



Rôle de l'EG-VEGF (Endocrine Gland Derived-Vascular Endothelial Growth Factor) dans le développement et la progression tumorale placentaire : cas du choriocarcinome

Wael Traboulsi

► To cite this version:

Wael Traboulsi. Rôle de l'EG-VEGF (Endocrine Gland Derived-Vascular Endothelial Growth Factor) dans le développement et la progression tumorale placentaire : cas du choriocarcinome. Cancer. Université Grenoble Alpes, 2016. Français. NNT : 2016GREAV039 . tel-01689806

HAL Id: tel-01689806

<https://theses.hal.science/tel-01689806>

Submitted on 22 Jan 2018

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE
GRENOBLE ALPES**

Spécialité : **Biologie Cellulaire**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Wael TRABOULSI

Thèse dirigée par **Le Dr. Nadia ALFAIDY**

Préparée au sein du **Laboratoire Biologie du Cancer et de
l'Infection**

Dans **l'École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Rôle de l'EG-VEGF (Endocrine Gland Derived-Vascular Endothelial Growth Factor) dans le développement et la progression tumorale placentaire : cas du choriocarcinome

Thèse soutenue à huis clos le **Lundi 12 décembre 2016.**

Devant le jury composé de :

Pr. Nathalie BARDIN

PU-PH à l'AP-HM, Rapporteur

Pr. Vincent SAPIN

PU-PH CHU, Clermont-Ferrand, Rapporteur

Dr. Anne Briançon

Maître de conférences, UFR de Pharmacie- Grenoble, examinateur

Pr. Marie-Noëlle Dieudonné

Professeur des universités, Université de Versailles, examinateur

Dr. Isabelle MICHAUD-SORET

DR1 CNRS, CEA-Grenoble, Président

Dr. Nadia ALFAIDY

DR2 INSERM, U1036-Grenoble, Directrice de thèse



*A ma famille,
Grâce à votre soutien permanent je suis arrivé jusque-là...*

"If you can't fly then run, if you can't run then walk, if you can't walk then crawl, but whatever you do you have to keep moving forward."

Martin Luther King Jr.

Je tiens à remercier et à adresser toute ma reconnaissance à toutes les personnes qui ont contribué, de loin ou de près, à la réalisation de ce travail. Aussi, je remercie la fondation « La ligue Nationale contre le cancer » d'avoir financé mon projet de thèse pendant ces trois années.

Je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté de juger la qualité de ce manuscrit de thèse. Je remercie le **Dr. Isabelle MICHAUD-SORET** d'avoir accepté de présider ce jury. Je remercie les deux rapporteurs, le **Pr. Nathalie BARDIN** et **Pr. Vincent SAPIN** d'avoir pris de leur temps pour la lecture et la discussion du manuscrit. En fin, je remercie le **Pr. Marie-Noëlle DIEUDONNE** et le **Dr. Anne BRIANCON** d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je ne remercierai jamais assez le **Dr Nadia ALFAIDY** qui a encadré cette thèse. Elle a su trouver l'équilibre qu'il me fallait avec une direction de thèse et un accompagnement. Cela m'a beaucoup apporté. Je la remercie aussi d'avoir partagé avec moi sa vision sur de nombreux sujets, à la fois scientifiques et sociétaux. Son soutien a été d'une importance capitale. Son enthousiasme scientifique rend la recherche ludique et passionnante au quotidien. J'espère que les occasions d'échanges et de collaborations perdureront au-delà de ce projet de thèse.

Je remercie également le **Dr. Jean-Jacques FEIGE**, directeur de notre laboratoire pour ses conseils scientifiques tout au long de mon projet de thèse. Son expertise et sa veille sur les bonnes pratiques de la recherche, font de l'U1036 un lieu avéré pour la formation des étudiants.

Je remercie chaleureusement tous les membres de notre équipe « Placenta ». Avec des pensées particulières pour, **Mr Frédéric SERGENT** que je remercie pour son aide précieuse dans le développement du modèle animal, le **Dr Sophie BROUILLET** et le **Pr. Pascal HOFFMANN** pour leurs conseils et leurs aides pour la collecte des échantillons au CHU de Grenoble. Bien évidemment, je remercie **Déborah REYNAUD** et **Dr Roland ABI NAHED**, mes successeurs pour le projet choriocarcinome, pour leur soutien et aide au quotidien.

Je remercie le **Dr Helena POLENA**, le **Dr Abir KHALIL**, **Olivier NICOUD** et le **Dr Isabelle VILGRAIN** pour leurs collaborations, conseils et soutien dans le projet VE-

cadhérine. Je remercie également chaleureusement tous les membres de notre laboratoire. Avec une pensée particulière pour le **Dr Nadia CHERRADI**, le **Dr Daniel VITTET**, le **Dr Agnès CASTAN**, **Marie-Pierre MANDEZ**, et **Caroline ROELQNTS**, pour leur aide et soutien moral tout au long de ma thèse.

Je remercie le **Dr. Mohamed BENHAROUGA** pour sa collaboration, son soutien et aide tout au long de mon projet.

Un grand merci à tous les membres de l'animalerie du CEA pour leur aide précieuse dans nos projets de recherche et leur soutien indispensable.

Aussi, je remercie nos collaborateurs Marocains pour leur contribution dans l'avancée de ce projet. Grace à l'accord « INSERM/CNRST » cette collaboration a permis la collecte d'échantillons précieux pour la réalisation de ce projet de thèse. Je remercie particulièrement le **Pr. Touria Aboussaouira** et le **Pr. Boufettal**.

En fin Je remercie mes amies et mes proches pour tous les moments merveilleux passés en dehors du contexte de la thèse et pour le soutien qu'ils m'ont toujours apporté.

Je ne remercierai jamais assez, et de tout cœur mes deux parents et mon frère dont le soutien sans faille m'a permis d'arriver là où je suis. Ils ont su entretenir ma curiosité et me donner la confiance nécessaire pour entreprendre des études aussi longues.

Table des matières

Liste des illustrations et des tableaux	5
Abréviations	7
Introduction	10
Le placenta	11
1. Le placenta humain	13
1.1 Mise en place de la placentation humaine	15
1.1.1 Phase préimplantatoire	15
1.1.2 Phase implantatoire	15
1.1.3 Stade pré lacunaire	15
1.1.4 Stade lacunaire	17
1.1.5 Stade vilieux	19
1.2 Mise en place de la villosité placentaire	19
1.2.1 Cytotrophoblaste vilieux	23
1.2.2 Cytotrophoblaste extravilleux	23
1.3 Le placenta murin	25
1.3.1 Comparaison entre placentas humain et murin.....	25
1.4 Remodelage vasculaire	27
1.4.1 Formation et rôle des bouchons trophoblastiques dans le remodelage.....	27
1.4.2 Remodelage indépendant de l'invasion trophoblastique	29
1.4.3 Mécanisme du remodelage des artères spiralées.	29
1.5 Cancer et grossesse: Similitudes dans la prolifération et l'invasion	33
1.5.1 Prolifération.....	33
1.5.2 Invasion	33
Résumé Chapitre I.....	35
Les Maladies Trophoblastiques Gestationnelles.....	37
2. Introduction	39
2.1 Pathologie, Génétique et classification des MTG	39
2.1.1 Grossesses molaire : Complètes et partielles	39
2.1.2 Nodules du site placentaire (NSP).....	44
2.1.3 Site placentaire exagéré (SPE)	44
2.1.4 Le Choriocarcinome (CC)	44
2.1.5 Mole invasive	44
2.1.6 Tumeur trophoblastique du site placentaire (TTSP).....	45
2.1.7 Tumeurs trophoblastiques Epithéloïdes (TTE).....	45

2.2 Epidémiologie.....	45
2.3 Facteurs de risque.	46
2.3.1 Age	46
2.3.2 Antécédents	46
2.3.3 Groupe sanguin.....	47
2.3.4 Niveau socio-économique	47
2.4 Diagnostic des maladies trophoblastiques gestationnelles.	49
2.5 Traitement des maladies trophoblastiques gestationnelles.....	51
2.5.1 Grossesse molaire	51
2.5.2 Néoplasie trophoblastique gestationnelle	51
2.5.2.1 Patientes à faible risque de néoplasie trophoblastique gestationnelle.	51
2.5.2.2 Patientes à Haut risque de néoplasie trophoblastique gestationnelle.....	52
2.5.3 Chirurgie.....	52
2.6 Dosage d'hCG : Faux positifs et "Fantôme d'hCG"	54
Résumé Chapitre II	55
Les Prokinéticines.....	57
3. Découverte des prokinéticines	59
3.1 Les gènes des prokinéticines	61
3.2 Les protéines des prokinéticines.....	61
3.3 Les récepteurs des prokinéticines	63
3.4 Activation des récepteurs couplés aux protéines G	65
3.4.1 Différentes protéines G.....	65
3.4.4 Affinités des agonistes et antagonistes pour les récepteurs des prokinéticines	67
3.5 Expression des prokinéticines	68
3.5.1 Expression des prokinéticines dans le système central et périphérique	68
3.5.2 Expression des prokinéticines dans le système reproducteur mâle.	69
3.5.3 Expression des prokinéticines dans le système reproducteur femelle: Ovaires.....	69
3.5.4 Expression des prokinéticines dans le placenta	71
3.6 Expression de l'EG-VEGF et de ses récepteurs dans le placenta murin	74
3.7 Régulations locales de l'expression de l'EG-VEGF.....	74
3.7.1 Régulation par l'hypoxie	75
3.7.2 Régulation par l'hCG	75
3.7.3 Régulation par les stéroïdes.....	76
3.8 Prokinéticines et angiogenèse	79
3.9 Prokinéticines et système immunitaire.....	80
3.10 Prokinéticines et cancer	80

3.10.1 EG-VEGF et Cancer colorectal	80
3.10.2 EG-VEGF et carcinome de l'endomètre	80
3.10.3 EG-VEGF et cancer de l'ovaire	81
3.10.4 EG-VEGF et Cancer de la prostate.....	81
3.10.5 EG-VEGF et Cancer des testicules.....	81
Résumé Chapitre III	82
VE-Cadhérine	83
4. Cadhérines épithéliales et endothéliales	85
4.1 Structure de la VE-cadhérine.....	87
4.2 Signalisation de la VE-cadhérine	87
4.3 Régulation de la VE-cadhérine par phosphorylation.....	88
4.4 Sites de phosphorylation de la VE-cadhérine humaine:	89
4.5 Cadhérines et cancer	89
Résumé Chapitre IV	91
OBJECTIFS.....	92
Résultats	95
I Contexte et présentation de la publication.	96
2. Résumé des résultats	127
2.1 Augmentation des niveaux circulants et de l'expression placentaire de l'EG-VEGF dans les MHC et dans le choriocarcinome.	140
2.2 EG-VEGF active les voies de signalisation tumorales et augmente la prolifération des cellules du Choriocarcinome.	140
2.3 EG-VEGF augmente la migration et l'invasion des cellules du choriocarcinome en culture 2D et 3D.	141
2.4 Développement et caractérisation du modèle murin du choriocarcinome.....	141
2.5 Effets des antagonistes des récepteurs PROKR1 et PROKR2 sur le développement et la progression du choriocarcinome <i>in vivo</i>	142
2.6 Analyse in situ des placentas de souris traitées avec les antagonistes des récepteurs PROKR1 ou PROKR2.....	142
2.7 Altération de l'expression de facteurs pro-angiogéniques chez les souris traitées <i>in vivo</i>	143
.....	144
.....	144
3. Conclusion.....	145
4. Discussion des résultats.....	145
4.1 Choix des cellules JEG3.....	145
4.2 Effets différentiels de l'EG-VEGF sur cellules trophoblastiques normales et tumorales.	146
4.3 Avantages de l'utilisation des antagonistes PROKR1 et PROKR2 in-vivo.	150

II Contexte et présentation de la publication	152
2. Résumé des résultats.	174
2.1 Augmentation des niveaux circulants de la sVE chez les patientes ayant des MHC ou choriocarcinome.	184
2.2 EG-VEGF augmente la perméabilité des cellules endothéliales via l'activation de la tyrosine kinase Src:	184
2.3 EG-VEGF affecte l'organisation des jonctions cellulaires adhérentes via la désorganisation de la VE-cadhérine.....	184
2.4 EG-VEGF induit la phosphorylation sur tyrosine des protéines intracellulaires des HUVEC.	185
2.5 EG-VEGF induit la phosphorylation de la VE-cadhérine sur la tyrosine Y685:	185
2.6 Le milieu conditionné des JEG3 induit le clivage de la VE-cadhérine:	186
3. Conclusion	188
4. Discussion des résultats	188
4.1 Phosphorylation de la tyrosine Y685 suite à l'activation de récepteurs couplés aux protéines G.	188
4.2 Lequel des récepteurs à l'EG-VEGF est impliqué dans le contrôle de perméabilité des cellules endothéliales.	189
Perspectives	190
1. Utilisation des inhibiteurs de Src <i>in-vivo</i> dans le modèle animal du choriocarcinome développé au laboratoire.....	190
2. Identification du rôle de la protéine NOV dans le contrôle de la progression tumorale.	190
3. Exploitation du modèle animal du choriocarcinome	190
Communications et publications	192
Références :	194

Liste des illustrations et des tableaux

Figure 1: Le placenta humain

Figure 2 : Les premières étapes du développement embryonnaire

Figure 3 : Le blastocyste

Figure 4 : Apposition et adhérence du blastocyste

Figure 5 : Implantation du blastocyste

Figure 6 : Stades précoces de la grossesse

Figure 5 : Développement placentaire humain

Figure 8 : Formation des villosités choriales

Figure 9 : Représentation schématique de la villosité choriale

Figure 10 : La villosité choriale et les cytotrophoblastes extravilloux

Figure 11 : Structure des villosités flottantes

Figure 12 : La villosité choriale flottante

Figure 13 : Comparaison anatomique des placentas humain et murin

Figure 14 : Trajets hypothétiques des trophoblastes extravilloux endovasculaires

Figure 15 : Remodelage des artères spiralées maternelles

Figure 16 : Similarités entre grossesse normale et développement tumoral.

Figure 17 : Classification des maladies trophoblastiques gestationnelles

Figure 18 : Origine cytogénétique de la môle hydatiforme

Figure 19 : Môle hydatiforme complète (MHC)

Figure 20 : Môle hydatiforme partielle (MHP)

Figure 21 : Choriocarcinome

Figure 22 : Aspect échographique d'une môle hydatiforme complète et partielle.

Figure 23 : MHP avec un fœtus et un placenta anormaux

Figure 24 : Structure des gènes *prok1* et *prok2*

Figure 25 : Séquence d'acides aminés des protéines de la famille AVIT

Figure 26: Structure secondaire de MIT-1 et de la colipase

Figure 27 : Activation d'un RCPG

Figure 28 : Activation de PROKR1 ou PROKR2

Figure 29 : EG-VEGF (PROK1), PROK2 et leurs récepteurs dans le système central et périphérique.

Figure 30 : Profil d'expression sérique de l'EG-VEGF au cours de la grossesse

Figure 31 : EG-VEGF et ses récepteurs au cours du premier trimestre de grossesse.

Figure 32: Expression d'EG-VEGF en ARNm et protéine au premier trimestre de la grossesse

Figure 33: Différentes fonctions physiologiques des prokinéticines.

Figure 34: Structure de la VE-cadhérine

Figure 35: Voies de phosphorylations de la VE-cadhérine

Figure 36: Vaisseaux sanguins normaux et tumoraux.

Figure 37: Expression des facteurs angiogéniques chez les différents groupes de souris.

Figure 38: Expression PROKR1 et PROKR2 dans les CTN et les JEG3.

Figure 39 : Effet de l'EG-VEGF sur les CTN et les JEG3.

Figure 40: Schéma récapitulatif du mécanisme de la progression tumorale du choriocarcinome.

Tableau 1: Classification FIGO des néoplasies trophoblastiques gestationnelles.

Tableau 2: Système d'évaluation des néoplasies trophoblastiques gestationnelles.

Tableau 3: Traitement des patientes à faible risque.

Tableau 4: Traitement des patientes à haut risque.

Tableau 5: Agonistes et antagonistes des récepteurs de prokinétines.

Abréviations

AC: Adénylyl Cyclase

Act-D: Actinomycine **D**

ADN: Acide DésoxyriboNucléique

ADNc: ADN complémentaire

ADAM-10: **A** Disintegrin **A**nd **M**etalloprotéase-**10**

AKT: Protein Kinase **B (PKB)**

AMPc : Adenosine Monophosphate Cyclique

ARN: Acide RiboNucléique

ARNm: ARN messenger

Bv8: Bombina variegata 8kDa

BiMHC: Môles Hydatiformes Biparentale Complètes

CC: Choriocarcinome

CO: Monoxyde de Carbone

COX-2: Cyclo-Oxgénase 2

CT : Cytotrophoblaste

CTEV: CytoTrophoblaste ExtraVilleux

CTV: CytoTrophoblaste Villeux

EG-VEGF: Endocrine Gland-derived Vascular Endothelial Growth Factor

EMA-CO : Etoposide, Méthotrexate, Actinomycine D, Cyclophosphamide, Onconin

TEV: Trophoblaste Extra-Villeux

FGF: Fibroblaste Growth Factor

FSH: Follicle Stimulating Hormone

GC: Guanylyl Cyclase

GDP: Guanosine Diphosphate

GnRH: Gonadotropin-Releasing Hormone

GTP: Guanosine Triphosphate

hCG: human Chorionic Gonadotropin

HLA-G: Human Leukocyte Antigen-G

hPL: Hormone Lactogène Placentaire

Hsp27: Heat Shock Protein 27

IgG: ImmunoGlobuline **G**

IGF: Insulin Growth Factor

IGF1R: Insulin Growth Factor 1 Receptor

IL-6: Interleukin 6

IL-11: Interleukin 11

JPC: jour post-coïtal/jour post-conception

kDa: Kilo Dalton

KHDC3L: K Homology domain containing 3 like, subcortical maternal complex member

LH: Hormone Lutéinisante

LIF: Leukemia Inhibitory Factor

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinases

MHC: Môle Hydatiforme Complète

MHP: Môle Hydatiforme Partielle

MHRF: Mômes Hydatiformes Récurrentes Familiales

MIT-1: Mamba Intestinal Toxin 1

MMP: Matrix Métallo-Protéinase

MTG: Maladies Trophoblastiques Gestationnelles

MTX: Méthotrexate

NK: Natural Killer

NO: Nitrite Oxyde

NSP: Nodules du Site Placentaire

NLRP7: NATCH, LRR and PYD domains-containing Protein 7

NTG: Néoplasie Trophoblastique Gestationnelle

PAK: p21 Activated kinase

PE: Pré-Eclampsie

PGH: Placental Growth Factor

ppO2: Pression partielle en Oxygène

pI: Point Isoélectrique

PI3K: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-Kinase

PPAR: Peroxisome Proliferator Activited Receptor

PROK1: Prokineticine-1

PROK2: Prokineticine-2

PROKR1: Prokineticine Receptor-1

PROKR2: Prokineticine Receptor-2

PKA: Protein Kinase A

PLA2: Phospholipase A2

PLC: Phospholipase C

p57kip2: Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C

RCPG: Récepteurs Couplés aux Protéines G

RCIU: Retard de Croissance Intra-Utérin

SA: Semaine d'Aménorrhée

ST: Syncytiotrophoblaste

SPE: Sites Placentaires Exagérés

SK: Syndrome de Kallman

sVE: VE cadhérine soluble

TEM: Transition Epithélio-Mésenchymateuse

TGF-β: Transforming Growth Factor beta

TNF: Tumor Necrosis Factor

TTG : Tumeurs Trophoblastiques Gestationnelles

TTSP: Tumeurs Trophoblastiques du Site Placentaire

TTE: Tumeurs Trophoblastiques Epithélioïdes

TSH: Thyroid-Stimulating Hormone

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

VEGFR-1: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1

VPRA: Venom Protein A

VEGF-A: Vascular Endothelial Growth Factor A.

Introduction

Le placenta

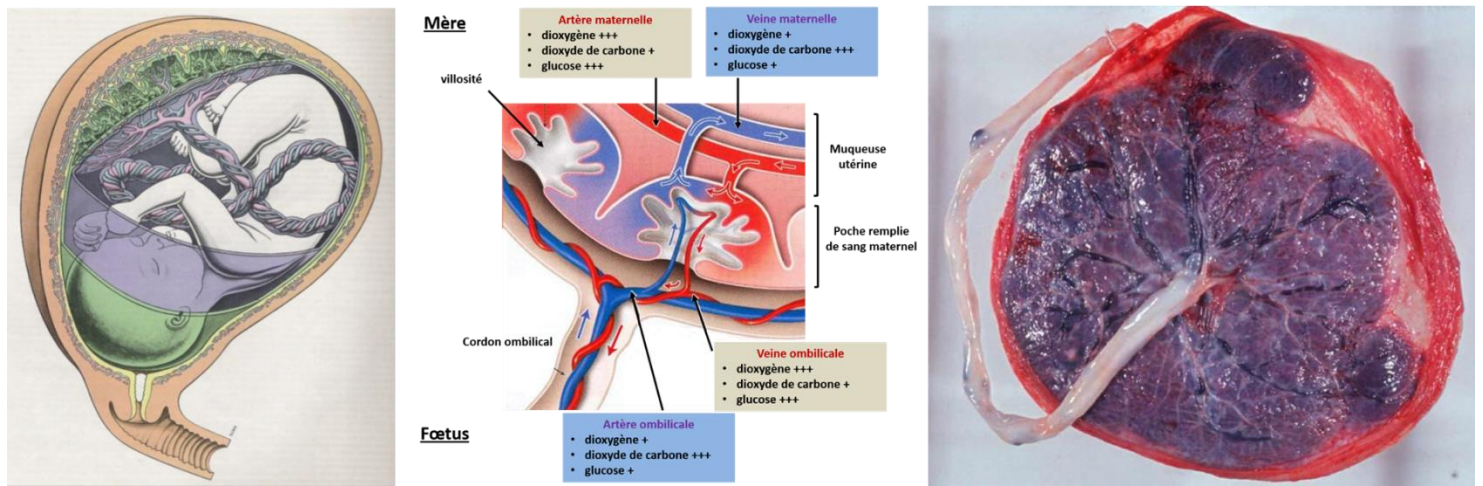


Figure 1. Le placenta humain (Bréal Schéma des échanges au niveau du placenta slideplayer.fr)

1. Le placenta humain

Le placenta est un organe temporaire essentiel à la grossesse. Il s'agit de l'organe le plus vascularisé du corps qui assure les échanges entre la mère et le fœtus de gaz, des éléments nutritifs et assure l'élimination des déchets (figure 1). Le placenta constitue également l'organe endocrine de la grossesse qui produit et métabolise les hormones d'une manière autocrine, paracrine et endocrine, contrôlant son propre fonctionnement, ainsi que celui du fœtus et de la mère. En outre, le placenta protège le « fœtus-allogreffe » du système immunitaire maternel et remplit de multiples fonctions comme celles assurées par l'intestin, les reins et les organes endocriniens après la naissances (Aplin, 1991). Sur le plan morphologique, les placentas des différentes espèces sont classés en plusieurs types en fonction de i) du nombre de couches de tissu fœtal intégrant le tissu maternel et constituant l'interface fœto-maternelle, (ii) l'interdigitation fœto-maternelle caractérisant la forme de contact entre le tissu fœtal et le sang maternel, et iii) la forme du placenta. Le placenta humain est classé comme un placenta hémochorial, car les villosités placentaires fœtales pénètrent jusque dans les vaisseaux sanguins maternels ; à interdigitation villositaire et d'une forme discoïde. Le placenta humain subit un remodelage continu tout au long de la grossesse et ce en réponse à l'évolution des besoins fonctionnels de l'embryon puis du fœtus en développement. La surface hémochoriale fœto-maternelle offre une surface de 15 m² d'échange et se compose de cinq couches distinctes: (i) le syncytiotrophoblaste villositaire en contact direct avec le sang maternel dans l'espace intervilloux (ii) la membrane basale (iii) les villosités contenant la matrice intracellulaire et les vaisseaux fœtaux (iv) une membrane basale attachée aux cellules endothéliales des capillaires (v) des cellules endothéliales des capillaires fœtaux où circule le sang fœtal (Georgiades, Ferguson-Smith, & Burton, 2002).

Chez l'homme la durée d'une grossesse et d'environ 39 semaines divisées en trois périodes de trois mois chacune dénommées trimestres de grossesse. Le terme d'une grossesse est calculé soit en semaines d'aménorrhées (SA) correspondant au nombre de semaines écoulées depuis le premier jour des dernières règles, soit en semaines de grossesse correspondant au nombre de semaines après la fécondation.

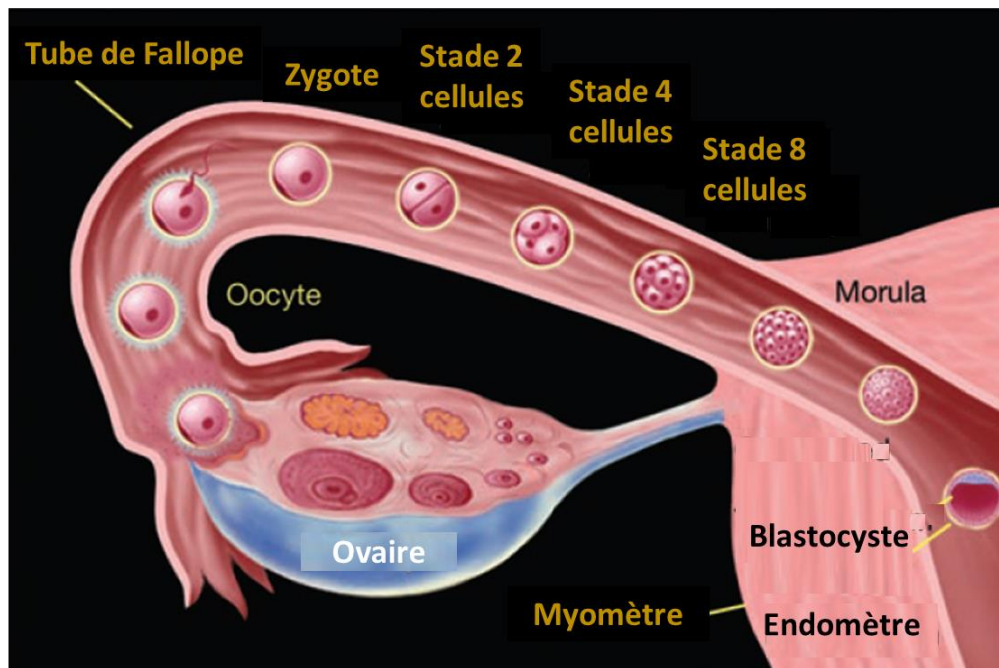


Figure 2. De la fécondation au stade morula. Les premières étapes du développement embryonnaire : de la fécondation à la formation du blastocyste. S.S. Gambhir and J. Strommer, Stanford University (Stanford, California, USA).

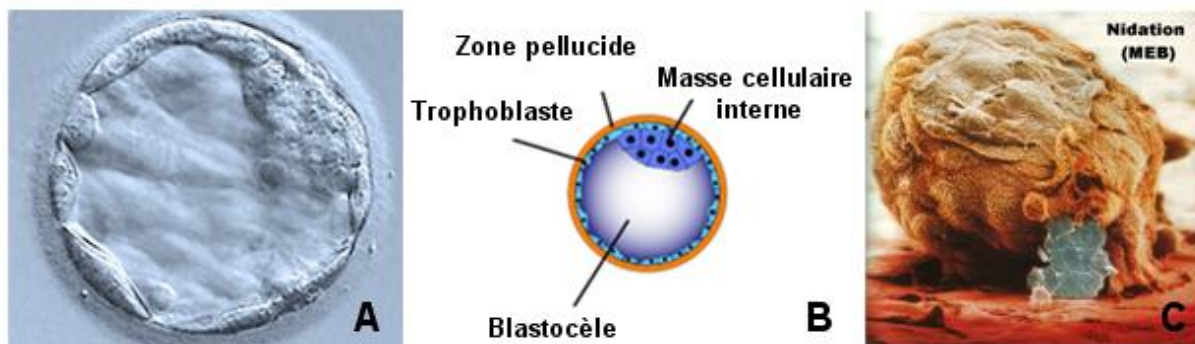


Figure3. Le blastocyste. Les cellules du trophoctoderme sont à l'origine d'annexes embryonnaires. Les cellules souches embryonnaires sont des cellules souches pluripotentes issues d'un embryon au stade de blastocyste.

A- Image de © Institute of Human Genetics/Newcastle University.

B- Schéma adapté de <http://commons.wikimedia.org/wiki/Accueil>.

C- Nidation du blastocyste. Image de <http://imagesbiogeolx.free.fr/reproduction/thumb.html>

1.1 Mise en place de la placentation humaine

1.1.1 Phase préimplantatoire

Dans les 24 heures après l'ovulation, la fécondation de l'ovocyte se produit dans la trompe de Fallope (figure 2). Les premières étapes du développement du zygote vers une morula à 16 blastomères s'effectuent lors de son passage dans la trompe de Fallope. A ce stade le zygote est enfermé dans une couche de revêtement non-adhésive appelée « Zone pellucide » (figure 3). La morula rentre dans la cavité utérine environ 2 à 3 jours après la fécondation. Les divisions cellulaires mènent à la transformation de la morula, par un phénomène de compaction, en un blastocyste. Ainsi une phase de différenciation cellulaire commence, le trophectoderme issu des cellules de la surface externe du blastocyste se différencie en trophoblastes. Ces cellules donneront par la suite les structures extra-embryonnaires, dont le placenta. Les cellules de la masse interne du blastocyste donneront le bouton embryonnaire à l'origine de l'embryon. A partir de ce stade, le blastocyste perd sa zone pellucide et les trophoblastes se trouvent en contact direct avec l'endomètre de l'utérus.

1.1.2 Phase implantatoire

La phase implantatoire implique une série d'événements incluant: l'apposition, l'adhérence et l'invasion du blastocyste. Chez les humains (et d'autres primates et rongeurs) l'embryon devient complètement intégré dans l'endomètre et l'implantation est appelée interstitielle.

