1995. Characterization of heterogeneous mutations causing constitutive activation of the luteinizing hormone receptor in familial male precocious puberty. *Hum Mol Genet* 4:183-188.
- Kraiem Z, Sadeh O, Blithe D, Nisula B. 1994. Human chorionic gonadotropin stimulates thyroid hormone secretion, iodide uptake, organification, and adenosine 3', 5' - monophosphate formation in cultured human thyrocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 79:595-599.
- Kristensen T, Oxvig C, Sand O, Moller NP, Sottrup-Jensen L. 1994. Amino acid sequence of human pregnancy-associated plasma protein-A derived from cloned cDNA. *Biochemistry* 33(6):1592-1598.
- Krupnick J, Benovic J. 1998. The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38:289-319.
- LaPolt P, Oikawa M, Jia X, Dargan C, Hsueh A. 1990. Gonadotropin-induced up- and down-regulation of rat ovarian LH receptor message levels during follicular growth, ovulation and luteinization. *Endocrinology* 126:3277-3279.
- Lapthorn A, Harris D, Littlejohn A, Lustbader J, Canfield R, Machin K, Morgan F, Isaacs N. 1994. Crystal structure of human chorionic gonadotropin. *Nature*:455-461.
- Latronico A, Anasti J, Arnhold I, Mendonca B, Domenice S, Albano M, Zachman K, Wajchenberg B, Tsigos C. 1995. A novel mutation of the luteinizing hormone receptor gene causing male gonadotropin-independent precocious puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 80:2490-2494.

- Laue L, Chan W, Hsueh A, Kudo M, Hsu S, Wu S, Blomberg L, Cutler GJ. 1995. Genetic heterogeneity of constitutively activating mutations of the human luteinizing hormone receptor in familial male-limited precocious puberty. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:1906-1910.
- Laue L, Wu S, Kudo M, Hsueh A, Cutler GJ, Jelly D, Diamond F, Chan W. 1996. Heterogeneity of activating mutations of the human luteinizing hormone receptor in male-limited precocious puberty. *Biochem Mol Med* 10:192-198.
- Lei Z, Mishra S, Zou W, Xu B, Foltz M, Mi X, Rao C. 2001. targeted distribution of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor gene. *Mol Endocrinol* 15:184-200.
- Lei Z, Rao C. 1992. Gonadotropin receptors in human fetoplacental unit: implications for hCG as an intracrine, paracrine and endocrine regulator of human fetoplacental function. *Trophoblast* 6:213-222'.
- Lei Z, Rao C, Kornyei J, Licht P, Hiatt E. 1993a. Novel expression of human chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptor gene in brain. *Endocrinology* 132:2262-2270.
- Lei Z, Toth P, Rao C, Pridham D. 1993b. Novel co-expression of human chorionic gonadotropin/human luteinizing hormone receptors and their ligand, hCG, in human fallopian tubes. *J Clin Endocrinol Metab* 77:863-872.
- Lei ZM, Rao CV, Lincoln SR, Ackermann DM. 1993c. Increased expression of human chorionic gonadotropin/human luteinizing hormone receptors in adenomyosis. *J Clin Endocrinol Metab* 76(3):763-768.
- Leiser R, Kaufmann P. 1994. Placental structure: in a comparative aspect. *Exp Clin Endocrinol* 102:122-134.
- Lejeune J, Gautier M, Turpin R. 1959. [Study of somatic chromosomes from 9 mongoloid children.]. *C R Hebd Seances Acad Sci* 248(11):1721-1722.
- Leung P, Steele G. 1992. Intracellular signaling in the gonads. *Endocr Rev* 13:476-498.
- Licht P, Cao H, Lei Z, CV. R, Merz W. 1993. Novel self-regulation of human chorionic gonadotropin biosynthesis in term pregnancy human placenta. *Endocrinology* 133:3014-3025.
- Linnemann K, Malek A, Sager R, Blum W, Schneider H, Fusch C. 2000. Leptin production and release in the dually in vitro perfused human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 11:4298-4301.
- Loosfelt H, Misrahi M, Atger M, Salesse R, Vu Hai-Luu Thi M, Jolivet A, Guiochon-Mantel A, Sar S, Jallal B, Garnier J. 1989. Cloning and sequencing of porcine LH-hCG receptor cDNA: variants lacking transmembrane domain. *Science*:525-528.
- Lu D, Peegel H, Mosier S, Menon K. 1993. Loss of lutropin/human choriogonadotropin receptor messenger ribonucleic acid during ligand-induced down-regulation occurs post transcriptionally. *Endocrinology* 132:235-240.
- Macri JN, Kasturi RV, Krantz DA, Cook EJ, Moore ND, Young JA, Romero K, Larsen JW, Jr. 1990. Maternal serum Down syndrome screening: free beta-protein is a more effective marker than human chorionic gonadotropin. *Am J Obstet Gynecol* 163(4 Pt 1):1248-1253.
- Malassine A, Frenco JL, Evain-Brion D. 2003. A comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model. *Hum Reprod Update* 9(6):531-539.
- Malassiné A, Cronier L. 2002. Hormones and human trophoblast differentiation. *Endocrine* 19.
- Maquoi E, Polette M, Nawrocki B, Bischof P, Noel A, Pintiaux A, Birembaut P, Basset P, Foidart J. 1995. Expression of stromelysin-3 in the human implantation placenta site. *Placenta* 16:A46.
- Maruo T, Matsuo H, Ohtani T, Hoshina M, Mochizuki M. 1986. Differential modulation of chorionic gonadotropin (CG) subunit messenger ribonucleic acid levels and CG secretion by progesterone in normal placenta and choriocarcinoma cultured in vitro. *Endocrinology* 119:855-864.
- Massin N, Frenco J-L, Guibourdenche J, Luton D, Giovannardi Y, Muller F, Vidaud M, Evain-Brion D. 2001. defect of syncytiotrophoblast formation and hCG expression in Down's syndrome. *Placenta* 22:Suppl A:S93-97.
- Matsusaki N, Li Y, Matsuihiro K. 1992. Trophoblast-derived transforming growth factor- $\beta$ 1 suppress cytokine-induced, but not gonadotropin-releasing hormone-induced, release of human chorionic gonadotropin by normal human trophoblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 74:211-216.
- Matzuk M, Boime I. 1988a. The role of Asparagine-linked oligosaccharides of the  $\alpha$ -subunit in the secretion and assembly of human chorionic gonadotropin. *J Cell Biol* 106:1049-1059.



- Matzuk M, Boime I. 1988b. Site-specific mutagenesis defines the intracellular role of the Asparagine linked oligosaccharides of chorionic gonadotropin  $\beta$ -subunit. *J Biol Chem* 263:17106-17111.
- Matzuk M, Hsueh A, LaPolt P, Tsafiriri A, Keene J, Boime I. 1990. The biological role of the carboxyl-terminal extension of human chorionic gonadotropin  $\beta$ -subunit. *Endocrinology* 126:376-383.
- Matzuk M, Keene J, Boime I. 1989. Site specificity of the chorionic gonadotropin N-linked oligosaccharides in signal transduction. *J Biol Chem* 264:2409-2414.
- McFarland K, Sprengel R, Phillips H, Kohler M, Roseblit N, Nikolics K, Segaloff D, Seeburg P. 1989. Lutropin-choriogonadotropin receptor: an unusual member of the G protein-coupled receptor family. *Science* 245:494-499.
- Meduri G, Charnaux N, Loosfelt H, Jolivet A, Spyrtos F, Brailly S, Milgrom E. 1997. Luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptors in breast cancer. *Cancer Res* 57:857-864.
- Merkatz I, Nitowsky H, Macri J, Johnson W. 1984. An association between low maternal serum alpha-fetoprotein and fetal chromosomal abnormalities. *Am J Obstet Gynecol* 148:886-894.
- Merz W. 1988. Evidence for impaired subunit interaction in chemically deglycosylated human choriongonadotropin. *Biochem Biophys Res Commun* 156:1271-1278.
- Merz W. 1994. The primate placenta and human chorionic gonadotropin. *Exp Clin Endocrinol* 102:222-234.
- Merz WE. 1996. Biosynthesis of human chorionic gonadotropin: a review. *Eur J Endocrinol* 135(3):269-284.
- Meuris S, Polliotti B, Robyn C, Lebrun P. 1994.  $Ca^{2+}$  entry through L - Type voltage sensitive  $Ca^{2+}$  channels stimulates the release of human chorionic gonadotrophin and placental lactogen by placental explants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1220:101-106.
- Mi S, Lee X, Li X-P, Veldman GM, Finnerty H, Racie L, LaVallie E, tang X-Y, Edouard P, Howes S, Keith JC, McCoy JM. 2000. Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature* 403:785-789.
- Midgley A, Pierce G, Denau G, Gosling J. 1963. Morphogenesis of syncytiotrophoblast in vivo: an autoradiographic demonstration. *Science* 141:350-351.
- Min K, liu X, Fabritz J, Jaquette J, Abell A, Ascoli M. 1998. Mutations that induce constitutive activation and mutations that impair signal transduction modulate the basal and/or agonist-stimulated internalization of the lutropin/choriogonadotropin receptor. *J Biol Chem* 273:34911-34919.
- Min L, Ascoli M. 2000. Effect of activating and inactivating mutations on the phosphorylation and trafficking of the human lutropin/choriogonadotropin receptor. *Mol Endocrinol* 14:1797-1810.
- Min L, Galet C, Ascoli M. 2002. The association of arrestin-3 with the human lutropin/choriogonadotropin receptor depends mostly on receptor activation rather than on receptor phosphorylation. *J Biol Chem* 277:702-710.
- Minegishi T, Nakamura K, Takakura Y, Miyamoto K, Hasegawa Y, Ibuki Y, Igarashi M. 1990. Cloning and sequencing of human LH/hCG receptor cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* 172:1049-1054.
- Morrish D, Bhardwaj D, Dabbagh L, Marusyk H, Siy O. 1987a. Epidermal growth factor induces differentiation and secretion of human chorionic gonadotropin and placental lactogen in normal human placenta. *J Clin Endocrinol Metab*:1282-1290.
- Morrish D, Bhardwaj D, paras M. 1991. Transforming growth factor  $\beta$ 1 inhibits placental differentiation and human chorionic gonadotropin and human placental lactogen secretion. *Endocrinology* 129:22-26.
- Morrish D, Dakour J, Li H. 1998. Functional regulation of human trophoblast differentiation. *J Reprod Immunol* 39:179-195.
- Morrish D, Marusyk H, Siy O. 1987b. Demonstration of specific secretory granules for human chorionic gonadotropin in placenta. *J Histochem Cytochem* 35:93-101.
- Moyle W, Campbell R, Rao S, Ayad N, Bernard M, Han Y, Wang H. 1995. Model of human chorionic gonadotropin and lutropin receptor interaction that explains signal transduction of glycoprotein hormones. *J Biol Chem* 270:20020-20031.

- Muller F, Benattar C, Audibert F, Roussel N, Dreux S, Cuckle H. 2003. First-trimester screening for Down syndrome in France combining fetal nuchal translucency measurement and biochemical markers. *Prenat Diagn* 23(10):833-836.
- Muyan M, Boime I. 1997. Secretion of chorionic gonadotropin from human trophoblasts. *Placenta* 18:237-241.
- Muyan M, Furuhashi M, Sugahara T, Boime I. 1996. The carboxy-terminal region of the  $\beta$  subunits of luteinizing hormone and chorionic gonadotropin differentially secretion and assembly of the heterodimers. *Mol Endocrinol* 10:1678-1687.
- Nakabayashi K, Kudo M, Kobilka B, Hsueh A. 2000. Activation of the luteinizing hormone receptor following substitution of Ser-277 with selective hydrophobic residues in the ectodomain hinge region. *J Biol Chem* 275:30264-30271.
- Nakamura K, Ascoli M. 1999. A dileucine-based motif in the C-terminal tail of the lutropin/choriogonadotropin receptor inhibits endocytosis of the agonist-receptor complex. *Mol Pharmacol* 56:728-736.
- Nakamura K, Lazari M, Li S, Korgaonkar C, Ascoli M. 1999a. Role of the rate of internalization of the agonist-receptor complex on the agonist-induced down-regulation of the lutropin/choriogonadotropin receptor. *Mol Endocrinol* 13:1295-1304.
- Nakamura K, liu X, Ascoli M. 1999b. The rate of internalization of the gonadotropin receptors is greatly affected by the origi of the extracellular domain. *J Biol Chem* 274:1902-1912.
- Nakamura K, liu X, Ascoli M. 2000. Seven non-contiguous intra-cellular residues of the lutropin/choriogonadotropin receptor dictate the rate of agonist-induced internalization and its sensitivity to non-visual arrestins. *J Biol Chem* 275:241-247.
- Naylor S, Chin W, Goodman H, Lalley P, Grzeschik K, Sakaguchi A. 1983. Chromosome assignment of genes encoding the alpha and beta subunits of glycoprotein hormones in man and mouse. *Somatic Cell Genet*:757-770.
- Nemansky M, de Leeuw R, Wijnands RA, van den Eijnden DH. 1995. Enzymic remodelling of the N- and O-linked carbohydrate chains of human chorionic gonadotropin. Effects on biological activity and receptor binding. *Eur J Biochem* 227(3):880-888.
- Nishi S, Nakabayashi K, Kobilka B, Hsueh A. 2001. The ectodomain of the luteinizing hormone receptor interacts with exoloop 2 to constrain the tranmembrane region: studies using chimeric human and fly receptors. *J Biol Chem* 277:3958-3964.
- Norman RJ, Buchholz MM, Somogyi AA, Amato F. 2000. hCGbeta core fragment is a metabolite of hCG: evidence from infusion of recombinant hCG. *J Endocrinol* 164(3):299-305.
- Oberweiss D, Gillerot Y, Koulischer L, Hustin J, Philippe E. 1983. Le placenta des Trisomie 21 dans le dernier trimestre de la gestation. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 12:345-349.
- Ogren L, Talamantes F. 1994. The placenta as an endocrine organ: polypeptides. In: Knobil E, Neill J, editors. *Physiology of reproduction*. New-York: Raven Press. p 875-945.
- Ohlsson R. 1989. Growth factors, protooncogènes and human placental development. *Cell Diff Dev* 28:1-16.
- Osuga Y, Kudo M, Kaipia A, Kobilka B, Hsueh A. 1997. Derivation of functional antagonists using N-terminal extracellular domain of the extracellulaire domain of the thyrotropin receptors. *Mol Endocrinol* 11:1659-1668.
- Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke C, Motoshima H, Fox B, Le Trong I, Teller D, Okada T, Stenkamp R, Yamamoto M, Miyano M. 2000. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 289:739-745.
- Peegel H, Randolph JJ, Midgley R, Menon K. 1994. *In situ* hybridization of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor mRNA in rat ovarian cells during follicular development and luteinization. *Mol Endocrinol* 4:1856-1865.
- Peters B, Krzesicki R, Perini F, Ruddon R. 1989. O-glycosylation of the  $\alpha$ -subunit does not limit the assembly of chorionic gonadotropin  $\alpha\beta$  dimer in human malignant and non malignant trophoblast cells. *Endocrinology* 124:1602-1612.
- Pfeffer U, Bisacchi D, Morini M, Benelli R, Minghelli S, Vacca A, Noonan DM, Albin A. 2002. Human chorionic gonadotropin inhibits Kaposi's sarcoma associated angiogenesis, matrix metalloprotease activity, and tumor growth. *Endocrinology* 143(8):3114-3121.