1.1.3 Stade pré lacunaire

L'adhérence initiale du blastocyste à la paroi utérine est appelée apposition. Ce phénomène se déroule au 6^{ème} jour après la fécondation. L'apposition est due à l'entrecroisement des microvillosités qui se trouvent à la surface apicale du trophectoderme et des micro-protusions de la surface apicale de l'épithélium utérin, connu sous le nom de pinopodes (figure 4). Au niveau de la zone de contact, deux assises vont se différencier : une assise cellulaire interne issue du trophectoderme constituée de cytotrophoblastes, et une assise cellulaire externe multi-nucléée qui va constituer le syncytiotrophoblaste (ST) (figure 5). Le syncytiotrophoblaste est l'unité endocrine du placenta capable de sécréter plusieurs hormones de grossesse notamment l'hCG (*human Chorionic Gonadotropin*). Hautement invasif à ce stade, le blastocyste envahit l'endomètre et pénètre progressivement dans l'épithélium utérin. Une brèche se forme, facilitant ainsi la nidation du blastocyste au sein de la muqueuse utérine (Aplin, 1991).

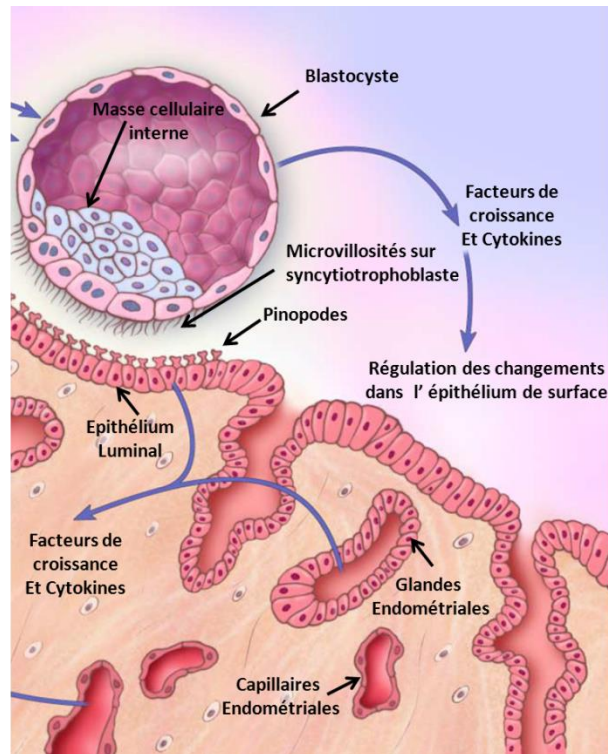


Figure 4. Apposition et Adhérence du blastocyste. Le schéma montre un blastocyste au stade préimplantatoire (environ six à sept jours après la fécondation) et les processus nécessaires à la réceptivité de l'utérus et l'apposition et l'adhérence du blastocyste (Adaptée de *Norwitz et al 2001*).

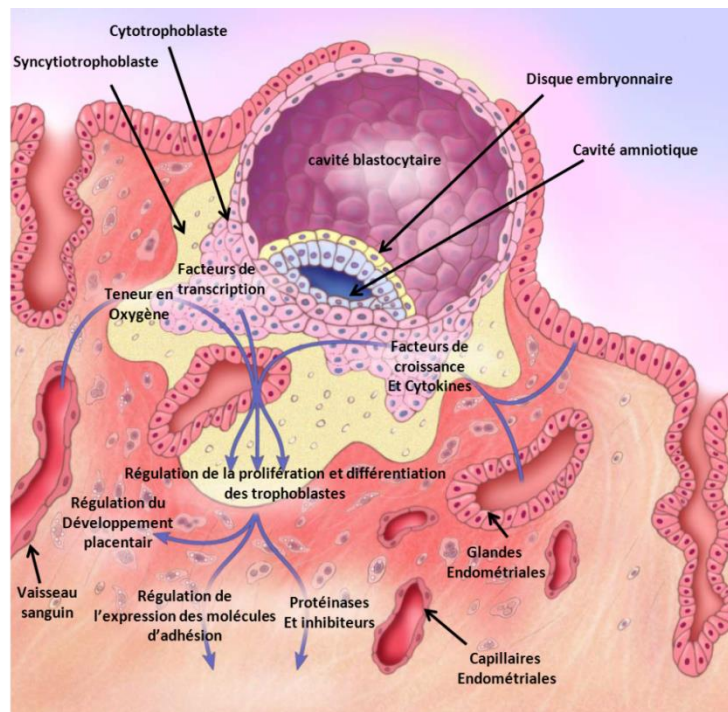


Figure 5. Implantation du blastocyste. Le schéma montre l'invasion d'un blastocyste (environ 9 à 10 jours après la conception) et les mécanismes entrepris lors de l'invasion trophoblastique. (Adaptée de *Norwitz et al 2001*).

1.1.4 Stade lacunaire

Ce stade est atteint entre le 8^{ème} et 9^{ème} jour après la fécondation. Des lacunes apparaissent dans le tissu syncytiotrophoblastique qui continue à se développer. Ces lacunes grandissent, se multiplient et finissent par fusionner et communiquer entre elles. Le réseau ainsi formé est limité par du syncytiotrophoblaste. Les lacunes formées constitueront la chambre intervillieuse dans laquelle circulera du sang maternel (figure 6).

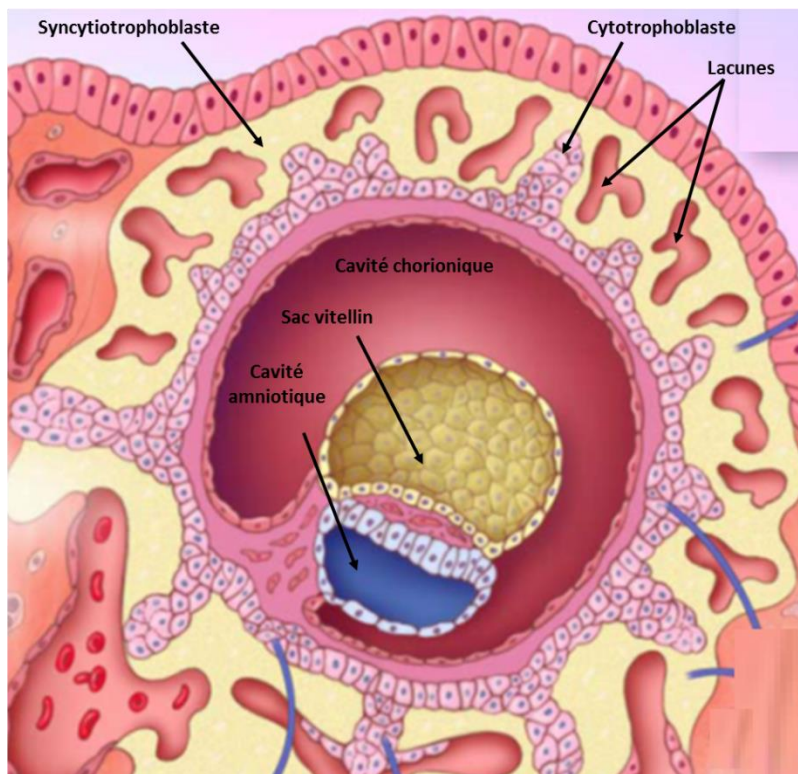


Figure 6. Stade précoce de la grossesse. Le schéma montre un embryon implanté (environ 14 jours après la conception) (Adaptée de Norwitz *et al* 2001).

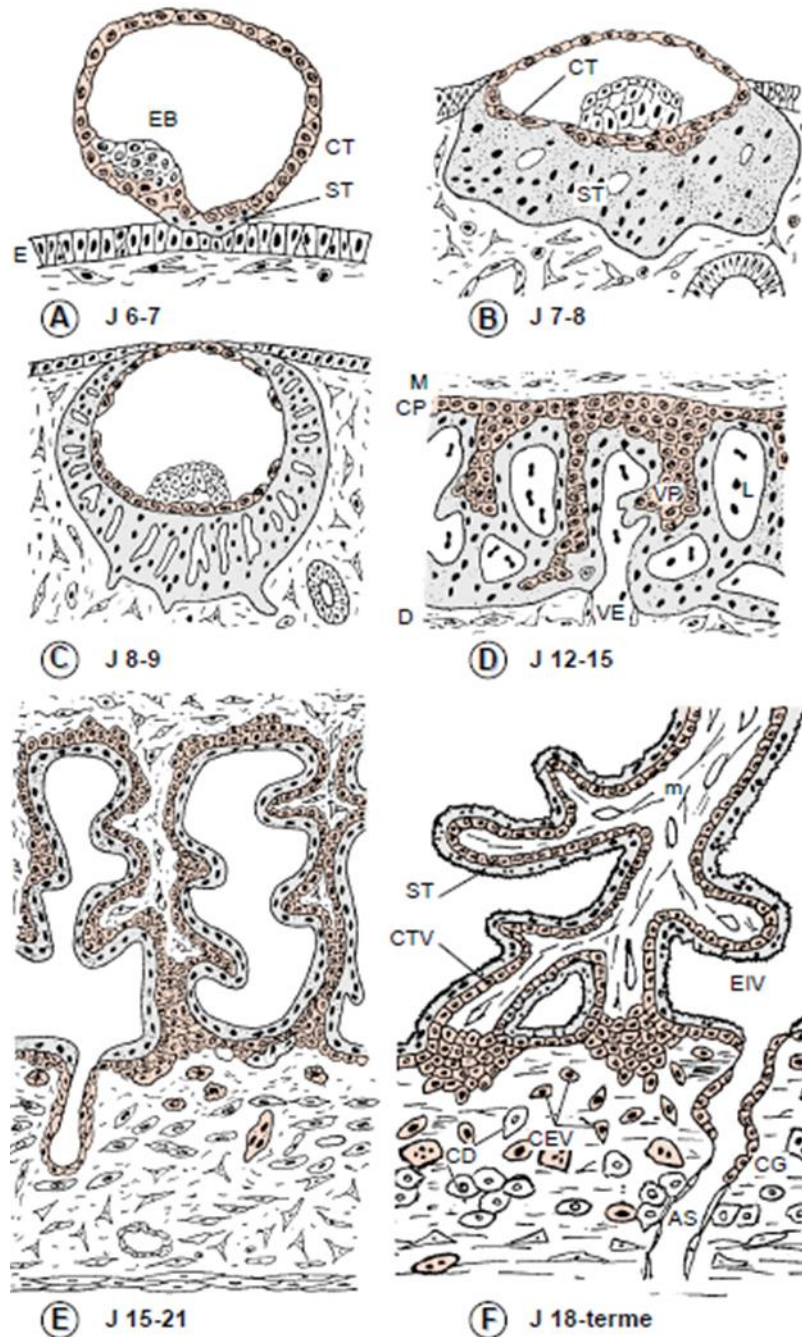


Figure 7. Représentation schématique des principales étapes du développement placentaire humain (d'après Benirschke et Kaufmann, 2000). **A** et **B**. Stade prélacunaire. **C**. Stade lacunaire. **D**. Stade villositaire et villosités primaires. **E**. Stade villositaire et villosités secondaires. **F**. Stade villositaire et villosités tertiaires.

CT : cytotrophoblaste ; D : décidue ; E : épithélium endométrial ; EB : bouton embryonnaire ; EM : mésoderme embryonnaire ; EV : vaisseau endométrial ; G : cellules géantes ; J : zone jonctionnelle ; L : lacunes de sang maternel ; PB : lit placentaire ; RF et NF : fibrinoïde ; ST : syncytiotrophoblaste ; T : villosité primaire ; TS : coque cytotrophoblastique ; X : trophoblaste extravilloux.

1.1.5 Stade villex

Ce stade est caractérisé par l'apparition de villosités. Leur formation est progressive et s'étend sur plusieurs jours. Ce processus se met en place du 13^{ème} jour post-fécondation et se poursuit jusqu'à l'accouchement. On distingue deux périodes. La première s'étendant du 13^{ème} jour post-fécondation à la fin du quatrième mois de grossesse ; elle est caractérisée par la formation de villosités chorales. C'est la période d'élaboration placentaire. La seconde est appelée période stationnaire, elle s'étend du cinquième mois jusqu'au terme (Mihi, Susman, Rus Ciuca, Mihi, & Costin, 2009). Le placenta est alors entièrement formé, mais continue à se développer par rallongement du système vasculaire (Figure 7 et 8).

1.2 Mise en place de la villosité placentaire

Le placenta humain est constitué d'une partie fœtale représentée par le chorion et d'une partie maternelle représentée par la décidue. L'interface fœto-maternelle se constitue graduellement au cours du premier trimestre de la grossesse et est régit par plusieurs processus finement contrôlé dans le temps et dans l'espace (Demir, Kaufmann, Castellucci, Erben, & Kotowski, 1989). Le premier contact des trophoblastes avec la vascularisation maternelle est à environ 9 jours après la fécondation, lorsque les syncytiotrophoblastes envahissant développent des lacunes dans lesquelles se déversera le sang maternel. Suite à cette étape, les cytotrophoblastes prolifèrent rapidement et s'insinuent dans les travées de syncytium formant ainsi des excroissances qui envahissent la paroi utérine. Les villosités baignent dans le sang maternel et sont appelées à ce stade des villosités primaires (figure 7 D). A la fin de la deuxième semaine les villosités primaires se remplissent de mésenchyme embryonnaire provenant de la plaque chorale basale. A ce stade elles sont appelées des villosités secondaires (figure 7 E). Enfin, à la troisième semaine après la fécondation, le système circulatoire fœtal commence à se former. Les néo-vaisseaux sanguins embryonnaires apparaissent dans les villosités ; ces dernières sont alors dénommées, villosités tertiaires (Demir et al., 1989) (figure 7 F). À partir de ce stade, les principaux constituants de la mise en place de la circulation fœto-maternelle sont en place. Dans sa forme finale, le placenta est constitué de tiges villositaires qui se prolongent à partir du tissu chorale (figure 9 et 10). Ces villosités sont soit flottantes dans l'espace intervilloux comme les villosités terminales (figure 10 et 11), soit ancrées dans l'endomètre maternel constituant les villosités crampons. Après cette étape de mise en place de la villosité chorale, deux voies de différenciation du cytotrophoblaste se distinguent, d'une part celle de la différenciation du CT vers le ST

endocrine et d'autre part celle de la différenciation vers le cytotrophoblaste extravilloux (CTEV) invasif (Cross, Werb, & Fisher, 1994).

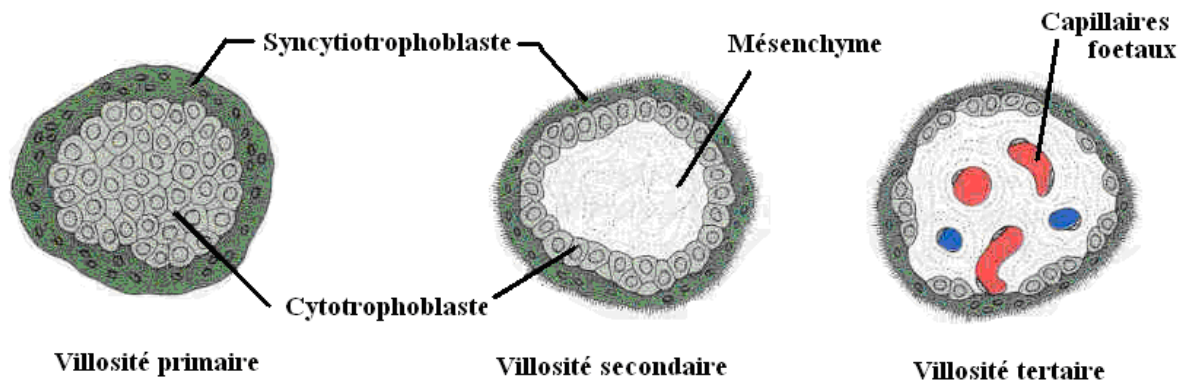


Figure 8. Formation des villosités chorales. Schéma adapté de <http://www.md.ucl.ac.be/didac/anat110/Chapitre1/placenta1.png>

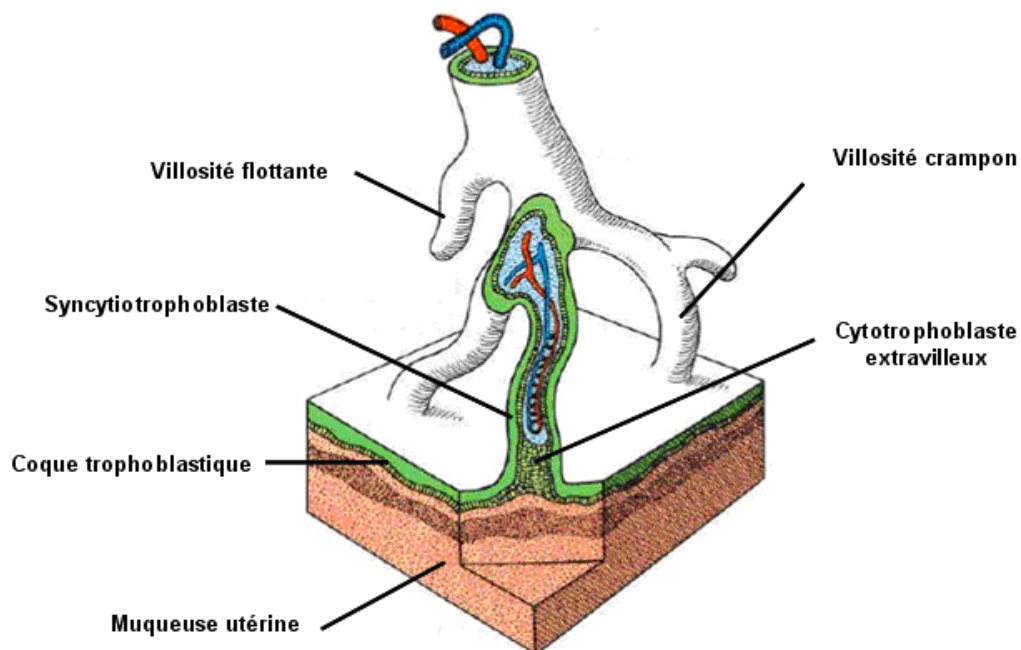


Figure 9. Représentation schématique de la villosité chorale. Schéma adapté de <http://homepage.mac.com/danielbalas/EMBRYO/embdes/embdes22.jpg>

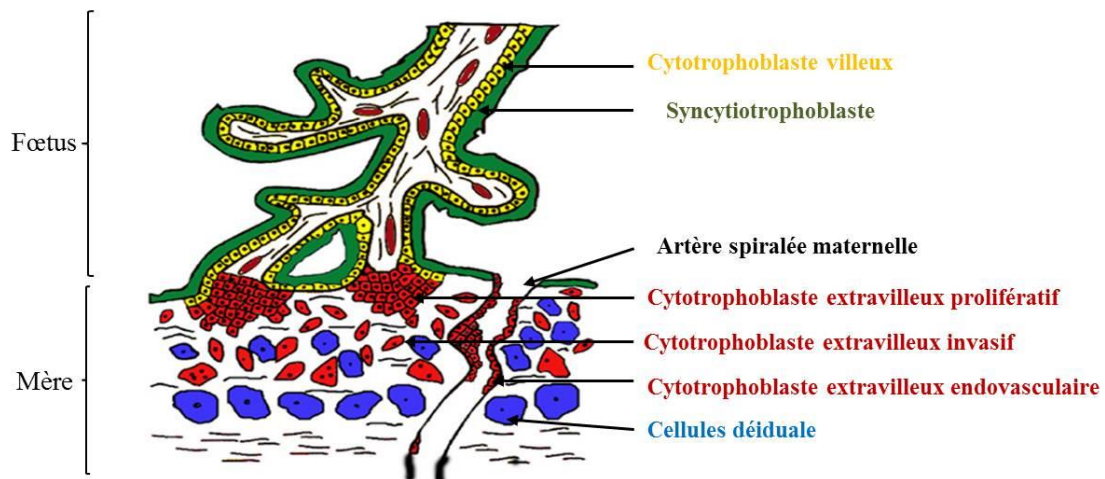


Figure 10. La villosité chorale et les cytotrophoblastes extravilloux
(Schéma adapté de Fournier et al. 2007)

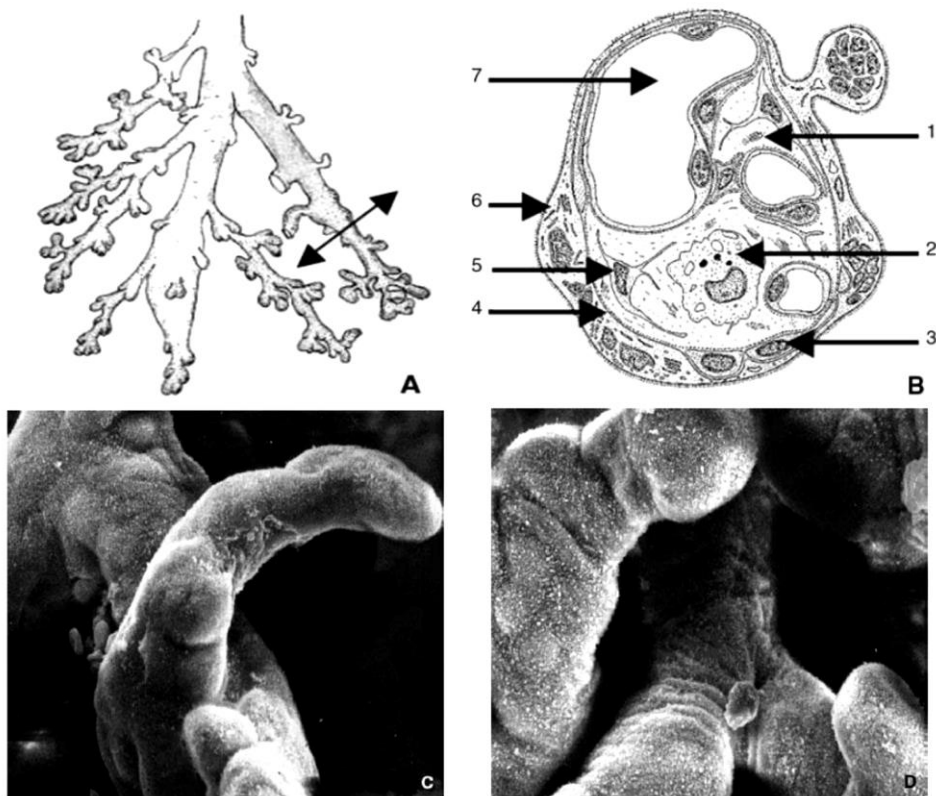


Figure 11. Structure des villosités flottantes

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

1.2.1 Cytotrophoblaste villex

La villosité chorale est formée d'un axe mésenchymateux contenant les vaisseaux fœtaux. Elle est recouverte d'une couche interne de cellules épithéliales mono-nucléées, appelées les cytotrophoblastes villex (CTV), qui reposent sur une membrane basale. Les cytotrophoblastes peuvent fusionner pour générer le syncytiotrophoblaste (ST) formé des cellules multi-nucléées. Le syncytiotrophoblaste constitue la couche cellulaire externe de la villosité ; il est en contact direct avec le sang maternel. La localisation du syncytiotrophoblaste au contact du sang maternel lui confère des caractéristiques de cellules endothéliales exprimant certains facteurs régulant l'hémostase dans la chambre intervillueuse (Jones & Fox, 1991). Le syncytiotrophoblaste assure plusieurs fonctions incluant des fonctions d'échange, de sécrétion, endocrines et d'hémostase. Le syncytiotrophoblaste constitue aussi le compartiment endocrine du placenta, capable de sécréter des hormones stéroïdes (progestérone, estrogènes), des hormones polypeptidiques comme l'hCG; l'hPL (*human Placental Lactogen*); la PGH (*Pituitary Growth Hormone*) et un grand nombre de facteurs de croissance, cytokines, et neuropeptides impliqués dans la croissance foetoplacentaire. Tout le long de la grossesse, le ST est renouvelé de manière continue par la fusion des CTV sous-jacents.

1.2.2 Cytotrophoblaste extravilloux

Le cytotrophoblaste extravilloux se trouve au niveau des colonnes des villosités crampons. Il est issu du cytotrophoblaste qui suit une voie invasive et se différencie en cytotrophoblaste extravilloux (CTEV). Les CTEV sont indispensables au processus implantatoire et dans le remodelage des artères spiralées pendant la grossesse. Dans un premier temps ces cellules vont proliférer dans la région proximale de la colonne villositaire, avant de migrer et d'envahir les parois des artères utérines et la décidue maternelle jusqu'au tiers supérieur du myomètre. A ce stade, les CTEV perdent leurs caractéristiques de cellules épithéliales, polarisées et se transforment en cellules prolifératives non-polarisées. On distingue deux populations de CTEV : *i*) les cytotrophoblastes extravilloux endovasculaires qui migrent en suivant la lumière vasculaire et remplacent progressivement les cellules endothéliales. *ii*) et les cytotrophoblastes extravilloux interstitiels qui vont envahir la muqueuse utérine et éroder les parois des artères spiralées (Jones & Fox, 1991). A la fin de la migration interstitielle, les cytotrophoblastes extravilloux se différencient en cellules géantes multi-nucléées (Jones & Fox, 1991).

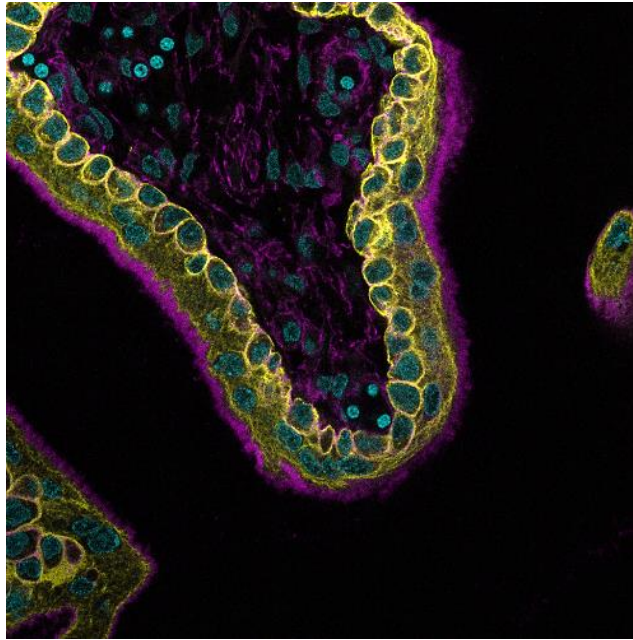


Figure 12. La villosité chorale flottante.

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

1.3 Le placenta murin

La souris représente le modèle le plus commun pour l'étude des mécanismes de la grossesse *in vivo*. Comme chez l'humain, le placenta de souris est un placenta hémochorial, avec des fonctions physiologiques similaires à celles observées dans le placenta humain. Aussi, la placentation chez la souris et l'établissement de la circulation fœto-maternelle seraient régis par les mêmes mécanismes que ceux décrits pour la placentation humaine, impliquant une invasion trophoblastique graduelle débutant à 10.5 jour post coitus (JPC), équivalent à la fin du premier trimestre de la grossesse. Par ailleurs, la souris présente plusieurs avantages comme la possibilité du suivi de la gestation jusqu'au terme, l'étude des différentes étapes de la placentation et l'exploitation de matériels biologiques importants, du fait la taille des portées (minimum 7 placentas par souris gestante).

1.3.1 Comparaison entre placentas humain et murin

Plusieurs similitudes existent entre la placentation murine et humaine. Chez les deux espèces la placentation se déroule dans un environnement hypoxique aux stades précoces de la gestation. La disparition des bouchons trophoblastiques et le remodelage des artères spiralées utérines se font au même période du développement placentaire, 10,5 jpc Pour la souris et 8-10^{ème} SA pour la femme.

Chez la souris on retrouve aussi les cellules trophoblastiques invasives représentées par les cellules géantes et les cellules à glycogène qui envahissent la *decidua basalis*. Néanmoins, Il est à noter que l'invasion déciduale chez la souris est moins profonde comparée à celle observée chez la femme et serait limitée dans l'espace. Cette invasion est maximale au niveau de la zone jonctionnelle ou spongiotrophoblastique et n'arrive jamais dans la zone myométriale. Les cellules trophoblastiques géantes chez la souris seraient l'équivalent des cytotrophoblastes extravilleux invasifs observés lors de la seconde phase d'invasion interstitielle et endovasculaire, entre la 8^{ème} et la 22^{ème} SA chez la femme (Cross, Nakano, Natale, Simmons, & Watson, 2006; Rossant & Cross, 2001).

Par ailleurs, les deux espèces présentent de fortes similitudes au niveau des zones d'échanges fœto-maternelles. Chez la femme, la zone est de type hémomonochoriale et les échanges s'effectuent au niveau des villosités chorioniques flottantes. Chez la souris cette zone est de type hémotrichoriale et les échanges sont réalisés dans le labyrinthe (Figure 13).

Sur le plan fonctionnel, les deux zones sont analogues. Les villosités présentent en leurs centres des vaisseaux fœtaux et sont recouvertes de ST multinuclés (deux couches de ST directement apposées sur les cellules endothéliales des vaisseaux fœtaux chez les rongeurs) en

contact direct avec le sang maternel (Cross et al., 2006). Cependant, des différences subsistent sur le plan architectural. Les zones d'échanges chez l'humain s'apparentent à une arborisation tandis que chez la souris elles ont une structure labyrinthique (Figure 13). Finalement les deux placentas sont de type chorio-allantoïdien (Downs & Bertler, 2000) avec une couche externe des villosités chorioniques composée de trophoblastes, tandis que le centre de ces villosités est formé de mésenchyme allantoïdien ainsi que de vaisseaux en continuité avec ceux du cordon ombilical.

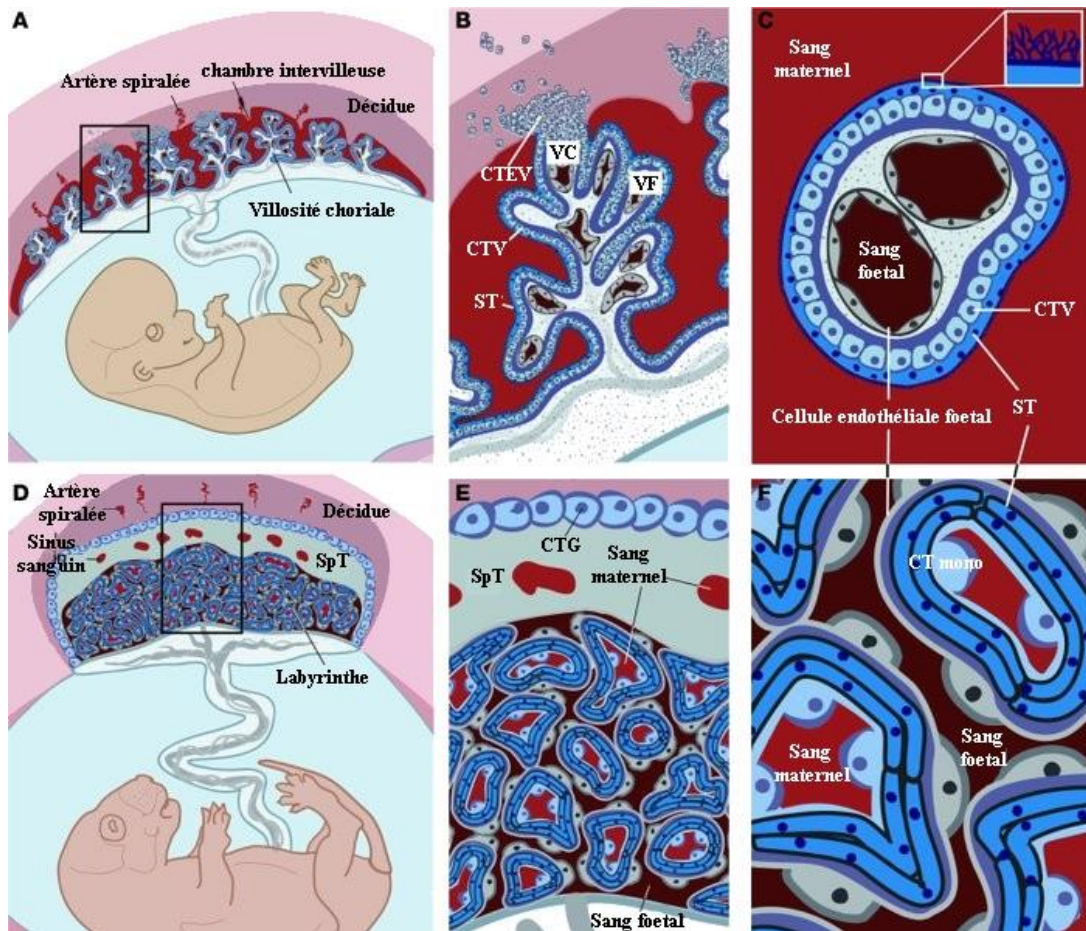


Figure 13. Comparaison anatomique des placentas humain et murin. Adaptée de Maltepe et al. 2010. **A-C.** Placenta humain. **B.** Villosité choriale. **C.** Coupe d'une villosité flottante. **D-F.** Placenta murin. **E.** Zone labyrinthique. **F.** Grossissement du labyrinthe. CT mono : Cytotrophoblaste mononucléé ; CTEV : cytotrophoblaste extravilleux ; CTG : Cellule Trophoblastique Géante ; CTV : cytotrophoblaste vilieux ; SpT : Cellules progénitrices des CTG ; ST : Syncytiotrophoblaste ; VC : villosité crampon ; VF : Villosité flottante.

1.4 Remodelage vasculaire

Le remodelage des artères spiralées commence dès les premières semaines de la grossesse, il permet la transformation des artères spiralées d'un état d'artères de faible débit, et de haute-résistance à un état d'artères de haut débit, et de faible-résistance (Brosens, Robertson, & Dixon, 1970). Le remodelage des artères spiralées par invasion des cytotrophoblastes extravilloux permet d'augmenter le débit sanguin vers le placenta avec une altération des propriétés des vaisseaux sanguins suite à un changement au niveau de leurs parois. Ce processus de remodelage est propre à la grossesse humaine. Une artère remodelée est le résultat d'une succession de processus biologiques qui se déroulent sur plusieurs semaines au cours de la grossesse. Ces processus nécessitent à la fois le recrutement des cellules immunitaires, de cellules vasculaires et de cytotrophoblastes extravilloux, principaux acteurs du remodelage vasculaire.

Les cytotrophoblastes extravilloux qui se trouvent au niveau des colonnes de la villosité crampon se différencient en cellules invasives tout en acquérant un phénotype de cellules mésenchymateuses. Ces cellules migrent et envahissent l'endomètre maternel en interagissant avec les cellules déciduales (Pijnenborg, Robertson, Brosens, & Dixon, 1981) comme les macrophages et les cellules NK (*natural killer*) (King, Wooding, Gardner, & Loke, 1993). L'invasion de la décidue maternelle par des cellules d'origine fœtale est facilitée par l'expression par ces cellules d'antigènes de classe 1 (HLA-G) ainsi que par la sécrétion de nombreuses cytokines et de facteurs immuno-modulateurs (Le Bouteiller & Mallet, 1997; Murphy, Choi, & Holtz, 2004).

1.4.1 Formation et rôle des bouchons trophoblastiques dans le remodelage

Dès la 5^{ème} semaine de gestation, les cytotrophoblastes extravilloux s'intercalent entre la couche de syncytiotrophoblastes et la muqueuse utérine pour former une coque trophoblastique. Les cellules trophoblastiques formant cette coque vont proliférer dans la lumière des artères spiralées maternelles et former des bouchons trophoblastiques. Durant cette période développementale la chambre intervillieuse est dépourvue d'éléments sanguins (notamment les hématies). La disparition des bouchons trophoblastiques commence autour de la 9^{ème}– 10^{ème} SA. La disparition des bouchons se fait de façon à permettre un passage de la pression en oxygène de 20 mmHg à 55 mmHg à 12 SA, correspondant à une ppO_2 de 2-3% à 7,2%, respectivement.

Il a été proposé par le groupe de Jauniaux (Jauniaux et al., 2000) que la villosité choriale est dépourvue d'activité enzymatique antioxydante aux âges gestationnels précoces et que la présence de bouchons trophoblastiques assureraient un environnement hypoxique nécessaire à la prolifération trophoblastique et aux processus angiogéniques régissant le développement placentaire (Figure 14). Grace aux bouchons trophoblastiques, la pression en oxygène est maintenue à 20 mmHg à 8 SA, correspondant à une ppO_2 de 2-3% jusqu'à la disparition de ces bouchons à la fin du premier trimestre de la grossesse.

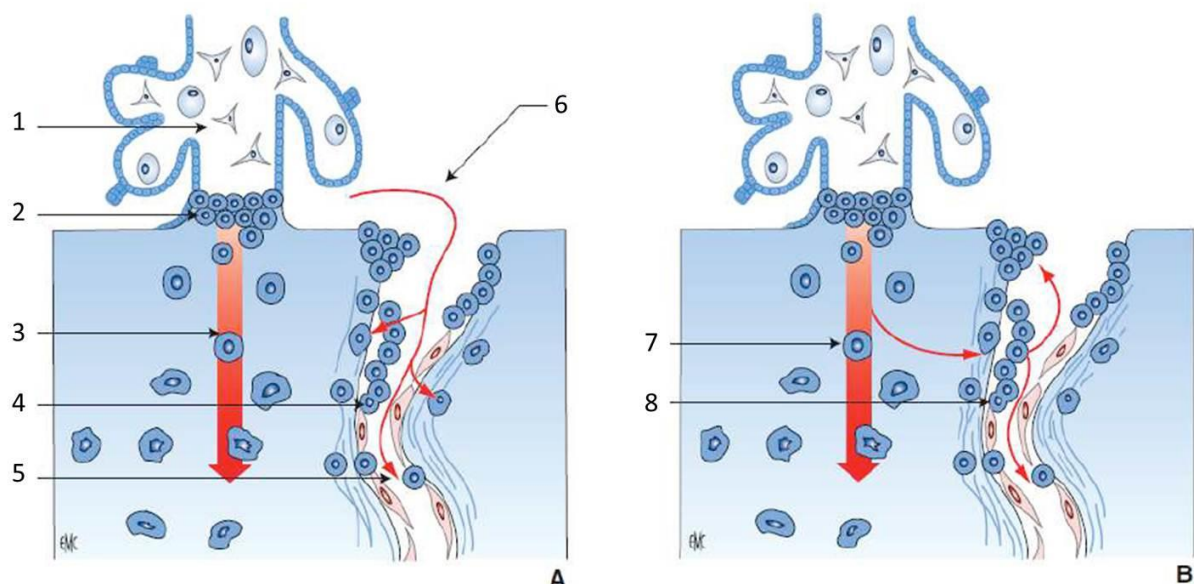


Figure 14. Trajets hypothétiques des trophoblastes extravilleux endovasculaires

(D'après Kaufmann et al. 2003)

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

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

1.4.2 Remodelage indépendant de l'invasion trophoblastique

Les artères spiralées peuvent aussi subir dès la 5^{ème} SA des modifications morphologiques indépendantes de l'invasion trophoblastique. Ces modifications sont caractérisées par une désorganisation et une hypertrophie des cellules musculaires lisses formant ces artères et une vacuolisation de leur cellules endothéliales (Graves, 1998; Harris, 2010; Kaufmann, Black, & Huppertz, 2003). Ces modifications ont lieu au niveau de site d'implantation, mais peuvent aussi survenir dans des zones déciduales, loin du site d'implantation. Ce processus serait dû à une activation du système rénine-angiotensine décidual ou à des facteurs hormonaux d'origine maternelle (Graves, 1998).

1.4.3 Mécanisme du remodelage des artères spiralées.

Avant le début de l'invasion propre des artères spiralées utérines par les cytotrophoblastes extravilloux, il a été montré que ces cellules sécrètent des facteurs qui amorcent la dilatation des artères. Le groupe de Kaufmann (Kaufmann et al., 2003) a rapporté un amincissement de la média de ces artères ainsi qu'un dépôt de fibrine dans leur lumière. Aussi, il a été rapporté que les cellules avoisinant les artères utérines synthétisent et sécrètent des vasodilatateurs comme l'oxyde nitrique (NO) et le monoxyde de carbone (CO). Les CTEV sécrèteraient aussi de multiples facteurs angiogéniques susceptibles d'être impliqués dans le remodelage vasculaire, comme le facteur de croissance vasculaire endothélial A (VEGF-A) (Carmeliet & Collen, 1999; Ferrara & Davis-Smyth, 1997).

En plus du processus de remodelage des artères spiralées basé sur la sécrétion de facteurs à distance, il a été démontré par le groupe de SJ. Fisher que les cytotrophoblastes extravilloux induisent via un contact direct avec les cellules endothéliales leur apoptose. Ce processus permet une substitution parfaite des cellules endothéliales par les cellules trophoblastiques dans l'artère spiralée.(Red-Horse et al., 2006). Ce phénomène induit alors une transformation de la tunique élastique artérielle en une paroi fibreuse ce qui diminue la résistance au flux sanguin maternel et permet un flux constant dans l'espace intervilleux (Harris & Aplin, 2007; Pijnenborg, Bland, Robertson, & Brosens, 1983).

Il est aujourd'hui bien établi que le remodelage vasculaire est un processus indispensable à l'établissement de la circulation fœto-maternelle et donc à la poursuite et au succès de la grossesse. Un remodelage superficiel ou excessif seraient étroitement associé au développement de pathologies de la grossesse.

Dans le cas d'une invasion trophoblastique superficielle, le placenta est maintenu dans un environnement hypoxique anormal, dû à une baisse de sa perfusion. Ce phénomène serait associé au développement de la plus grande pathologie de la grossesse, la pré-éclampsie (PE) (Kaufmann et al., 2003). A l'inverse une invasion excessive causerait une migration des cellules trophoblastiques au-delà de leur limite physiologique. Ce phénomène est observé dans les maladies gestationnelles trophoblastiques et en particulier dans le cancer placentaire le plus redoutable, ie : le choriocarcinome (Louwen, Muschol-Steinmetz, Reinhard, Reitter, & Yuan, 2012).

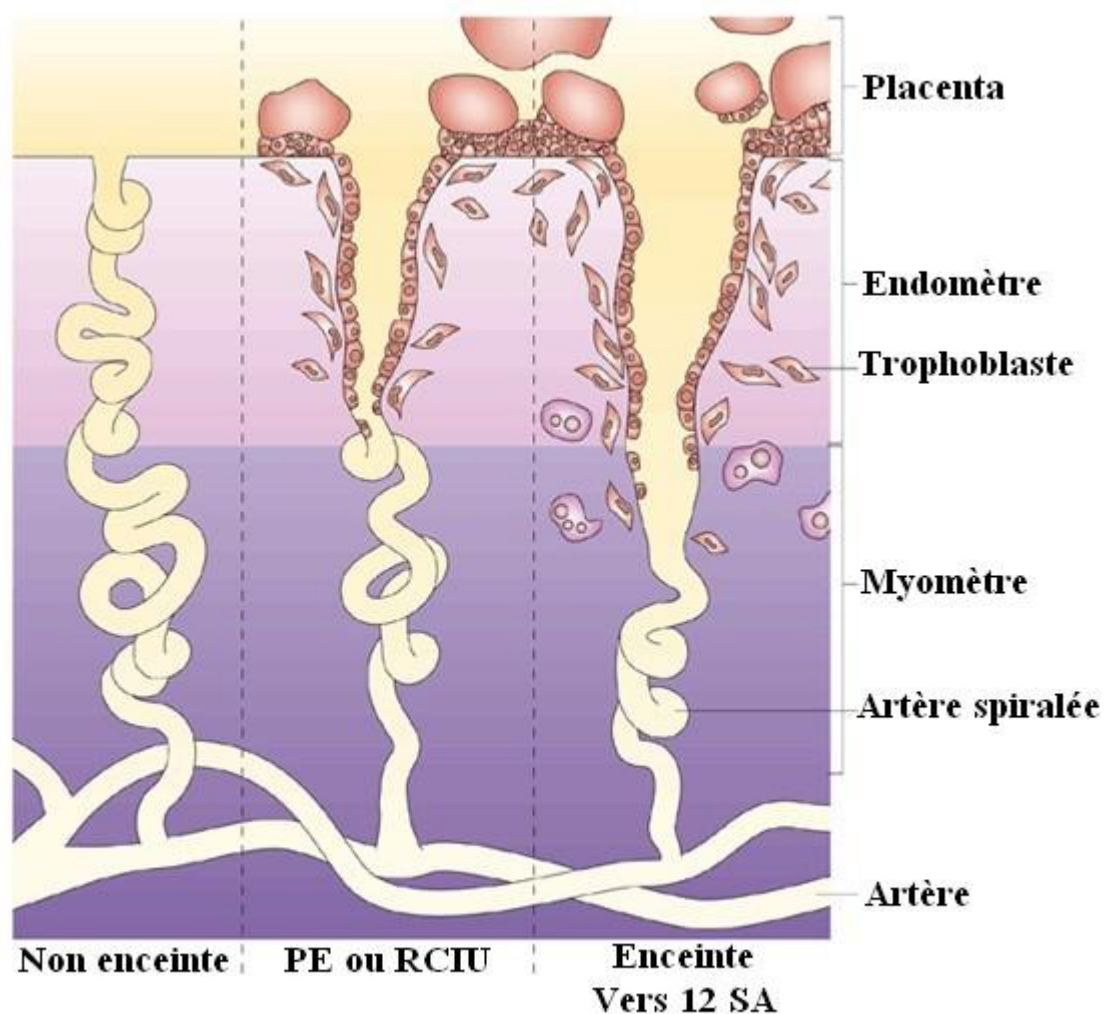


Figure 15. Remodelage des artères spiralées maternelles.

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

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

Pré-éclampsie

Grossesse normale

Développement tumoral

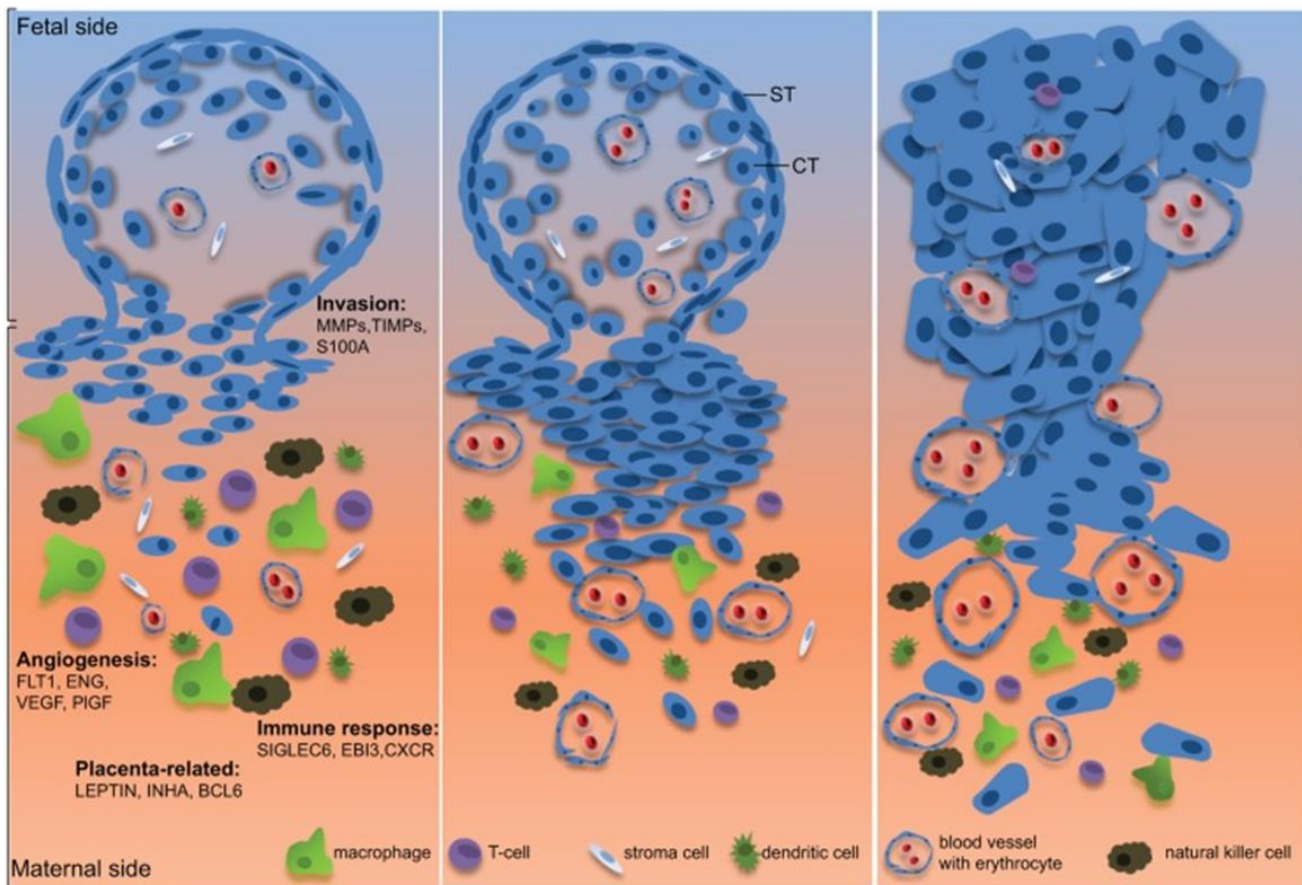


Figure 16. Schéma illustratif des caractéristiques communes partagées par une grossesse normale et le développement d'une tumeur. Alors que les trophoblastes extravilloux dans le placenta sont capables de migrer dans la décidue utérine pour établir la circulation fœto-maternelle nécessaire pour le développement du fœtus, les cellules tumorales malignes ont la capacité d'envahir les tissus voisins et former un microenvironnement propice à la progression tumorale. ST : Syncytiotrophoblaste; CT : Cytotrophoblaste. La conception de la figure est inspirée par Holtan et al 2012.

1.5 Cancer et grossesse: Similitudes dans la prolifération et l'invasion

Bien que le placenta soit un tissu normal, de nombreuses similitudes existent entre l'implantation embryonnaire et l'invasion des cellules cancéreuses. L'index prolifératif élevé, l'absence d'inhibition cellulaire par contact, les propriétés migratoires et invasives ainsi que la capacité des trophoblastes à échapper à la réponse immunitaire, ont conduit plusieurs chercheurs à qualifier le trophoblaste comme un tissu «pseudo-malin» formant des métastases physiologiques (Genbacev, Zhou, Ludlow, & Fisher, 1997; Mullen, 1998; Redman, 1997; Strickland & Richards, 1992).

1.5.1 Prolifération

Comme les cellules cancéreuses, les cellules trophoblastiques ont des capacités prolifératives régies par des voies de signalisation particulières. Une des principales voies communes aux cellules trophoblastiques et aux cellules cancéreuses est la voie de l'IGF (*Insulin Growth Factor*). En se liant à son récepteur IGF1R dans les cellules trophoblastiques, l'IGF stimule leur prolifération par la voie MAPK et induit leur survie par activation de la voie PI3K (Forbes, Westwood, Baker, & Aplin, 2008). Dans les cellules cancéreuses, la voie IGF1R est non seulement mitogénique et anti-apoptotique, mais serait aussi impliquée dans la protection des cellules cancéreuses contre les effets néfastes de la chimiothérapie et de la radiation (Tao, Pinzi, Bourhis, & Deutsch, 2007).

1.5.2 Invasion

Au cours de la grossesse, et pendant la croissance tumorale, l'apport du sang et des nutriments est une condition nécessaire à la survie. Ainsi l'invasion des tissus normaux voisins par les trophoblastes ou par les cellules cancéreuses est un processus indispensable. Alors que les cellules cancéreuses se propagent et métastasent dans plusieurs sites distants, les trophoblastes suivent un modèle organisé avec une prolifération et l'invasion contrôlées dans le temps et dans l'espace, sans métastase.(Marco, Cannas, Montemurro, Hu, & Cheng, 2009).

L'acquisition d'un phénotype invasif est associée à des changements dans les molécules d'adhésion cellulaire, la sécrétion de protéases, et à l'effet des facteurs de croissance. Un exemple d'un mécanisme commun utilisé par les cellules cancéreuses (Yang & Weinberg, 2008) et les trophoblastes (Vicovac & Aplin, 1996) est celui assuré par l'expression des intégrines et la perte d'expression de la E-cadhérine, induisant une perte de polarité et une augmentation de la motilité pour les deux types cellulaires (Blehschmidt et al., 2007; Floridon et al., 2000). Par ailleurs, les cellules trophoblastiques et cancéreuses sécrètent des protéases qui dégradent les protéines de la matrice extracellulaire et facilitent l'invasion des

tissus environnants. Les cellules TEV exprimeraient un niveau élevé de l'HSP27. Le niveau Basal de l'HSP27 est aussi élevé dans les cellules cancéreuses. Il serait associé à la protection de ces cellules des stimuli apoptotiques (Jaattela, 1999), et à l'augmentation de leur potentiel métastatique (Ciocca & Calderwood, 2005). Enfin, les facteurs de croissance tels que le facteur de croissance épidermique stimule la motilité des cellules TEV par phosphorylation des MAPK sur les deux sites p42 et p44- et des protéines PI3K-dépendantes comme l'AKT et p38 (LaMarca et al., 2008). Dans les cellules cancéreuses; ce facteur est associée à l'invasion des cellules tumorales à travers l'expression de MMPs (Binker, Binker-Cosen, Richards, Oliver, & Cosen-Binker, 2009).

Résumé Chapitre I

Le placenta est un organe temporaire essentiel à la grossesse. Il s'agit de l'organe le plus vascularisé du corps qui assure les échanges de gaz, des éléments nutritifs et assure l'élimination des déchets. Le placenta humain est classé comme un placenta hémochorial, car les villosités fœtales baignent dans des « lacs sanguins » de l'utérus. Les villosités placentaires sont formées de plusieurs types cellulaires, parmi ces types cellulaires : Les syncytiotrophoblastes considérés comme les unités sécrétrices, capables de libérer plusieurs hormones comme, l'hCG (*human Chorionic Gonadotropin*) et d'autres facteurs comme l'EG-VEGF; les cellules trophoblastiques extravillositaires (CETV) connues pour leur forte capacité proliférative et invasive. Au cours du premier trimestre de grossesse, les artères spiralées maternelles sont bouchées par les trophoblastes prolifératifs, laissant l'embryon et le placenta se développer dans un environnement hypoxique. A la fin du premier trimestre les CETV vont envahir et élargir les artères spiralées pour établir la circulation fœto-maternelle. Ce processus est contrôlé dans le temps et l'espace par différents facteurs. Les défauts d'invasion trophoblastiques sont à l'origine de différentes pathologies placentaires comme la pré-éclampsie, souvent associée à une invasion superficielle des artères maternelles. A l'inverse une invasion excessive et mal contrôlée est observée dans les cas de développement tumoral placentaire, dénommé choriocarcinome, pathologie faisant partie des **Maladies Trophoblastiques Gestationnelles**

Les Maladies Trophoblastiques Gestationnelles

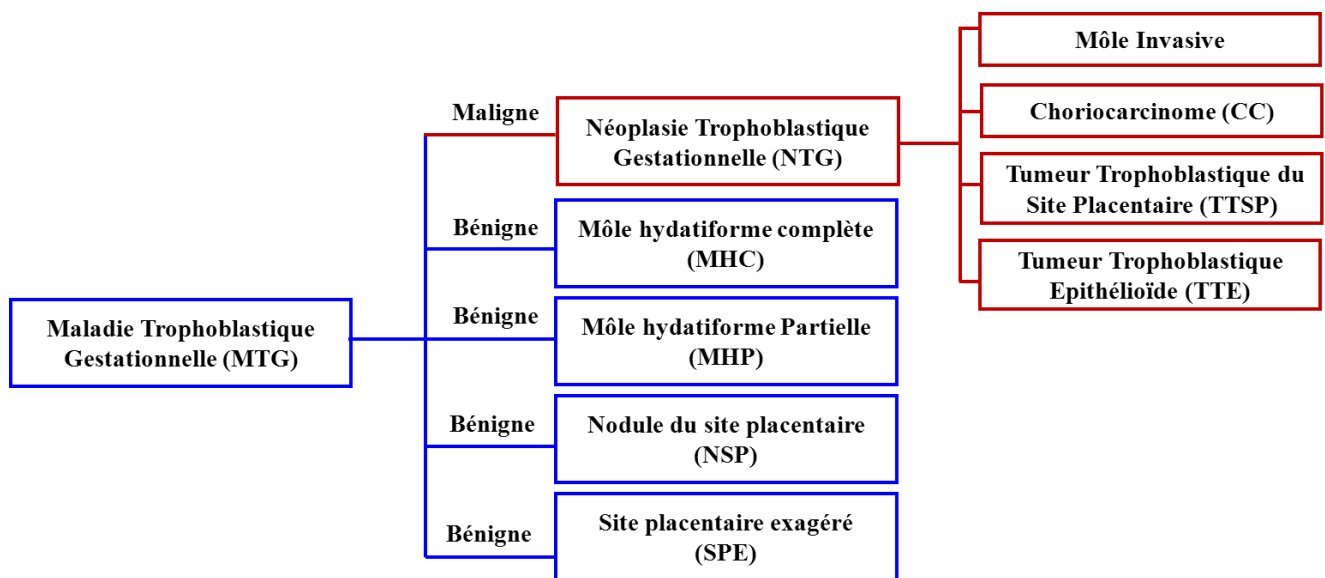


Figure 17. Classification des maladies trophoblastiques gestationnelles adaptée de Stevens et al.2015

2. Introduction

Quelques jours après la conception les cellules trophoblastiques normales issues des cellules périphériques du blastocyste envahissent l'endomètre de l'utérus pour former le placenta via des mécanismes bien contrôlés. Les maladies trophoblastiques gestationnelles (MTG) sont des complications rares de la grossesse au cours desquelles ces mécanismes sont dérégulés, résultant en le développement de différents types de tumeurs placentaires vascularisées et agressives avec plusieurs sites métastatiques, notamment le cerveau, le foie, le vagin et les poumons chez certaines patientes (Froeling & Seckl, 2014; Hancock, Nazir, & Everard, 2006; Lurain, 2010; H. Y. Ngan et al., 2015; Seckl, Sebire, & Berkowitz, 2010). Les MTG correspondent à une transformation kystique des villosités choriales, associée à une hyperprolifération des cellules trophoblastiques et une sécrétion excessive de l'hCG (Froeling & Seckl, 2014; Hancock et al., 2006; Lurain, 2010; H. Y. Ngan et al., 2015; Seckl et al., 2010). Ces maladies comportent un large spectre de pathologies trophoblastiques, allant des lésions bénignes précancéreuses, représentées par les mûles hydatiformes complètes (MHC), les mûles hydatiformes partielles (MHP), les Nodules du site placentaire (NSP), les Sites placentaires exagérés (SPE), aux tumeurs trophoblastiques gestationnelles (TTG), représentées par les mûles invasives, les choriocarcinomes (CC), les tumeurs trophoblastiques du site placentaire (TTSP) et les tumeurs trophoblastiques Epithélioïdes (TTE) (Froeling & Seckl, 2014; Hancock et al., 2006; Lurain, 2010; H. Y. Ngan et al., 2015; Seckl et al., 2010). Les tumeurs malignes sont aussi décrites comme "Néoplasies Trophoblastiques Gestationnelles" (NTG) (Froeling & Seckl, 2014; Hancock et al., 2006; Lurain, 2010; H. Y. Ngan et al., 2015; Seckl et al., 2010) (Figure 17).

2.1 Pathologie, Génétique et classification des MTG

Les MGT sont le résultat d'une grossesse humaine aberrante avec un caryotype anormal, principalement dû à une fécondation anormale de l'ovocyte.

2.1.1 Grossesses mûlares : Complètes et partielles

Dans 80% des cas, la fécondation d'un ovule vide par un spermatozoïde haploïde conduit à une MHC contenant un caryotype 46XX dupliqué et d'origine paternelle (Fisher, Lawler, Povey, & Bagshawe, 1988; Kajii & Ohama, 1977; Yamashita, Ishikawa, Shimizu, & Kuroda, 1981) (Figure 18 a). Les 20% des cas restant sont représentés par une fécondation dispermique d'un ovule vide présentant un caryotype 46XX ou 46XY (Pattillo, Sasaki, Katayama, Roesler, & Mattingly, 1981) (Figure 18b).