- Pidoux G, Gerbaud P, Tsatsaris V, Marpeau O, Ferreira F, Meduri G, Guibourdenche J, Badet J, Evain-Brion D, Frenco JL. 2006. Biochemical characterization and modulation of LH/CG-receptor during human trophoblast differentiation. *J Cell Physiol*:article in revision.
- Pidoux G, Guibourdenche J, Frenco JL, Gerbaud P, Conti M, Luton D, Muller F, Evain-Brion D. 2004. Impact of trisomy 21 on human trophoblast behaviour and hormonal function. *Placenta* 25 Suppl A:S79-84.
- Pierce J, Parsons T. 1981. Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu Rev Biochem*:465-495.
- Pitcher J, Freedman N, Lefkowitz R. 1998. G protein-coupled receptor kinases. *Annu Rev Biochem* 67:653-692.
- Pollioti B, Lebrun P, Robyn C, Meuris S. 1994. The release of human chorionic gonadotrophin and placental lactogen by placental explants can be stimulated by Ca<sup>2+</sup> entry through a Na<sup>+</sup> - Ca<sup>2+</sup> exchange process. *Placenta* 15:477-485.
- Pueschel SM, Jackson IM, Giesswein P, Dean MK, Pezzullo JC. 1991. Thyroid function in Down syndrome. *Res Dev Disabil* 12(3):287-296.
- Quintana J, Wang H, Ascoli M. 1993. The regulation of the binding affinity of the luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor by sodium ions is mediated by a highly conserved aspartate located in the second transmembrane domain of G protein-coupled receptors. *Mol Endocrinol* 7:767-775.
- Rajagopalan-Gupta R, Lamm M, Mukherjee S, Rasenick M, Hunzicker-Dunn M. 1998. Luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor-mediated activation of heterotrimeric guanine nucleotide binding proteins in ovarian follicular membranes. *Endocrinology* 139:4547-4555.
- Rao C. 1996. The beginning of a new era in reproductive biology and medicine: expression of low levels of functional luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptors in nongonadal tissues. *J Physiol Pharmacol* 47:41-53.
- Rao C. 1999. A paradigm shift on the targets of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin actions in the body. *J Bellevue Obstet Gynecol Soc* 15:26-32.
- Rao C, Li X, Toth P, Lei Z, Cook V. 1993. Novel expression of functional human chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptor gene in umbilical cords. *J Clin Endocrinol Metab* 77:1706-1714.
- Rao CV. 1982. Receptors for gonadotropins in human ovaries. *Prog Clin Biol Res* 112 Pt A:123-135.
- Reeves RH. 2001. Down's syndrome. A complicated genetic insult. *Lancet* 358 Suppl:S23.
- Reiter R. 1995. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J* 9:526-533.
- Reshef E, Lei Z, Rao C, Pridham D, Chegini N, Luborsky J. 1990. The presence of gonadotropin receptors in nonpregnant human uterus, human placental, fetal membranes, and decidua. *J Clin Endocrinol Metab* 70(2):421-430.
- Richard R. 1961. Studies of placental morphogenesis I. Radioautographic studies of human placenta utilizing tritiated thymidine. *Proc Soc Exp Biol Med* 106:829-831.
- Richards J. 1994. Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocr Rev* 15:725-751.
- Richtsmeier JT, Baxter LL, Reeves RH. 2000. Parallels of craniofacial maldevelopment in Down syndrome and Ts65Dn mice. *Dev Dyn* 217(2):137-145.
- Richtsmeier JT, Zumwalt A, Carlson EJ, Epstein CJ, Reeves RH. 2002. Craniofacial phenotypes in segmentally trisomic mouse models for Down syndrome. *Am J Med Genet* 107(4):317-324.
- Ringler G, Kallen C, Strauss Jr. 1989. Regulation of human trophoblast function by glucocorticoids: dexamethasone promotes increased secretion of chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 124:1625-1631.
- Ringler G, Strauss Jr. 1990. In vitro systems for the study of human placental endocrine function. *Endocr Rev* 1:105-123.
- Roberson MS, Meermann S, Morasso MI, Mulvaney-Musa JM, Zhang T. 2001. A role for the homeobox protein Distal-less 3 in the activation of the glycoprotein hormone alpha subunit gene in choriocarcinoma cells. *J Biol Chem* 276(13):10016-10024.
- Roberts L, Sebire N, Fowler D, Nicolaidis K. 2000. Histomorphological features of chorionic villi at 10-14 weeks of gestation in trisomic and chromosomally normal pregnancies. *Placenta* 21:678-683.

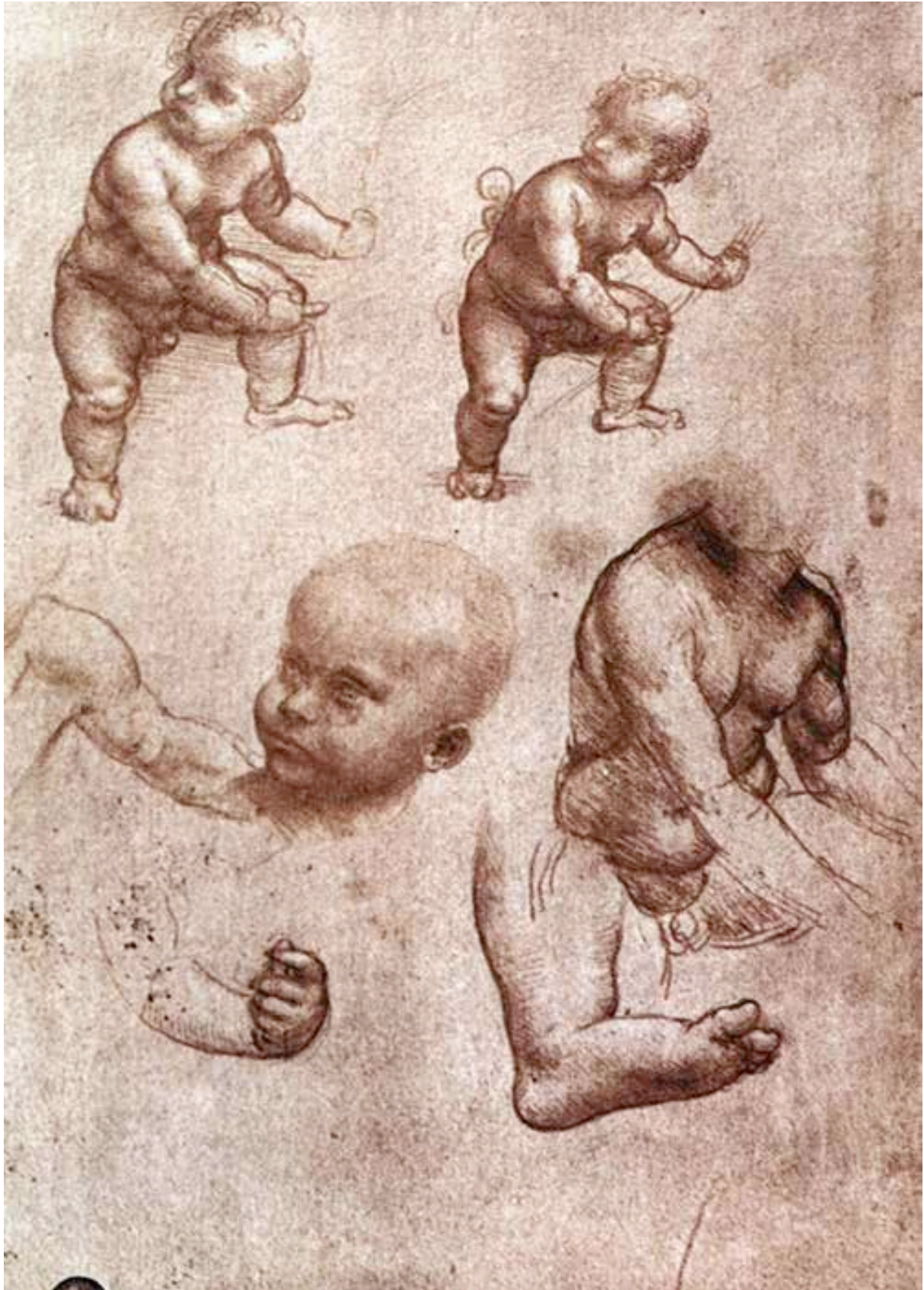
- Roberts RM, Ezashi T, Das P. 2004. Trophoblast gene expression: transcription factors in the specification of early trophoblast. *Reprod Biol Endocrinol* 2:47.
- Rodien P, Cetani F, Costagliola S, Tonacchera M, Duprez L, Minegishi T, Govaerts C, Vassart G. 1998. Evidences for an allelic variant of the human LH/CG receptor rather than a gene duplication: functional comparison of wild-type and variant receptors. *J Clin Endocrinol Metab*:4431-4434.
- Rosenthal I, Refetoff S, Rich B, Barnes R, Sunthornthepvarakul T, Parma J, Rosenfield R. 1996. Response to challenge with gonadotropin-releasing hormone agonist in a mother and her two sons with a constitutively activating mutation of the luteinizing hormone receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 81:3802-3806.
- Rousseau-Merck M, Atger M, Loosfelt H, Milgrom E, Berger R. 1993. The chromosomal localization of the human follicle-stimulating hormone receptor gene (FSHR) on 2p21-p16 is similar to that of the luteinizing hormone receptor gene. *Genomics*:222-224.
- Rousseau-Merck M, Misrahi M, Atger M, Loosfelt H, Milgrom E, Berger R. 1990a. Localization of the human luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor gene (LHCGR) to chromosome 2p21. *Cytogenet Cell Genet*:77-79.
- Rousseau-Merck M, Misrahi M, Loosfelt H, Atger M, Milgrom E, Berger R. 1990b. Assignment of the human thyroid stimulating hormone receptor (TSHR) gene to chromosome 14q31. *Genomics*:233-236.
- Rozell T, Davis D, Chai Y, Segaloff D. 1998. Association of gonadotropin receptor precursors with the protein folding chaperone calnexin. *Endocrinology* 139:1588-1593.
- Ruddon R, Bryan A, Hanson C, Perini F, Ceccorulli L, Peters B. 1981. Characterization of the intracellular and secreted forms of the glycoprotein hormone chorionic gonadotropin produced by human malignant cells. *J Biol Chem* 256:5189-5196.
- Ryseck RP, Bravo R. 1991. c-JUN, JUN B, and JUN D differ in their binding affinities to AP-1 and CRE consensus sequences: effect of FOS proteins. *Oncogene* 6(4):533-542.
- Sago H, Carlson EJ, Smith DJ, Kilbridge J, Rubin EM, Mobley WC, Epstein CJ, Huang TT. 1998. Ts1Cje, a partial trisomy 16 mouse model for Down syndrome, exhibits learning and behavioral abnormalities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(11):6256-6261.
- Sairam M. 1989. Role of carbohydrates in glycoprotein hormone signal transduction. *FASEB J* 3:1915-1926.
- Sairam MR, Jiang LG. 1992. Comparison of the biological and immunological properties of glycosylation deficient human chorionic gonadotropin variants produced by site directed mutagenesis and chemical deglycosylation. *Mol Cell Endocrinol* 85(3):227-235.
- Schreck R, Bauerle P. 1991. A role for oxygen free radicals as second messengers. *Trends in Cell Biology* 1:39-42.
- Segaloff D, Wang H, Richards J. 1990. Hormonal regulation of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor mRNA in rat ovarian cells during follicular development and luteinization. *Mol Endocrinol* 4:1856-1865.
- Shenker A, Laue L, Kosugi S, Merendino JJ, Minegishi T, Cutler GJ. 1993. A constitutively mutation of the luteinizing hormone receptor in familial male precocious puberty. *Nature* 365:652-654.
- shi C, Zhuang L. 1993. Norepinephrine regulates human chorionic gonadotropin production by first trimester trophoblast tissue in vitro. *Placenta* 14:683-693.
- Shi Q, Lei Z, Rao C, Lin J. 1993. Novel role of human chorionic gonadotropin in differentiation of human cytotrophoblasts. *endocrinology* 132:1387-1395.
- Shull M, Doetschman T. 1994. Transforming growth factor- $\beta$ 1 in reproduction and development. *Mol Reprod Dev* 39:239-246.
- Sibley C, Hochberg A, Boime I. 1991. Bromo-adenosine stimulates choriogonadotropin production in Jar and cytotrophoblast cells: evidence for effect on two stage of differentiation. *Mol Endocrinol* 5:582-586.
- Sinet P, Couturier J, Dutrillaux B, Poissonnier M, Raoul O, Rethore M, Allard D, Lejeune J, Jerome H. 1976. Trisomy 21 and superoxide dismutase-1 (IPO-A). Tentative localization of sub-band 21Q22.1. *Exp Cell Res* 97:47-55.
- Song Y, Ji I, Beauchamp J, Isaacs N, Ji T. 2001. Hormone interactions to Leu-rich repeats in the gonadotropin receptors. I. Analysis of Leu-rich repeats of human luteinizing

- hormone/chorionic gonadotropin receptor and follicle-stimulating hormone receptor. *J Biol Chem* 276:3426-3435.
- Steger DJ, Buscher M, Hecht JH, Mellon PL. 1993. Coordinate control of the alpha- and beta-subunit genes of human chorionic gonadotropin by trophoblast-specific element-binding protein. *Mol Endocrinol* 7(12):1579-1588.
- Steger DJ, Hecht JH, Mellon PL. 1994. GATA-binding proteins regulate the human gonadotropin alpha-subunit gene in the placenta and pituitary gland. *Mol Cell Biol* 14(8):5592-5602.
- Strickland T, Parsons T, Pierce J. 1985. Structure of LH and hCG. In: Ascoli M, ed. *Luteinizing hormone action and receptors*. 1-16 p.
- Stromberg K, Pigott D, Ranchalis J, Twardzik D. 1982. Human term placenta contains transforming growth factors. *Biochem Biophys Res Commun* 106:354-361.
- Sturgeon CM, McAllister EJ. 1998. Analysis of hCG: clinical applications and assay requirements. *Ann Clin Biochem* 35 (Pt 4):460-491.
- Talmadge K, Boorstein W, Fiddes J. 1983. The human genome contains seven genes for the beta-subunit of chorionic gonadotropin but only one gene for the beta-subunit of luteinizing hormone. *DNA*:281-289.
- Talmadge K, Vamvakopoulos N, Fiddes J. 1984. Evolution of the beta subunits of human chorionic gonadotropin and luteinizing hormone. *Nature*:37-40.
- Tapanainen J, Bo M, Dunkel L, Billig H, Perlas E, Boime I, Hsueh A. 1993. Deglycosylation of the human luteinizing hormone receptor does not affect ligand binding and signal transduction. *Endocrine* 1:219-225.
- Thomas D, Rozell T, Liu X, Segaloff D. 1996. Mutation analysis of the extracellular domain of the full-length lutropin/choriogonadotropin receptor suggest leucine rich repeats 1-6 are involved in hormone binding. *Mol Endocrinol* 10:760-768.
- Toth P, Rao C. 1994. Direct novel regulation of cyclooxygenase and prostacyclin synthetase by human chorionic gonadotropin in the human amnion. *Trophoblast* 8:503-514.
- Tsai-Morris C, Buczko E, Wang W, Dufau M. 1990. Intronic nature of the rat luteinizing hormone receptor gene defines a soluble receptor subspecies with hormone binding activity. *J Biol Chem* 265:19385-19388.
- Tsai-Morris C, Geng Y, Buczko E, Dufau M. 1998. A novel human luteinizing hormone receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab*:288-291.
- Udagawa A, Okamoto T, Nomura S, Matsuo K, Suzuki H, Mizutani S. 1998. Human chorionic gonadotropin beta-core fragment is present in the human placenta. *Mol Cell Endocrinol* 139(1-2):171-178.
- Van Hall I, Vaitukaity J, Ross G, Hickman J, Aswell G. 1971. Immunological and biological activity of hCG following progressive desialylation. *Endocrinology* 88:456-464.
- Vuhai-Luuthi M, Jolivet A, Jallal B, Salesse R, Bidart J, Houllier A, Guiochon-Mantel A, Garnier J, Milgrom E. 1990. Monoclonal antibodies against luteinizing hormone receptor. Immunochemical characterization of the receptor. *Endocrinology*:2090-2098.
- VuHai-LuuThi M, Misrahi M, Houllier A, Jolivet A, Milgrom E. 1992. Variant forms of the pig lutropin/choriogonadotropin receptor. *Biochemistry* 31:8377-8383.
- Wakelam M. 1985. The fusion of myoblasts. *Biochem J* 15:1-12.
- Wald N, Cuckle H, Densem J. 1988. Maternal serum unconjugated oestriol as an antenatal screening test for Down's syndrome. *Br J Obstet Gynaecol* 95:334-341.
- Wang H, Segaloff D, Ascoli M. 1991. Lutropin/choriogonadotropin down-regulates its receptor by both receptor mediated endocytosis and a cAMP-dependent reduction in receptor mRNA. *J Biol Chem* 266:780-785.
- Wang Z, Hipkin R, Ascoli M. 1996. Progressive cytoplasmic tail truncations of the lutropin-choriogonadotropin receptor prevent agonist- or phorbol ester-induced phosphorylation, impair agonist or phorbol ester-induced desensitization and enhance agonist-induced receptor down-regulation. *Mol Endocrinol* 10:748-759.
- Wang Z, Liu X, Ascoli M. 1997. Phosphorylation of the lutropin/choriogonadotropin receptor facilitates uncoupling of the receptor from adenylyl cyclase and endocytosis of the bound hormone. *Mol Endocrinol* 11:183-192.