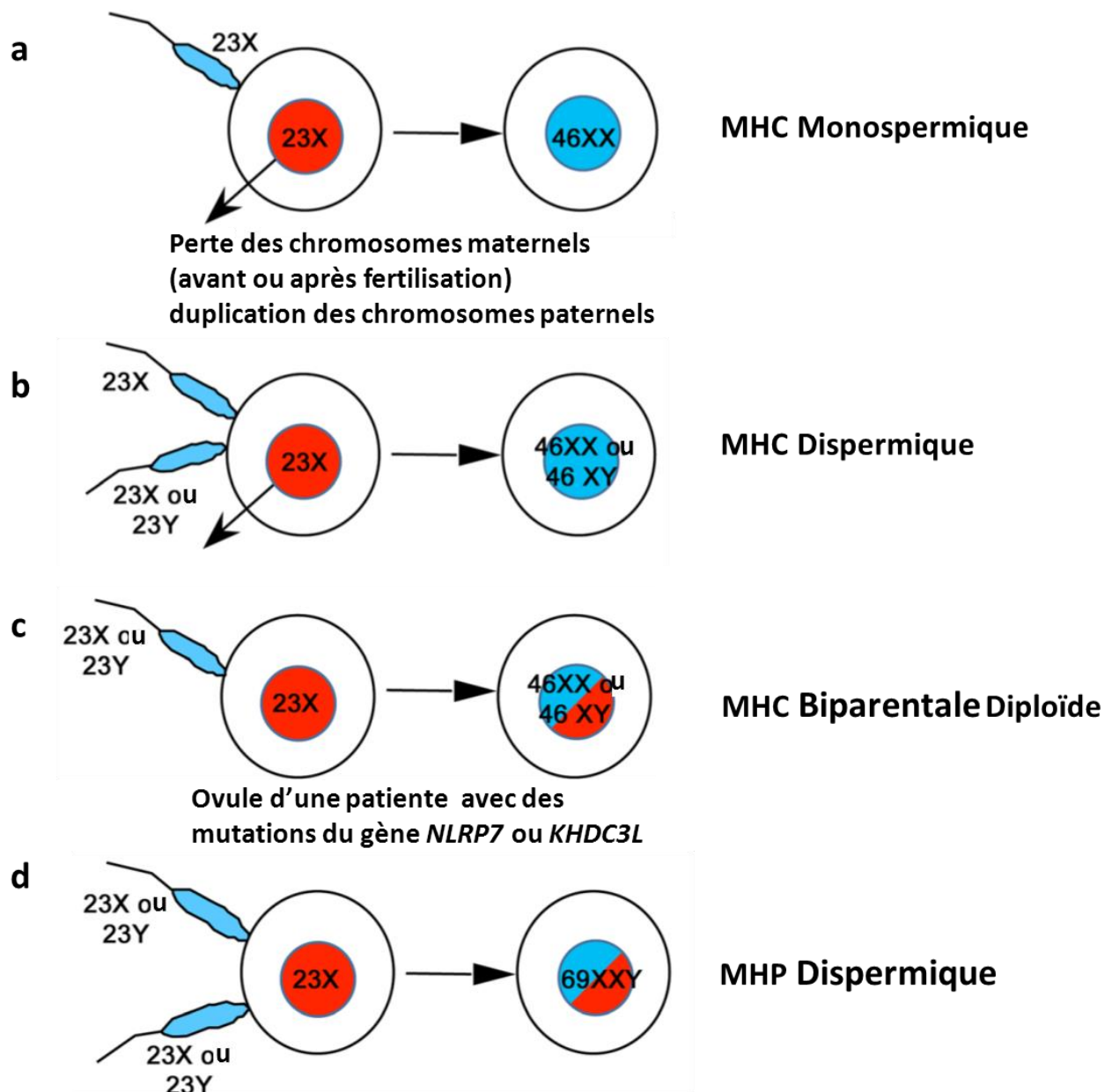


Figure 18. Origine cytogénétique d'une môle hydatiforme complète (MHC) et d'une môle hydatiforme partielle (MHP). Une MHC se développe après une fécondation monospermique (a) ou dispermique (b) d'un ovule, avec une perte des chromosomes maternels avant ou juste après la conception, résultant en un caryotype 46XX androgénique (monospermique; a) par duplication du génome paternel ou un caryotype 46XY (dispermique; b). Une MHC diploïde biparentale (c) se produit chez les femmes avec des MHC récurrentes qui présentent des mutations du gène *NLRP7* ou *KHDC3L*. Une MHP est le résultat d'une fécondation normale dispermique d'un ovule (d). Une MHP est généralement triploïde avec un caryotype 69XXX, 69XXY or 69YY.

La perte des chromosomes maternels peut se produire avant ou juste après la conception (Hancock et al., 2006). Bien que l'ADN nucléaire soit entièrement paternel dans les MHC, l'ADN mitochondrial est encore d'origine maternelle (Azuma et al., 1991). En outre, la MHC récurrente est liée à une maladie autosomique récessive avec un caryotype biparental (BiMHC). Cette môle est aussi appelée môle hydatiforme récurrente familiale (MHRF) ; elle résulte d'une fécondation normale de l'ovocyte par un spermatozoïde sans la perte du pronucléus femelle (Fisher, Hodges, & Newlands, 2004) (Figure 18c). La BiMHC est souvent associée à des mutations du gène *NLRP7* (*NATCH, LRR and PYD domains-containing protein 7*) (70%) (OMIM 609 661) et du gène *KHDC3L* (5%) (*KH domain containing 3 like, subcortical maternal complex member*) (OMIM 611 687) (Murdoch et al., 2006). Il est à ce jour bien établi que *NLRP7* joue un rôle important dans la régulation de l'empreinte maternelle dans les ovocytes (Fisher et al., 2002; Judson, Hayward, Sheridan, & Bonthron, 2002; Kinoshita, Wang, Hasegawa, Imamura, & Suda, 2005; Murdoch et al., 2006). Contrairement à une MHC, la MHP est observée suite à la fécondation d'un ovule par deux spermatozoïdes conduisant à un caryotype triploïde dans la plupart des cas (Lage et al., 1992; Lawler, Fisher, & Dent, 1991; Szulman & Surti, 1978) (Figure 18d). Bien que diverses caractéristiques morphologiques soient connues pour distinguer les MHC des MHP, elles sont très semblables aux premiers stades de la grossesse nécessitant un examen histopathologique très subtil (Seckl et al., 2013). Une MHC (Figure 19) présente une architecture pathogénomique décrite comme une structure botryoïde (en forme de grappes) qui serait induite par une hyperplasie anormale du trophoblaste, une hypercellularité du stroma, des débris karyorrhéctiques stromaux et des vaisseaux sanguins mal formés. Au contraire, une MHP (Figure 20) présente une dispersion anormale des villosités placentaires avec des formes irrégulières, des pseudoinclusions trophoblastiques, et une hyperplasie trophoblastique (Sebire, Fisher, & Rees, 2003; Sebire, Makrydimas, et al., 2003; Sebire & Seckl, 2008). D'autres grossesses, comme la trisomie, la monosomie, la triploïdie et les translocations d'origine maternelle, peuvent présenter des caractéristiques histologiques similaires à celles observées dans les MH. La distinction entre MHC, MHP et les grossesses non molaires serait basée sur l'immunomarquage de la protéine p57Kip2. Cette protéine exprimée exclusivement par les chromosomes maternels, l'immunomarquage est positif dans les MHP et les grossesses non molaires et il est négatif dans les MHC (S. Ngan & Seckl, 2007). Aussi, d'autres techniques peuvent être utilisées pour distinguer les MHC des MHP et grossesses non molaires comme celles de l'hybridation in situ, l'analyse de l'ADN par cytométrie de flux ou le

génotypage moléculaire (Fisher & Newlands, 1993; Makrydimas et al., 2002; Osada, Iitsuka, Matsui, & Sekiya, 1995).

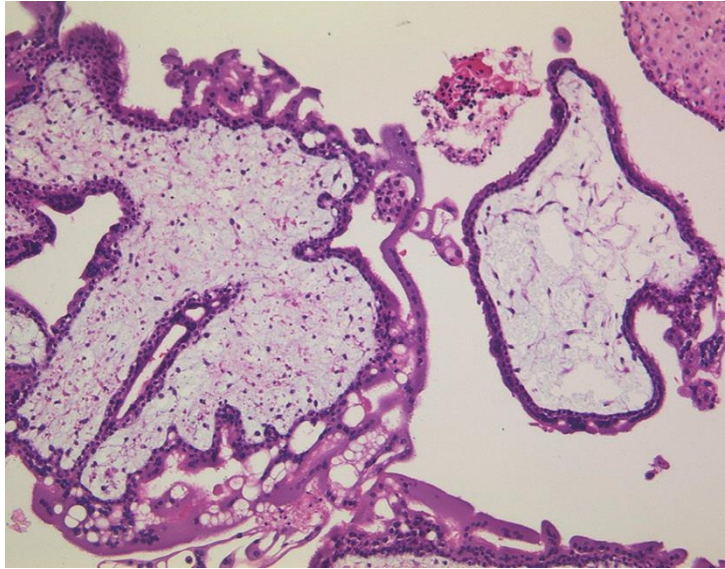


Figure 19. Môle hydatiforme complète, coloration hématoxyline-éosine, grossissement x 100 (Prof. Gabbert, Département de Pathologie, Heinrich-Heine-Universität de Düsseldorf).

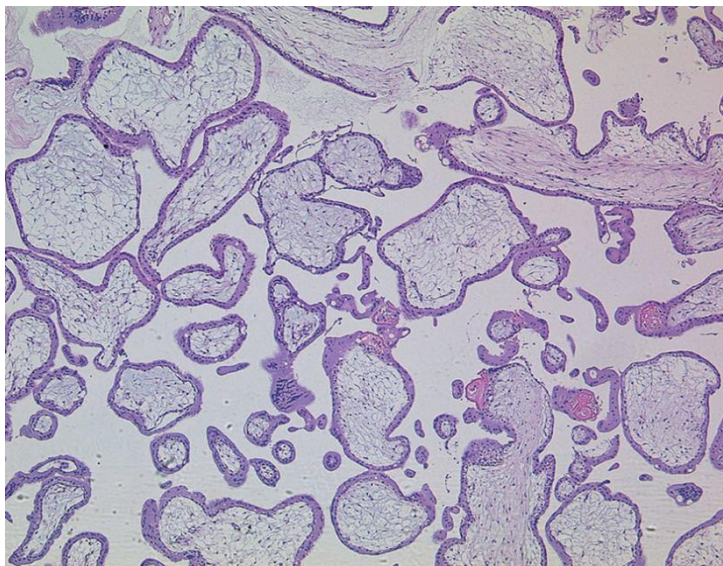


Figure 20. Môle hydatiforme partielle, coloration hématoxyline-éosine, grossissement x 50 (Prof. Gabbert, Département de Pathologie, Heinrich-Heine-Universität de Düsseldorf).

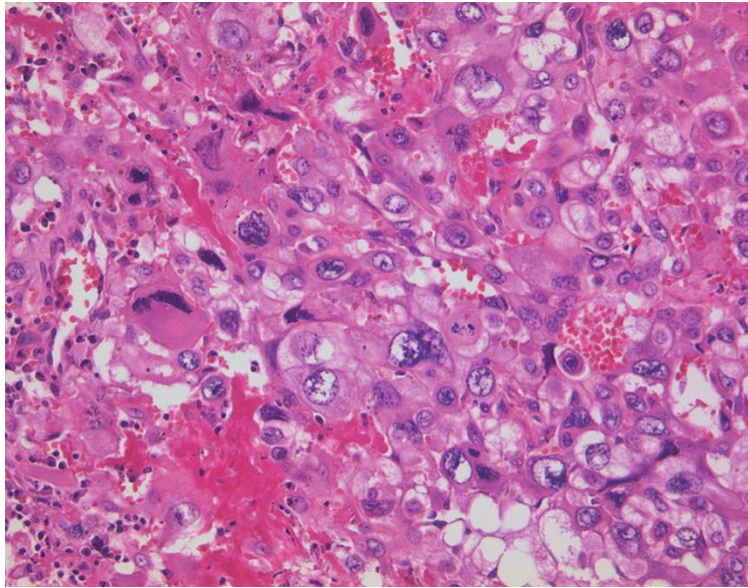


Figure 21. Choriocarcinome, coloration hématoxyline-éosine, grossissement $\times 200$
(Prof. Gabbert, Département de Pathologie, Heinrich-Heine-Universität de Düsseldorf).

2.1.2 Nodules du site placentaire (NSP)

Les nodules du site placentaire représentent une lésion non néoplasique. Ils sont composés d'un nodule central avec des cellules placentaires autour desquelles siègent des cellules tumorales périphériques. Des données récentes montrent que le nodule du site d'implantation peut évoluer vers une tumeur trophoblastique épithéloïde (B. J. Chen, Cheng, & Chen, 2013).

2.1.3 Site placentaire exagéré (SPE)

Cette lésion, appelée autrefois « endométrite syncytiale » représente une exagération du processus physiologique de l'implantation.(Wang et al., 2006). Elle peut être observée après une grossesse normale, mais serait plus fréquente après un avortement spontané ou provoqué. Selon le registre de Pathologie Chirurgicale du Johns Hopkins Hospital (Shih & Kurman, 2001) la SPE représenterait 1,6% des avortements spontanés du premier trimestre.

2.1.4 Le Choriocarcinome (CC)

Les choriocarcinomes sont des tumeurs épithéliales dérivées des cellules trophoblastiques également connu sous le nom de chorioepithelioma. Elles se caractérisent par une prolifération excessive des cytotrophoblastes et syncytiotrophoblastes. Dans plus de 50% des cas, le choriocarcinome est précédé par une môle hydatiforme. Cependant, des cas de choriocarcinome ont également été signalés après une grossesse à terme, une fausse couche, et dans de cas rares, après une grossesse extra-utérine. Dans 2,5% des cas, en particulier après une grossesse à terme ou une fausse couche, le diagnostic du choriocarcinome ne repose pas sur les résultats cliniques, mais sur des complications liées à l'apparition de plusieurs sites métastatiques, en particulier dans les poumons et le vagin (Ozalp & Oge, 2013). Plusieurs autres sites métastatiques ont aussi été rapportés comme le foie, la rate, les reins, les intestins et le cerveau. Histologiquement, le CC montre une image biphasique avec une nécrose centrale. La tumeur choriocarcinomateuse (Figure 21) est essentiellement formée de cellules de cytotrophoblastique-like multi-nucléées et de syncytiotrophoblastes-like pléomorphes qui forment les villosités chorales ainsi que plusieurs sites nécrotiques et hémorragiques (Arima, Imamura, Amada, Tsuneyoshi, & Wake, 1994).

2.1.5 Mole invasive

Une môle invasive décrit le cas d'une MHC infiltrant le myomètre plutôt qu'une MHP. Contrairement à un CC, une môle invasive possède des villosités chorales. Les villosités molaires sont présentes au sein du myomètre, le plus souvent dans la lumière de volumineux

vaisseaux utérins, au contact direct de l'endomètre vasculaire (Allias, Bolze, Gaillot-Durand, Devouassoux-Shisheboran, & reseau des maladies trophoblastiques, 2014).

2.1.6 Tumeur trophoblastique du site placentaire (TTSP).

Les TTSP se caractérisent par une infiltration des trophoblastes interstitiels du myomètre, avec moins de nécrose et d'hémorragies et un taux d'hCG plus faible comparé au choriocarcinome. Les études immunohistochimiques des TTSP montrent une coloration positive pour le lactogène placentaire humain (LPh) et d'autres marqueurs des cellules trophoblastiques extravillositaires. Les cellules tumorales du TTSP sont caractérisées par des membranes nucléaires irrégulières avec des noyaux hyperchromatiques et éosinophiles et un cytoplasme amphiphile (molécules à moitié hydrophile et hydrophobe). Dans les TTSP les villosités chorales sont absentes.

2.1.7 Tumeurs trophoblastiques Epithélioïdes (TTE).

Les TTE sont des lésions de type chorionique issu des trophoblastes intermédiaires. Dans le cas de cette tumeur, le myomètre ou le col de l'utérus sont envahis par des cellules régulières épithélioïdes du trophoblaste intermédiaire. Les signes révélateurs sont des métrorragies irrégulières et une élévation modérée de l'hCG. Histologiquement, les TTE se présentent sous forme d'îlots de cellules trophoblastiques intermédiaires entourés par des sites nécrotiques et associés à une matrice de type hyalin (H. Y. Ngan et al., 2015). La tumeur est immunoréactive à l'hLH ; hCG ; cytokératine et inhibine-alpha. Elle peut être différenciée des PSTT par un immunomarquage positif pour la protéine p63. La TTE peut coexister avec un choriocarcinome ou une TTSP (B. J. Chen et al., 2013; Luk & Friedlander, 2013; Shen et al., 2003).

2.2 Epidémiologie

L'incidence et l'épidémiologie des MTG diffèrent dans le monde. Bien que l'incidence soit d'environ 1-3 pour 1000 grossesses pour MHC et 3 pour 1000 grossesses pour MHP en Amérique du Nord et en Europe, les deux pathologies semblent être diagnostiquées plus souvent en Asie et en Amérique latine avec une incidence de 13,2 pour 1000 grossesses (Shrivastava et al., 2014). Cela pourrait être dû à des différences dans **i)** la prise en charge de ces pathologies entre les pays occidentaux et pays en voie de développement, **ii)** les paramètres génétiques (Palmer, 1994; Seckl et al., 2010). Le risque d'une grossesse molaire est augmenté de 1-2% après une première grossesse molaire, et de 15-20% après deux grossesses molaires antérieures et successives. La survenue d'une grossesse molaire est

fortement dépendante de l'âge maternel. Elle est plus importante chez les femmes de moins de 16 ans et plus de 45 ans (S. Ngan & Seckl, 2007). L'incidence des CC et TTSP / TTE est estimée à 1 pour 50 000 grossesses, mais peut même être plus élevées car résulteraient de toutes sortes de grossesses (Fisher et al., 1988; Seckl et al., 2000). En outre, l'influence des facteurs hormonaux comme une ménarche tardive, l'utilisation de contraceptifs oraux et le flux menstruel irrégulier ont été associés à un risque accru de MTG (Seckl et al., 2010).

2.3 Facteurs de risque.

Les principaux facteurs de risque décrits à ce jour sont l'âge maternel précoce ou trop élevé lors de la conception, le groupe sanguin, le niveau socio-économique et la présence d'antécédents de MH familiaux.

2.3.1 Age

L'âge semble jouer un rôle très important dans la survenue d'une MTG. Le risque est multiplié par 1,5 pour les femmes de moins de 16 ans et par 7,6 pour les femmes de plus de 45 ans en comparaison avec des femmes entre 20 et 35 ans (Dreyfus, Tissier, & Philippe, 2000; Golfier et al., 2010). Peu de données de la littérature ont rapporté une association entre l'âge paternel et la survenue des MH. Une étude récente de Parazzini et al. a rapporté une incidence augmentée chez les hommes de plus de 45 ans (Mangili, Parazzini, Maggi, & Spolti, 1993). L'augmentation du risque de survenue de MH chez les femmes de plus de 45 ans seraient expliquée par des anomalies de la fécondation due au vieillissement de l'ovocyte (Fleming et al., 2008).

2.3.2 Antécédents

Selon plusieurs études, un antécédent d'avortement multiplierait le risque de môle hydatiforme par 3, et par 32 après deux avortements consécutifs (Horn, Kowalzik, Bilek, Richter, & Einkenkel, 2006). La môle hydatiforme augmente le risque de développement d'un choriocarcinome d'un facteur 2500 après une môle hydatiforme comparé à une grossesse normale. Le risque de développer une TTG est de 10–20 % après l'évacuation d'une môle hydatiforme complète, contre seulement 0,5 % dans le cas d'une môle hydatiforme partielle (Noal, Joly, & Leblanc, 2010).

2.3.3 Groupe sanguin

Le groupe sanguin de la patiente serait également un facteur important dans la survenue de TTG. Le risque serait plus élevé pour les patientes du groupe sanguin A ou AB comparé aux patientes du groupe B ou O. Cependant, le mécanisme physiopathologique associé à ces observations reste à démontrer (Noal et al., 2010).

2.3.4 Niveau socio-économique

Les conditions de vie sont souvent citées comme facteur de risque pour les TTG. Un faible niveau socioéconomique associé à une malnutrition et essentiellement à des carences en vitamines A et B9 seraient étroitement associés à la survenue de ces pathologies (Berkowitz et al., 1985). Ces facteurs pourraient expliquer la différence dans l'incidence des TTG entre pays en voie de développement et pays développés.

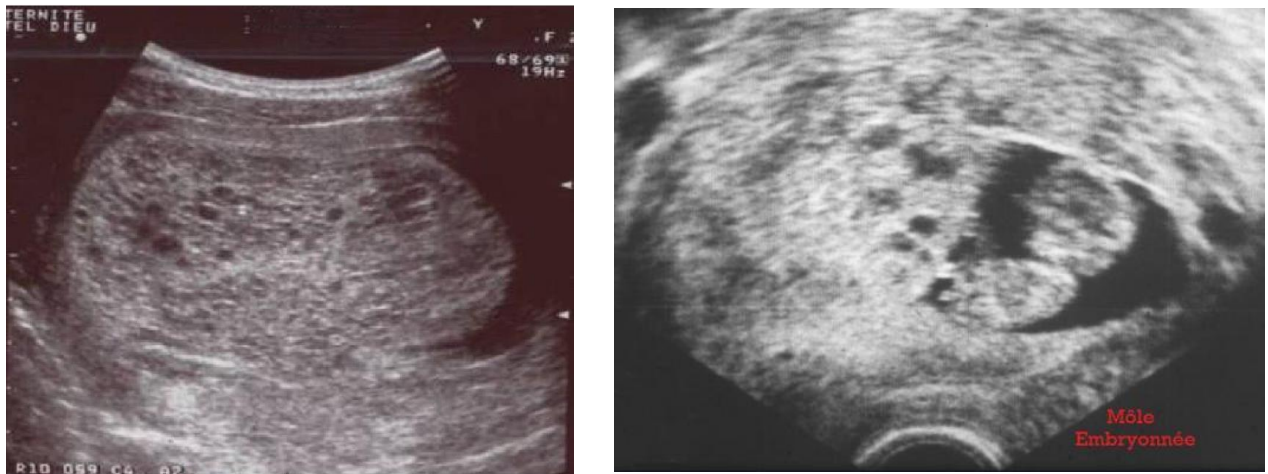


Figure 22. Aspect échographique d'une môle hydatiforme complète à 6 semaines d'aménorrhée (A droite) (Golfier et al 2010) et d'une môle hydatiforme partielle (A gauche) (<http://medsein.e-monsite.com>).

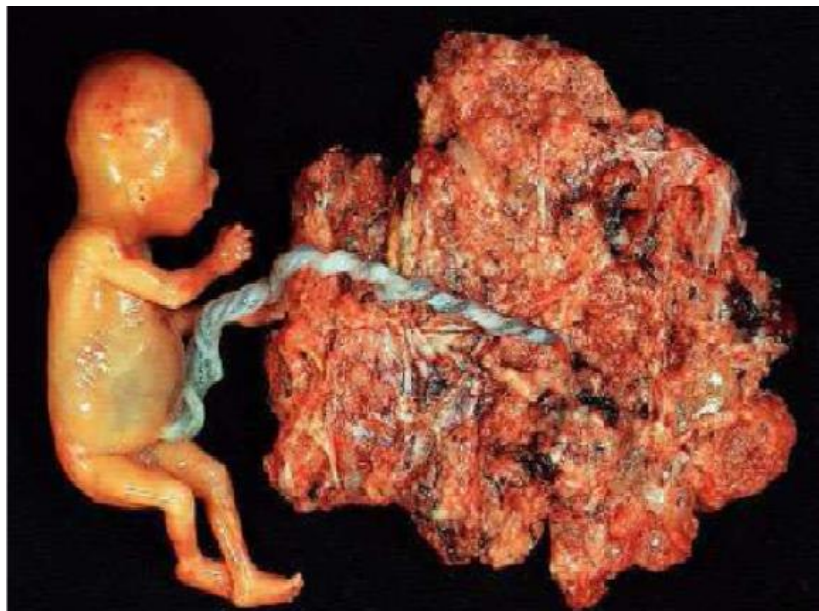


Figure 23. MHP avec un fœtus et un placenta anormaux (Benatti K, 2010).

2.4 Diagnostic des maladies trophoblastiques gestationnelles.

La plupart des patientes avec une MHC ou MHP présentent un saignement vaginal abondant au cours du premier trimestre de la grossesse. En raison des examens échographiques systématiques en début de grossesse, les symptômes rapportés précédemment tels que les vomissements, l'anémie, la pré-éclampsie, la taille excessive de l'utérus, l'hyperthyroïdie sont de moins en moins observés en association avec les MH (Hou, Wan, Xiang, Qi, & Yang, 2008). L'aspect échographique classique d'une MHC au cours du second trimestre de la grossesse était connu sous le terme « tempête de neige ». La MHC est caractérisée par la présence d'une cavité utérine remplie d'une masse hétérogène en absence d'un développement fœtal et l'apparition des kystes lutéiques ovariens (Figure 22) (Fowler, Lindsay, Seckl, & Sebire, 2007). A l'inverse, une MHP se caractérise généralement par la présence d'un développement fœtal qui présente plusieurs malformations. Le fœtus est non viable au-delà de 16 semaines d'aménorrhée (Figure 23) (Fowler et al., 2007). Les CC, TTSP et TTE peuvent se développer quelques mois ou années après une grossesse antérieure, rendant leur diagnostic plus difficile. Elles peuvent induire des saignements vaginaux irréguliers ou des symptômes liés à des métastases tumorales comme des maux de tête ou une hémiparésie due à des métastases cérébrales ou des symptômes respiratoires liés à des métastases pulmonaires (Seckl et al., 2013). Les MTG sont pratiquement uniques car elles produisent par elles-mêmes un marqueur très spécifique, l'hCG. Cette hormone peut être mesurée dans l'urine et / ou dans le sang, et ses taux peuvent être corrélés à l'avancée de la pathologie. Il s'agit d'une glycoprotéine placentaire composée d'une sous-unité alpha, qui est similaire à ceux des autres hormones glycoprotéiques (LH, FSH et TSH), et une sous-unité bêta qui est spécifique à l'hCG. Dans le cas d'une grossesse normale, la sous-unité bêta est intacte et elle est hyperglycosylée au cours du premier trimestre. En revanche, dans le cas d'une maladie trophoblastique gestationnelle ou d'un cancer, la sous-unité bêta peut exister sous différentes formes, y compris des sous-unités β -libres, des sous-unités β -core, ou des fragments immunoréactifs. Néanmoins, la plus part des tests commerciaux utilisés à ce jour ne détectent pas toutes les formes de la sous-unité bêta et/ou sur- ou sous-détectent certaines formes, ce qui peut générer de faux positifs ou négatifs chez les patientes atteintes d'un cancer, notamment du CC. D'autres tests seraient plus sensibles, mais avec souvent plus de faux positifs, en raison d'une réaction croisée avec des anticorps hétérophiles (Tsai, 2006). La surveillance de l'hCG joue un rôle crucial dans le diagnostic et la gestion des MTG, cependant il est important de noter les faiblesses des tests actuellement commercialisés.

Tableau 1.

Classification FIGO des néoplasies trophoblastiques Gestationnelles (NTG).

Stade FIGO	Description
I	Tumeur trophoblastique gestationnelle strictement limitée au corps utérin.
II	Tumeur trophoblastique gestationnelle étendue dans le vagin, mais limitée aux structures génitales.
III	Tumeurs trophoblastique gestationnelle métastasée dans les poumons, avec ou sans présence dans les voies génitales.
IV	Plusieurs sites métastatiques: Foie, reins, rate et le cerveau

Tableau 2.

Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (FIGO) système d'évaluation des néoplasies trophoblastiques gestationnelles

Facteurs Pronostiques	Score			
	0	1	2	4
Âge (ans)	<40	≥40		
Grossesse Antécédente	Môle	avortement	A Terme	
Intervalle entre grossesse antérieure et la chimiothérapie (mois)	<4	4-6	7-12	> 12
hCG (UI / L)	<10 ³	10 ³ -10 ⁴	10 ⁴ -10 ⁵	> 10 ⁵
Nombre de métastases	0	1-4	5-8	> 8
Site métastatique	poumon	Reins, Rate	GI	Cerveau, Foie
masse tumorale la plus grande (cm)		3-5	> 5	
chimiothérapie précédente			monothérapie	thérapeutique combiné

Le score total est calculé en additionnant les scores individuels pour chaque facteur pronostique. Faible risque :0-6; haut risque: 7 ou plus.
GI Tractus gastro-intestinal, hCG gonadotrophine chorionique humaine

2.5 Traitement des maladies trophoblastiques gestationnelles.

2.5.1 Grossesse molaire

Actuellement le traitement d'une grossesse molaire se fait par aspiration sous surveillance échographique. Une seconde aspiration est nécessaire si le saignement vaginal persiste toujours (Golfier et al., 2010). En revanche, l'hystérectomie est rarement indiquée sauf contre-indication chez des femmes à haut risque de développer des mûles récurrentes. En cas de grossesse molaire, le suivi et la surveillance des taux d'hCG est essentiel pour le diagnostic d'une NTG post-molaire. Des données récentes montrent qu'une MTG se produit rarement après le retour des taux de l'hCG à une concentration négative. Actuellement six mois au lieu d'une année sont recommandés pour surveiller les taux de l'hCG (Lurain, 2010; Sebire et al., 2007). Pendant cette période il est recommandé de prendre des contraceptifs oraux. Le risque de récurrence est faible (0,6% -2%) après une grossesse molaire, bien qu'il soit beaucoup augmenté après les grossesses molaires récurrentes (Fisher et al., 2004; Matsui, Iitsuka, Suzuka, Seki, & Sekiya, 2001; Sebire, Fisher, Foksett, et al., 2003; Tse & Ngan, 2012). Des mutations du gène NLRP7 et KHDC3L ont été détectées chez des femmes présentant des grossesses molaires récurrentes (Fisher et al., 2004; Ulker et al., 2013; Williams, Hodgetts, & Gupta, 2010).

2.5.2 Néoplasie trophoblastique gestationnelle

Le traitement des NTG se fait généralement par chimiothérapie (Golfier et al., 2010). Le meilleur protocole dépend du stade et de la classification FIGO (Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique) de la pathologie. Selon la classification FIGO 2000 (tableaux 1 et 2) les patientes avec un score de 6 et en de ça de ce score sont classées comme des patientes à faible risque et celles au-dessus de 6 sont considérées à haut risque.

2.5.2.1 Patientes à faible risque de néoplasie trophoblastique gestationnelle.

Les patientes qui développent une NTG avec faible risque sont traitées selon un protocole utilisant un seul agent : le méthotrexate ou l'actinomycine (tableaux 3). L'étude publiée par la data base Cochrane en 2012 sur une cohorte de 513 patients et comparants cinq essais cliniques a montré que l'actinomycine D (Act-D) est plus efficace que le méthotrexate (MTX) (Alazzam, Tidy, Hancock, & Osborne, 2009). Le méthotrexate était associé à plus l'échec dans les traitements que l'actinomycine D. Des études sont actuellement en cours pour comparer à la fois l'efficacité, la toxicité et la qualité de vie suite à l'utilisation de l'actinomycine D ou méthotrexate. En absence de réponse à une monothérapie, à un maintien

de taux élevés de l'hCG, à un développement de métastases, la chimiothérapie multi-agents est utilisée pour des patientes à haut-risque. Des études réalisées au Royaume-Unis ont montré que si le taux d'hCG est inférieure à 100 UI / L ou 300 UI / L, le traitement par un seul agent Act-D donne une bonne réponse (McGrath et al., 2010; McNeish et al., 2002; Seckl et al., 2010). Après une baisse du taux d'hCG, le risque de récurrence diminue suite à 2-3 cycles de chimiothérapie. Le taux global de rémission complète est proche de 100% (Lurain, 2011; Seckl et al., 2010).

2.5.2.2 Patientes à Haut risque de néoplasie trophoblastique gestationnelle.

Pour les patientes à haut-risque de NTG, des protocoles de chimiothérapie avec multi-agents sont les plus souvent appliqués. Le plus utilisé est l'EMA-CO (étoposide, le méthotrexate, actinomycine D, cyclophosphamide, Oconin) (tableau 4). L'étude publiée par le data base Cochrane n'a pas pu mettre en évidence la meilleure combinaison de ces traitements (Deng, Zhang, Wu, & Lawrie, 2013). Le taux global de rémission complète était d'environ 85% et le taux de cinq ans de survie après traitement était de 75% -90%. Cependant, les patientes atteintes d'une métastase au foie et / ou au cerveau ont de moins bons résultats (Ahamed, Short, North, Savage, & Seckl, 2012; Neubauer et al., 2012; Newlands et al., 2002).

2.5.3 Chirurgie

La chirurgie peut avoir un rôle important dans la gestion de NTG (H. Y. Ngan et al., 2015). L'hystérectomie peut être appliquée en cas de saignement utérin incontrôlé. La laparotomie peut être nécessaire pour arrêter le saignement dans des organes tels que le foie, tractus gastro-intestinal, les reins et la rate. Aussi, une neurochirurgie peut s'avérer nécessaire s'il y a un saignement dans le cerveau ou une augmentation de la pression intracrânienne. Chez les patientes atteintes d'une tumeur résistante aux chimiothérapies, l'extraction des sites métastatiques du cerveau ou des nodules pulmonaires ou l'hystérectomie peuvent améliorer la survie (H. Y. Ngan et al., 2015).

Tableau 3.

Traitement des patientes à faible risque	
Agent	Protocole
Méthotrexate	50 mg par voie intramusculaire, toutes les 48 h pour un total de 4 doses
Acide folinique	15 mg par voie orale, 30 h après chaque injection méthotrexate
Cycle répété toutes les 2 semaines	

Tableau 4.

Traitement des patientes à haut risque		
	Agent	Protocole
Jour 1	Etoposide	100 mg / m ² par voie intraveineuse pendant 30 min
	actinomycine D	bolus intraveineux de 0,5 mg
	Méthotrexate	300 mg / m ² par voie intraveineuse pendant 12 h
Jour 2	Etoposide	100 mg / m ² par voie intraveineuse pendant 30 min
	actinomycine D	bolus intraveineux de 0,5 mg
	Acide folinique	
Jour 8	vincristine Cyclophosphamide	1 mg / bolus intraveineux m ²
La thérapie à base d'Etoposide / méthotrexate / actinomycine D alterne avec Une thérapie à base de vincristine / cyclophosphamide chaque semaine.		

2.6 Dosage d'hCG : Faux positifs et "Fantôme d'hCG"

Chez quelques patientes, le test de dosage de l'hCG peut révéler une élévation persistante de l'hormone, conduisant à la suspicion de maladie gestationnelle trophoblastique comme le choriocarcinome. Ces situations constituent des faux diagnostics. Ainsi ces patientes sont traitées d'une façon inutile avec une chimiothérapie cytotoxique. Ce phénomène est appelé "Fantôme d'hCG" ou "Fantôme du syndrome de choriocarcinome (pseudohypergonadotropinemia)". Non seulement cette défiance dans le système de détection peut engendrer des faux positifs; mais peut aussi engendrer un mauvais suivi des patientes diagnostiquées pour un choriocarcinome pendant leur période de traitement.

Il existe deux causes connues du "Fantôme d'hCG", la première serait dû à la présence chez certaines patientes d'enzymes protéolytiques qui miment l'hCG (Cole, 1997), et à des anticorps hétérophiles (Baulieu, Lepape, Baulieu, & Besnard, 1982; Berglund & Holmberg, 1989; Boscato & Stuart, 1988; Dericks-Tan, Jost, Schwedes, & Taubert, 1984; McCarthy, Ryan, & McKenzie, 1988; Vladutiu, Sulewski, Pudlak, & Stull, 1982). La seconde serait dû à des effets mimiques de la toxine du choléra, des enzymes bactériennes et des protéases trypsine-like, qui peuvent imiter la sous-unité β d'hCG et sont responsables du faible niveau d'immunoréactivité d'hCG chez les femmes non gestantes (Baulieu et al., 1982; Berglund & Holmberg, 1989; Boscato & Stuart, 1988; Dericks-Tan et al., 1984; McCarthy et al., 1988; Vladutiu et al., 1982). Par ailleurs, l'exposition à des animaux comme la souris, le lapin, la chèvre, ou le sérum de mouton peuvent conduire à la formation d'anticorps humains contre ces espèces (Baulieu et al., 1982; Berglund & Holmberg, 1989; Boscato & Stuart, 1988; Dericks-Tan et al., 1984; McCarthy et al., 1988; Vladutiu et al., 1982). De tels anticorps peuvent lier les différents anti-hCG immunoglobulines de souris, lapin, chèvre, ou de mouton utilisés dans les différents tests, induisant à de faux positifs lors des dosages sériques (Baulieu et al., 1982; Berglund & Holmberg, 1989; Boscato & Stuart, 1988; Dericks-Tan et al., 1984; McCarthy et al., 1988; Vladutiu et al., 1982).

En conclusion, si les niveaux persistants d'hCG sont détectés chez les femmes sans grossesse ou sans antécédents de maladies trophoblastiques ou de masses tumorales, le phénomène du "Fantôme d'hCG" doit être pris en considération.

Résumé Chapitre II

Les Maladies Trophoblastiques Gestationnelles (MTG) sont des complications rares de la grossesse qui comportent un large spectre de pathologies trophoblastiques, allant des lésions bénignes précancéreuses, représentées par les môles hydatiformes complètes (MHC), les môles hydatiformes partielles (MHP), les Nodules du site placentaire (NSP), les Sites placentaires exagérés (SPE), aux tumeurs trophoblastiques gestationnelles (TTG), représentées par les môles invasives, les choriocarcinomes (CC), les tumeurs trophoblastiques du site placentaire (TTSP) et les tumeurs trophoblastiques Epithélioïdes (TTE).

Les MTG se développent le plus souvent suite à une fécondation anormale de l'ovocyte aboutissant à un caryotype anormal. Les patientes qui développent une MHC ou MHP sont à un risque plus élevé de développer un choriocarcinome. Néanmoins, ce risque est beaucoup plus élevé pour une MHC (20%) par rapport à une MHP (1,5%). Le choriocarcinome est une tumeur très métastatique en raison de la propriété invasive intrinsèque des cellules trophoblastiques. Le diagnostic et le suivi de la progression du choriocarcinome sont basés sur la mesure des taux de l'hormone hCG sécrétée par le syncytiotrophoblaste. Néanmoins, les mesures d'hCG ont été récemment signalées associées à des diagnostics de faux positifs obligeant certaines patientes à subir des procédures thérapeutiques invasives inutiles, y compris la chimiothérapie, l'hystérectomie, et d'autres chirurgies. Par conséquent, il est encore nécessaire de développer de nouvelles approches thérapeutiques spécifiques et moins toxiques pour empêcher l'apparition de ce type de cancer.

Les Prokinéticines

3. Découverte des prokinétines

La motilité gastro-intestinale est régulée par plusieurs signaux intrinsèques et extrinsèques qui regroupent des neurotransmetteurs, des neuropeptides et des hormones. En plus des facteurs endogènes, de nouveaux peptides exogènes ont été identifiés par Schweitz et al. comme facteurs possédant la capacité de contrôler la motilité gastro-intestinale (Schweitz, Bidard, & Lazdunski, 1990; Schweitz, Pacaud, Diochot, Moinier, & Lazdunski, 1999). La première protéine purifiée est une petite protéine non toxique du venin de Mamba noir (*Dendroaspis polytis*). Cette protéine a été dénommée MIT-1 en référence à MAMBA toxine intestinale 1. Ces auteurs ont montré par la suite la capacité de cette protéine à induire la contraction de l'iléon chez le cochon d'inde (Schweitz et al., 1990; Schweitz et al., 1999). Joubert et Strydom avaient aussi travaillé sur la même protéine qu'ils ont appelé VPRA pour le Vennom Protein A (Joubert & Strydom, 1980). La même année une autre protéine riche en cystéines a été isolée à partir des sécrétions de la peau de la grenouille *Bombina variegata*. Cette protéine de 8 kDa a été appelée BV8 en référence à *Bombina variegata*, et à son poids moléculaire (Mollay et al., 1999). Bv8 avait aussi la capacité d'interagir avec des récepteurs présents dans les tissus des mammifères et de stimuler la contraction de l'iléon des rongeurs (Mollay et al., 1999). L'analyse de la séquence protéique a montré de fortes similitudes entre la MIT-1 et BV8. Cela consiste principalement en une conservation des résidus de cystéines et sérines en position 18 et 22, respectivement. En 2001, Zhou et al. ont utilisé les séquences d'ADN codant pour MIT-1 et BV8 comme sondes pour rechercher des homologues dans la base de données du génome humain. Deux orthologues ont été identifiés (M. Li, Bullock, Knauer, Ehlert, & Zhou, 2001). En raison de leur capacité à stimuler la contraction du tractus gastro-intestinal chez les rongeurs, ils ont été nommés prokinétines: prokinétine-1 (PROK1) pour MIT-1 et prokinétine-2 (PROK2) pour BV8 (M. Li et al., 2001; Schweitz et al., 1999). Les Prokinétines des différentes espèces montrent des similitudes dans leurs régions N-terminales et la partie transmembranaire. En revanche des différences ont été trouvées dans la région C-terminale (Bullock, Li, & Zhou, 2004). PROK1 et PROK2 sont exprimées dans le tractus gastro-intestinal et dans de nombreux tissus chez l'embryon et l'adulte (Eddie et al., 2015; M. Li et al., 2001). Plusieurs études ont associé les deux prokinétines avec différentes fonctions biologiques. En particulier, PROK1 a été décrite comme un puissant facteur angiogène et mitogène dans l'épithélium vasculaire endocrinien. Récemment, elle a été rapporté comme facteur clé de contrôle du développement placentaire (Brouillet, Hoffmann, Feige, & Alfaidy, 2012). En revanche, PROK2 serait associée au développement du système nerveux

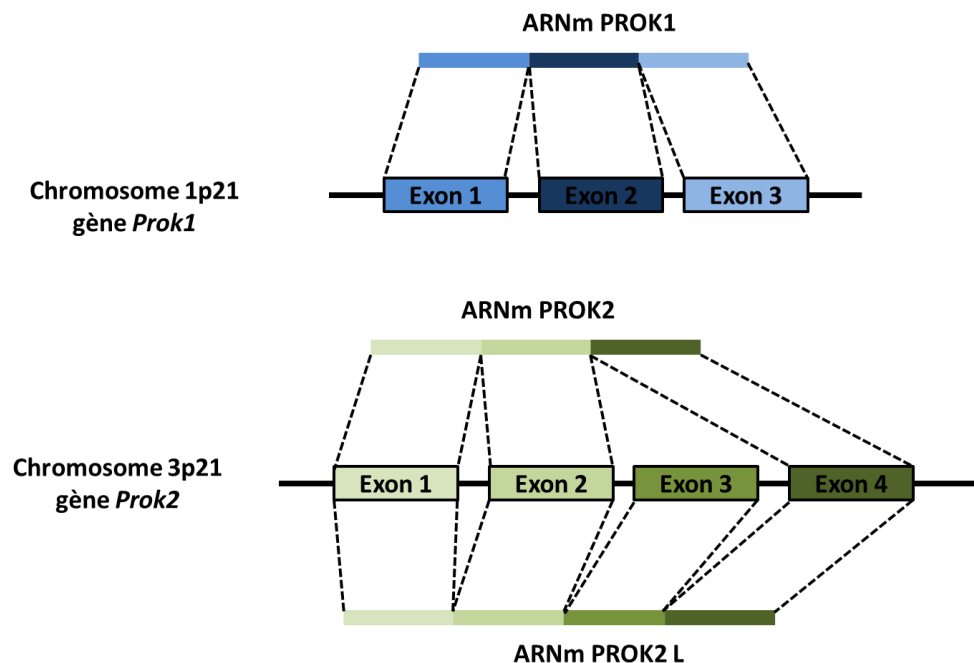


Figure 24. Structure des gènes *prok1* et *prok2* (D'après Brouillet et al. 2012)

H1	AVITGA CERDV QCG AGT CCA ISLWLRGL RM CTPL	G REGEE CHP GSHKVPFFR-KRKHHT CP CLPN LLC	SRFPDGRYR C SMDLKNINF	86
R1	AVITGA CERDV QCG AGT CCA ISLWLRGL RL CTPL	G REGEE CHP GSHKIPFFR-KRQHHT CP CSPS LLC	SRFPDGRYR C SODLKNVNF	86
M1	AVITGA CERDI QCG AGT CCA ISLWLRGL RL CTPL	G REGEE CHP GSHKIPFLR-KRQHHT CP CSPS LLC	SRFPDGRYR C FRDLKNANF	86
Mam	AVITGA CERDI QCG GT CCA AVSLWIKSV RV CTPV	GT SGED CHP ASHKIPFSGQRKMHT CP CAPN LAC	VQTSPPKFK C LSK	80
Bom	AVITGA CDKDV QCG SGT CCA ASAWSRNIR FC IPL	G NSGED CHP ASHKVPYDG-KLRSSL CP CKSG LTC	SKSGE-KFK C S	77
F1	AVITGA CERDV QCG L GL CCA AVSLWLRGL RM CAPR	G LEGDE CHP FSHKVPYPG-KROHHT CP CLPH LVC	TRDRDSKYR C TDDFKNVDLYEVGOTLR	94
H2	AVITGA CDKDS QCG GG MCCA VSIWVKSI RI CTPM	G KLGD SCH PLTRKVPFFG-RRMHHT CP CLPG LAC	LRTSFNRFI C LAOK	81
M2	AVITGA CDKDS QCG GG MCCA VSIWVKSI RI CTPM	G QVGDS CH PLTRKVPFWG-RRMHHT CP CLPG LAC	LRTSFNRFI C LARK	81
R2	AVITGA CDKDS QCG GG MCCA VSIWVKSI RI CTPM	G QVGDS CH PLTRKVPFWG-RRMHHT CP CLPG LAC	LRTSFNRFI C LARK	81
B2	AVITGA CDRDP QCG GG MCCA VSLWVKSI RI CTPM	G KVGDS CH PMTRKVPFLG-RRMHHT CP CLPG LAC	SRTSFNRYT C LAQK	81
F2	AVITGA CEKDS QCG GG MCCA VSLWIRSL RM CTPM	G REGDD CHP MSHTVPFFG-KRLHHT CP CLPN LSC	IMPDEGRAK C LSTYKYPDYLL	88

Figure 25. Séquence d'acides aminés des protéines matures de la famille AVIT dans différentes espèces. Le numéro fait référence au type 1 ou au type 2 des prokinétines. **H** : homme, **R** : rat, **M** : souris, **Mam** : serpent *mamba*, **Bom** : grenouille *Bombina varieta*, **B** : Taureau, **F** : Fugu. Les rectangles bleus montrent les acides aminés conservés. 86 indique le nombre d'acides aminés chez l'homme (D'après Kaser et al. 2003)

central et en particulier à la migration des cellules à GNRH et à la régulation et morphogenèse des cellules du bulbe olfactif (Masumoto et al., 2006; Matsumoto et al., 2006). En 2001, Li et al. ont montré que les prokinétines agissent par l'intermédiaire de récepteurs de la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) (M. Li et al., 2001). La même année, le groupe de Ferrara décrit un nouveau facteur angiogène exprimé spécifiquement dans les glandes endocriniens (Glandes corticosurréaliennes, Ovaires, Testicules, et Placenta) et agissant sur les cellules endothéliales dérivées de ces tissus (LeCouter & Ferrara, 2003). Ce facteur avait la capacité d'induire la prolifération des cellules endothéliales issues de capillaires du cortex surrénalien bovins (LeCouter & Ferrara, 2003). De façon intéressante l'analyse de séquence de PROK1 et EG-VEGF a montré que les deux protéines représentaient la même molécule. Pour la clarté de ce manuscrit, je nommerai cette protéine EG-VEGF plutôt que PROK1.

3.1 Les gènes des prokinétines

Chez l'homme, l'EG-VEGF est transcrit par le gène prok1 composé de trois exons situés sur le chromosome 1 en 1p21 (Kaser, Winklmayr, Lepperdinger, & Kreil, 2003; LeCouter et al., 2001; M. Li et al., 2001). À ce jour, aucun produit résultant d'un épissage alternatif n'a été rapporté. À l'inverse, le gène codant pour PROK2 et se situant sur le chromosome 3 en 3p13, compte quatre exons et résulte en la production par épissage alternatif de deux protéines. PROK2 est la forme la plus active, elle est exemptée de l'exon 3 et sa protéine compte 81 acides aminés. La PROK2L constitue le deuxième variant qui comprend tous les exons et compte 102 acides aminés (Figure 24). Chez l'homme et la souris, les régions promotrices de prok2 sont hautement conservées suggérant une régulation similaire chez les deux espèces. Cependant, des différences existent dans les régions promotrices du gène de prok1 entre ces deux espèces (Bullock et al., 2004; LeCouter & Ferrara, 2003).

3.2 Les protéines des prokinétines

La forme mature d'EG-VEGF (PROK1) est composée de 86 acides aminés et a une masse moléculaire de 8,6 kDa. Son ADN complémentaire (ADNc) code pour une protéine de 105 acides aminés avec un peptide signal de 19 acides aminés. PROK2, est composé de 81 acides aminés alors que la seconde forme, PROK2L compte 102 acides aminés. L'EG-VEGF humain / PROK1 et BV8 /PROK2 partagent 44% d'identité et 10 cystéines qui forment cinq ponts disulfure. Bien que ces deux protéines présentent de fortes homologues structurales, leurs fonctions restent distinctes (Boisbouvier et al., 1998; Kaser et al., 2003). Chez toutes les

espèces, la région N-terminale présente une séquence hexa-peptidique qui est conservée entre tous les membres de la famille appelée AVITGA (figure 2 et 3) (Kaser et al., 2003).

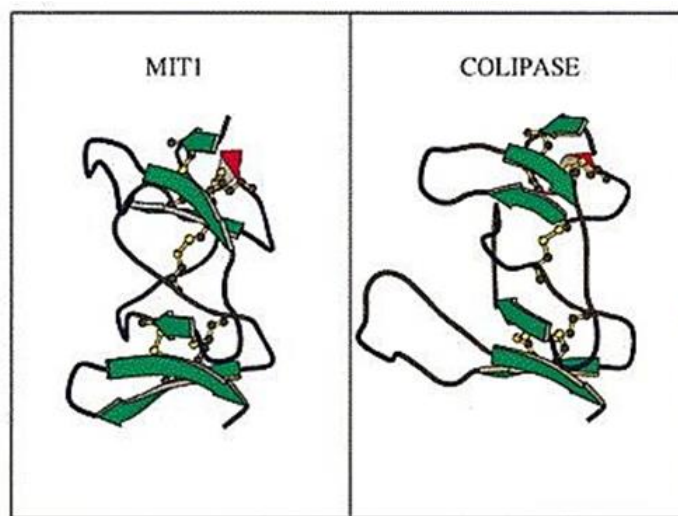


Figure 26. Structure secondaire de MIT-1 et de la colipase (D'après Boisbouvier et al. 1998)

Cette séquence est essentielle pour l'activité biologique et pour la liaison aux deux récepteurs PROKR1 et PROKR2. Des délétions ou des insertions dans la région hexapeptidique N-terminal entraînent la perte de l'activité agoniste des deux ligands. Ainsi, il a été rapporté que des mutations dans cette séquence inhibent l'activation des récepteurs par leurs ligands (Bullock et al., 2004; Negri et al., 2005). Les mutants se comportent comme des antagonistes des récepteurs (Bullock et al., 2004; Negri et al., 2005). À ce jour, aucune structure d'EG-VEGF ou de PROK2 n'a été rapportée. Les prokinétines sont des protéines très basiques avec un pI (point isoélectrique) de 8,65 pour EG-VEGF; 8,85 pour PROK2 et 10,68 pour PROK2L. EG-VEGF se lie avec une forte affinité à l'héparine suggérant une séquestration dans les compartiments extracellulaires (LeCouter et al., 2001) (Figure 25 et 26).

3.3 Les récepteurs des prokinétines

Deux récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) ont été découverts simultanément par trois équipes de recherche (D. C. Lin et al., 2002; Masuda et al., 2002; Soga et al., 2002). Ces récepteurs ont été appelés initialement GPR73A et B, puis récepteur à la prokinétine 1 (PROKR1) et prokinétine 2 (PROKR2). Ils partagent 85% d'homologie dans leur séquence d'acides aminés, mais diffèrent dans leurs parties N-terminales (D. C. Lin et al., 2002; Masuda et al., 2002; Soga et al., 2002). Cependant, de fortes similitudes ont été trouvées dans leurs domaines transmembranaires, suggérant des similitudes dans leur mécanisme d'activation (Soga et al., 2002). PROKR1 est composé de 393 acides aminés, et PROKR2 est composé de 384 amino-acides (Soga et al., 2002). Chez l'homme, les gènes prokr2 et prokr1 comprennent deux exons et sont situés sur deux chromosomes différents. Le gène prokr2 est situé sur le chromosome 2 en 2q14 et prokr1 est situé sur le chromosome 20 en 20p13 (Kaser et al., 2003; D. C. Lin et al., 2002). Les deux prokinétines agissent comme de puissants ligands à la fois pour PROKR1 et PROKR2. De façon intéressante, une expression différentielle et tissu-spécifique a été rapportée pour les deux récepteurs. PROKR2 serait exprimé d'une manière abondante dans le cerveau et les testicules; tandis que PROKR1 serait principalement exprimé dans les tissus périphériques tels que la rate, la prostate, le pancréas, le cœur et les cellules sanguines. Dans le système reproducteur féminin, des niveaux élevés d'expression des deux récepteurs ont été rapportés (Brouillet, Hoffmann, Feige, et al., 2012).

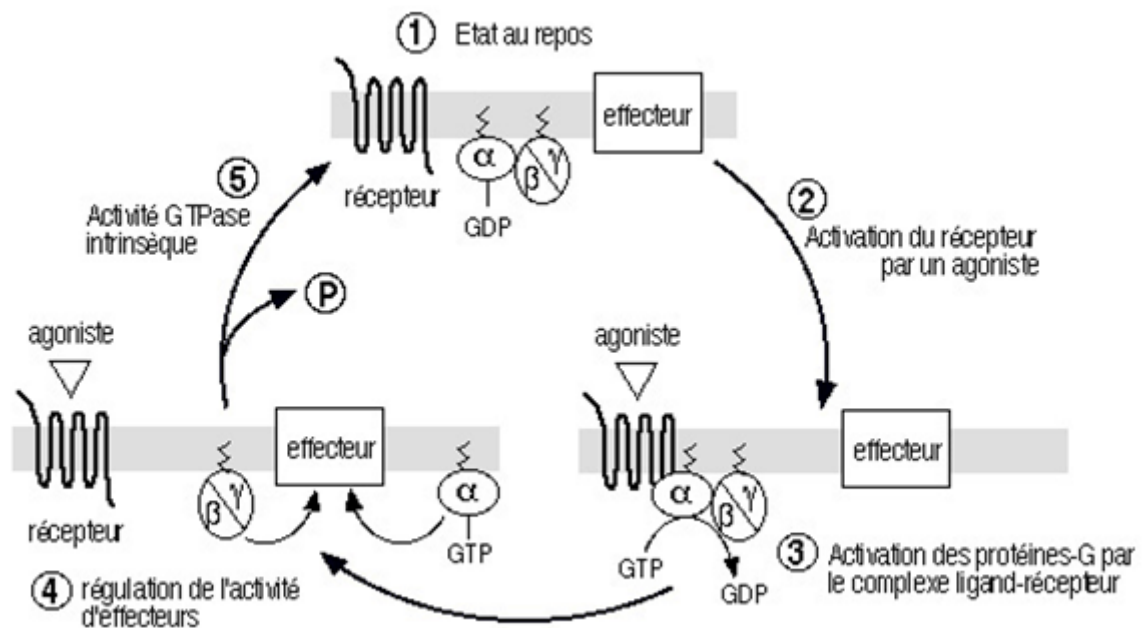


Figure 27. Activation d'un RCPG. Un RCPG au repos (1) est activé par la liaison d'un agoniste spécifique (2). Le changement de conformation du complexe agoniste-récepteur, induit par cette liaison, permet l'activation de l'échange du GDP par du GTP et donc l'activation de la protéine-G hétérotrimérique (sous-unités $G\alpha$ et $G\beta/\gamma$) intracellulaires (3) qui vont aller réguler l'activité de divers effecteurs (4) membranaires ou cytosoliques. Le déclenchement de l'activité phosphatase, intrinsèque à la sous-unité $G\alpha$ entraîne la réassociation des sous-unités $G\alpha$ et $G\beta/\gamma$ (5) et le retour à l'état initial (1). Tant que le récepteur est activé par son ligand, et tant que le système ne subit pas une désensibilisation, le cycle d'échange du GDP par du GTP continue. Schéma de <http://rcpg.chez.com/images/GTPase.jpg>

3.4 Activation des récepteurs couplés aux protéines G

Les prokinétines sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires qui ont la particularité d'interagir avec les protéines G hétérotrimériques, d'où la terminologie de récepteurs couplés à des protéines G.

Les protéines G regroupent trois polypeptides: la sous unité α , qui se lie et hydrolyse le GTP (guanosine tri-phosphate), et le dimère composé des sous unités β et γ (Figure 27). A l'état inactif la protéine hétérotrimérique est composée de la sous unité α liée au GDP (guanosine di-phosphate), qui est associée au dimère $\beta\gamma$ (GDP- $\alpha\beta\gamma$). En présence de stimuli, le récepteur transmet l'information aux protéines-G intracellulaires qui à leur tour inhibent ou activent d'autres effecteurs intracellulaires. Le récepteur peut changer de conformation en présence de son ligand ou de manière constitutive (Smit et al., 2007) (Smit et al. 2007), ce qui entraîne un changement de conformation de GDP- α et une réduction de l'affinité du GDP. Le GTP se lie alors à la sous-unité α et provoque la dissociation de $\beta\gamma$ du récepteur. Une fois le GTP est hydrolysé en GDP grâce à l'activité intrinsèque GTPase, la sous-unité α perd sa forme active et s'associe à nouveau avec le dimère $\beta\gamma$ et le récepteur (Neer, 1995) (Neer 1995). La sous-unité $\beta\gamma$ peut interagir également avec différents effecteurs tels que la phospholipase C (PLC), l'adénylyl cyclase (AC) ou la phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate kinase (PI3K) (Ford et al., 1998).

3.4.1 Différentes protéines G

Il existe quatre familles principales de la sous-unité α constituant différentes protéines G α : Gas, Gai, G α q/11, et G α 12/13. Elles diffèrent entre elles par leurs couplages intracellulaires. Les voies de signalisations induites changent selon la protéine G qui interagit avec le RCPG. En effet les deux sous-unités α et $\beta\gamma$ peuvent activer ou inhiber différents effecteurs comme l'adénylyl cyclase (AC) et la guanylyl cyclase (GC), les phosphodiesterases, la phospholipase A2 (PLA2), la phospholipase C (PLC), le phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate kinase (PI3K) et les canaux ioniques. Cette stimulation ou inhibition des différents effecteurs entraîne une modulation de différents seconds messagers, et induit diverses réponses biologiques (Wettschureck & Offermanns, 2005).

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

- à G α q et ainsi augmenter la mobilisation calcique intracellulaire (D. C. Lin et al., 2002; Soga et al., 2002)

- à Gαi (R. Lin, LeCouter, Kowalski, & Ferrara, 2002) (Lin R. et al. 2002b) et augmenter la signalisation via PKC (Protein Kinase C) MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) ou PI3K (Phosphoinositide 3 Kinase)-AKT,
- à Gαs et augmenter l'accumulation de l'AMPc (Cyclic Adenosine monophosphate) avec activation de la protéine kinase PKA (Negri, Lattanzi, Giannini, & Melchiorri, 2007; E. S. Ngan & Tam, 2008) (Negri et al. 2007, Ngan and Tam 2008).

Dans les cellules endothéliales des capillaires du cortex surrénalien (ACE), la liaison des prokinétines à leurs récepteurs induit l'activation de la PKC (Protein Kinase C)-MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) et/ou PI3K (Phosphoinositide 3 Kinase)-AKT (protéine kinase-B) (D. C. Lin et al., 2002) (Lin et al., 2002). Par ailleurs, il a aussi été rapporté que l'activation des PROKRs dans les cellules CHO transfectées par les ADNc des PROKR1 et 2 induisait la mobilisation de Ca^{2+} intracellulaire. Enfin, les PROKRs activés dans les cellules HEK293 augmenteraient l'accumulation de l'AMPc (J. Chen et al., 2005)(J. Chen et al., 2005)

(Figure 28).