- Wice B, Menton D, Geuze H, Schwartz A. 1990. Modulators of cyclic AMP metabolism induce syncytiotrophoblast formation in vitro. *Exp Cell Res*:306-316.
- Wrana J, Attisano L, Weiser R, Ventura F, Massague J. 1994. Mechanism of activation of the TGF $\beta$  receptor. *Nature* 70:341-347.
- Wu H, Lustbader J, Liu Y, Canfield R, Hendrickson W. 1994. Structure of human chorionic gonadotropin at 2.6 Å resolution from MAD analysis of the selenomethionyl protein. *Structure*:545-558.
- Xie Y, Wang H, Segaloff D. 1990. Extracellular domain of lutropin/choriogonadotropin receptor expressed in transfected cells binds choriogonadotropin with high affinity. *J Biol Chem* 265:21411-21414.
- Yamawaki T, Toyoda N. 1994. Human chorionic gonadotropin secretion and protein phosphorylation in chorionic tissue. *Endocrine* 41:509-516.
- Yang M, Lei Z, Rao C. 2003. The central role of human chorionic gonadotropin in the formation of human placental syncytium. *Endocrinology* 144:1108-1120.
- Yano K, Hidaka A, Saji M, Polymeropoulos M, Okuno A, Kohn L, Cutler GJ. 1994. A sporadic case of male-limited precocious puberty has the same constitutively activating point mutation in luteinizing/choriogonadotropin receptor gene as familial cases. *J Clin Endocrinol Metab* 79:1818-1823.
- Zamboni Zallone A, Teti A, Primavera M. 1984. Monocytes from circulating blood fuse in vitro with purified osteoclasts in primary culture. *J Cell Sci* 66:335-342.
- Zawel L, Reinberg D. 1993. Initiation of transcription by RNA polymerase II: a multi-step process. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 44:67-108.
- Zeng H, Phang T, Song Y, Ji I, Ji T. 2001. The role of the hinge region of the luteinizing hormone receptor in hormone interaction and signal generation. *J Biol Chem* 276:3451-3458.
- Zhang F, Kero J, Huhtaniemi I. 1998. The unique exon 10 of the human luteinizing hormone receptor is necessary for expression of the receptor protein at the plasma membrane in the human luteinizing hormone receptor, but deleterious when inserted in the human follicle-stimulating hormone receptor. *Mol Cell Endocrinol* 142:165-174.
- Zhang F, Rannikko A, Manna P, Fraser H, Huhtaniemi I. 1997. Cloning and functional expression of the luteinizing hormone receptor complementary deoxyribonucleic acid from the marmoset monkey testis: absence of sequences encoding exon 10 in other species. *Endocrinology*:2481-2490.
- Zhang R, Buczek E, Dufau M. 1996. Requirement of cysteine residues in exons 1-6 of the extracellular domain of the luteinizing hormone receptor for gonadotropin binding. *J Biol Chem* 271:5775-5760.
- Zhang Y, Dufau M. 2000. Nuclear orphan receptors regulate transcription of the gene for the human luteinizing hormone receptor. *J Biol Chem* 275:2763-2767.
- Zhang Y, Dufau M. 2001. EAR2 and EAR3/COUP-TF1 regulate transcription of the rat LH receptor. *Mol Endocrinol* 15:1891-1905.
- Zhang Y, Dufau ML. 2002. Silencing of transcription of the human luteinizing hormone receptor gene by histone deacetylase-mSin3A complex. *J Biol Chem* 277(36):33431-33438.
- Zhang Y, Dufau ML. 2003. Repression of the luteinizing hormone receptor gene promoter by cross talk among EAR3/COUP-TF1, Sp1/Sp3, and TFIIB. *Mol Cell Biol* 23(19):6958-6972.
- Zhu H, Wang H, Ascoli M. 1995. The lutropin/choriogonadotropin (LH/CG) receptor is palmitoylated at intracellular cysteine residues. *Mol Endocrinol* 9:141-150.
- Zhu X, Gilbert S, Birnbaumer M, Birnbaumer L. 1994. Dual signaling potential is common among Gs-coupled receptors and dependent on receptor density. *Mol Pharmacol* 46:460-469.
- Zuo J, Lei Z, Rao C. 1994. Human myometrial chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptors in preterm and term deliveries. *J Clin Endocrinol Metab* 79:907-911.
- Zygmunt M, Herr F, Keller-Schoenwetter S, Kunzi-Rapp K, Munstedt K, Rao C, Lang U, Preissner K. 2002. Characterization of human chorionic gonadotropin as a novel angiogenic factor. *J Clin Endocrinol Metab* 87:5290-5296.



**ANNEXE**  
**(Autres publications)**





## Impact of Trisomy 21 on Human Trophoblast Behaviour and Hormonal Function

G. Pidoux<sup>a</sup>, J. Guibourdenche<sup>a,b</sup>, J.-L. Frendo<sup>a</sup>, P. Gerbaud<sup>a</sup>, M. Conti<sup>d</sup>, D. Luton<sup>c</sup>, F. Muller<sup>a,b</sup> and D. Evain-Brion<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> INSERM U427, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, 4 Avenue de l'Observatoire, 75270 Paris, France;

<sup>b</sup> Service de Biochimie Hormonologie, Hôpital Robert Debré, 48 Boulevard Sérurier, 75019 Paris, France; <sup>c</sup> Maternité, Hôpital Robert Debré, 48 Boulevard Sérurier, 75019 Paris, France; <sup>d</sup> Service de Biochimie, Hôpital du Kremlin Bicêtre, 78 rue du Général Leclerc, 94275 Le Kremlin Bicêtre, France

Paper accepted 7 January 2004

Although trisomy 21 (T21) is the most frequent genetic abnormality and some maternal serum markers for this fetoplacental aneuploidy are of placental origin, little is known of its impact on placental development. We therefore studied the influence of T21 on trophoblast behaviour.

Using cultured cells from 46 human T21 pregnancies, we confirmed the defective morphological and functional differentiation of the villous cytotrophoblast in this setting; indeed, villous cytotrophoblast cells aggregate normally but fuse inefficiently to form the syncytiotrophoblast. This is in part related to the abnormal oxidative status of the T21 cytotrophoblast, characterized by a gene dosage-related increase in SOD-1 (copper-zinc superoxide dismutase) expression and activity. This was associated with a significant ( $P < 0.01$ ) increase in catalase activity but no significant change in glutathione peroxidase activity. On the basis of these in vitro findings and studies of large panels of maternal serum, we propose a pathophysiological explanation for trisomy 21 maternal serum markers of placental origin.

© 2004 IFPA and Elsevier Ltd. All rights reserved.  
Placenta (2004), 25, Supplement A, Trophoblast Research, Vol. 18, S79–S84

### INTRODUCTION

Chromosome 21 trisomy (T21), which causes the phenotype known as Down syndrome, is the principal known genetic cause of mental retardation, affecting about 1 in 800 live births. Screening strategies designed to identify women at an increased risk of bearing a T21 fetus are based on maternal age, ultrasound signs [1] and/or maternal serum markers [2–4]. Some of these markers, such as hCG, are of placental origin.

The syncytiotrophoblast (ST), which forms the outer layer of the chorionic villi, is the active endocrine unit of the human placenta, secreting its hormonal products into the maternal circulation. Some of these polypeptide hormones are specific to pregnancy, such as human chorionic gonadotropin (hCG), human placental lactogen (hPL) and placental growth hormone (hPGH) [5–7], and can be used as markers of syncytium formation. The syncytiotrophoblast arises both in vitro [8,9] and in vivo [10] by differentiation of villous cytotrophoblasts, which aggregate and fuse to form multinucleated syncytiotrophoblasts.

We recently examined the impact of T21 on trophoblast behaviour, and confirmed previous observations by Eldar-

Geva et al. [11] that cultured cytotrophoblasts isolated from T21 placentae aggregate normally but fuse poorly or tardily [12,13]. This is in agreement with previous macroscopic and histological observations pointing to an increase in the cytotrophoblast layer in T21 placentae [14–16]. We also found that this defective/delayed syncytiotrophoblast formation and function in vitro was characterized by markedly decreased synthesis and secretion of syncytiotrophoblastic pregnancy-associated hormones such as hCG, human placental lactogen (hPL), human placental growth hormone (hPGH) and leptin [12,13]. Similarly, we observed a significant fall in the mRNA levels of these hormones in total extracts of T21 placentae, indicating a decrease in functional syncytiotrophoblast mass in T21 placentae [12].

Given the role of oxygen free radicals in trophoblast cell differentiation, we then investigated the role of the key antioxidant enzyme copper/zinc superoxide dismutase (SOD-1), the gene for which is located on chromosome 21, in trophoblast differentiation in vitro. We found that SOD-1 over-expression in normal cytotrophoblasts impaired ST formation. This was associated with significantly reduced mRNA levels and significantly subnormal secretion of hCG and other hormonal markers of ST. We confirmed abnormal cell fusion by overexpression of GFP (green fluorescent protein)-tagged SOD-1 in cytotrophoblasts. We then

\* To whom correspondence should be addressed. Tel.: +33-1-44-07-39-91; Fax: +33-1-44-07-39-92; E-mail: evain@pharmacie.univ-paris5.fr

examined SOD-1 expression and activity in isolated trophoblast cells from T21 placentae. SOD-1 mRNA expression ( $P < 0.05$ ), protein levels ( $P < 0.01$ ), and activity ( $P < 0.05$ ) were significantly higher in trophoblast cells isolated from T21 placentae than from normal placentae [17,18]. This suggested that SOD-1 overexpression might directly impair trophoblast cell differentiation and fusion, and might, at least in part, be responsible for the failure of ST formation observed in T21 placentae.

Here, we studied the oxidative status of villous cytotrophoblast cells isolated from T21 placentae, and confirmed their abnormal differentiation into a syncytiotrophoblast. We propose a pathophysiological explanation for trisomy 21 maternal serum markers of placental origin.

## MATERIALS AND METHODS

### Collection of placentae and sera

Since 1988, maternal serum samples have been collected at Hôpital Ambroise Paré from women undergoing second-trimester trisomy 21 maternal serum screening. All pregnant women in France also undergo first-trimester maternal serum screening for toxoplasmosis, and stored samples were also used for this study. During the third trimester, maternal blood samples are taken when ultrasound findings are abnormal. All serum samples were stored at  $-30^{\circ}\text{C}$ . Since 1996, serum samples have been collected from all women prior to termination of T21 pregnancies. (French law authorizes termination of pregnancy, with no gestational age limit, when severe fetal abnormalities are observed.) Trisomy 21 was diagnosed by karyotyping. The indications for chorionic villus sampling, amniocentesis or fetal blood sampling were advanced maternal age, ultrasound abnormalities or abnormal maternal serum markers. Demographic and pregnancy-related information (maternal age, weight, and gestational age at sampling) were entered in a database.

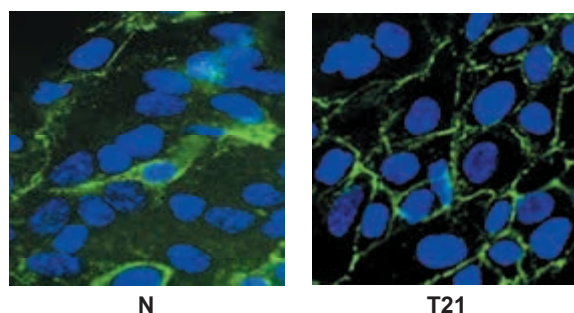
Placental tissues were collected at termination of pregnancy (12–25 weeks of amenorrhea) in T21 pregnancies and gestational age-matched control pregnancies. Gestational age was confirmed by ultrasound measurement of crown–rump length at 8–12 weeks of pregnancy. Fetal Down syndrome was diagnosed by karyotyping of amniotic fluid cells, chorionic villi or fetal blood cells.

The indications for termination of control pregnancies were severe bilateral or low obstructive uropathy and major cardiac abnormalities. The karyotype of placental cells was checked in all cases (free T21 or normal).

### Hormone assays

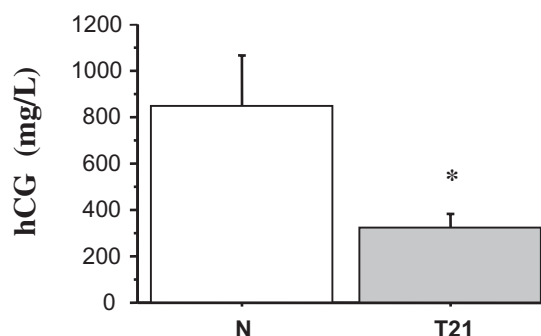
Commercial kits were used to assay maternal serum for free  $\beta$ -hCG, total hCG (time-resolved fluoroimmunoassay Delfia,

**A**



**B**

### hCG secretion at 3 days

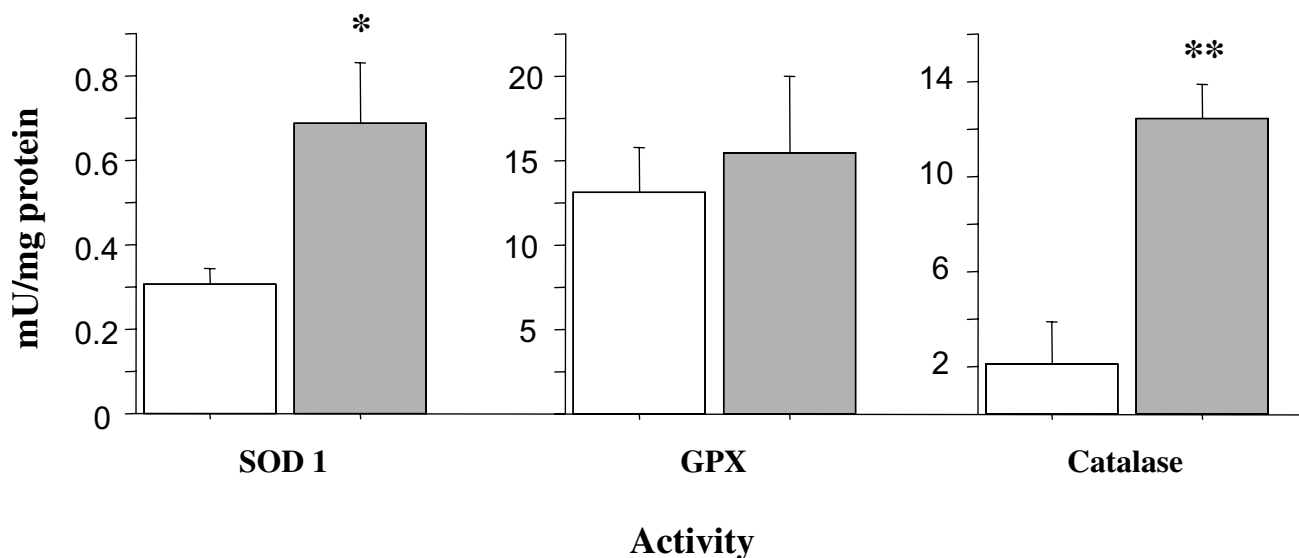


**Figure 1.** Morphological and functional differentiation of villous cytotrophoblasts from T21 placentae. Panel A. Desmoplakin immunodetection after three days of culture of trophoblast cells isolated from normal (N) and T21 placentae. With normal trophoblast cells, positive immunofluorescence staining is only observed in cytotrophoblasts juxtaposing the syncytiotrophoblast, and no staining is seen in the fused syncytiotrophoblast. In contrast, desmoplakin staining is observed at the boundaries between aggregated cytotrophoblasts from T21 placentae ( $\times 2200$ ). Panel B. HCG secretion in the culture medium of 46 primary cultures from 15 control placentae (N) and 46 primary cultures from 31 T21 placentae (T21). The results are means  $\pm$  SEM of 3 culture dishes per time point.