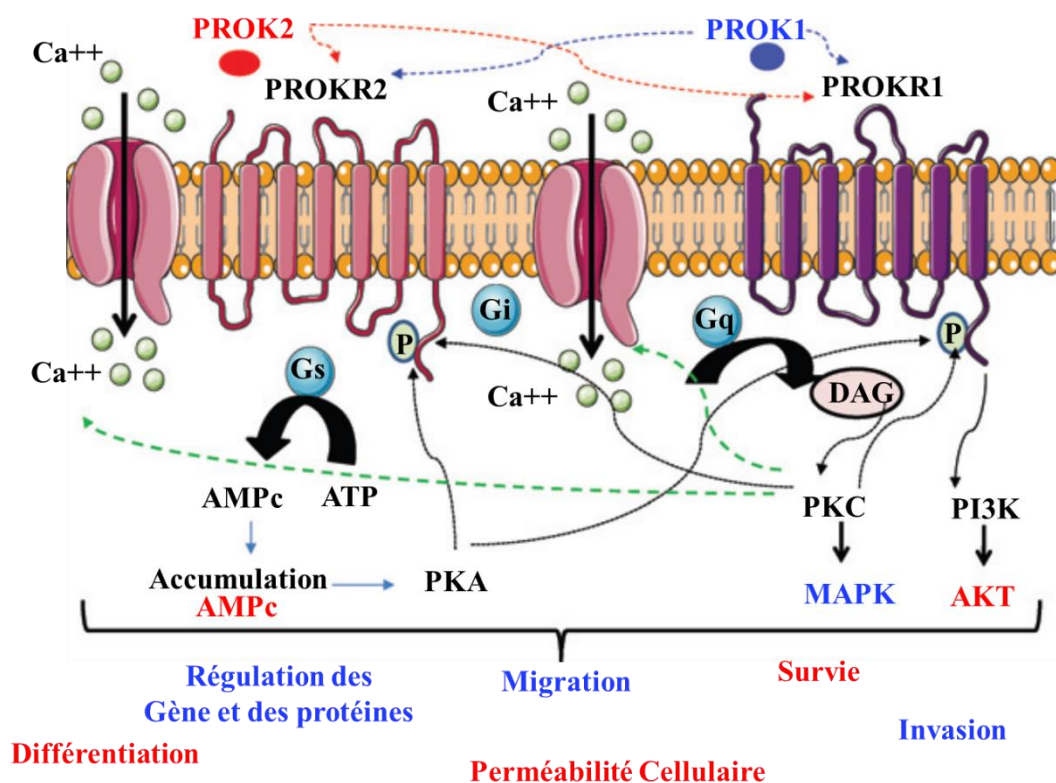


Figure 28. L'activation de PROKR1 ou PROKR2 induit différentes voies de signalisations intracellulaires impliquées dans des activités biologiques multiples.

3.4.4 Affinités des agonistes et antagonistes pour les récepteurs des prokinéticines

Plusieurs études ont été réalisées pour déterminer l'affinité des deux ligands PROK1 (EG-VEGF) et PROK2 (BV8) pour les deux récepteurs de prokinéticines. Les résultats montrent que PROK2 possède la plus forte affinité pour les PROKRs (EC₅₀ de $4,5 \pm 0,8$ nmol/L pour PROKR1 et de $6,4 \pm 1,3$ nmol/L pour PROKR2) (J. Chen et al., 2005). Alors que PROK1 montre une affinité un peu plus modérée pour ces deux récepteurs (EC₅₀ de $27,6 \pm 8,2$ nmol/L pour PROKR1 et de $52,2 \pm 16,4$ nmol/L pour PROKR2) (voir Tableau 5) (J. Chen et al., 2005). A l'inverse de PROK2 β (forme plus courte de PROK2) qui a une haute affinité pour PROKR1, mais une très faible pour PROKR2, l'affinité de PROK1 et PROK2 pour les PROKRs est du même ordre de grandeur (voir Tableau 5). Ces données suggèrent que la liaison des deux ligands à leurs récepteurs peut être contrôlée, à la fois par le niveau d'expression des ligands et par l'expression de leurs récepteurs dans un tissu cible. A ce jour plusieurs antagonistes des deux récepteurs, PROKR1 et PROKR2 ont été synthétisés et testés par différents groupes de recherches (Balboni et al., 2008; Cheng et al., 2012; Jacobson et al., 2011). Ces antagonistes sont de nature non-peptidique avec des affinités différentes pour les deux récepteurs (voir Tableau 5).

Tableau 5.

Agonistes	PROKR1	PROKR2	Référence
Prokineticin-1	EC ₅₀ : 27 nmol/L	EC ₅₀ : 52 nmol/L	Chen et al
Prokineticin-2 (Bv8)	EC ₅₀ : 4.5 nmol/L	EC ₅₀ : 6.4 nmol/L	Chen et al
PK2β peptide	EC ₅₀ : 34 nmol/L	EC ₅₀ : >1000	Chen et al
Antagonistes			
PC 1	IC ₅₀ : 100 nmol/L	IC ₅₀ : 100 nmol/L	Balboni et al
PC-7	IC ₅₀ : 33 nmol/L	IC ₅₀ : 5230 nmol/L	Jacobson et al
PKR-A	-	IC ₅₀ : 48 nmol/L	Cheng MY et al

Tableau des agonistes et antagonistes des récepteurs de prokinéticines.

3.5 Expression des prokinéticines

Les prokinéticines et leurs récepteurs sont exprimés dans de nombreux tissus tels que les ovaires, les testicules, les glandes surrénales, le placenta, l'utérus, le cerveau, le tractus digestif et la moelle osseuse (Boulberdaa, Urayama, & Nebigil, 2011; Brouillet, Hoffmann, Feige, et al., 2012; Ferrara, LeCouter, Lin, & Peale, 2004; Kaser et al., 2003; Maldonado-Perez, Evans, Denison, Millar, & Jabbour, 2007). Plusieurs études ont rapporté des expressions dynamiques de ces protéines en fonction de processus physiologiques comme le rythme circadien (Cheng et al., 2002), le cycle menstruel (Battersby, Critchley, Morgan, Millar, & Jabbour, 2004) et la grossesse (Brouillet, Hoffmann, Feige, et al., 2012). Dans ces systèmes l'expression des prokinéticines est régulée par des effecteurs locaux et/ou par des hormones du système endocrinien. Dans les ovaires, EG-VEGF est régulée par l'hCG, les œstrogènes et par la FSH (hormone folliculo-stimulante) (Fraser et al., 2005; Maldonado-Perez et al., 2007). Dans le placenta, EG-VEGF est régulée par l'hCG, le PPAR γ et par l'hypoxie. Dans le système nerveux, l'expression de PROK2 est soumise aux régulations par le rythme circadien (Cheng et al., 2002; J. D. Li, Hu, & Zhou, 2012). Néanmoins, la nature physiologique de ces régulations reste à déterminer.

3.5.1 Expression des prokinéticines dans le système central et périphérique

La première évidence de l'implication du système PROK2/PROKR2 dans le contrôle neuroendocrinien du système reproducteur chez les mammifères provient des souris invalidées pour les gènes *prok2* et *prokr2*. Les deux souris présentaient un phénotype similaire à celui retrouvé dans le syndrome de Kallman (SK) (Matsumoto et al., 2006). Ce syndrome est caractérisé par une absence du développement pubère associé à une anosmie. L'anosmie serait due à une agénésie du bulbe olfactif suite à une absence de migration des neurones à GnRH (Matsumoto et al., 2006; Pitteloud et al., 2007) (Figure 29). Chez ces souris un défaut de la sécrétion de l'hormone GnRH a été observé, affectant le bon développement et fonctionnement des organes sexuels et causant une infertilité chez les souris mâles et femelles (Guimiot, Teixeira, Dode, Delezoide, & Hardelin, 2011; Masumoto et al., 2006; Pitteloud et al., 2007). Les souris mâles présentaient de petits tubules séminifères avec disparition de lumens et absence de spermatocytes et spermatides haploïdes (Pitteloud et al., 2007). Les souris femelles avaient des cycles d'œstrus perturbés, associés à un développement folliculaire incomplet (Pitteloud et al., 2007).

3.5.2 Expression des prokinéticines dans le système reproducteur mâle.

Dans le testicule, EG-VEGF a été rapporté comme facteur spécifiquement exprimé dans les cellules de Leydig (LeCouter & Ferrara, 2003; Monnier & Samson, 2010), tandis que PROK2 est présent au niveau des tubes séminifères dans les spermatocytes primaires (LeCouter & Ferrara, 2003). La synthèse d'EG-VEGF par les cellules de Leydig a été associée à un rôle de ce facteur dans l'angiogenèse testiculaire (LeCouter & Ferrara, 2003; Samson et al., 2004). L'implication d'EG-VEGF dans le développement tumoral du testicule a aussi été rapportée (Samson et al., 2004). La présence de PROK2 dans les spermatocytes primaires, suggère un rôle de cette protéine dans le processus de la spermatogenèse. Des données récentes ont rapporté une augmentation du taux de l'ARNm de PROK2 dans la varicocèle testiculaire, suggérant un rôle potentiel des prokinéticines dans la prédiction du risque d'infertilité associée à cette pathologie (Pasquali et al., 2006; Tu, Yu, Xiong, & Zhang, 2012). Dans la prostate, PROK1 est principalement synthétisé par l'épithélium glandulaire et son niveau d'expression a été associé au développement de la tumeur prostatique et au degré de malignité (Pasquali et al., 2006) (Figure 29).

3.5.3 Expression des prokinéticines dans le système reproducteur femelle: Ovaires

PROK2 est indétectable dans les organes reproducteurs féminins (Brouillet, Hoffmann, Feige, et al., 2012; Ferrara et al., 2004; Fraser et al., 2005; Hoffmann, Feige, & Alfaidy, 2006). A l'inverse, EG-VEGF constitue le principal membre des prokinéticines associé au développement et au fonctionnement du système reproducteur féminin.

EG-VEGF est abondamment exprimé dans le stroma de l'ovaire, en particulier dans la région hilaire des cellules produisant les hormones stéroïdiennes (Ferrara et al., 2004). L'expression d'EG-VEGF varie au cours du cycle ovarien. Une forte expression est rapportée dans les cellules primordiales, primaires, et secondaires de la granulosa comparée aux follicules tertiaires (Fraser et al., 2005). Après l'ovulation, les taux de l'ARNm d'EG-VEGF augmentent dans les corps jaunes (Fraser et al., 2005). EG-VEGF est abondant dans les cellules de la thèque à partir de 8^{ème} jour post-ovulatoire jusqu'à la fin de la phase lutéale. EG-VEGF a également été rapporté être augmenté dans les follicules atrésiques (Ferrara et al., 2004; Fraser et al., 2005). Des études *in vitro* ont montré que l'expression de d'EG-VEGF est augmentée en réponse au traitement par l'hCG, mais pas en réponse à la progestérone, suggérant un rôle de l'EG-VEGF dans la formation du corps jaune (Fraser et al., 2005). La sécrétion de l'EG-VEGF est également détectée dans le liquide folliculaire (Gao et al., 2011). Par ailleurs, l'injection d'EG-VEGF dans l'ovaire de ratte induit un effet angiogène local

(LeCouter et al., 2001). Récemment, des mutations dans le gène de l'EG-VEGF ont été rapportées dans le syndrome des ovaires polykystique (Fraser et al., 2005), ainsi que dans le syndrome d'hyperstimulation ovarienne (Fraser et al., 2005; Gao et al., 2011; LeCouter et al., 2001) (Figure 29).

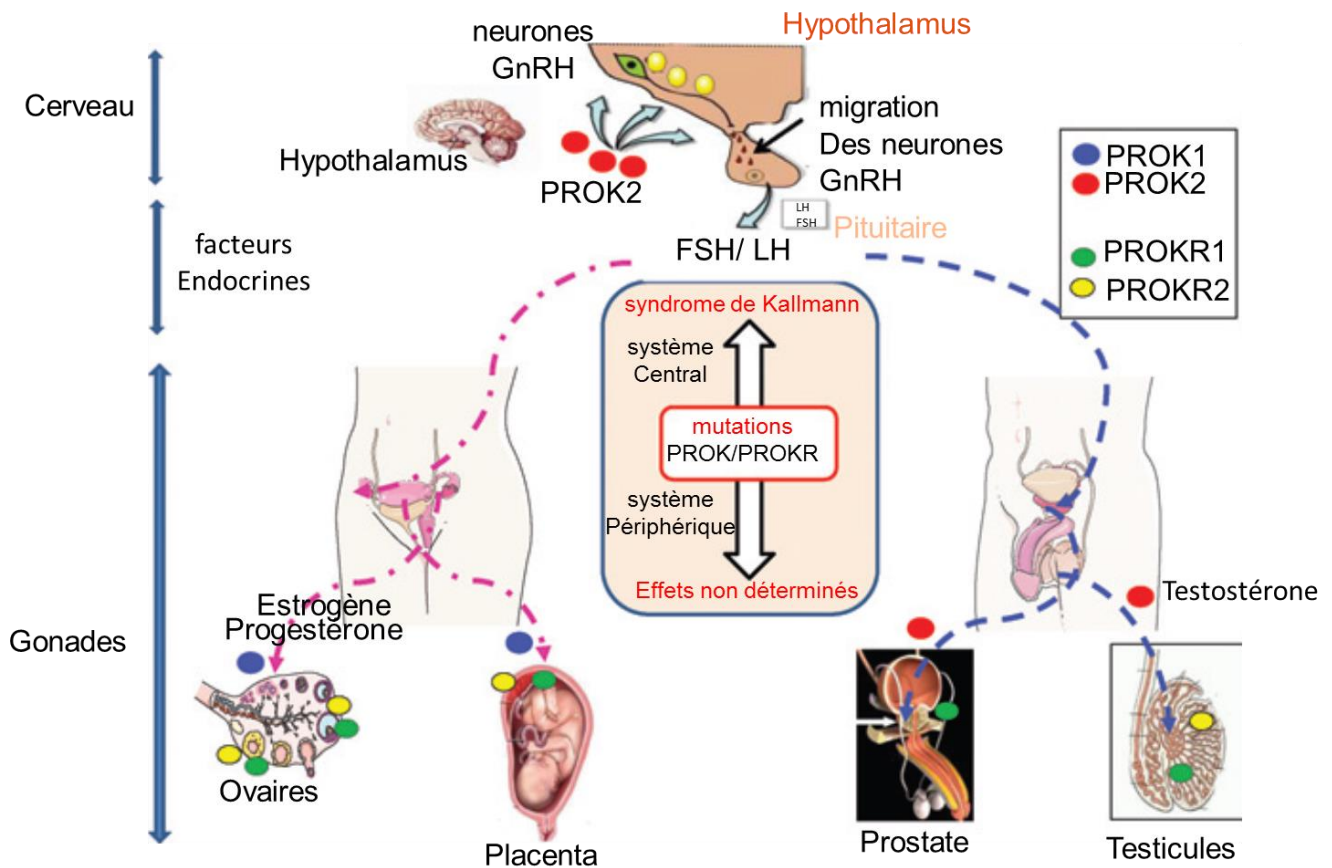


Figure 29: Expression de l'EG-VEGF (PROK1), PROK2 et leurs récepteurs dans le système central et périphérique. PROK1 est associée au système de reproduction périphérique, tandis que PROK2 est associée au système central. Les prokinétines agissent via deux récepteurs exprimés dans le système central et périphérique. Des mutations dans le système PROK/PROKR sont associées au syndrome de Kallmann.

3.5.4 Expression des prokinétines dans le placenta

En 2001 l'équipe de Ferrara avait décrit pour la première fois l'expression de l'EG-VEGF dans le placenta (LeCouter et al., 2001). L'expression placentaire a été confirmée par plusieurs autres études (Burton et al., 2003; Denison, Battersby, King, Szuber, & Jabbour, 2008; LeCouter et al., 2001; Y. L. Lee et al., 2009). Néanmoins, l'essentiel des études relatant son expression, sa régulation et son rôle dans le placenta au cours de la grossesse ont été décrit par notre groupe (Figure 30).

3.5.4.1 Taux de l'EG-VEGF circulant au cours de la grossesse

La première étude rapportant et comparant les taux circulants de l'EG-VEGF chez les hommes, les femmes non-enceintes et femmes enceintes aux trois trimestres de la grossesse a été publiée par notre laboratoire en 2009. (Figure 30). Les taux circulants de l'EG-VEGF étaient détectables dans tous les sera testés. Les taux étaient significativement plus élevés chez les femmes non-enceintes comparés aux hommes, mais significativement plus élevés chez les femmes enceintes au premier trimestre de leur grossesse comparé à toutes les autres conditions. Chez les femmes non enceintes les taux d'EG-VEGF est de l'ordre de 50pg/ml, mais cinq fois plus élevés au cours du 1^{er} trimestre de la grossesse (250 pg/ml) (Hoffmann et al., 2009). Ces taux baissent progressivement au 2^{ème} et 3^{ème} trimestre de la grossesse pour atteindre un niveau d'environ 70 pg/ml au 3^{ème} trimestre de la grossesse (Hoffmann et al., 2009). Ces données suggéraient que le placenta était la principale source de production de cette cytokine. La production abondante de l'EG-VEGF par le placenta a été confirmée *ex vivo* par dosage de sa sécrétion dans les milieux conditionnés de cultures d'explants placentaires du premier trimestre de la grossesse (Brouillet et al., 2010; Hoffmann, Feige, & Alfaidy, 2007). L'EG-VEGF serait aussi produite par les ovaires, et en particulier par les cellules de la granulosa du corps jaune (corpus luteum) pendant la phase lutéale du cycle (Fraser et al., 2005), suggérant qu'au début de la grossesse le placenta ne constituerait pas la seule source d'EG-VEGF.

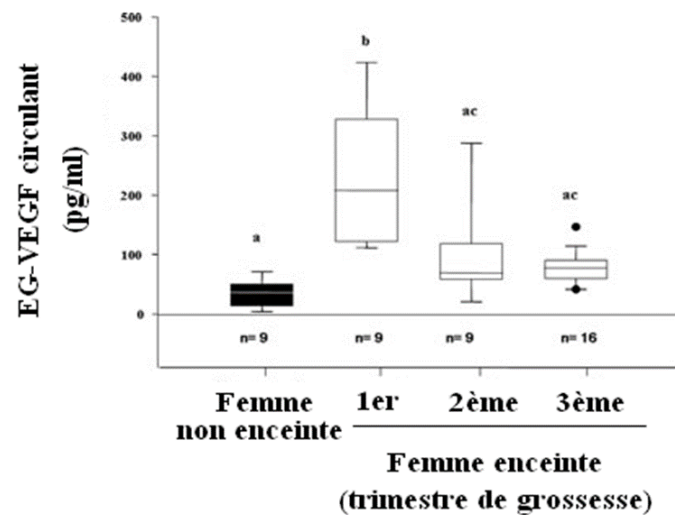


Figure 30. Profil d'expression sérique de l'EG-VEGF au cours de la grossesse. Figure adaptée de Hoffmann et al. 2009

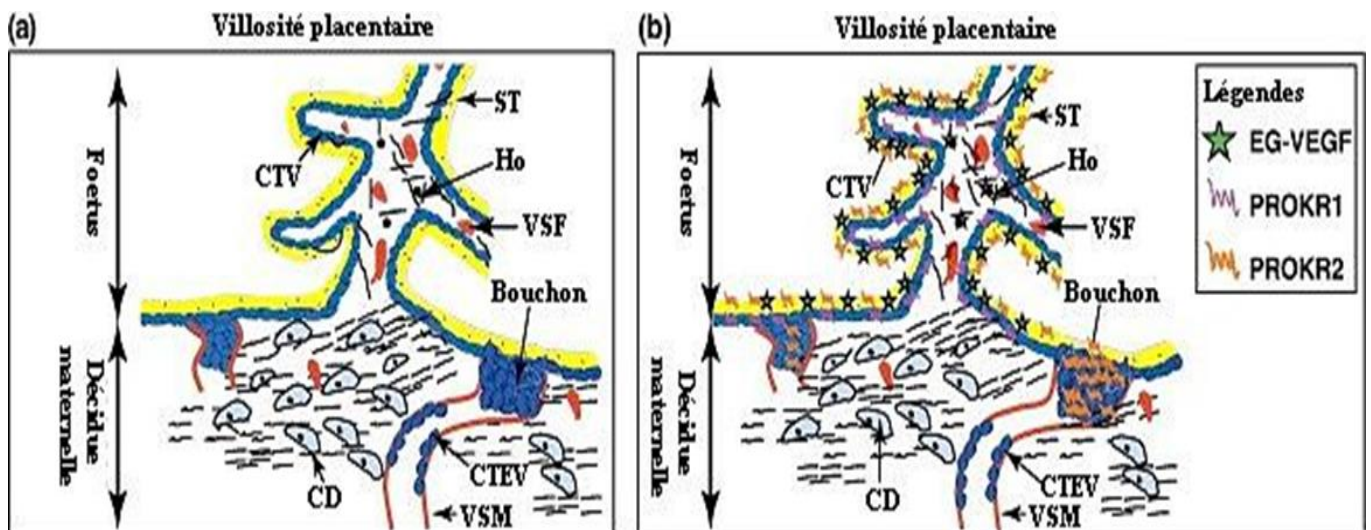


Figure 31. Localisation de l'EG-VEGF et de ses récepteurs dans le placenta au cours du premier trimestre de grossesse.

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

3.5.4.2 Expression placentaire de l'EG-VEGF et de ses récepteurs au cours du 1er trimestre de grossesse

L'expression placentaire de l'EG-VEGF est observée dès la 6^{ème} semaine d'aménorrhée dans les syncytiotrophoblastes (ST), le tissu endocrine du placenta. Son expression est restreinte au ST jusqu'à la 8^{ème} SA, puis détectée dans les cellules de Hofbauer et les CTV à des âges gestationnels plus avancés (9 – 12 SA) (Hoffmann et al., 2006). Aucune expression de l'EG-VEGF n'a été observée dans les cellules trophoblastiques extra-villositaires (CTEV). Au sein de la villosité placentaire, l'expression des deux récepteurs de l'EG-VEGF a aussi été bien documentée. PROKR1 est principalement localisée dans les CTV, tandis que PROKR2 est exprimé dans les ST, les CTEV et les cellules endothéliales microvasculaires placentaires (Hoffmann et al., 2006; Hoffmann et al., 2009) (Figure 31). Au niveau ARN, PROKR1 serait 80 fois plus abondant comparé à celui de PROKR2 dans les cultures primaires de trophoblastes. Le profil d'expression en ARNm et en protéines de l'EG-VEGF et de PROKR1 est similaire. Les deux protéines présentent un pic d'expression entre 10 et 12 SA, avant l'établissement finale de la circulation fœto-maternelle (Hoffmann et al., 2006) (Figure 32). L'expression de PROKR2 est plus stable au cours du 1^{er} trimestre et se maintient au-delà des 10-12 SA (Hoffmann et al., 2006).

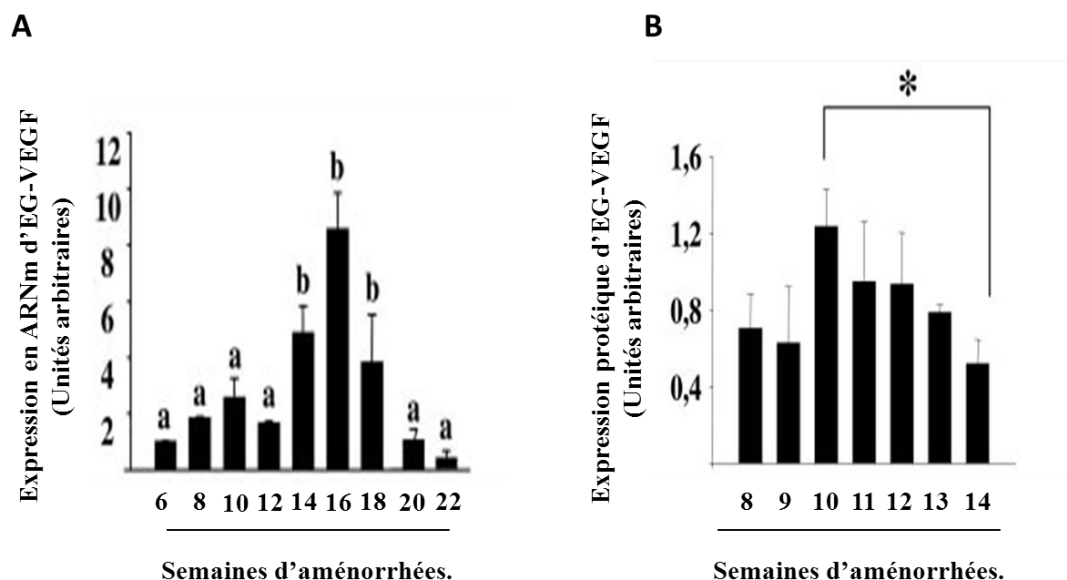


Figure 32. Expression d'EG-VEGF en ARNm et protéine au cours du premier trimestre de la grossesse. Les âges gestationnels sont en semaines de d'aménorrhée (a et b sont significativement différents). Figures adaptées de Hoffmann et al. 2006

3.5.4.3 Expression de l'EG-VEGF et de ses récepteurs au 3^{ème} trimestre de la grossesse

Dans le placenta, les niveaux d'EG-VEGF sont significativement plus bas comparés à ses niveaux au premier trimestre de la grossesse, suggérant son implication dans le développement propre du placenta au début de la grossesse (Hoffmann et al., 2006; Hoffmann et al., 2009). Néanmoins, des études menées par notre équipe sur l'expression de ce facteur et de ses récepteurs dans les composantes extra-utérines comme les membranes fœtales ont démontré que l'EG-VEGF et ses récepteurs sont abondamment exprimés dans le chorion et l'amnion à terme de la grossesse et que ces protéines seraient étroitement associées au déterminisme de l'accouchement au cours du 3^{ème} trimestre de la grossesse (Dunand et al., 2014). Des études actuellement en cours visent à démontrer l'implication potentielle de cette famille de protéines dans les accouchements prématurés.

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

Au vu des grandes similitudes entre la placentation humaine et murine, notre équipe a utilisé la souris gestante comme modèle d'investigation *in vivo* pour l'étude du rôle de l'EG-VEGF. En 2007, notre équipe a rapporté le profil d'expression de l'EG-VEGF et de ses récepteurs tout au long de la gestation murine (Hoffmann et al., 2007). Comme chez la femme enceinte, l'EG-VEGF est majoritairement exprimé au début de la gestation dans le placenta. Le pic d'expression de l'EG-VEGF est atteint à 10,5 jpc (jour post coïtus) correspondant à la fin du premier trimestre de la grossesse chez la femme. EG-VEGF est aussi exprimé par l'unité endocrine du placenta de souris, ie: le syncytiotrophoblaste. De même, les récepteurs de l'EG-VEGF, PROKR1 et PROKR2 sont exprimés dans les mêmes types cellulaires que ceux rapportés pour le placenta humain (Hoffmann et al., 2007). Ces résultats confortaient le choix de l'équipe pour l'utilisation de la souris comme modèle de la caractérisation du rôle de l'EG-VEGF dans la placentation normale et pathologique (Hoffmann et al., 2007).

3.7 Régulations locales de l'expression de l'EG-VEGF

L'expression dynamique de l'EGVEGF au cours de la grossesse suggérait une régulation finement contrôlée dans le temps et dans l'espace. Dans le système reproducteur féminin, différents régulateurs de l'expression de l'EG-VEGF ont été rapportés. Dans les ovaires et l'endomètre EG-VEGF serait régulé par les hormones stéroïdes (les œstrogènes et la progestérone). Dans le placenta, ce facteur est régulé par l'hCG (human Chorionic Gonadotropin), l'hypoxie et par le PPAR γ (Battersby et al., 2004; Brouillet et al., 2010; Garnier et al., 2015; Hoffmann et al., 2006; Maldonado-Perez et al., 2007; E. S. Ngan et al., 2006).

3.7.1 Régulation par l'hypoxie

L'analyse des gènes *prok1* et *prok2* a permis de montrer la présence de sites de liaison HIF-1 alpha (Hypoxia Inducible Factor 1), suggérant une régulation potentielle de ces gènes par l'hypoxie. Plusieurs études de la littérature utilisant différentes lignées cellulaires comme les SW13 et H295R (lignées tumorales de surrénales), les P19 (cellules murines de carcinome embryonnaire) et les HTR-8-Svneo, ont confirmé la régulation de l'EG-VEGF par l'hypoxie (LeCouter & Ferrara, 2003; LeCouter et al., 2001). Ces résultats ont aussi été confirmés dans des cultures de cytotrophoblastes isolés (Hoffmann et al., 2006). Notre équipe a aussi montré que le récepteur PROKR1 est soumis à des régulations par l'hypoxie au cours du premier trimestre de la grossesse (Hoffmann et al., 2006). Ces régulations seraient de type transcriptionnel (Hoffmann et al., 2006). La régulation de l'EG-VEGF et de ses récepteurs par l'hypoxie conforte l'implication directe de ce système dans le développement placentaire au premier trimestre qui se déroule dans un environnement hypoxique.

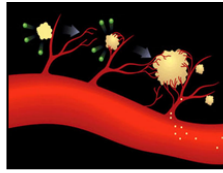
3.7.2 Régulation par l'hCG

Au cours de la grossesse le pic de l'expression (8-10 SA) de l'hCG précède de peu celui de l'EG-VEGF (10-12 SA), suggérant une régulation potentielle de l'EG-VEGF par l'hCG (Brouillet, Hoffmann, Chauvet, et al., 2012). L'hCG est un biomarqueur spécifique de la gestation humaine (Pierce & Parsons, 1981). Elle joue un rôle important dans le maintien de la grossesse, par **i)** la stimulation de la production de progestérone par l'ovaire, **ii)** l'implication dans le développement précoce du placenta en régulant la différenciation trophoblastique (Cronier, Bois, Herve, & Malassine, 1995; Shi, Lei, Rao, & Lin, 1993) et **iii)** le contrôle de l'invasion des cytotrophoblastes extravilleux (Handsuh et al., 2007). Des études chez le babouin ont démontré que l'hCG augmentait l'expression de l'ARNm de l'EG-VEGF. Ces résultats étaient confirmés dans les cellules épithéliales endométriales humaines et dans les cellules déciduales du 1er trimestre (Evans et al., 2009). Dans le placenta humain, la caractérisation de cette régulation a récemment été rapportée par notre groupe en utilisant à la fois des cultures primaires de trophoblastes et des cultures d'explants placentaires du premier trimestre. Dans ces deux systèmes, l'hCG agissait de manière autocrine sur les cellules trophoblastiques pour augmenter à la fois l'expression de l'EG-VEGF et de son récepteur PROKR2. L'ensemble de ces résultats ont permis de proposer de nouvelles boucles de régulations endocrines au niveau du placenta humain (Brouillet, Hoffmann, Chauvet, et al., 2012).