Perking Elmer, France). Assay sensitivity was 2 mU/ml. hPL concentration was assayed (Amerlex IRMA, Amersham) in maternal serum. Assay sensitivity was 0.5 mg/ml. Leptin was determined using the Sensitive Human Leptin RIA kit (Linco, St Louis, USA). Assay sensitivity was 0.05 ng/ml.

### Cell culture

Cytotrophoblast culture was undertaken as previously described [12]. Villous tissue was dissected free of membranes, rinsed and minced in  $\text{Ca}^{2+}$ -,  $\text{Mg}^{2+}$ -free Hank's balanced salt solution. Cytotrophoblasts were isolated after trypsin-DNase digestion and discontinuous Percoll gradient fractionation, using the method of Kliman and Alsat with slight modifications [8,9] and adaptation for second-trimester placentae. The villous samples were submitted to sequential enzymatic



**Figure 2.** Activity of antioxidant enzymes (mU/mg of protein) in control and T21 cytotrophoblasts. SOD-1, GPX and catalase activities are compared between normal cytotrophoblasts (white) and T21 cytotrophoblasts (gray). \*:  $P < 0.05$  and \*\*:  $P < 0.01$ .

digestion in a solution containing 0.5 per cent powdered trypsin (W/V, Difco), 5 IU/ml DNase I, 25 mM HEPES, 4.2 mM  $MgSO_4$  and 1 per cent (W/V) penicillin/streptomycin (Biochemical Industry, Israel) in HBSS, with monitoring under a light microscope. The first and/or second digestions were discarded to eliminate syncytiotrophoblast fragments, and the following four or five digestions were kept for further use. Cells contained in these latter digestions were purified on a discontinuous Percoll gradient (5 to 70 per cent in 5 per cent steps). Cells that migrated to the middle layer (density 1.048–1.062) were allowed to adhere to plastic culture dishes ( $10^6$  cells/cm<sup>2</sup>), then washed three times with culture medium 3 h later. At this time, we checked that 90–95 per cent of the cells isolated from both normal and T21 placentae were cytokeratin 7-positive (specific monoclonal antibody, dilution 1 : 200; Dako, France), that less than 0.5 per cent were vimentin-positive (monoclonal antibody, dilution 1 : 200, Amersham International), and that other cells were mononucleated (macrophages). None of these cells were hPL-positive with a specific polyclonal antibody (dilution 1 : 500, Dako).

Cells were plated in triplicate on glass slides (for immunocytochemistry) or on 60-mm culture dishes ( $10^6$  cells/cm<sup>2</sup>, culture period 3 days). Cytotrophoblasts were isolated from T21 placentae and from gestational age-matched (second-trimester) control placentae.

### Enzyme assays

SOD-1, catalase and GPX (glutathione peroxidase) activities were measured in T21 and control cytotrophoblasts as previously described [17,19]. Cells cultured from six individual T21 placentae and six control placentae were studied.

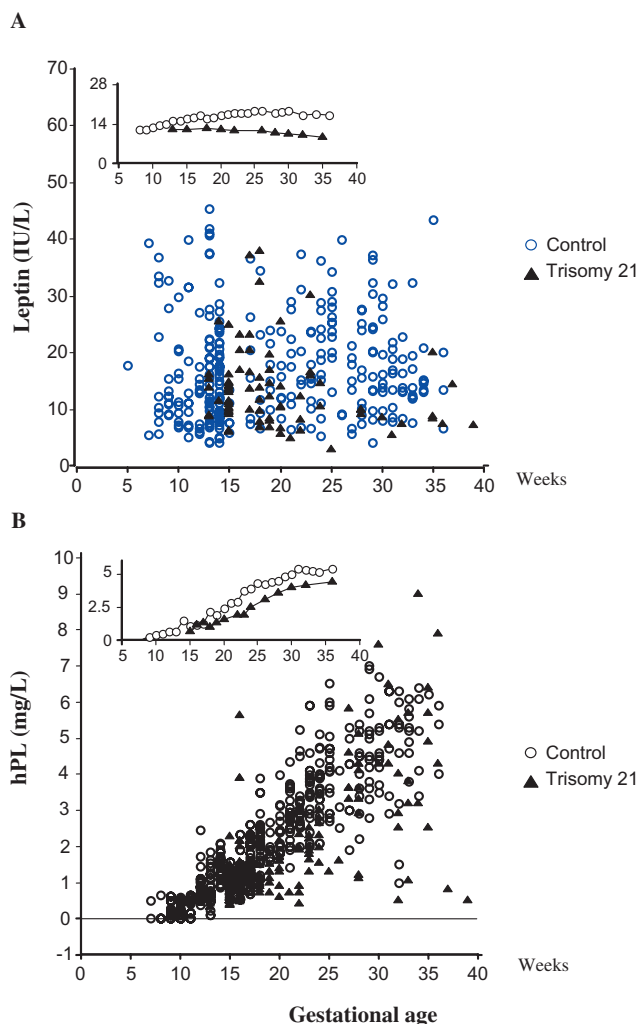
## RESULTS

### Morphological and functional differentiation of T21 villous cytotrophoblasts

As previously described [12], we confirmed in 46 primary cultures (from 46 placentae) that villous cytotrophoblasts isolated from T21 placentae had the same plating efficiency as controls; we also confirmed that they aggregated normally, but that their fusion was inefficient and/or delayed. After 3 days of culture syncytiotrophoblasts were rare, as indicated by immunodetection of desmoplakin (a desmosomal plaque protein) and E-cadherin (a cell adhesion molecule) (Figure 1, panel A). We also tested 31 of these primary cultures for hCG secretion in the culture medium, and confirmed that levels were significantly lower (mean  $\pm$  SEM  $323 \pm 59$  IU/l;  $P < 0.04$ ) than in controls ( $n=15$ , mean  $\pm$  SEM  $850 \pm 220$  IU/l). Similarly, as previously described [12,13], the transcript levels of hCG beta and alpha subunit ( $P < 0.001$ ), leptin ( $P < 0.01$ ) and hPL ( $P < 0.008$ ) were significantly lower in T21 cells than in control cells. Human PL and leptin protein secretion were not detected in 3-day culture medium of trophoblast cells isolated from T21 placentae, contrary to controls.

### Oxidative status of T21 villous cytotrophoblasts

As illustrated in Figure 2, catalase activity was significantly higher ( $P < 0.008$ ) in T21 cytotrophoblasts than in controls, while glutathione peroxidase activity was similar. We also confirmed the significantly elevated SOD-1 expression and activity in T21 cytotrophoblasts relative to controls.



**Figure 3.** Maternal serum levels of two non-glycosylated hormones as a function of gestational age: panel A, leptin (controls:  $n=293$ ; T21:  $n=80$ ); panel B, hPL (controls:  $n=707$ ; T21:  $n=199$ ). Empty circles=controls; black triangles=T21 pregnancies. Inserts show median values.

### Maternal leptin and hPL profiles in T21 pregnancies

The pattern of *in vitro* trophoblast differentiation and syncytiotrophoblast formation observed here, and the subnormal hormone transcript levels in total placental extracts reported elsewhere [12,20] pointed to reduced syncytiotrophoblast mass in T21 placentae. To determine whether this was accompanied by subnormal maternal serum levels of hormones of syncytiotrophoblastic origin, we assayed large panels of maternal sera for hPL and leptin, two hormones which directly reflect syncytiotrophoblast mass and activity. Indeed these hormones are simple unglycosylated polypeptide hormones secreted by the syncytiotrophoblast [6,21,22], directly into the maternal blood bathing the chorionic villi in the intervillous spaces. Levels of these two hormones in maternal serum were significantly lower in T21 pregnancies than in gestational age-matched control pregnancies (Figure 3, panel A and B). These

low levels were constant and were observed throughout pregnancy (Table 1). We also confirmed that maternal serum hCG levels are elevated throughout T21 pregnancies (Figure 4, Table 1).

### DISCUSSION

The main component of the human placenta is the syncytiotrophoblast, a highly polarized tissue which secretes the bulk of its hormonal products into the maternal circulation and has almost no storage capacity [10]. Any alteration in syncytiotrophoblast formation and/or function should therefore be reflected in the maternal circulation by changes in syncytiotrophoblast-secreted hormone levels. Here we confirmed the *in vitro* defect in syncytiotrophoblast formation of T21 placentae. Indeed, as compared to gestational age matched control cells, T21 cells aggregate but fuse poorly or with delay to form syncytiotrophoblast.

The molecular mechanisms underlying cytotrophoblast fusion are poorly understood. Recently, an endogenous retroviral envelope protein [23–25], connexin 43 [26,27] and cadherin 11 [28] were all shown to be directly involved in cytotrophoblast membrane fusion. Cytotrophoblast cell oxidative status appears to play a regulatory role in this process. In particular, we and others have observed that cytotrophoblast fusion and differentiation is inhibited by hypoxia [29–31]. Similarly, the histological abnormalities of term placentae from pregnancies associated with underperfusion and hypoxia are characterized by abundant cytotrophoblasts and abnormal syncytiotrophoblast differentiation [32,33]. This suggests that cytotrophoblast oxidative status may be a key element regulating differentiation into the syncytium, and points to a direct role of oxygen free radicals in cell fusion. Cu/Zn superoxide dismutase (SOD-1 is a cytoplasmic enzyme which protects cells from oxygen free radicals [34]. SOD-1 transforms the superoxide anion  $O_2^{\cdot-}$  into hydrogen peroxide, which is then converted to water by peroxisomal catalase and glutathione peroxidase (GPx). This two-step process eliminates  $H_2O_2$  and other reactive oxygen species that could otherwise interact with macromolecules such as DNA, proteins and lipids, to alter their structure and function. However, any alteration of the balance between the first and second steps may induce an oxidative stress related to the misregulation of  $H_2O_2$  production.

The human SOD-1 gene is located on chromosome 21 [35]. SOD-1 activity is increased by about 50 per cent in red blood cells [36] platelets [37] lymphocytes, polymorphonuclear granulocytes and fibroblasts [38] of individuals with trisomy 21. Here we confirmed that SOD-1 mRNA and activity in purified trophoblast cells isolated from T21 placentae were about 50 per cent higher than in normal trophoblasts, in keeping with a gene dosage effect. We also observed significantly increased catalase activity, but normal GPx activity. Antioxidant enzyme studies of patients with Down's syndrome have generally focused on red blood cells, and have given

**Table 1.** Median of markers expressed in multiple of median (MoM) throughout gestation

	hCG	hPL	Leptin	PAPP-A
First trimester	1.90 (n=15)	(n=2)	(n=5)	0.42 (n=39)
Second trimester	2.15 (n=373)	0.62 (n=123)	0.76 (n=46)	0.94 (n=24)
Third trimester	1.93 (n=109)	0.70 (n=73)	0.55 (n=28)	0.72 (n=13)

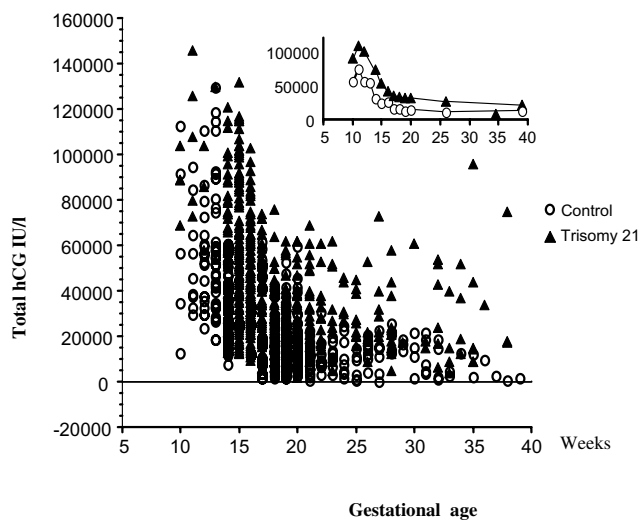
conflicting results [39–41]. Recently, Muchova et al. [39] confirmed an oxidative imbalance (elevated ratio of SOD-1 to catalase+GPX) in red blood cells from these patients, accompanied by an increase in cellular malondialdehyde content. Preliminary results also indicate an increased malondialdehyde content in T21 cytotrophoblasts compared to controls (Conti, personal data). This suggests that T21 trophoblast cells cannot fully compensate for the oxidative imbalance due to genetically mediated SOD-1 overexpression.

It was recently reported that, in T21 pregnancies, chorionic villi show an increased double layer of proliferative trophoblasts. This suggests that the increased oxidative stress due to SOD-1 overexpression damages trophoblasts, resulting in their increased proliferation and diminished differentiation, as observed in other pathological conditions [42–44].

We confirmed that T21 is associated with reduced synthesis and secretion of placental hormones of syncytiotrophoblastic origin, such as hCG, hPL, and leptin. We also found that abnormal syncytiotrophoblast formation and the resulting decrease in syncytiotrophoblast mass within T21 placentae is reflected by a decrease in circulating maternal levels of non-glycosylated hormones of syncytiotrophoblastic origin, such as hPL and leptin. It is well established that maternal serum total human chorionic gonadotropin (hCG) levels are high in T21 pregnancies, despite the low placental hCG synthesis. These results do not agree with previous observations of different authors describing increased or no change in hCG transcript levels or protein levels. Eldar-Geva et al. [11] reported an increase in hCG $\alpha$  and hCG $\beta$  mRNA levels in trophoblast cells of T21 placentae. Jauniaux et al. [45] and Newby et al. [46] compared the levels of hCG and/or its free subunits in total placental homogenate extracts, by means of immunoassay, a method dependent on antibody specificity. In addition, total placental extracts are contaminated by maternal blood, which may lead to a spurious increase in hCG levels. Newby et al. [46] found no increase in hCG in an immunohistochemical study.

We recently demonstrated that T21 trophoblast cells produce weakly bioactive and abnormally glycosylated hCG that shows normal maternal clearance; impaired placental uptake of this weakly bioactive hCG results in high maternal serum levels throughout pregnancy [20].

In conclusion, villous cytotrophoblast cells isolated from T21 placentae offer a good model to study the impact of this trisomy and the accompanying abnormal oxidative status on cell growth and differentiation. The failure of cytotrophoblasts to fuse normally and to form a normal syncytiotrophoblast appears to be related to oxidative stress due to SOD-1 overexpression, leading to qualitatively and quantitatively abnormal trophoblast-derived hormone production.



**Figure 4.** Maternal serum levels of glycosylated total hCG as a function of gestational age (controls: n=894; T21: n=499). Empty circles=controls; black triangles=T21 pregnancies. Inserts show median values.

**ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank the obstetrics department of Robert Debré hospital for providing us with placentae. This work was supported by a grant from the Association Française pour la Recherche sur la Trisomie 21 (AFRT), the Caisse d'Assurance Maladie des Professions Libérales de Province, and INSERM (projet Avenir 2002).

**REFERENCES**

[1] Pandya P, Snijders R, Johnson S, Brizot M, Nicolaides K. Screening for fetal trisomies by maternal age and fetal nuchal translucency thickness at 10 to 14 weeks of gestation. *Br J Obstet Gynaecol* 1995;102: 957–62.

[2] Bogart M, Pandian M, Jones O. Abnormal maternal serum chorionic gonadotropin levels in pregnancies with fetal chromosome abnormalities. *Prenat Diagn* 1987;7:623–30.

[3] Merkatz I, Nitowsky H, Macri J, Johnson W. An association between low maternal serum alpha-fetoprotein and fetal chromosomal abnormalities. *Am J Obstet Gynecol* 1984;148:886–94.

[4] Wald N, Watt H, Hackshaw A. Integrated screening for Down's syndrome on the basis of tests performed during the first and second trimesters. *N Engl J Med* 1999;341:461–7.

[5] Alsat E, Guibourdenche J, Luton D, Frankenne F, Evain-Brion D. Human placental growth hormone. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 177:1526–34.

- [6] Handwerger S. The physiology of placental lactogen in human pregnancy. *Endocrinology* 1991;12:329–36.
- [7] Jameson J, Hollenberg A. Regulation of chorionic gonadotropin gene expression. *Endocr Rev* 1993;14:203–21.
- [8] Kliman H, Nestler J, Sermasi E, Sanger J, Strauss III J. Purification, characterization, and *in vitro* differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinology* 1986;118:1567–82.
- [9] Alsat E, Mirllesse V, Fondacci C, Dodeur M, Evain-Brion D. Parathyroid hormone increases epidermal growth factor receptors in cultured human trophoblastic cells from early and term placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;73:288–94.
- [10] Kaufmann P, Scheffen I. In: Neonatal and fetal medicine: physiology and pathophysiology. Orlando.
- [11] Eldar-Geva T, Hochberg A, deGroot N, Weinstein D. High maternal serum chorionic gonadotropin level in Down's syndrome pregnancies is caused by elevation of both subunits messenger ribonucleic acid level in trophoblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:3528–31.
- [12] Frendo J-L, Vidaud M, Guibourdenche J, Luton D, Muller F, Bellet D et al. Defect of villous cytotrophoblast differentiation into syncytiotrophoblast in Down syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:3700–7.
- [13] Massin N, Frendo J-L, Guibourdenche J, Luton D, Giovangrandi Y, Muller F et al. Defect of syncytiotrophoblast formation and hCG expression in Down's syndrome. *Placenta* 2001;22(Suppl A):S93–7.
- [14] Benirschke K, Kaufmann P. Pathology of the human placenta. New York, 2000, p. 22–70.
- [15] Oberweiss D, Gillerot Y, Koulischer L, Hustin J, Philippe E. Le placenta des Trisomie 21 dans le dernier trimestre de la gestation. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 1983;12:345–9.
- [16] Roberts L, Sebire N, Fowler D, Nicolaides K. Histomorphological features of chorionic villi at 10–14 weeks of gestation in trisomic and chromosomally normal pregnancies. *Placenta* 2000;21:678–83.
- [17] Frendo J-L, Thérond P, Bird T, Massin N, Muller F, Guibourdenche J et al. Overexpression of copper zinc superoxide dismutase impairs human trophoblast cell fusion and differentiation. *Endocrinology* 2001;142:3638–48.
- [18] Frendo J-L, Therond P, Guibourdenche J, Vidaud M, Evain-Brion D. Implication of copper zinc superoxide dismutase (SOD-1) in human placenta development. *Ann N Y Acad Sci* 2002;973:297–301.
- [19] Thérond P, Gerbaud P, Dimon S, Anderson W, Evain-Brion D, Raynaud F. Antioxidant enzymes in psoriatic fibroblasts and erythrocytes. *J Invest Dermatol* 1996;106:1325–8.
- [20] Frendo J-L, Guibourdenche J, Pidoux G, Vidaud M, Luton D, Giovangrandi Y et al. Trophoblast production of a weakly bioactive human chorionic gonadotropin in trisomy 21-affected pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 2003b in press.
- [21] Guibourdenche J, Tarrade A, Laurendeau I, Rochette-Egly C, Chambon P, Vidaud M et al. Retinoids stimulate leptin synthesis and secretion in human syncytiotrophoblast. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:2550–5.
- [22] Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H et al. Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med* 1997;3:1029–33.
- [23] Blond J-L, Lavillette D, Cheynet V, Bouton O, Oriol G, Chapel-Fernandes S et al. An envelope glycoprotein of the human endogenous retrovirus HERV-W is expressed in the human placenta and fuses cells expressing the type D mammalian retrovirus receptor. *J Virol* 2000;74:3321–9.
- [24] Mi S, Lee X, Li X-P, Veldman GM, Finnerty H, Racie L et al. Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature* 2000;403:785–9.
- [25] Frendo J-L, Olivier D, Cheynet V, Blond J-L, Vidaud M, Rabreau M et al. Direct involvement of HERV-W Env glycoprotein in human trophoblast cell fusion and differentiation. *Mol Cell Biol* 2003c; 23:3566–74.
- [26] Cronier L, Frendo J-L, Defamie N, Pidoux G, Bertin G, Guibourdenche J et al. Requirement of gap junctional intercellular communication for human villous trophoblast differentiation. *Biol Reprod* 2003 in press.
- [27] Frendo J-L, Cronier L, Bertin G, Guibourdenche J, Vidaud M, Evain-Brion D et al. Involvement of connexin 43 in human trophoblast cell fusion and differentiation. *J Cell Sci* 2003a;116:3413–21.
- [28] Getsios S, MacCalman C. Cadherin-11 modulates the terminal differentiation and fusion of human trophoblastic cells *in vitro*. *Dev Biol* 2003; 257:41–54.
- [29] Alsat E, Wyplosz P, Malassiné A, Guibourdenche J, Porquet D, Nessmann C et al. Hypoxia impairs cell fusion and differentiation process in human cytotrophoblast, *in vitro*. *J Cell Physiol* 1996;168:346–53.
- [30] Esterman A, Greco M, Mitani Y, Finlay T, Ismail-Beigi F, Dancis L. The effect of hypoxia on human trophoblast in culture: morphology, glucose transport and metabolism. *Placenta* 1997;18:129–36.
- [31] Nelson D, Johnson R, Smith S, Anteby E, Sadovsky Y. Hypoxia limits differentiation and up-regulates expression and activity of prostaglandin H synthase 2 in cultured trophoblast from term human placenta. *Am J Obstet Gynecol* 1999;180:896–902.
- [32] Jones C, Fox C. An ultrastructural and ultrahistochemical study of the placenta in maternal essential hypertension. *Placenta* 1981;2:193–204.
- [33] Van Der Veen F, Fox C. The human placenta in idiopathic intrauterine growth retardation: a light and electron microscopic study. *Placenta* 1983; 4:65–73.
- [34] Finkel T. Oxygen radicals and signaling. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10:248–53.
- [35] Sinet P, Couturier J, Dutrillaux B, Poissonnier M, Raoul O, Rethore M et al. Trisomy 21 and superoxide dismutase-1 (IPO-A). Tentative localization of sub-band 21Q22.1. *Exp Cell Res* 1976;97:47–55.
- [36] Gilles L, Ferradini C, Foos J, Pucheault J, Allard D, Sinet P et al. The estimation of red cell superoxide dismutase activity by pulse radiolysis in normal and trisomic 21 subjects. *FEBS Lett* 1976;69:55–8.
- [37] Sinet P, Lavelle F, Michelson A, Jerome H. Superoxide dismutase activities of blood platelet in trisomy 21. *Biochem Biophys Res Commun* 1975;67:904–9.
- [38] Feaster W, Kwok L, Epstein C. Dosage effects for superoxide dismutase-1 in nucleated cells aneuploid for chromosome 21. *Am J Hum Genet* 1977;29:563–70.
- [39] Muchova J, Sustrova M, Garaiova I, Liptakova A, Blazicek P, Kvasnicka P et al. Influence of age on activities of antioxidant enzymes and lipid peroxidation products in erythrocytes and neutrophils of Down syndrome patients. *Free Radic Biol Med* 2001;31:499–508.
- [40] Pastor M, Sierra C, Dolade M, Navarro E, Brandi N, Cabre E et al. Antioxidant enzymes and fatty acid status in erythrocytes of Down's syndrome patients. *Clin Chem* 1998;44:924–9.
- [41] Percy M, Dalton A, Markovic V, McLachlan D, Hummel J, Rusk A et al. Red cell superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in Down syndrome patients with and without manifestations of Alzheimer disease. *Am J Med Genet* 1990;35:459–67.
- [42] Banerjee S, Smallwood A, Nargund G, Campbell S. Placental morphogenesis in pregnancies with Down's syndrome might provide a clue to pre-eclampsia. *Placenta* 2002;23:172–4.
- [43] Burton G, Hempstock J, Jauniaux E. Oxygen, early embryonic metabolism and free radical-mediated embryopathies. *Reprod Biomed Online* 2003;6:84–96.
- [44] Wang Y, Walsh S. Increased superoxide generation is associated with decreased superoxide dismutase activity and mRNA expression in placental trophoblast cells in pre-eclampsia. *Placenta* 2001;22:206–12.
- [45] Jauniaux E, Bao S, Eblen A, Li X, Lei ZM, Mewis S et al. HCG concentration and receptor gene expression in placental tissue from trisomy 18 and 21. *Mol Hum Reprod* 2000;6:5–10.
- [46] Newby D, Aitken DA, Crossley JA, Howatson AG, Macri JN, Connor JM. Biochemical markers of trisomy 21 and the pathophysiology of Down's syndrome pregnancies. *Prenat Diagn* 1997;17:941–51.

## Requirement of Gap Junctional Intercellular Communication for Human Villous Trophoblast Differentiation<sup>1</sup>

Laurent Cronier,<sup>3</sup> Jean-Louis Frendo,<sup>4</sup> Norah Defamie,<sup>5</sup> Guillaume Pidoux,<sup>4</sup> Gladys Bertin,<sup>4</sup> Jean Guibourdenche,<sup>4</sup> Georges Pointis,<sup>5</sup> and André Malassiné<sup>2,4</sup>

Laboratoire de Biomembranes et Signalisation cellulaire,<sup>3</sup> Université de Poitiers, 86022 Poitiers cedex, France  
INSERM, unité 427,<sup>4</sup> Faculté de Pharmacie, 75270 Paris cedex 6, France  
INSERM, EMI 00-09,<sup>5</sup> Faculté de médecine, 06107 Nice cedex, France

### ABSTRACT

During pregnancy, the villous trophoblast develops from the fusion of cytotrophoblastic cells (CT) into a syncytiotrophoblast (ST), supporting the main physiological functions of the human placenta. Connexin43 (Cx43) is demonstrated *in situ* and *in vitro* in the villous trophoblast between CT and between CT and ST. Moreover, the presence of a gap junctional intercellular communication (GJIC) during *in vitro* trophoblast differentiation was previously demonstrated. Because the exchange of molecules through gap junctions is considered to play a major role in the control of cell and tissue differentiation, we studied the effects of a gap junctional uncoupler, heptanol, on morphological and functional trophoblast differentiation and on GJIC measured by the fluorescence recovery after photobleaching method. We found that when the GJIC was interrupted, CT still aggregated but fused poorly. This morphological effect was associated with a significant decrease of trophoblastic-specific gene expression ( $\beta$  human chorionic gonadotropin and human chorionic somatomammotropin). This blocking action was reversible as demonstrated by recovery of GJIC and trophoblast differentiation process after heptanol removal. Moreover, the inhibition of the trophoblast differentiation did not affect Cx43 transcript expression and Cx43 protein expression. These data suggest that the molecular exchanges through gap junctions preceding cellular fusion are essential for trophoblast differentiation generating the multifunctional syncytiotrophoblast.

*human chorionic gonadotropin, placenta, signal transduction, syncytiotrophoblast, trophoblast*

### INTRODUCTION

One of the major processes in human placental development is the fusion of mononucleated cytotrophoblastic cells (CTs) to generate multinucleated syncytiotrophoblast (ST) [1, 2]. Indeed, the ST that covers the chorionic villi is bathed with maternal blood in the intervillous space. Given its frontier position, ST plays a major role in numerous placental functions, including exchanges, metabolism, and synthesis of steroid and peptide hormones required for fetal growth and development [3, 4]. This process of cell fusion can be reproduced *in vitro* [5]. Isolated mononucleated CTs

<sup>1</sup>Partly supported by grants from the Langlois Foundation.

<sup>2</sup>Correspondence: A. Malassiné, INSERM U427, Faculté de pharmacie, 4 Av. de l'observatoire, 75270 Paris cedex 6, France.  
FAX: 33 1 44 07 39 92; e-mail: amalassi@pharmacie.univ-paris5.fr

Received: 13 February 2003.  
First decision: 7 March 2003.  
Accepted: 9 June 2003.

© 2003 by the Society for the Study of Reproduction, Inc.  
ISSN: 0006-3363. <http://www.biolreprod.org>

make initial contacts by pseudopodia with neighboring cells, transform into cellular aggregates, and then fuse to form a syncytium. This *in vitro* differentiation mimics the activities of normal CTs during their *in vivo* maturation. Indeed, the morphological differentiation is associated, both *in vivo* and *in vitro*, with an increase in the production of specific hormones like hCG and human chorionic somatomammotropin (hCS) and with specific gene expression [6, 7].

Gap junctions are clusters of transmembrane channels composed of hexamers of connexins (Cx) providing a pathway for the diffusion of ions and small molecules such as cAMP, cGMP, inositol triphosphate, and Ca<sup>2+</sup>. Connexins represent a family of closely related membrane proteins that are encoded by a multigene family of at least 20 members in humans [8]. It has been suggested that molecular exchanges through gap junctions are involved in the control of cell proliferation, cell and tissue differentiation, metabolic cooperation, and spatial compartmentalization during embryonic development [9–12]. Furthermore, gap junctional intercellular communications (GJICs) have been described to be directly involved in the fusion of mononucleated myoblast to generate multinucleated myotube [13, 14]. We have previously demonstrated, both *in situ* and *in vitro*, the expression of Cx43 mRNA and the presence of Cx43 protein localized between CTs and between CTs and STs, whereas Cx26, Cx32, Cx33, and Cx40 were not detected in the villous trophoblast [15]. Furthermore, using fluorescence recovery after photobleaching method (gap-FRAP), we demonstrated the presence of a functional intertrophoblastic communication via gap junctions preceding trophoblastic fusion [15, 16].

Therefore, the aim of the present study was to investigate the involvement of gap junction-mediated cell-cell communication in trophoblast differentiation by interrupting the exchange of molecules with heptanol, a junctional uncoupler [17]. We demonstrated that heptanol-treated CTs aggregated but fused very poorly with an associated decrease of  $\beta$ hCG secretion and hCS expression compared to untreated cells. The uncoupling action totally abolished GJIC, whereas Cx43 mRNA expression, protein levels, and tissue localization were not affected by the heptanol treatment. Our data show that interruption of the molecular exchanges by gap junctions during human trophoblast differentiation impaired cellular fusion, suggesting the requirement of a GJIC for the syncytiotrophoblast formation.