3.7.3 Régulation par les stéroïdes

L'analyse du promoteur du gène *prok1* a révélé un site de liaison potentiel pour SF-1 (Steroidogenic factor-1), facteur transcriptionnel impliqué dans la différenciation stéroïdogénique. En outre, il a été montré que les hormones stéroïdes, telles que les œstrogènes et la progestérone, régulent positivement l'expression de l'EG-VEGF dans les ovaires et dans l'endomètre (Battersby et al., 2004; E. S. Ngan et al., 2006).

EG-VEGF



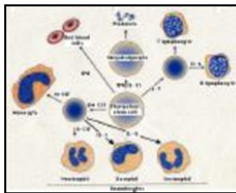
Angiogenèse

(LeCouter Jet al., Nature 2001)
Samson M, JCEM, 2004)
Kilsiouk T, Endocrinology, 2005)

Angiogenèse placentaire

(Brouillet et al MBOC 2012)
Hoffmann et al JCMM 2009;
Brouillet et al, Trends in Endocrinology and metabolism)

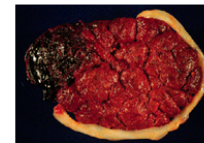
PROK2



Hématopoïèse,

(Lecouter, PNAS., 2004)
Dorsh M, J Leukoc Biol, 2005)

EG-VEGF=PROK1
Et PROK2

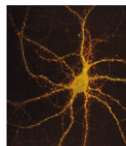


EG-VEGF

Pathologies de la grossesse

(Hoffmann, 2006, 2007, 2009)
Brouillet, 2012, 2013)

PROK2
et PROKR2



Syndrome de Kallmann

(Matsumoto S, PNAS 2006)
(Dodé C, Plos Gent, 2006)
(Pitteloud N, PNAS, 2007)



PROK1 et
PROK2

Motilité GI

(Li et al., 2001)
Hoogerwerf, Neurogastroenterol , 2006

Figure33. Présentation des différentes fonctions physiologiques des prokinétines depuis leur découverte.

3.8 Prokinéticines et angiogenèse

Il est bien établi que les prokinéticines participent activement à l'angiogenèse physiologique dans de nombreux organes comme la glande surrénale, le pancréas, l'ovaire, le testicule, l'endomètre, le placenta et le cœur (Monnier & Samson, 2010) (Figure 33). Les premières propriétés angiogéniques des prokinéticines ont été observées suite à des études *ex vivo* et *in vivo* dans des modèles animaux (Monnier & Samson, 2010). L'administration des prokinéticines dans l'ovaire, le testicule ou la rétine des rongeurs entraîne une forte réponse angiogénique (Monnier & Samson, 2010). Cette réponse s'est manifestée dans l'ovaire par la formation de kystes ovariens et dans la rétine par la croissance d'un réseau vasculaire dans la choroïde (Tanaka, Ikawa, Mata, & Verma, 2006). Au niveau cellulaire, l'incubation des cellules endothéliales bovines primaires du cortex surrénalien en présence de l'EG-VEGF ou de PROK2 a induit des augmentations dans la prolifération, la survie, la migration et la fenestration de ces cellules (LeCouter et al., 2001; LeCouter et al., 2003).

Les prokineticines exercent leur activité angiogénique en se liant et en activant leurs deux récepteurs. L'endothélium provenant de plusieurs tissus distincts montrent une expression différentielle des deux récepteurs PROKR1 et PROKR2 (Guilini et al., 2010). Les cellules endothéliales dérivées du corps jaune (LEC) expriment les deux récepteurs, alors que les cellules endothéliales de l'aorte (CEAB) et des capillaires du cerveau (BCEC) n'expriment que PROKR1. Les cellules endothéliales sinusoidales hépatiques expriment préférentiellement le PROKR2 (Guilini et al., 2010).

Dans des modèles *in vivo*, la surexpression du récepteur PROKR1 dans les cellules cardiaques chez les souris augmente la densité capillaire, le nombre des artérioles, ainsi que le nombre de cellules souches (EPDCs). La surexpression du récepteur PROKR2 n'induit aucun changement dans la densité vasculaire. Cependant, les souris présentent une hypertrophie des cellules endothéliales, avec modifications des jonctions serrées résultant en une "fragilisation" de l'endothélium (Monnier, Piquet-Pellorce, et al., 2008; Urayama et al., 2007; Urayama et al., 2008). En outre, des études *in vitro* ont démontré que l'activation des PROKR1 dans les cellules endothéliales entraîne la prolifération, la migration et la formation de néo-vaisseaux, tandis que les cellules endothéliales exprimant PROKR2 présentent un phénotype cellulaire endothéliale fenestré (Guilini et al., 2010). Il a aussi été proposé que les deux récepteurs puissent avoir des fonctions complémentaires dans la synchronisation de l'angiogenèse. PROKR1 contrôlerait le recrutement de cellules précurseurs impliquées dans la prolifération,

et la stabilisation des vaisseaux sanguins formés; alors que PROKR2 serait impliqué dans la déstabilisation endothéliale qui favorise le bourgeonnement et le rallongement du réseau vasculaire. Ces conclusions méritent d'être validées dans d'autres modèles.

3.9 Prokinéticines et système immunitaire.

En relation avec le système immunitaire, il est à noter que les prokinéticines et en particulier la PROK2 est fortement exprimée par les cellules du système immunitaire comme les lignées des monocytes et granulocytes. Les prokinéticines seraient des protéines du chimiotactisme pour les neutrophiles et les monocytes, et induiraient la survie, la différenciation et l'activation des lignées des granulocytes et des monocytes (Monnier, Quillien, et al., 2008). L'activation des récepteurs des prokinéticines dans ces cellules entraîneraient la libération de médiateurs pro-inflammatoires telles que la cyclooxygénase (COX) -2, le facteur inhibiteur de leucémie (LIF), l'IL-6, CXCL8 et IL-11 (Denison et al., 2008; Evans et al., 2008; Monnier, Quillien, et al., 2008).

3.10 Prokinéticines et cancer

Depuis leur découverte, les prokinéticines ont été associées à plusieurs pathologies en lien avec la vascularisation et l'angiogenèse. Parmi ces pathologies, figure le développement tumoral dans différents organes. Néanmoins, dans toutes ces études les dérégulations des prokinéticines ont été interprétées comme des conséquences du développement de ces cancers.

3.10.1 EG-VEGF et Cancer colorectal

Une étude transcriptomique d'un panel de 113 cancers colorectaux a montré une expression d'EG-VEGF dans 31 cas. Son expression positive a été le plus souvent associée à un faible taux de survie et au développement de métastases (Nagano et al., 2007). *In vitro*, il a aussi été montré que les lignées cellulaires du cancer colorectal expriment fortement la protéine EG-VEGF comparées à des cellules humaines de la muqueuse normale. Aussi l'injection d'une lignée cellulaire du cancer colorectal (SW620), transfectées avec EG-VEGF a causé une augmentation de la néovascularisation locale et des métastases hépatiques (Goi et al., 2004).

3.10.2 EG-VEGF et carcinome de l'endomètre

Au cours des processus implantatoires l'expression de l'EG-VEGF est corrélée au degré de l'angiogenèse endométriale et aux interactions avec le placenta en développement.(Maldonado-Perez et al., 2007). Néanmoins, la seule étude publiée à ce jour a démontré qu'EG-VEGF ne serait pas associée au développement du cancer de l'endomètre car sa présence a été rarement détectée dans les échantillons du cancer de l'endomètre. Toutefois,

compte tenu du fait qu'EG-VEGF induit la fenestration et augmente la perméabilité microvasculaire, il n'est pas à exclure que ce facteur pourrait être impliqué dans les métastases associées à ce type de cancer (E. S. Ngan et al., 2006).

3.10.3 EG-VEGF et cancer de l'ovaire

EG-VEGF est exprimé d'une façon dynamique dans l'ovaire au cours du cycle menstruel, et est considéré à la fois comme un facteur mitogène pour les cellules stéroïdogènes et un facteur pro-angiogénique pour les cellules du corps jaune. Ces effets seraient principalement induits par activation des voies de signalisation impliquant le récepteur PROKR1 (Kisliouk, Podlovni, & Meidan, 2005; Kisliouk, Podlovni, Spanel-Borowski, et al., 2005). L'expression de l'EG-VEGF serait abaissée dans les stades les plus avancés du développement tumoral. Cependant, un rôle potentiel pour cette cytokine dans les processus angiogéniques accompagnant les premiers stades du développement d'un cancer ovarien a été proposé. EG-VEGF serait exprimée dans les cellules stromales et les cellules de lymphocytes T tumorales infiltrant l'organe (Zhang et al., 2003).

3.10.4 EG-VEGF et Cancer de la prostate

L'expression des prokinéticines et de leurs récepteurs a aussi été étudiée dans le cancer de la prostate. L'expression de l'EG-VEGF serait faible dans la prostate normale, mais significativement augmentée en lien avec le degré de malignité (Pasquali et al., 2006). EG-VEGF serait localisée dans les cellules épithéliales glandulaires. PROK2 ainsi que les deux récepteurs PROKR1 et PROKR2 seraient exprimés dans des cultures primaires des cellules épithéliales isolées à partir du cancer de la prostate (Pasquali et al., 2006).

3.10.5 EG-VEGF et Cancer des testicules

Dans une étude comparant les niveaux d'expression de l'EG-VEGF dans différentes tumeurs testiculaires, incluant les tumeurs des cellules de Leydig, les séminomes et les tumeurs des cellules germinales non séminomateuses, il a été rapporté que cette protéine serait majoritairement exprimée dans les tumeurs des cellules de Leydig. Les récepteurs PROKRs seraient exprimés dans l'endothélium testiculaires, suggérant une implication du système EG-VEGF/PROKRs dans l'angiogenèse néoplasique du testicule (Samson et al., 2004).

Résumé Chapitre III

EG-VEGF (Endocrine Gland–Vascular Endothelial Growth Factor): est la forme canonique des protéines de la famille des prokinétines identifiée par l'équipe de Ferrara. EG-VEGF a été rapportée comme facteur angiogénique spécifique des organes stéroïdes endocriniens. Elle est exprimée dans l'ovaire, le testicule, les glandes surrénales et le placenta.

Bien qu'EG-VEGF ne montre aucune homologie de séquence avec la famille de VEGF, elle est aussi impliquée dans l'activation de voies de signalisation comme les MAPK p44/42 (Mitogen-Activated Protein-kinase) et PI3K (Phosphatidylinositol-3 kinase) induisant la prolifération, la migration et la survie des cellules endothéliales, processus également induits par le VEGF. EG-VEGF agit via deux récepteurs transmembranaires couplés aux protéines G, dénommées PROKR1 et PROKR2. Les prokinétines sont régulés par un paramètre clé de l'angiogenèse normale et pathologique, qu'est l'hypoxie. Les gènes *prok1* et *prok2* possèdent des sites de liaison au facteur HIF-1alpha et sont induits par de faibles tensions en oxygène. Il est bien établi que les prokinétines participent activement à l'angiogenèse physiologique dans de nombreux organes comme la glande surrénale, le pancréas, l'ovaire, le testicule, l'endomètre, le placenta et le cœur. Depuis leur découverte, les prokinétines ont été associées à plusieurs pathologies en lien avec la vascularisation et l'angiogenèse. Parmi ces pathologies figure le développement tumoral dans différents organes et notamment dans l'appareil reproducteur mâle et femelle. L'EG-VEGF serait associée au développement du cancer de l'endomètre, de la prostate ; des testicules et de l'ovaire, mais son rôle reste inconnu dans le **développement tumoral placentaire**.

VE-Cadhérine

4. Cadhérines épithéliales et endothéliales

Les principaux récepteurs des jonctions adhérentes sont des protéines membranaires appelées cadhérines. Ces molécules d'adhérence, Ca^{2+} -dépendantes, sont impliquées dans les interactions cellulaires. Les cadhérines sont impliquées dans plusieurs fonctions comme le maintien de l'épithélium et la formation de la barrière endothéliale (Dejana, 2004; Dejana, Orsenigo, & Lampugnani, 2008; Takeichi, 2011). L'interaction des cadhérines avec l'actine intracellulaire du cytosquelette permet la stabilisation des jonctions cellulaires et le maintien de la forme et la polarité des cellules (Dejana, 2004). Ces protéines assurent la régulation dynamique de l'ouverture et la fermeture des jonctions cellulaires (Dejana, 2004). La dénomination des différentes cadhérines a été établie en fonction des tissus dans lesquels ils sont exprimés. Par exemple, la (E)-cadhérine est le constituant principal des jonctions adhérentes des cellules épithéliales, tandis que la (VE)-cadhérine est exprimée d'une manière sélective dans les jonctions adhérentes des cellules endothéliales et la N-cadhérine est exprimée dans le tissu neural mésenchymateux et endothélial. En plus de leurs fonctions mécaniques, les cadhérines activent des voies de signalisations impliquées dans la prolifération, la motilité, la survie cellulaire, ainsi que l'homéostasie tissulaire (Dejana, 2004; Giannotta, Trani, & Dejana, 2013). Ces activités sont induites par l'intermédiaire de protéines de la jonction intracellulaire comme la β -caténine (Berx & van Roy, 2009; Giannotta et al., 2013; Yilmaz & Christofori, 2009). De plus, les cadhérines peuvent interagir avec des récepteurs et des facteurs de croissance modulant leurs activités et leurs signalisations. Par exemple, la VE-cadhérine régulerait l'activité des récepteurs du VEGF, du facteur de croissance TGF- β , et du facteur de croissance fibroblastique (FGF) (Giannotta et al., 2013). Les cellules endothéliales expriment aussi la N-cadhérine, mais dans la plupart des cas seule la VE-cadhérine est localisée au niveau des jonctions cellulaires (Giampietro et al., 2012). Le rôle de la N-cadhérine dans les cellules endothéliales est partiellement compris. Il est probable que la N-cadhérine favorise le contact et la communication des cellules endothéliales avec d'autres types cellulaires, comme les pericytes (Giannotta et al., 2013).

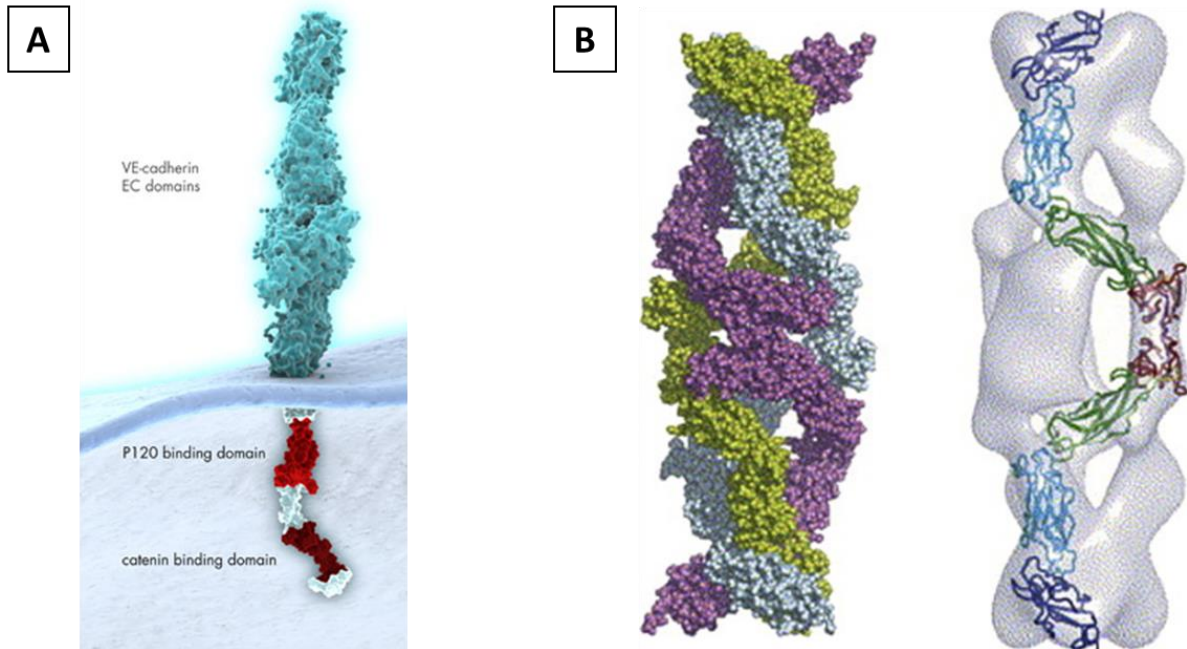


Figure 34. (A) Structure de la VE-cadhérine. La partie extracellulaire est responsable de la formation des homodimères trans avec les cellules voisines. Le compartiment cytoplasmique intracellulaire peut interagir avec l'actine du cytosquelette. (<http://www.sabiosciences.com/>). (B) Modèle d'assemblage hexamérique du domaine extracellulaire de la VE-cadhérine d'après Hewat et al .2007.

4.1 Structure de la VE-cadhérine.

La VE-cadhérine est une glycoprotéine transmembranaire de type I de 125 kDa, et composée de 784 acides aminés. Le domaine extracellulaire est formé de cinq ectodomaines (EC1 à 5) d'environ 100 acides aminés chacun (Figure 34). Les domaines EC1 à EC4 sont composés de structures en feuillet β alors que le domaine EC5, le plus proche de la membrane, comprend quatre résidus cystéines à l'origine de deux ponts disulfures. Le domaine transmembranaire (TM) est constitué de 21 acides aminés. Le domaine cytoplasmique (162 acides aminés) comporte également plusieurs sites potentiels de phosphorylations (Ser, Thr, Tyr) (Dejana et al., 2008).

4.2 Signalisation de la VE-cadhérine

En plus de l'interaction avec plusieurs molécules qui confèrent à la VE-cadhérine son caractère adhésif et son maintien de la barrière endothéliale (Dejana et al., 2008), il a été montré que la VE-cadhérine peut interagir avec VEGF-R2 (Le récepteur 2 du VEGF, également connu sous le nom de Flk1). Cette interaction a été décrite dans les cellules endothéliales quiescentes, où la VE-cadhérine régulerait l'action anti-apoptotique induite par VEGF-R2 (Carmeliet et al., 1999; Grazia Lampugnani et al., 2003; Lampugnani, Orsenigo, Gagliani, Tacchetti, & Dejana, 2006). L'interaction VE-cadhérine / VEGF-R2 est aussi connue pour l'activation de plusieurs voies de signalisations impliquées dans différents processus au cours de l'angiogenèse comme la migration, la perméabilité et le branchement des cellules endothéliales (Abraham et al., 2009; Cook, Ferrari, Pintucci, & Mignatti, 2008; Gaengel et al., 2012; Hayashi et al., 2013; Venkatesh et al., 2011; Weis et al., 2004). Des études antérieures ont montré que la VE-cadhérine active d'autres récepteurs de l'angiopoïétine 1, le Tie2, le TGF β -R2 (facteur de croissance transformant récepteur) et le FGF (fibroblast growth factor) (Fukuhara et al., 2008; Hayashi et al., 2013; Murakami et al., 2008; Rudini et al., 2008; Saharinen et al., 2008; Winderlich et al., 2009). En plus de l'activation de récepteurs membranaires, la VE-cadhérine peut activer des molécules intracellulaires comme les GTPases; Ras (Birukova et al., 2012; Braga, Del Maschio, Machesky, & Dejana, 1999; Lampugnani et al., 2002) et augmenter l'activité catalytique de PI3K (phosphoinositide 3 kinase) (Carmeliet et al., 1999; Taddei et al., 2008). Finalement, la VE-cadhérine peut augmenter le contact cellulaire et stabiliser la barrière par un mécanisme de signalisation « Outside-in » qui implique la voie de signalisation de calcium et des modifications dynamiques des microtubules (Taddei et al., 2008).

4.3 Régulation de la VE-cadhérine par phosphorylation

Les protéines des jonctions endothéliales présentent plusieurs sites de phosphorylation. Il a été montré que la phosphorylation de ces protéines jonctionnelles peut être induite en réponse au VEGF et à d'autres facteurs inflammatoires comme l'histamine et la thrombine (Rabiet et al., 1996). Cette phosphorylation a été corrélée à la dissociation des cellules endothéliales (Esser, Lampugnani, Corada, Dejana, & Risau, 1998). En effet comme la VE-cadhérine présente une analogie aux récepteurs de facteurs de croissance, cette dernière peut être phosphorylée sur plusieurs résidus tyrosine dans son domaine cytoplasmique. Ce domaine présente des sites tyrosines cibles pour une phosphorylation par des tyrosines kinases. Cette phosphorylation permet ensuite une interaction avec des protéines à domaines SH2.

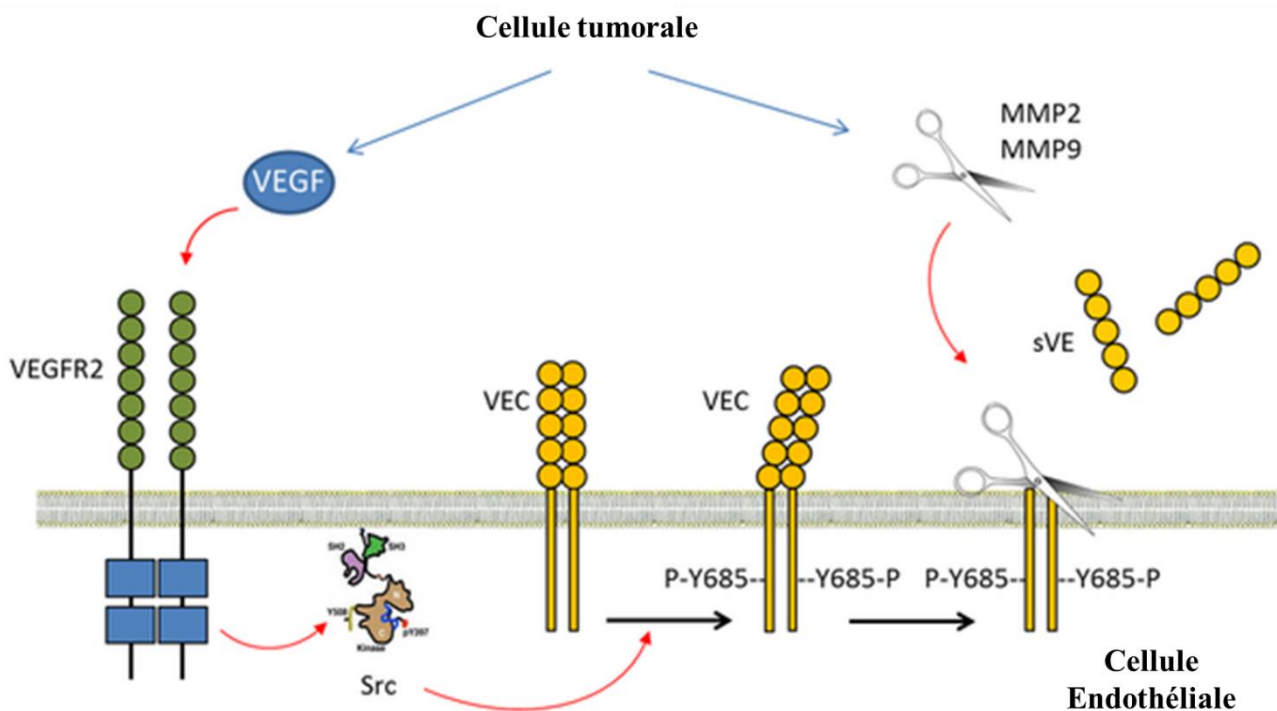


Figure 35. Schéma pour le mécanisme hypothétique d'un lien entre la VE-cadhérine phosphorylation et le clivage. D'après Vilgrain et al 2012.

4.4 Sites de phosphorylation de la VE-cadhérine humaine:

Le domaine cytoplasmique de la VE-cadhérine présente plusieurs sites de phosphorylation sur tyrosines : Y645, Y658, Y685, Y731 et Y733. L'activation de ces sites serait impliquée dans la stabilité de la barrière endothéliale (Orsenigo et al., 2012; Potter, Barbero, & Cheresch, 2005; Turowski et al., 2008; Wallez et al., 2007). Des études récentes de notre laboratoire ont démontré par des essais d'activité kinase *in vitro* et des analyses par carte peptidique *in cellulo*, que la VE-cadhérine est un substrat de Src en réponse au VEGF et que seule la tyrosine (Y685) serait phosphorylée. Cette phosphorylation est un pré-requis à la migration des cellules endothéliales stimulées par VEGF (Wallez et al., 2007) . Ces résultats ont été confirmés par d'autres laboratoires (Baumeister et al., 2005). Par ailleurs, des phosphorylations sur la sérine 665 induite par PAK (p21 activated kinase) ont aussi été rapportées (Gavard & Gutkind, 2006). De façon intéressante, les études de notre laboratoire ont montré que la phosphorylation de la tyrosine 685 est impliquée dans le processus de clivage de la partie extracellulaire de la VE-cadhérine dans les cellules endothéliales. Ce clivage libérerait une forme soluble de la VE-cadhérine dénommée, VE-cadhérine soluble (sVE). Il a été démontré que le clivage de la VE-cadhérine serait associé à une baisse de l'adhésion cellulaire conduisant à une augmentation de la perméabilité de la barrière endothéliale (Figure 35).

4.5 Cadhérines et cancer

Au cours du développement tumoral, les cellules cancéreuses acquièrent des capacités qui leur permettent de maintenir leur prolifération, d'échapper à l'apoptose, d'envahir les tissus et de former des métastases à distance. Une des caractéristiques de la progression tumorale d'un cancer est la perte de son phénotype épithélial et le gain de caractéristiques mésenchymateuses, processus appelé « Transition Epithélio-Mésenchymateuse » (TEM) (Micalizzi, Farabaugh, & Ford, 2010; Yilmaz & Christofori, 2009). La TEM est souvent associée à la perte de l'expression de la E-cadhérine (Yilmaz & Christofori, 2009). Cette perte serait due à une activation de répresseurs de la transcription tels que, Snail, Slug, Zeb et Twist (Peinado, Olmeda, & Cano, 2007).

Il est actuellement bien établi que les cellules tumorales colonisent d'autres sites grâce suite à leur passage dans la circulation sanguine. Des anomalies structurales ont été observées dans la vascularisation tumorale qui présente de nombreuses « ouvertures » (« fenestrae » endothéliales, vésicules et trous trans-cellulaires), de larges jonctions inter-endothéliales et une membrane

basale discontinue ou absente (Baluk, Hashizume, & McDonald, 2005) (Figure 36). L'ensemble de ces anomalies transforme les vaisseaux sanguins tumoraux en vaisseaux non rigides avec une perméabilité facilitant les métastases des cellules cancéreuses par voie sanguine (Baluk et al., 2005). Les études actuelles suggèrent fortement que la déstabilisation de la VE-cadhérine au niveau des jonctions endothéliales contribuerait à l'extravasation des cellules tumorales. A ce jour, peu d'études ont caractérisé le mécanisme par lequel les cellules tumorales affectent la barrière endothéliale.

De façon intéressante, des résultats très récents de l'équipe du Dr Vilgrain ont montré que la sVE circulante est augmentée dans le glioblastome (Vilgrain et al., 2013). Néanmoins le mécanisme de ce clivage reste à déterminer dans cette pathologie. Cette équipe a aussi démontré dans un autre travail que la sVE est augmentée dans la pathologie de l'athérosclérose suite au clivage de la VE-cadherin, en réponse aux traitements par le TNF α (Sidibe et al., 2012).

Le clivage de la VE-cadhérine peut aussi avoir lieu suite à l'exposition de la VE-cadhérine à des métallo-protéases comme l'élastase, la cathepsine G ou à des concentrations minimale de trypsine (Hermant et al., 2003; Herren, Levkau, Raines, & Ross, 1998; Luplertlop et al., 2006). Il existe d'autres enzymes de la famille des métalloprotéases susceptibles d'induire la protéolyse de la VE-cadhérine comme, la métallo-protéase ADAM-10 (A Disintegrin And Metalloprotéase-10 (Hermant et al., 2003; Herren et al., 1998; Luplertlop et al., 2006).

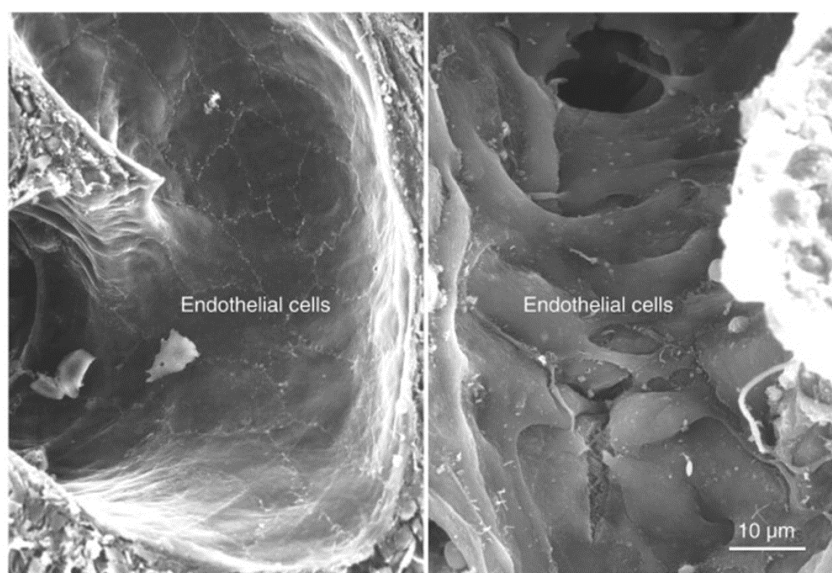


Figure 36. Image de micrographie électronique de l'intérieur de vaisseaux sanguins normal (gauche) et tumoral (droite). D'après Baluk, 2005.