### MATERIALS AND METHODS

#### *Trophoblastic Cell Culture*

Human placentas were obtained after cesarian sections from mothers with uncomplicated pregnancies. CTs were isolated using a method pre-

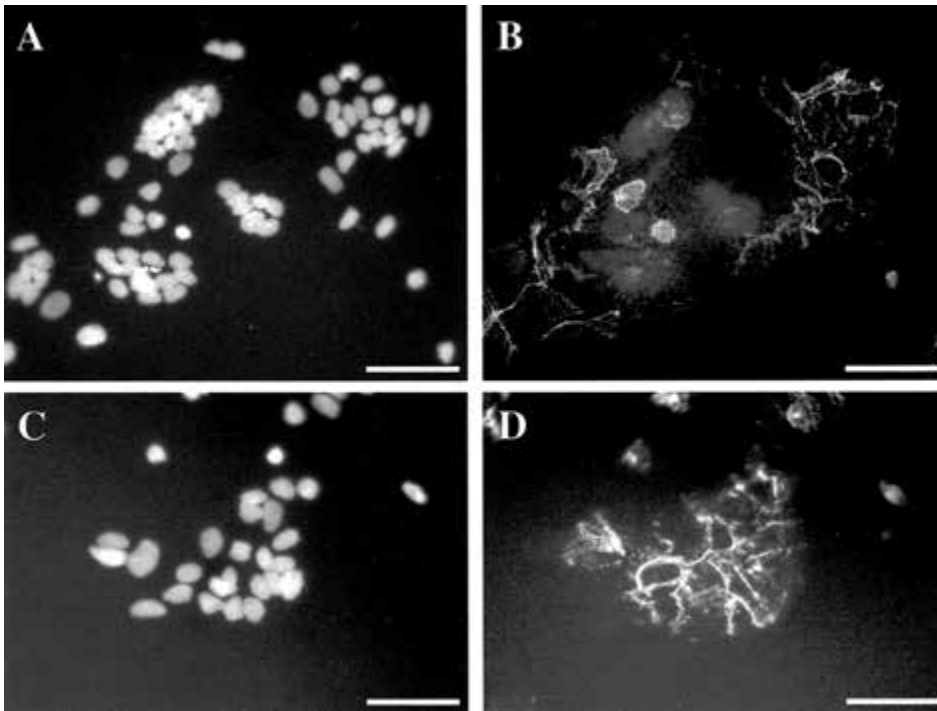


FIG. 1. Effects of long-term heptanol treatment on morphological trophoblast differentiation. **A, B**) Double immunofluorescence for nuclear staining with DAPI (**A**) and desmoplakin (**B**) in villous CT cells cultured for 48 h in control conditions. A strong desmoplakin staining is observed at the intercellular boundaries between CT and ST cells and between CT cells but disappears in fused STs. Scale bars = 50  $\mu\text{m}$ . **C, D**) In the presence of heptanol for 48 h, aggregated CT cells were mainly observed, indicating that the trophoblast differentiation is delayed. Scale bars = 50  $\mu\text{m}$ . These pictures are representative of three experiments.

viously described [18]. After several sequential trypsin/DNase digestions followed by Percoll gradient centrifugation, the cells were further purified by means of a negative selection procedure to obtain a trophoblast preparation without contamination of other cells according to a published method [19]. Monoclonal anti-human leukocytic antigen-A, -B, and -C antibody (W6-32HL, Sera Lab, Crawley Down, UK) reacts with most cell types (e.g., macrophages, fibroblasts, extravillous trophoblast) but not with villous cyto- or syncytiotrophoblast. Briefly, the isolated cells were transferred to plastic culture dishes coated with the monoclonal antibody. After 15 min at 37°C, nonadherent cells were recovered by gently rocking the dishes and removing them with a pipette. CTs were diluted to a final concentration of  $0.5 \times 10^6/\text{ml}$  in minimum essential medium (MEM) containing 10% fetal calf serum (FCS), 25 mM glucose, and 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  gentamicin. Cells were plated in 35-mm plastic dishes (Nunc, Roskilde, Denmark) and incubated at 37°C in 5%  $\text{CO}_2$ . For long-term uncoupler treatment, heptanol (1.5 mM) or octanol (0.4 mM) purchased from Sigma (St. Louis, MO) was added to the culture medium after CT adherence (4 h after cell seeding). The culture medium was renewed every 8 h to avoid the evaporation of alcohol. Cytokeratin 07 immunocytochemistry was performed after each purification to confirm the cytotrophoblastic nature of the attached cells, and about 95% of the cells were positively stained.

### Immunocytochemistry

To detect desmoplakin, cultured cells were rinsed with PBS solution and fixed in methanol at  $-20^\circ\text{C}$  for 25 min. A monoclonal antidesmoplakin antibody (Sigma), diluted 1:400, was applied, followed by fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled goat anti-mouse immunoglobulin (Ig)G (Sigma) diluted 1:100 as previously described [20]. After washing, samples were mounted in medium with 4',6'-diamino-2-phenylindole (DAPI) for nuclear staining (Vector Laboratories, Burlingame, CA).

For Cx43 detection, cultured cells were fixed for 10 min in methanol at  $-20^\circ\text{C}$ . They were then washed three times in PBS and processed using a method previously described [15]. After incubation in a blocking solution consisting of 2% BSA and 1% Triton X-100 in PBS for 30 min at room temperature, specimens were incubated overnight in PBS 1% BSA containing a monoclonal anti-cx43 primary antibody (1/200; Transduction Laboratories, Lexington, KY). After five further washes in PBS, the secondary antibody conjugated to FITC (1/200; Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) was applied for 45 min at room temperature. After washing, samples were mounted in medium with DAPI for nuclear staining. All controls performed by omitting the primary antibody or using a nonspecific IgG of the same isotype (IgG1; Immunotech, Marseille, France) were negative.

### Gap-FRAP Method

The cell-to-cell diffusion of a fluorescent dye was measured by the gap-FRAP method [21], using an interactive laser cytometer (ACAS 570, Meridian Instruments, Okemos, MI), which allows for convenient digital video imaging and analysis. After washing, cultured trophoblastic cells were loaded for 10 min at room temperature in saline solution containing the membrane-permeant molecule 6-carboxyfluorescein diacetate (Sigma: 7  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in 0.25% dimethylsulfoxide). This lipophilic compound is hydrolyzed by cytoplasmic esterases to 6-carboxyfluorescein, a hydrophilic derivative that accumulates inside the cells. After washing off the excess extracellular fluorogenic ester to avoid further loading, the fluorescence of some selected cells adjacent to others cells was photobleached by applying strong light pulses (8 mW; 2 sec) from an argon laser set at 488 nm. The fluorescence intensity was recorded in the bleached cells before and after photobleaching during 12 min (each time period = 2 min). In each experiment, one labeled isolated cell, left unbleached, served as a reference for the loss of fluorescence because of repeated scanning and dye leakage, and an isolated bleached cell served as a control (see Fig. 4). The return of fluorescence following a fast step-like course, reaching at least 90% of the final steady state in less than 30 sec after photobleaching (see Fig. 4B), indicated that the diffusion of dye was neither prevented by cell membrane nor limited by the presence of gap junctions. It was inferred that fusion of cell membranes had been completed and that the cellular elements were part of a true syncytium. When the bleached cells were interconnected by open gap junctional channels to unbleached contiguous cells, a fluorescence recovery following a slow exponential time course was measured (see Fig. 4A). Therefore, the analysis of the kinetic of fluorescence recovery allows to discriminate between aggregated cytotrophoblastic cells and syncytiotrophoblast. In our experimental conditions, GJIC was investigated (coupled cells or not) in a population of cells in contact with results expressed as a percentage of coupled cells.

### Immunoblotting

To detect Cx43 and hCS, cell extracts were prepared as previously described [20]. Solubilized proteins were immunoblotted using either a polyclonal antibody directed against hCS (1/250, Dako, Glostrup, Denmark) or a monoclonal antibody directed against Cx43 (1/1000, Transduction Laboratories). The corresponding antigens were detected after incubation with alkaline phosphatase-coupled secondary antibodies (1/7500 for anti-rabbit IgG and 1/10 000 for anti-mouse IgG). Densitometric analyses of hCS or Cx43 signals were performed by means of image-master software (Pharmacia Biotech, Orsay, France).



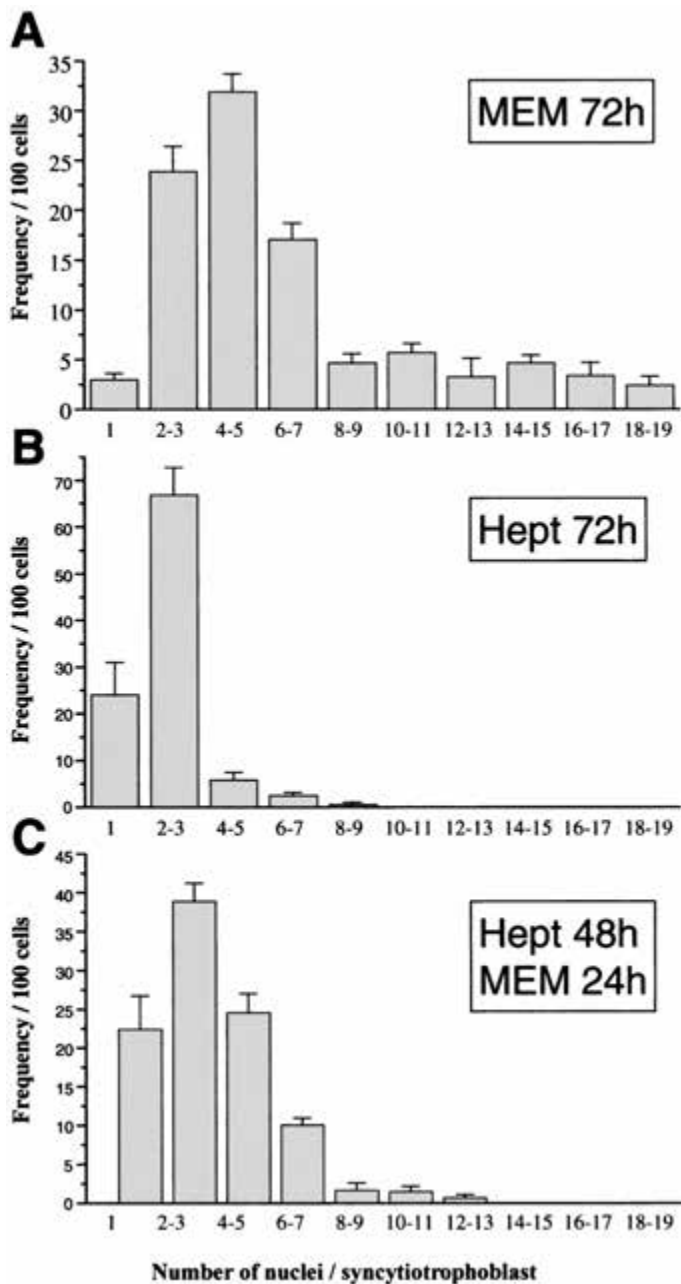


FIG. 2. Effects of heptanol on cell fusion index. Human CT cells were cultured in MEM for 72 h (A) or in the presence of 1.5 mM heptanol for 72 h (B) or 1.5 mM heptanol (48 h) and then in MEM for 24 h (C). Data show the distribution of syncytia as a function of the number of nuclei per syncytium and are the mean  $\pm$  SEM of three separate experiments. Statistical analysis using a chi-square test revealed a significant difference between trophoblastic cells cultured in control conditions for 72 h and in the presence of heptanol for 72 h (chi-square = 92.26; df = 9;  $P < 0.0001$ ). The difference is also significant between trophoblastic cells cultured in heptanol for 72 h and in heptanol for 48 h and then in MEM for 24 h (chi-square = 28.46; df = 6;  $P < 0.0001$ ).

#### Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

Total RNA was isolated by RNeasy method (Quiagen, Hilden, Germany) from isolated highly purified CT cells. The total RNA was treated with Range-free DNase I (Life Technologies, Cergy Pontoise, France) at 22°C for 5 min.

For Cx43 transcripts, total RNA (5  $\mu$ g) was transcribed into cDNA using oligo(dT)<sub>12-18</sub> as primer and superScriptII reverse transcriptase (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany). One fifth of the reaction mixture was amplified with Taq polymerase (Life Technologies) in a final

volume of 50  $\mu$ l. For the semiquantitative polymerase chain reaction (PCR), each cycle consisted of denaturation at 94°C for 1 min, primer annealing at 60°C for 1 min, and primer extension at 72°C for 1 min. To quantify amplification in exponential phase, primers for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) were added during cycle 8 and PCR products (10  $\mu$ l) were obtained in cycles 23, 24, 25, 26, and 27. Primers were designed from previously published sequence data: the human GAPDH 5' sense CTG-CAC-CAC-CAA-CTG-CTT-AG-3' and 5' antisense AGG-TCC-ACC-ACT-GAC-ACG-TT-3'; human Cx43 5' sense AGT-CTA-TCT-TTG-AGG-TGG-CC-3' and 5' antisense GGC-TGT-AAT-TCA-TGT-CCA-GC-3'. Reaction products were resolved on an agarose gel (1.5%) and stained with ethidium bromide. Sizes of the expected amplification products are 1158 base pairs (bp) for Cx43 and 275 bp for GAPDH.

#### Hormone Assay

The hCG concentrations were determined by means of an enzyme-linked fluorescence assay (Vidas system, Biomérieux, Marcy-l'Étoile, France) in cell culture media at various times as previously described [22]. Assay sensitivity was 2 mIU/ml. The values are the means  $\pm$  SEM of triplicate determinations. Significant differences were identified using the Student *t* test.

#### Analysis of Syncytium Formation

Syncytium formation was monitored by analyzing the distribution of desmoplakin and nuclei in fixed cells, as described by Keryer et al. [23]. Desmoplakin staining of aggregated cells gradually disappears at the boundaries with the syncytium formation [24]. From a random point near the middle of the coverslip, the nuclei of 100 desmoplakin-delimited cellular elements were counted, distributed in class, and the results expressed as the percentage of cellular elements versus number of nuclei per syncytium. Data are the mean  $\pm$  SEM of three separate experiments.

#### 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide Assay

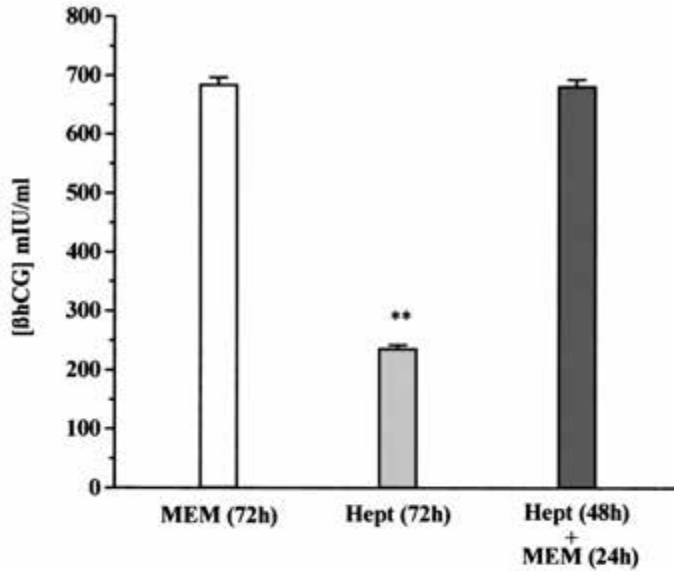
Heptanol toxicity was estimated by a 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma) test. After 3 days of culture in control or heptanol conditions, trophoblastic cells were rinsed in Earles balanced saline solution, and MTT was added to the culture medium at 0.5 mg/ml. At the end of a 3-h incubation period at 37°C, the formazan formation caused by active mitochondrial dehydrogenases was measured spectrophotometrically at a wavelength of 570 nm with background subtraction at 630 nm.

Each determination was performed in triplicate. All statistics are given as mean  $\pm$  SEM.

## RESULTS

#### Effects of Long-Term Heptanol Treatment During Trophoblast Differentiation

When purified CTs were cultured in the presence of 10% FCS, after adhesion and flattening, cells make initial contacts by pseudopodia with neighboring cells, transform into cellular aggregates, and then fuse to form a large multinucleated ST [5, 16]. This morphological differentiation is currently followed by staining cells with antidesmoplakin antibodies to reveal cell boundaries. Indeed, the staining of desmoplakin present at the intercellular boundaries in aggregated cells progressively disappears with the syncytium formation (Fig. 1, A and B). After 48 h of culture, mononuclear CTs mainly differentiated into aggregated cells and ST. This is illustrated in Figure 1A by a gathering of numerous nuclei in large cytoplasmic mass of the ST. In contrast, CT incubated with 1.5 mM heptanol aggregated but did not fuse or fused poorly (Fig. 1, C and D). To further investigate the influence of heptanol on cell fusion and ST formation, we estimated the number of DAPI-stained nuclei per desmoplakin-defined ST. As illustrated in Figure 2A, after 72 h of culture, 73.3%  $\pm$  1.8% of examined STs con-

**A**

Experiment	MEM 72h	Heptanol 72h	Hept 72h + MEM 24h
1	685 ± 11.1	237.3 ± 5.5	682 ± 10.9
2	259 ± 6.9	121.3 ± 6.8	229 ± 10.6
3	871 ± 8.7	397.7 ± 2.8	837 ± 20.1

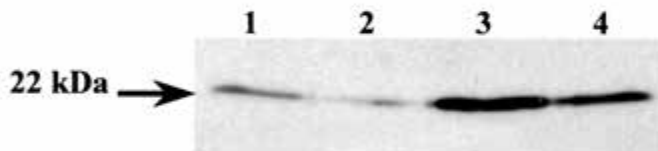
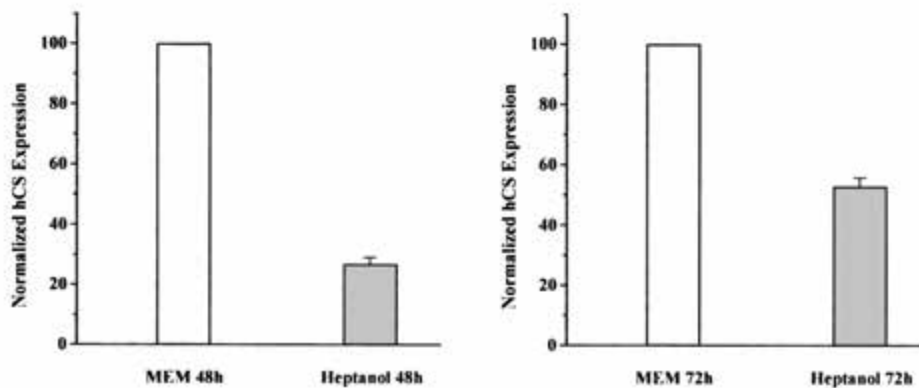
**B****C**

FIG. 3. Effects of long-term heptanol treatment on specific hormonal productions. **A**) Third day  $\beta$ hCG secretion in control conditions (MEM) in the presence of 1.5 mM heptanol for 72 h or in the presence of heptanol for a 48-h period followed by a 24-h period in control conditions. Values represent mean of data  $\pm$  SEM of triplicate determinations. Values of  $\beta$ hCG secretion in three independent experiments are shown in the table, and graph is representative of experiment 1.  $**P < 0.01$ ; Student *t* test. **B**) Immunoblotting of hCS after 2 days (lanes 1 and 2) and 3 days (lanes 3 and 4). Lanes 1 and 3 represent hCS expression in trophoblastic cells cultured in control conditions and lanes 2 and 4 in trophoblastic cells cultured in the presence of 1.5 mM heptanol. The figure illustrates one of six of a representative experiment. **C**) Normalized densitometric analyses of hCS protein performed on six independent experiments. The hCS expressions are significantly different at  $P < 0.01$  from MEM (Student *t* test for grouped data).

tained more than four nuclei. In contrast, ST formation was impaired in the presence of heptanol because only small STs with two or three nuclei being observed (Fig. 2B). Interestingly, the heptanol removal after 48 h of culture induced an increase of trophoblastic fusion as indicated by

the presence of  $38.7\% \pm 2.0\%$  of STs with more than four nuclei (Fig. 2C). Furthermore, statistical analysis using a chi-square test showed a significant difference in the nuclei distribution between trophoblastic cells cultured 72 h in control conditions and in the presence of heptanol. The dif-

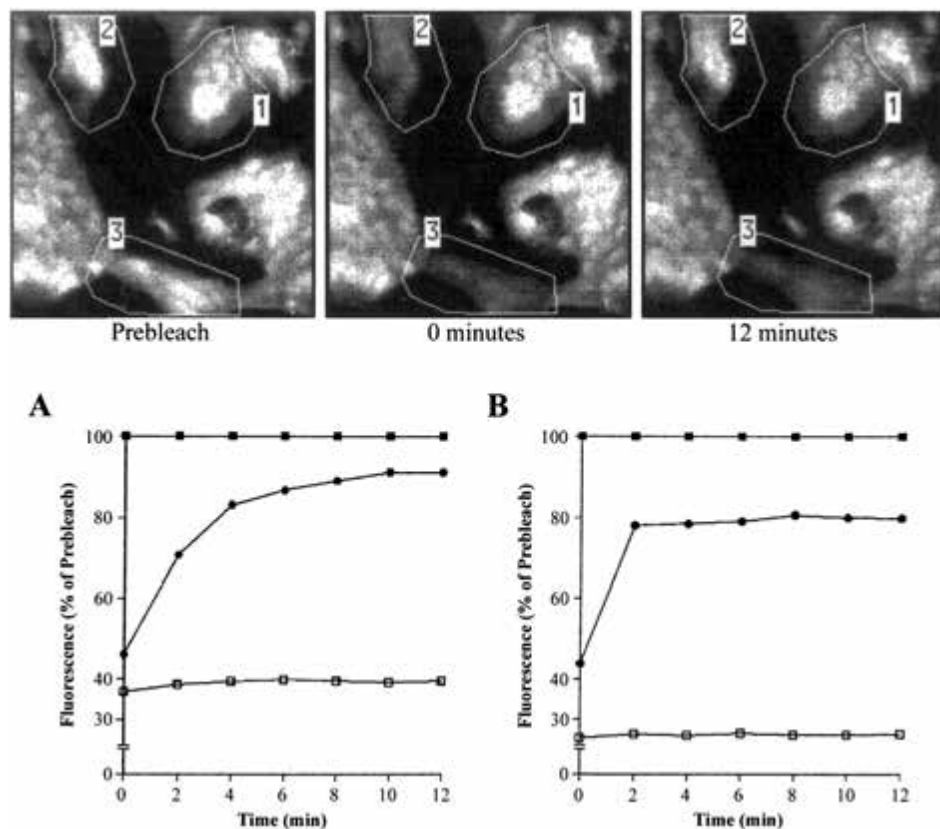


FIG. 4. Gap-FRAP analysis. Top, Typical computer-generated images of fluorescence intensities in cultured trophoblast measured during FRAP experiments. White represents the highest intensity. Areas 2 and 3 closely corresponding to cell territories (syncytiotrophoblasts) were selected in the prebleach scan and photobleached by laser pulses. Area 1 serves as an unbleached control cell to measure the loss of fluorescence because of repeated scanning and weak dye leakage. Immediately after photobleaching, the scan at time 0 shows the reduction of fluorescence emission in area 2 and 3. After 12 min, a fluorescence recovery had occurred in area 2, whereas the fluorescence intensity remains weak in area 3. Bottom, Evolution of fluorescence intensities versus time in isolated cells in cells connected by gap junctions and in fused cells. **A)** Graphic display of gap-FRAP experiment shown in upper row. Fluorescence recovery in cell 2 (●) follows a closely exponential time course, reflecting the presence of gap junctional communication. In contrast, the fluorescence intensity remains unchanged in cell 3 (□). **B)** Fast fluorescence recovery following a step-like course, when the membrane fusion is achieved between two cells (●). It was previously demonstrated that, in this case, heptanol (3 mM), a known junctional uncoupler, had no effect or fluorescence recovery, confirming the absence of gap junctional communication. The fluorescence intensities remained unchanged in the reference unbleached cell (■) and isolated bleached cell (□). (Reproduced from [43] with permission of the publisher, Wiley, Inc.)

ference was also significant when heptanol removal was compared with heptanol treatment alone. This reappearance of cellular fusion process illustrated the reversibility of heptanol action on trophoblast differentiation. It should be noted that the presence of heptanol in the culture medium did not prevent migration or cell-to-cell adhesion as shown in Figure 1D, leading to a majority of aggregated CT.

Given the potential nonspecific effects of heptanol, the action of octanol, another gap junctional inhibitor, was investigated. In this experiment, after 72 h of culture in control conditions,  $66\% \pm 3.1\%$  of examined STs contained more than four nuclei, and when the cells were cultured in the presence of 0.4 mM octanol for the same period, only  $11\% \pm 1.5\%$  of the analyzed STs contained more than four nuclei. Furthermore, octanol removal after 48 h of culture induced an increase in the number of STs, with more than four nuclei ( $34.3\% \pm 3.5\%$ ) observed 24 h later.

#### Effects of Long-Term Heptanol Treatment on Trophoblastic Hormonal Productions

As previously reported, the ST formation by fusion of CT is associated with a significant increase in  $\beta$ hCG secretion [5] and hCS expression [25]. Figure 3A shows that cells treated with heptanol for 72 h exhibited a significant

decrease in  $\beta$ hCG secretion, compared with cells in control conditions. Interestingly, when heptanol was removed after the first 48-h period,  $\beta$ hCG rose to a level similar to the control at 72 h, showing the reversibility of the action. Moreover, Western blotting analyses of hCS production showed that in the presence of heptanol for 2 or 3 days, expressions represent  $26.8\% \pm 2.3\%$  and  $52.8\% \pm 2.9\%$  of the control value, respectively (Fig. 3C).

#### Effects of Long-Term Heptanol Treatment on GJIC and Connexin Expression During Trophoblast Differentiation

When the purified CTS were cultured for 48 h, the GJIC was analyzed between contiguous CTs, between contiguous STs, and between contiguous CTs and STs. Functionality of the intercellular channels was demonstrated by means of gap-FRAP. Typical changes in the fluorescence intensity of selected cells within a field before and after the photobleaching procedure as well as the corresponding fluorescence recovery curves are depicted in Figure 4. The slow exponential fluorescence recovery (Fig. 4A) characteristic of GJIC was recorded between CT cells, between CT cells and STs, and between contiguous STs. It was demonstrated that a functional coupling occurred in 2.6% and 6% of tested cells after, respectively, 1 or 2 days. The presence of 1.5

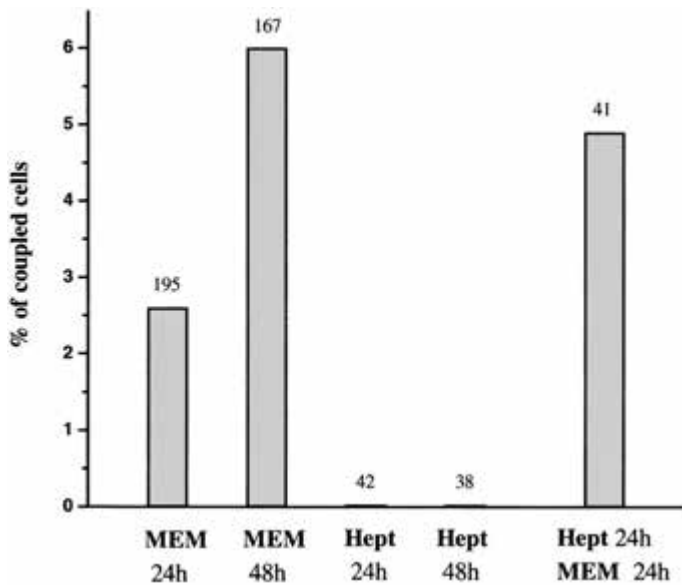


FIG. 5. Effects of heptanol on GJIC. Percentage of coupled cells between contiguous villous trophoblastic cells after 24 or 48 h in MEM (control conditions) or in the presence of heptanol 1.5 mM or after a 24-h period in the presence of heptanol followed by a 24-h period in control conditions. Coupled cells were characterized by the exponential time course of fluorescence recovery into a photobleached cell as shown in Figure 1A. Number of intercellular contacts analyzed is indicated on top of the bars.

mM heptanol in the culture medium during these periods totally abolished the number of coupled cells (Fig. 5). These results indicated that the culture conditions used for this study maintained the inhibitory effects of the junctional uncoupler. Moreover, this inhibitory action was simply reversed by washing off heptanol, leading to the reappearance of a functional coupling. This fact demonstrated the reversibility of the heptanol action. To firmly establish that heptanol was not cytotoxic, cell viability was also evaluated with the tetrazolium colorimetric assay. After 3 days of culture, the optical densities (OD) were, respectively,  $0.445 \pm 0.039$  and  $0.382 \pm 0.063$  in untreated and heptanol-treated trophoblastic cells (mean  $\pm$  SEM). These  $OD_{570-630}$  were not significantly different (Student *t* test), reflecting a similar number of living cells. To determine a possible action of heptanol on Cx43 gene and protein expressions, Cx43 mRNA was analyzed by reverse transcription (RT)-PCR and Cx43 protein by Western blotting and immunostaining. Figure 6A shows that Cx43 PCR products were not affected by the presence of heptanol, compared with control conditions. Furthermore, Western blotting analysis showed no significant difference between heptanol-treated cells and control cells (Fig. 6, B and C). Moreover, as illustrated in Figure 7, A and B, immunofluorescence (IF) localization of Cx43 protein in term villous trophoblastic cells revealed a punctuate immunostaining at the borders of contiguous cells (mainly between CTs and STs) and around the nuclei. Addition of heptanol in the culture medium did not significantly decrease Cx43 punctuate IF in the aggregated trophoblastic cells (Fig. 7, C and D).

## DISCUSSION

In the present study, we found that an agent blocking GJIC impaired trophoblastic cell fusion and differentiation, as revealed by morphological and functional analyses. This blocking action is reversible as demonstrated by the recov-

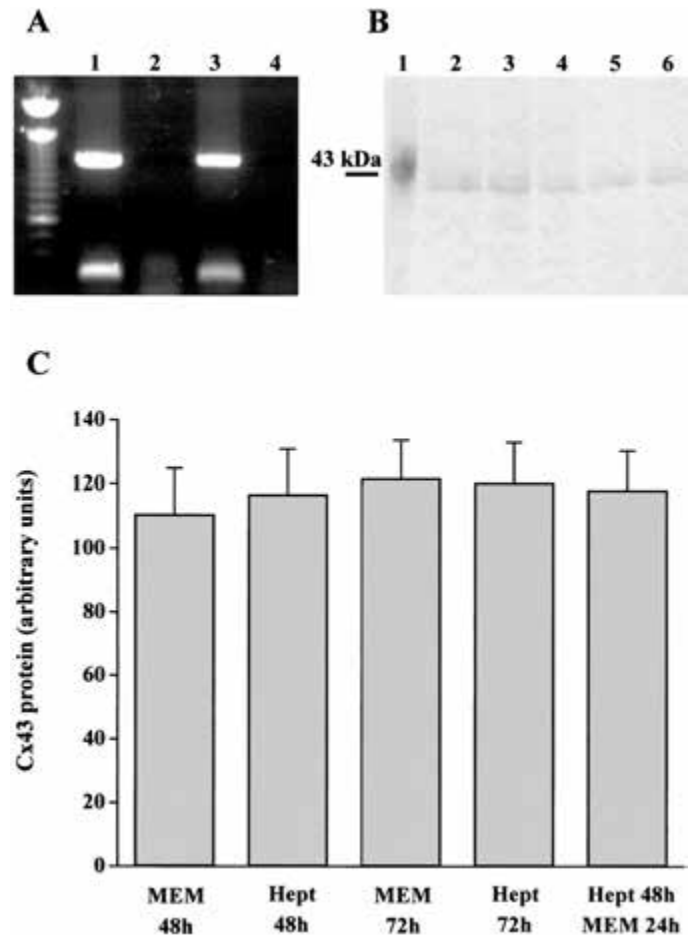


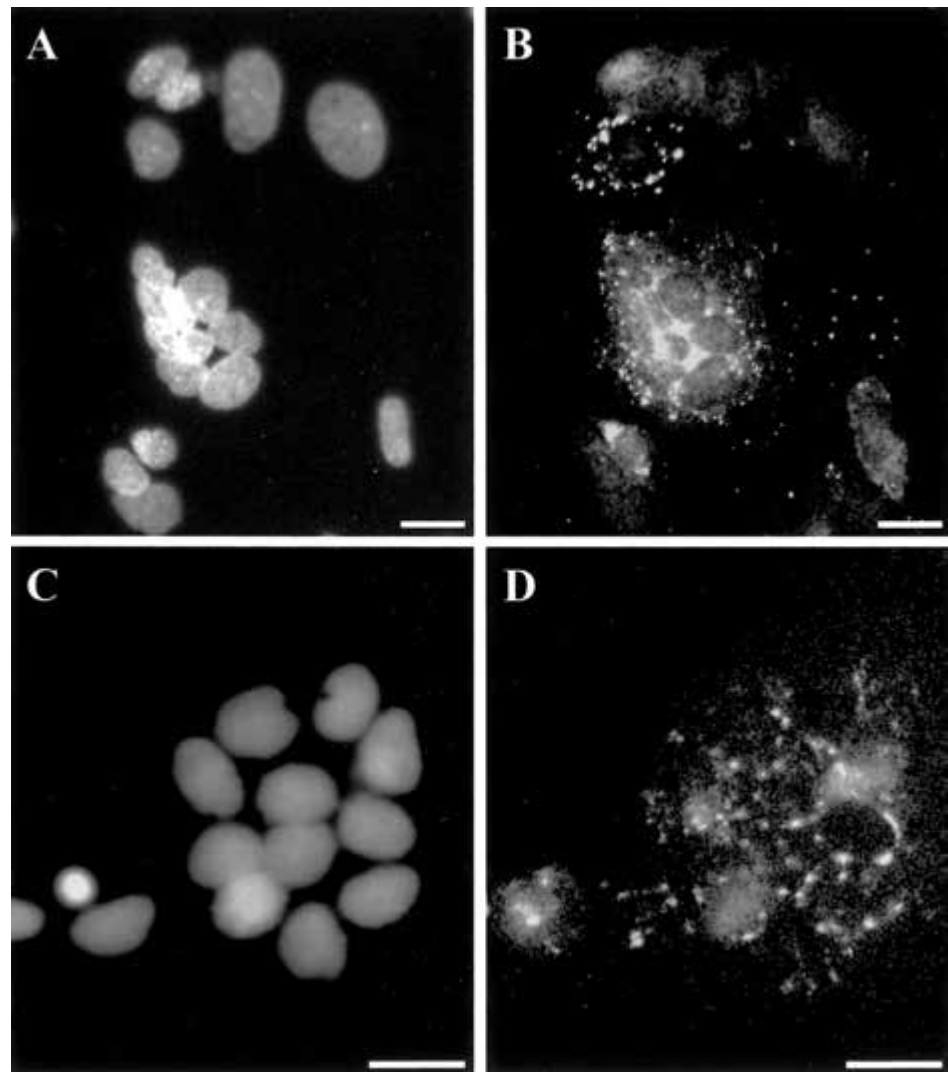
FIG. 6. Effects of heptanol on Cx43 mRNA and protein expressions. **A**) Expression of Cx43 mRNA in villous trophoblastic cells. The expected size of the PCR products is 1143 bp for Cx43 (top) and 275 bp for GAPDH (bottom). Lane 1 represents extracts from cytotrophoblastic cells cultured for 2 days in MEM and lane 3 from cytotrophoblastic cells cultured for 2 days in the presence of 1.5 mM heptanol. Lanes 2 and 4 represent respective controls without RT. A 100-bp DNA ladder was used for size analysis. **B**) Immunoblotting of Cx43 after 2 days (lanes 2 and 3) and 3 days (lanes 4 through 6). Lane 1 represents positive control for Cx43 (rat brain). **A, B**) Representative of three separate experiments. **C**) Normalized densitometric analyses of Cx43 protein. Bars = mean  $\pm$  SEM of values from three independent experiments. Statistical analysis reveals that Cx43 expression is not significantly different in all conditions tested (Student *t* test for grouped data).

ery of GJIC and trophoblast differentiation process after heptanol removal.

Only a few human cell types can fuse together, differentiate, and form syncytia: osteoclast [26, 27], myoblast [14, 28], and CT cells. The process of syncytium formation is poorly understood. In the human trophoblast, a phosphatidylserine (PS) flip has been involved in the cell-cell fusion process [29]. According to Huppertz et al. [30], this PS flip is a consequence of activation of initiator caspase (e.g., caspase 8), leading to the concept that the molecular machinery of early apoptosis is involved in the fusion process. Implication of endogenous retrovirus genome in trophoblastic fusion has been suggested, and recently a role of endogenous retroviral envelope glycoprotein encoded by the HERV-W (syncytin) was demonstrated [31, 6].

Other evidences point to an important role of gap junctions and GJIC in the control of cell and tissue differentiation processes [9, 10, 32]. The most clear-cut examples of

FIG. 7. **A, B**) Double IF for nuclear staining with DAPI (**A**) and for Cx43 (**B**) in villous CT cells cultured for 48 h in control conditions. Cx43 punctuate IF is observed around the cluster of nuclei of a ST and at the border of a cytotrophoblastic cell that is still in contact with the ST. Scale bars = 10  $\mu$ m. **C, D**) Double immunofluorescence for nuclear staining with DAPI (**C**) and for Cx43 (**D**) in villous CT cells cultured for 48 h in the presence of 1.5 mM heptanol. In the presence of uncoupler for 48 h, only aggregated CT cells were observed, but the Cx43 localization seems unchanged with a Cx43 punctuate IF at intercellular boundaries and around the nuclei. Scale bars = 10  $\mu$ m.



GJIC intervention in differentiation and development processes were given by interruption of molecular exchanges with anti-connexin antibody [33] or analysis of connexin knockout mice [34, 35]. In these studies, the uncoupling induced developmental abnormalities and cardiac or bone malformations. The role of gap junctions in differentiation can be also studied by chemically inhibiting GJIC. A variety of substances such as aliphatic alcohols, halothane, glycyrrhetic acid, and oleamide can uncouple cells. Heptanol is the most common gap junctional inhibitor used. Long-term incubation with heptanol considerably reduces the fusion of myoblasts [13, 14] and inhibits the fibroblast-populated collagen lattices [36], osteoclastic bone resorption [27], and actin organization and calcium propagation in astrocytes [37]. Although its exact mechanism of action is not known, it seems related to a decreased fluidity of membranous cholesterol-rich domains [17, 38], leading to a decrease of the open probability of junctional channels. Furthermore, in cultured neonatal rat cardiomyocytes, heptanol did not decrease the number of gap junctional channels, and in pancreatic acinar cells, there is a cessation of GJIC, although gap junctions remain structurally intact [39]. In the same way, in our study, heptanol totally abolished GJIC as measured by gap-FRAP without affecting Cx43 transcripts production and Cx43 protein expression and localization. It must be pointed out that in our experi-

mental conditions, heptanol action was not due to a cytotoxic effect because cell adherence and aggregation were not affected, an MTT test demonstrated no effects of heptanol on cell viability, and heptanol removal restored gap junctional communication and functional activities of the trophoblast (hCG and hCS production).

These results suggest that the diffusion of molecules between aggregated trophoblastic cells might regulate the fusion process. Indeed, according to a recent review [40], the initiation of the syncytial fusion seems require a concerted action of tissue-specific recognition molecules like HERV-W retroviral glycoprotein and phospholipids at the outer cellular surface. It is conceivable that second messengers like  $Ca^{2+}$ , inositol triphosphate<sub>3</sub>, and cAMP would control various cellular effectors involved in fusion and in the transcription of syncytiotrophoblast-specific genes [7]. For instance, it has been recently demonstrated that the stimulation of trophoblastic cell fusion and differentiation by cAMP is associated with a concomitant increase in HERV-W env. mRNA and protein expression [41]. These intercellular messengers may also cross-talk with gap junction channels, which are regulated by cAMP and  $Ca^{2+}$ . Furthermore, the fusion process coincides with a decrease in basal  $Ca^{2+}$  activity [20] and with an increase in cellular cAMP levels [42]. It was also demonstrated that trophoblastic villous differentiation occurs earlier when cell-cell

communication and Cx43 expression were enhanced (cAMP analogues, hCG, glucocorticoids). On the contrary, differentiation process is delayed when this communication is decreased by transforming growth factor $\beta$ 1 or endothelin [16, 20, 43, 44].

Recently gene knock-out approaches have been demonstrated that Cx26 and Cx31 deficiencies disturbed placental development in mice, but these molecules are not expressed in the human placenta [45, 46]. Therefore, given the striking species diversity of placental structures and endocrine functions, care must be taken when extrapolating mouse gene inhibition/disruption data to humans. For evident ethical reason, studies of the human placenta require carefully designed approaches, and our *in vitro* study demonstrated the involvement of GJIC in the trophoblastic fusion and consequently in human placental development.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful for the Clinique du Fief de Grimoire and the Department of Obstetrics and Gynecology at St. Vincent de Paul Hospital for providing us the placentas. We would like to thank Dr. F. Gaillard for his expertise in statistical analysis and J. Habrioux for his technical assistance.

## REFERENCES

- Richard R. Studies of placental morphogenesis I. Radioautographic studies of human placenta utilizing tritiated thymidine. *Proc Soc Exp Biol Med* 1961; 106:829–831.
- Benirschke K, Kaufmann P. *Pathology of the Human Placenta*. New York: Springer-Verlag; 2000.
- Ogren L, Talamentes F. The placenta as an endocrine organ: polypeptides. In: Knobil E, Neill J (eds.). *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press; 1994: 875–945.
- Desoye G, Shafirir E. Placental metabolism and its regulation in health and diabetes. In: Desoye G, Shafirir E (eds.), *Molecular Aspects of Medicine*. New York: Pergamon; 1994: 505–682.
- Kliman HJ, Nestler J, Sermasi E, Sanger J, Strauss J III. Purification, characterization, and *in vitro* differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinology* 1986; 118:1567–1582.
- Frendo JL, Théron P, Bird T, Massin N, Muller F, Guibourdenche J, Luton D, Vidaud M, Anderson WB, Evain-Brion D. Overexpression of copper zinc superoxide dismutase impairs human trophoblast cell fusion and differentiation. *Endocrinology* 2000; 142:3638–3648.
- Aronow B, Richardson B, Handwerger S. Microarray analysis of trophoblast differentiation: gene expression reprogramming in key gene function categories. *Physiol Genomics* 2001; 17:105–116.
- Willecke K, Eiberger J, Degen J, Eckardt D, Romualdi A, Guldenagel M, Deutsch U, Sohl G. Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol Chem* 2002; 383:725–737.
- Saez J, Berthoud V, Moreno A, Spray DC. Gap junctions. Multiplicity of controls in differentiated and undifferentiated cells and possible functional implications. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 1993; 27:163–198.
- Bruzzzone R, White TW, Goodenough DA. The cellular Internet: on-line with connexins. *Bioessays* 1996; 18:709–718.
- Yamasaki H, Krutovskikh V, Mesnil M, Omori Y. Connexin genes and cell growth control. *Arch Toxicol Suppl* 1996; 18:105–114.
- Trosko JE, Chang CC, Wilson MR, Upham B, Hayashi T, Wade M. Gap junctions and the regulation of cellular functions of stem cells during development and differentiation. *Methods* 2000; 20:245–264.
- Mege R, Goudou D, Giaume C, Nicolet M, Rieger F. Is intercellular communication via gap junctions required for myoblast fusion? *Cell Adhes Commun* 1994; 2:329–343.
- Constantin B, Cronier L. Involvement of gap junctional communication in myogenesis. *Int Rev Cytol* 2000; 196:1–65.
- Cronier L, Defamie N, Dupays L, Théveniau-Ruissy M, Goffin F, Pointis G, Malassiné A. Connexin expression and gap junctional intercellular communication in human first trimester trophoblast. *Mol Hum Reprod* 2002; 8:1005–1013.
- Cronier L, Bastide B, Hervé JC, Délèze J, Malassiné A. Gap junctional communication during human trophoblast differentiation: influence of human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 1994; 135:402–408.
- Johnston MF, Simon SA, Ramon F. Interaction of anaesthetics with electrical synapses. *Nature* 1980; 286:498–500.
- Malassiné A, Alsat E, Besse C, Rebourcet R, Cedard L. Acetylated low density lipoprotein endocytosis by human syncytiotrophoblast in culture. *Placenta* 1990; 11:191–204.
- Schmon B, Hartmann M, Jones CJ, Desoye G. Insulin and glucose do not affect the glycogen content in isolated and cultured trophoblast cells of human term placenta. *J Clin Endocrinol* 1991; 73:888–893.
- Cronier L, Dubut A, Guibourdenche J, Malassiné A. Effects of endothelin on villous trophoblast differentiation and free intracellular calcium. *Trophobl Res* 1999; 13:69–86.
- Wade MH, Trosko JE, Schindler M. A fluorescence photobleaching assay of gap junction-mediated communication between human cells. *Science* 1986; 232:525–528.
- Guibourdenche J, Alsat E, Soncin F, Rochette-Egly C, Evain-Brion D. Retinoid receptors expression in human term placenta: involvement of RXRa in retinoid induced-hCG secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:1384–1387.
- Keryer G, Alsat E, Tasken K, Evain-Brion D. Cyclic AMP-dependent protein kinases and human trophoblast cell differentiation *in vitro*. *J Cell Sci* 1998; 111:996–1004.
- Douglas GC, King BF. Differentiation of human trophoblast cells *in vitro* as revealed by immunocytochemical staining of desmoplakin and nuclei. *J Cell Sci* 1990; 96:131–141.
- Handwerger S. The physiology of placental lactogen in human pregnancy. *Endocrinology* 1991; 12:329–336.
- Roodman GD. Advances in bone biology: the osteoclast. *Endocr Rev* 1996; 17:308–332.
- Ilvesaro J, Vaananen K, Tuukkanen J. Bone-resorbing osteoclasts contain gap-junctional connexin-43. *J Bone Miner Res* 2000; 15:919–926.
- Wakelam MJO. The fusion of myoblasts. *Biochem J* 1985; 228:1–12.
- Adler R, Ng A, Rote N. Monoclonal antiphosphatidylserine antibody inhibits intercellular fusion of the choriocarcinoma line, *Jar Biol Reprod* 1995; 53:905–910.
- Huppertz B, Frank H, Kingdom J, Reister F, Kaufmann P. Villous cytotrophoblast regulation of the syncytial apoptotic cascade in the human placenta. *Histochem Cell Biol* 1998; 110:495–508.
- Mi S, Lee X, Li XP, Veldman GM, Finnerty H, Racie L, LaVallie E, Tang XY, Edouard P, Howes S, Keith JC, McCoy JM. Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature* 2000; 403:785–789.
- Loewenstein WR. Junctional intercellular communication: the cell-to-cell membrane channel. *Physiol Rev* 1981; 61:829–913.
- Warner AE, Guthrie SC, Gilula NB. Antibodies to gap junction protein selectively disrupt junctional communication in the early amphibian embryo. *Nature* 1984; 311:127–131.
- Reaume AG, De Sousa PA, Kulkarni S, Languille BL, Zhu D, Davies TC, Juneja SC, Kidder GM, Rossant J. Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science* 1995; 267:1831–1834.
- Lecanda F, Warlow PM, Sheikh S, Furlan F, Steinberg TH, Civitelli R. Connexin43 deficiency caused delayed ossification, craniofacial abnormalities, and osteoblast dysfunction. *J Cell Biol* 2000; 151:931–944.
- Ehrlich HP, Gabbiani G, Meda P. Cell coupling modulates the contraction of fibroblast-populated collagen lattices. *J Cell Physiol* 2000; 184:86–92.
- Yamane Y, Shiga H, Asou H, Ito E. Gap junctional channel inhibition alters actin organization and calcium propagation in rat cultured astrocytes. *Neuroscience* 2001; 112:593–603.
- Takens-Kwak B, Jongsma HJ, Rook MB, Van Ginneken ACG. Mechanism of heptanol-induced uncoupling of cardiac gap junctions: a perforated patch-clamp study. *Am J Physiol* 1992; 262:C1531–C1538.
- Chanson M, Bruzzzone R, Bosco D, Meda P. Effects of n-alcohols on junctional coupling and amylase secretion of pancreatic acinar cells. *J Cell Physiol* 1989; 139:147–156.
- Pötgens AJG, Schmitz U, Bose P, Versmold A, Kaufmann P, Frank HG. Mechanisms of syncytial fusion: a review. *Placenta* 2002; 23:S107–S113.
- Frendo JL, Olivier D, Cheynet V, Blond JL, Bouton O, Vidaud M, Rabreau M, Evain-Brion D, Mallet F. Direct involvement of HERV-W Env glycoprotein in human trophoblast cell fusion and differentiation. *Mol Cell Biol* 2003; 23:3566–3574.
- Roulier S, Rochette-Egly C, Rebut-Bonneton C, Porquet D, Evain-Brion D. Nuclear retinoic acid receptor characterization in cultured human trophoblast cells: effect of retinoic acid on epidermal growth factor receptor expression. *Mol Cell Endocrinol* 1994; 105:165–173.

43. Cronier L, Hervé JC, Délèze J, Malassiné A. Regulation of gap junctional communication during human trophoblast differentiation. *Microsc Res Tech* 1997; 38:21–28.
44. Malassiné A, Cronier L. Hormones and human trophoblast differentiation: a review. *Endocrine* 2003; 19:3–10.
45. Gabriel H, Jung D, Butzler C, Temme A, Traub O, Winterhager E, Willecke K. Transplacental uptake of glucose is decreased in embryonic lethal connexin26-deficient mice. *J Cell Biol* 1998; 140:1453–1461.
46. Plum A, Winterhager E, Pesch J, Lautermann J, Hallas G, Rosentreter B, Traub O, Herberhold C, Willecke K. Connexin31-deficiency in mice causes transient placental dysmorphogenesis but does not impair hearing and skin differentiation. *Dev Biol* 2001; 231:334–347.