Résumé Chapitre IV

Il est bien établi que le tissu épithélial et endothélial sont composés de couches de cellules interconnectées par des jonctions cellulaires, notamment les jonctions adhérentes et les jonctions serrées. Les principaux récepteurs d'adhérence des jonctions adhérentes sont des protéines membranaires appelées cadhérines. La VE-cadhérine, pour Vascular endothelial-cadherin, est une protéine d'adhérence exprimée d'une manière sélective dans les jonctions adhérentes des cellules endothéliales. La présence de la VE-cadhérine dans les jonctions cellulaires est nécessaire pour le maintien de l'intégrité de la couche endothéliale et l'inhibition de contact des cellules endothéliales. La VE-cadhérine est une glycoprotéine transmembranaire de type I de 125 kDa, composée de 784 acides aminés. Le domaine cytoplasmique de la VE-cadhérine présente plusieurs sites de phosphorylations sur des tyrosines, potentiellement impliquées dans la stabilité de la barrière endothéliale, la phosphorylation de la VE-cadhérine sur son site y685 induit son clivage et la libération de la partie soluble (sVE-cadhérine). La vascularisation tumorale se caractérise par l'abondance de vaisseaux sanguins de morphologie hétérogène avec souvent des formes irrégulières. Cette désorganisation serait favorable à l'intravasation des cellules tumorales à travers l'endothélium pour gagner la circulation sanguines et les sites métastatiques par la suite.

OBJECTIFS

Le laboratoire de la Biologie du Cancer et de l'Infection dirigé par le Dr. Jean-Jacques Feige est composé de trois équipes de recherche dont l'activité principale est centrée sur l'étude et la compréhension de la biologie du cancer et de l'infection. Notre équipe au sein de cette unité s'intéresse à l'étude de l'invasion cellulaire dans un contexte physiologique et tumoral. Au sein de cette équipe le groupe du Dr Nadia Alfaidy, directrice de cette thèse, s'intéresse à l'étude de l'invasion de la cellule trophoblastique au cours de la grossesse, à la fois dans le contexte physiologique et physiopathologique : cas de la pré-éclampsie et du choriocarcinome.

Les études de notre groupe sont focalisées sur un nouveau facteur de l'angiogenèse, EG-VEGF (Endocrine Gland-derived Vascular Endothelial Growth Factor).

J'ai réalisé cette thèse au sein du groupe « Placenta » fondé et dirigé par le Dr. Nadia Alfaidy depuis 2003. Le groupe s'intéresse au rôle de l'EG-VEGF dans la placentation normale et pathologique. Les travaux de l'équipe ont démontré l'expression de l'EG-VEGF et de ses récepteurs dans le placenta humain et murin (Hoffmann et al. 2006, 2007), ont mis en évidence leur régulation par l'hypoxie, l'hCG et le PPAR γ dans les villosités chorales (Hoffmann et al. 2006 ; Brouillet et al. 2012, Garnier et al, 2014), et ont caractérisé leur expression dans les pathologies de la pré-éclampsie (PE) et du Retard de Croissance Intra-Utérin (RCIU) (Hoffmann et al. 2009, Brouillet 2013). De plus l'équipe a démontré le rôle angiogénique de l'EG-VEGF dans les cellules endothéliales microvasculaires placentaires, les HPEC (Brouillet et al. 2010).

L'implication de l'EG-VEGF dans différents types de cancer et en particulier dans les cancers du système reproducteur a été bien rapportée par plusieurs équipes de recherche. Néanmoins, l'investigation de l'implication potentielle de l'EG-VEGF dans le développement des tumeurs placentaires n'a jamais été abordée. Le projet de cette thèse avait pour objectif l'étude et la caractérisation du rôle de L'EG-VEGF dans les complications rares de la grossesse, les moles hydatiformes qui évoluent très souvent en un cancer malin du placenta, le choriocarcinome.

Trois approches ont été développées

- La première est fondamentale, impliquant la caractérisation de l'EG-VEGF et de ses récepteurs dans une lignée tumorale du choriocarcinome humain, les cellules JEG3.
- la deuxième est clinique, impliquant le dosage de l'EG-VEGF circulant dans les mûles hydatiformes complètes, dans le but d'estimer sa valeur informationnelle dans la prédiction et l'évolution de ces mûles vers des tumeurs trophoblastiques gestationnelles TTG.
- la troisième repose sur le développement d'un nouveau modèle animal du choriocarcinome, avec la particularité de l'injection des cellules tumorales humaines directement dans le placenta de souris immunodéficientes et gravides.

Résultats

EG-VEGF : Nouvelle cible thérapeutique dans la progression du choriocarcinome: Etudes *in vitro*, *in vivo* et cliniques.

I Contexte et présentation de la publication.

Le choriocarcinome est une tumeur trophoblastique maligne qui peut se développer à partir d'une grossesse normale ou anormale. Le plus souvent, cette lésion maligne apparaît suite à une môle hydatiforme complète (MHC) ou partielle (MHP), un avortement spontané ou une grossesse ectopique (Froeling & Seckl, 2014; Stevens et al., 2015). Les patientes qui développent une MHC ou une MHP ont un risque élevé de développer un choriocarcinome. Néanmoins, ce risque est beaucoup plus élevé pour une MHC (20%) comparé à une MHP (1,5%). Le choriocarcinome est une tumeur très métastatique en raison de la propriété invasive et intrinsèque des cellules trophoblastiques. Le diagnostic et le suivi de la progression du choriocarcinome sont actuellement basés sur le dosage des taux circulants de l'hormone hCG (gonadotrophine chorionique humaine), sécrétée par le syncytiotrophoblaste (Esfandiari & Goldberg, 2003). Néanmoins, les tests de mesures de l'hCG ont été récemment rapportés comme associés à la génération de faux positifs obligeant certaines patientes à subir des procédures thérapeutiques invasives et inutiles, comme la chimiothérapie, l'hystérectomie, et d'autres chirurgies (Olsen, Hubert, & Nycum, 2001; Sasaki, Sasaki, & Iino, 2010). Ainsi, il est essentiel de développer de nouvelles approches de diagnostic, de suivi et de thérapeutique, plus spécifiques et moins toxiques pour le traitement de ce type de cancer.

Il est bien établi que la progression de la MHC vers un choriocarcinome est régit par l'acquisition par cellules trophoblastiques d'un caractère hyper-prolifératif (Louwen et al., 2012). Ce phénomène se traduit dans un deuxième temps par l'apparition d'amas cellulaires qui acquièrent un phénotype migratoire et invasif.

De façon intéressante, notre groupe a récemment démontré qu'un nouveau facteur dénommé EG-VEGF (Endocrine Glande derived Vascular Endothelial Growth Factor), fortement exprimé par le placenta, régulé par l'hCG, par l'hypoxie et par le PPAR α contrôle de façon positive la prolifération des cellules trophoblastiques au cours du premier trimestre de la grossesse. EG-VEGF est également appelé prokinéticine-1, il appartient à une nouvelle famille de cytokines, « les prokinéticines » (LeCouter et al., 2001; M. Li et al., 2001). L'expression de l'EG-VEGF est spécifique des tissus endocriniens, y compris le placenta (Brouillet, Hoffmann, Feige, et al., 2012). EG-VEGF exerce ses effets par l'intermédiaire de deux récepteurs couplés aux protéines G, appelés PROKR1 et PROKR2.

EG-VEGF a été récemment rapporté comme étant associé au développement de multiples tumeurs des organes reproducteurs comme les ovaires (Zhang et al., 2003), les testicules (Samson et al., 2004) et de la prostate (Pasquali et al., 2006). Ces résultats suggèreraient l'implication potentielle de ce facteur dans le développement tumoral placentaire et dans la progression de la MHC vers un choriocarcinome.

A ce jour, aucune étude ne s'est intéressée au rôle que pourrait jouer l'EG-VEGF dans le développement et la progression du choriocarcinome.

Au moment d'entreprendre ce projet, nous savions que l'étude de l'implication de l'EG-VEGF dans le développement tumoral placentaire pouvait être réalisée *in vitro*, via l'utilisation de cellules tumorales placentaires comme les cellules JEG3, et en analysant des cohortes de patientes ayant des MHC et/ou des choriocarcinomes. En revanche, l'étude de l'implication de l'EG-VEGF dans la progression du choriocarcinome, une fois développé par le placenta n'était possible que par l'utilisation de modèle animaux du choriocarcinome.

A la lumière de l'ensemble de ces informations sur l'EG-VEGF, nous avons mené cette étude en commençant par l'étude *in vitro*, impliquant l'utilisation de la lignée cellulaire isolée d'un choriocarcinome humain, les cellules JEG3. Grâce à cette lignée, nous avons déterminé l'effet de l'EG-VEGF dans différents processus de la tumorigenèse comme la prolifération, la migration et l'invasion cellulaire. Des antagonistes des deux récepteurs de l'EG-VEGF ont été utilisés pour démontrer l'implication directe de l'EG-VEGF dans le développement tumoral, et potentiellement les proposer comme de nouveaux agents thérapeutiques de ce type de cancer.

La partie clinique de ce projet a concerné le dosage de l'EG-VEGF circulante dans les sera de patientes MHC et/ou ayant un choriocarcinome. Cette partie du projet a été possible grâce à la coopération développée entre notre laboratoire INSERM et le CNRST (Centre National Marocain de la Recherche en Santé et Technologie). Cette coopération nous a permis de collecter au niveau du CHU de Casablanca, 38 sera de patientes MHC et 3 échantillons de choriocarcinome. Le choix du Maroc était basé sur le fait que dans ce pays l'incidence du développement du choriocarcinome est encore élevée (4,5‰ grossesses) comparé aux pays occidentaux (1‰ grossesse).

La troisième partie impliquant le travail sur un modèle animal du choriocarcinome a été possible suite au développement d'un modèle animal du choriocarcinome, original et différent de ceux publiés, à ce jour. En effet les modèles animaux proposés dans la littérature

préconisent l'injection en sous-cutané ou en intraveineux des cellules tumorales placentaires. Ces modèles ne nous intéressaient pas car la tumeur ne se développait pas depuis son site initial. En l'absence d'un modèle animal mimant au plus près le choriocarcinome, nous avons développé un nouveau modèle avec une injection orthotopique des cellules cancéreuses dans le placenta chez des souris gravides. L'avantage de ce modèle est que les cellules tumorales évoluent dans un environnement gestationnel et depuis le site de leur développement initial.

EG-VEGF, a new therapeutic target in choriocarcinoma progression: *in vitro, in vivo and clinical studies.*

W. Traboulsi^{1,2,3}, F. Sergent^{1,2,3}, S. Brouillet^{1,2,3,4}, P. Hoffmann^{1,2,3,4}, M. Benlahfid⁵, H. Boufettal⁵, QY. Zhou⁸, F. Balboni⁷, T. Aboussaouira⁵, J.J. Feige^{1,2,3}, M. Benharouga^{2,3,6}, and N. Alfaidy^{1,2,3}.

Short title: EG-VEGF contributes to choriocarcinoma progression

1. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 1036, Grenoble. France
2. University Grenoble-Alpes, 38000, Grenoble, France
3. Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives (CEA), Bioscience and Biotechnology Institute of Grenoble, Grenoble, France
4. University Hospital of Grenoble, Department of Obstetrics and Gynaecology, and Laboratoire d'Aide à la Procréation-CECOS, La Tronche, France
5. University Hassan II, Casablanca. Faculty of Medicine and Pharmacy. Ibn Rochd Hospital of Casablanca, Obstetrics and Gynecology department, Morocco.
6. Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 5249, Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, Grenoble, France.
7. Department of Life and Environmental Sciences, University of Cagliari, Italy
8. Department of Pharmacology, University of California, Irvine, California, USA

Word account:

No Disclosure

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

Abstract

Choriocarcinoma (CC) is the most malignant gestational trophoblastic disease that often develops from complete hydatidiform moles (CHM). Neither the mechanism of CC development nor its progression are yet characterized. We recently identified EG-VEGF as a key placental factor that acts *via* two G protein-coupled receptors called PROKR1 and PROKR2. Here, we hypothesized that EG-VEGF might constitute a potential marker and/or target for CC. Three approaches were used: a clinical investigation encompassing measurement of circulating EG-VEGF in control, CHM and CC patients, an *in vitro* study investigating EG-VEGF effects on the choriocarcinoma cell line JEG3, and an *in vivo* study involving the development of a new CC mouse model through direct injection of JEG3-luc cells in the placenta of gravid SCID mice. This unique model served to test the effects of EG-VEGF receptors antagonists on CC progression. We demonstrated that both placental and circulating EG-VEGF levels were significantly increased in CHM and CC patients and that EG-VEGF increased JEG3 proliferation, migration and invasion, using both 2D and 3D cultures. In JEG3, EG-VEGF activates MMP-2 and 9 as well as key tumor signaling pathways. More importantly, we developed an animal model that mimicked CC development and progression and demonstrated that treatment with PROKR1 and PROKR2 antagonists significantly reduced tumor progression, through regulation of key angiogenic proteins such as NOV and MMP-9. This study proposes the use of EG-VEGF as a marker of CC development and its neutralization as a potential treatment for the disease. These findings might allow a reduction of the toxicity of the currently used multiagent chemotherapies.

Introduction

Gestational choriocarcinoma is a malignant trophoblastic tumor that develops upon normal or abnormal pregnancy. The latter includes complete (CHM) or partial hydatidiform moles (PHM), spontaneous abortions, or ectopic pregnancies (Froeling & Seckl, 2014; Stevens et al., 2015). CHM develops when one or two spermatozoa fertilized an oocyte in the absence of the maternal nucleus, while PHM results from dispermic fertilization of a normal oocyte (Froeling & Seckl, 2014; Stevens et al., 2015). Both CHM and PHM patients are at high risk of developing choriocarcinoma; nevertheless, this risk is much higher in CHM (20%) as compared to PHM (1.5%) (Froeling & Seckl, 2014; Stevens et al., 2015). Choriocarcinoma is a rare disease with an estimated incidence of 2 to 7 in 100,000 pregnancies in North America and Europe. This number reaches 5 to 202 in 100,000 pregnancies in Asia (Altieri, Franceschi, Ferlay, Smith, & La Vecchia, 2003; Smith, 2003). Choriocarcinoma is highly metastatic due to the intrinsic invasive property of trophoblast cells (Savage, Kelpandides, Tuthill, Short, & Seckl, 2015). Most patients with non-metastatic gestational choriocarcinoma are successfully treated with single-agent chemotherapy (Foulmann et al., 2006; Lurain, 2002; Lurain, Singh, & Schink, 2006). Metastatic cases are only curable using multiagent chemotherapy, known to induce considerable adverse effects (Cagayan & Lu-Lasala, 2006; Lurain et al., 2006; Soper, 2003). Choriocarcinoma diagnosis and progression is based on the measurement of the human chorionic gonadotropin (hCG), released by the syncytiotrophoblast (Froeling & Seckl, 2014; Stevens et al., 2015). Nevertheless, hCG measurements have recently been reported to be associated to false positive diagnoses and unnecessary invasive therapeutic procedures including chemotherapy, hysterectomy, and other surgeries (Esfandiari & Goldberg, 2003; Olsen et al., 2001; Sasaki et al., 2010; Seror et al., 2009; Zavadil, Feyereisl, Safar, Pan, & Turyna, 2006). Thus, it is still necessary to prevent the occurrence of this cancer and develop novel and more specific diagnostic markers as well as less toxic therapeutic approaches.

We recently reported that a specific endocrine placental factor named EG-VEGF (Endocrine Gland-Derived Vascular Endothelial Growth Factor) exhibits features of a potential marker of pregnancy pathologies, including preeclampsia (Sergent et al., 2016). EG-VEGF is also called prokineticin-1 and represents the canonical member of a recently described family of cytokines, the prokineticin family (LeCouter et al., 2001; M. Li et al., 2001). EG-VEGF

expression is grossly restricted to endocrine tissues, including the placenta (Brouillet, Hoffmann, Feige, et al., 2012). It exerts its actions *via* two G protein-coupled prokineticin receptors, called PROKR1 and PROKR2 (Brouillet, Hoffmann, Feige, et al., 2012; D. C. Lin et al., 2002). We reported that EG-VEGF **i)** is abundantly produced by the endocrine unit of the placenta, the syncytiotrophoblast during the first trimester of human pregnancy with a peak of expression just before the establishment of the feto-maternal circulation, **ii)** its expression is up-regulated by hypoxia, a key parameter of tumor development and by hCG and that **iii)** its receptors, PROKR1 and PROKR2 are highly expressed in trophoblast and placental endothelial cells (Brouillet, Hoffmann, Feige, et al., 2012; Hoffmann et al., 2006; Hoffmann et al., 2009). We have also demonstrated that EG-VEGF circulating levels are around 50 pg/ml in non-pregnant women and increased 5-fold during the first trimester of pregnancy ($\approx$ 250 pg/ml) (Hoffmann et al., 2009).

In relation to choriocarcinoma development and progression, it is proposed that trophoblast cells are excessively proliferative, a phenomenon that ultimately results in an increased pool of cells acquiring migratory and invasive phenotype (Louwen et al., 2012). Importantly, we have demonstrated that EG-VEGF increases trophoblast proliferation and ensures their survival under deprived conditions (Brouillet et al., 2013). Also, EG-VEGF has recently been reported to be associated with tumor development of multiple reproductive organs such as ovary (Zhang et al., 2003), testis (Samson et al., 2004) and prostate (Monnier & Samson, 2010; Pasquali et al., 2006).

Altogether, these findings suggest that EG-VEGF could be a potential actor in choriocarcinoma development and progression with the perspective of its use as a biomarker and/or a therapeutic target. However, no previous study has investigated its involvement in the development and/or progression of this pathology. Here, we conducted **i)** a clinical study to determine EG-VEGF association to CHM, choriocarcinoma development and progression, **ii)** an *in vitro* study, using JEG3 cells, a human choriocarcinoma cell line to characterize EG-VEGF effects on their proliferation, migration and invasion, moreover, we developed a new animal model of choriocarcinoma upon orthotopic injection of JEG3 cells in immunodeficient gravid mice. This model was used to characterize choriocarcinoma progression and to test the effects of EG-VEGF receptors antagonists on tumor development and progression.

Material and methods

Human study

Normal and pathological human tissue and sera:

Pathological material consisting of placental tissue (n=28) and sera (n=38) from patients with CHM (n=3) and choriocarcinoma were collected at Ibn Rochd University Hospital of Casablanca. Normal sera was also collected from normal first trimester pregnant women (n=18). Collection and processing were approved by the local hospital ethics committees, and informed patient consent was obtained in all cases. Table 1 reports all clinical information for pathological pregnancies.

Cell culture

JEG3 cell line culture.

JEG3 (ATCC® HTB-36™) is one of six clonally derived lines isolated from the Woods strain of the Erwin-Turner tumor by Kohler and associates (Kohler et al., 1971). JEG3 cells were used as a choriocarcinoma cell line model. Cells were used between 4 and 10 passages and grown in Dulbecco's modified Eagle's medium DMEM-F12 supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin, and amphotericin B (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Cells were maintained at 37°C under normoxic (20% O₂) or hypoxic (1.5% O₂) conditions. Conditioned media from JEG3 cultures were collected and centrifuged. The supernatants were stored at -20°C until use. In another set of experiments, JEG3 cells were serum starved for 12h and incubated in absence or presence of human recombinant EG-VEGF (Peprotech, France) for 24h. Protein extracts were prepared as previously described (Alfaidy, Li, MacIntosh, Yang, & Challis, 2003).

JEG3 Luc cell line preparation

JEG3-Luc (Luciferase positive JEG3 cells) were prepared using a lentivirus supernatant (pLenti-II-CMV-Luc-IRES-GFP control vector). The protocol was performed according to the company's instructions (Applied Biological Materials Inc.). Briefly JEG3 cells were plated in DMEM/F-12 (1/1) medium supplemented with 10% fetal bovine serum. Cells were infected for 6h with retroviruses at a ratio of 1:1 in fresh culture medium. Infected cells were selected with G418 (200 µg/ml) for 7 days.

EG-VEGF ELISA

EG-VEGF was measured by ELISA (PeproTech, France) in the collected sera and conditioned media. Two separated standard curves were constructed to allow accurate readings of samples at upper and lower ranges of the assay. All samples were in the linear range of the standard curves. The detection limit of the assay was 16 pg/ml. The intra-assay coefficient of variability (CV) was 6.7%, and the interassay CV was 8.1%.

Proliferation Assay

JEG3 cells were seeded into 96-well plate at the density of 3×10^4 cells/well and incubated with increased concentrations of recombinant EG-VEGF for 24h. Proliferation was also assessed in the absence or presence PROKRs antagonists. PROKR1 antagonist was obtained from Dr F. Balboni (University of Cagliari, Italy) and PROKR2 antagonist was obtained from Dr QY Zhou (University of California Irvine, CA, USA). Both antagonists were used at 1 μ M. Proliferation was assessed using a colorimetric, and non-radioactive assay for assessing cell viability and proliferation (WST-1, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Cells were cultured at 37 °C with 5% CO₂. 24h later, 10 μ l of WST-1 was added into each well. Following 1h reaction, an ELISA reader (Multiskan EX; Thermo Lab systems) was used to determine the light absorption values at 450 nm.

Wound-healing Assay

Wound-healing assay was performed using JEG3 cells. Cells were seeded in complete medium (DMEM-F12 10% FBS) at a density of 2×10^5 cells/well into 24-well plates. At confluence, complete medium was replaced by serum-free medium with increased concentrations of recombinant EG-VEGF (Peprotech, France) for 24h, in the absence or presence of PROKR1 or PROKR2 antagonists (1 μ M). Wound healing assay was performed in the presence of mitomycin C (Sigma-Aldrich) to inhibit cell proliferation. Cells were scratched with a sterile tip to create an artificial wound and were allowed to heal for 24h. Photographs were taken at regular time intervals (0 to 24h). The size of the wound closure was measured using Scion Image software (version 4.0.2). The results are presented as percentage of wound closure after 24h of treatment.

Invasion Assay

JEG3 cells were stained with the Vybrant DiI Cell-Labeling Solution (Invitrogen) for 1 h at 37°C. The top chamber of 8 µm pore size FluoroBlok cell culture inserts (BD Biosciences) was precoated with 100µl of 1:25 Matrigel (BD Biosciences). 2×10^4 DiI-stained JEG3 cells/insert were seeded in 500 µl of DMEM-F12 medium in the presence of 1% FBS. The inserts were placed into 24-well plates containing 750µl of DMEM-F12 medium with 15% FBS. Cells were treated, for 24 with increased concentrations of recombinant EG-VEGF (Peprotech, France) in the absence or presence of PROKR1 or PROKR2 antagonists (1µM). The chambers were then removed and fixed with paraformaldehyde. The membranes of the chambers were excised and placed on glass slides. The cells that invaded the chamber were visualized under the microscope and counted.

3D culture

Confluent monolayers of JEG3 cells were trypsinized. 1.000 cells were suspended in culture medium DMEM-F12 supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), and seeded in; non-adherent round-bottom 96-well plates (Greiner, Frickenhausen, Germany) coated previously with Poly-HEMA (Poly (2-hydroxyethyl methacrylate); sigma Aldrich). Under these conditions all suspended cells contribute to the formation of a single JEG3 cell spheroid specimen. The spheroids were harvested after 24 h and transferred into a collagen gel (3.54 mg/ml, BD Biosciences). Spheroids were treated with different concentrations of recombinant EG-VEGF for 24 h. These experiments were also performed in the absence or presence of PROKRs antagonists. Quantification of JEG3 cells spreading was assessed using ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) after 24h of culture by image analysis of microphotographs. At least, three replicates were included within each experiment. The spreading was assessed by calculating the ratio of invaded area (the whole spheroid) over the non-invaded area (center of the spheroid).

Western blot analysis

JEG3 cells were incubated in the presence of increased concentrations of recombinant EG-VEGF (Peprotech, France) for 24h. Protein extracts were prepared as previously described (Alfaidy et al., 2003). Protein extracts were electrophoretically separated on 0.1% sodium dodecyl sulfate-12% polyacrylamide gels and electrically transferred onto 0.45µm nitrocellulose membranes. The membranes were blotted with antibodies against PROKR1 or

PROKR2 (Hoffmann et al., 2009). Both PROKR1 and PROKR2 antibodies were used at a final concentration of 0.45 µg/ml. The blots were washed with PBS-Tween 0.1% and incubated for 1h in blocking solution (5% skimmed milk in PBS-T). Subsequently, the membranes were immunoblotted with a rabbit antibody against PROKR1, PROKR2 (0.45 µg/ml) overnight. The blots were, then rinsed with PBS-T and incubated with goat anti-rabbit IgG (1:3.000) for 1 h. After three PBS-T washes, the antibody-antigen complex was detected using the ECL plus detection system (Amersham Pharmacia Biotech). The intensities of immunoreactive bands were measured by scanning the photographic film and analyzing the images on a desktop computer using ImageJ software. The Chemidoc analyzing system was also used (Image Lab version 4.0.1). To standardize for sample loading, the blots were subsequently stripped using a commercially available kit, following the manufacturer's instructions (Re-blot; Millipore), and reprobed with an anti-β-actin antibody (Sigma-Aldrich) as an internal control for protein loading. For signaling pathway analyses, membranes were incubated at 4°C overnight respectively with phospho-MAPK (1:5.000) (Promega), phospho-AKT (Ser473) (1:2.000) (Cell Signaling), phospho-Src (pY418) (1:1.000) (Invitrogen). Blots were reprobed respectively with anti-MAPK (1:40.000) (Sigma), anti-AKT (1:1.000) (Cell Signaling) or anti-Src (1:1000) (Millipore) antibodies to standardize for sample loading.

Zymography

JEG3 cells were incubated in the absence or presence of EG-VEGF for 24h. The protein concentration was determined in the culture medium of all conditions. The same amount of proteins was electrophoresed under non-reducing conditions in a 10% acrylamide gel containing 1 mg/ml gelatin (Sigma Aldrich, France) according to the method of Xu et al. (Xu, Alfaidy, & Challis, 2002). After electrophoresis, the gels were washed at room temperature for 1 h in 2.5% Triton X-100 and 50 mM Tris·HCl, pH 7.5, and then incubated at 37°C overnight in buffer containing 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, and 50 mM Tris·HCl, pH 7.6. Thereafter, gels were stained with 0.1% (wt/vol) Coomassie brilliant blue R-250 in 30% (vol/vol) isopropyl alcohol and 10% glacial acetic acid for 60 min and destained in 10% (vol/vol) methanol/5% (vol/vol) glacial acetic acid.

Immunohistochemistry of human placentas

Human placental tissues were collected from normal pregnant women during the first trimester of pregnancy (n= 10) and from patients with complete hydatiform moles (n= 16) or choriocarcinoma. Placental tissues were fixed for 24 h at 4°C in 4% (vol/vol) paraformaldehyde, embedded in paraffin, and cut into 5µm sections, as described previously (Alfaidy, Gupta, DeMarco, Caniggia, & Challis, 2002). Adjacent sections were stained using specific antibodies. The avidin/biotin immunoperoxidase detection method was applied (Hoffmann et al., 2006).

Endogenous peroxidase activity was quenched by pretreatment with 3% (vol/vol) hydrogen peroxide in methanol for 30 min. Specific antibodies were used to detect EG-VEGF, PROKR1, and PROKR2 (Covalab, Lyon, France), Ki67 (Dako, Trappes, France). These antibodies were used and characterized previously (Brouillet, Hoffmann, Feige, et al., 2012; Brouillet et al., 2013; Hoffmann et al., 2006; Hoffmann et al., 2009). The tissue sections were subsequently washed three times with PBS and incubated with biotinylated goat anti-rabbit IgGs (1:400 dilution in blocking solution; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) for 1h in a humid chamber. After three PBS washes, the slides were incubated with an avidin-biotin complex (Vectastain ABC kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA) for 1h. After a final PBS wash, the immunoreactive proteins were visualized after the addition of 3, 3'-diaminobenzidine (Dako) for 2min and then counterstained with hematoxylin.

Animal model study

Experimental Groups

All animal studies were approved by the institutional guidelines and those formulated by the European Community for the Use of Experimental Animals. Two to three month-old SHO SCID female mice were mated in the animal facility. The presence of a vaginal plug was observed at 0.5dpc. The gravid mice were randomly assigned to be injected by JEG3-luc cells (**see flowchart for detailed protocol, Fig. S4**). Five groups of female mice were established. At least five animals were assigned to each experimental group, which were defined as follows: Mice in Group 1 were injected at 7.5 days post coitus (dpc) in two opposed placenta with JEG3 cells embedded in Matrigel. Group 2 mice are non-gravid mice that were injected in their uterine horns with JEG3-luc embedded in Matrigel. Group 3 mice were injected with Matrigel alone in either uterine horns or placentas. Mice in the Group 4 were injected in two

opposed placenta with JEG3 cells embedded in Matrigel and at days 8.5, 11.5, 14.5, and 17.5. These mice were injected with PC7, the PROKR1 antagonist (500µg/kg, ip). In the group 5, mice were injected in two opposed placentas with JEG3 cells embedded in Matrigel and at 8.5, 11.5, 14.5, and 17.5 dpc, these mice were injected with PKAR505, the PROKR-2 antagonist (100 mg/kg, ip). Two other control groups of mice were injected with vehicles of PC7 and PKR505 antagonists.

Bioluminescence Imaging

At 19.5 dpc, bioluminescence imaging was performed with a highly sensitive, cooled CCD camera, mounted in a light-tight specimen box (IVIS®. In Vivo Imaging System. PerkinElmer). Before imaging, animals were anesthetized in 2% isoflurane. 10µl/10g of body weight of luciferin (potassium salt, Xenogen, USA), was injected to the mice 15 min before imaging. This dose and route of administration have been shown to be optimal for studies in rodents when images were acquired within 15min post-luciferin administration.

For imaging, mice were placed onto the warmed stage inside the light-tight camera box, with continuous exposure to 1% to 2% isoflurane. The animals were imaged, and data were acquired for 45s; this imaging time was shown to yield superior results. The low levels of light emitted from the bioluminescent tumors were detected by the IVIS® camera system and were then integrated, digitized, and displayed. The regions of interest (ROI) from displayed images were designated around the tumor area and were quantified as total photon counts or in photons/s, using Living Image® software (Xenogen, USA).

After imaging the whole body of the mouse, a laparotomy was performed to collect blood and to expose and image the uterine horn containing embryos with their attached placentas, as well as the rest of metastatic organs. A second imaging of the organs was performed and quantified as described above. Placentas and metastatic organs were collected and stored at -80°C or collected in PFA for immunohistochemistry analyses.

Immunohistochemistry of mouse placentas and metastatic organs

Mouse placentas were processed similarly to human tissues. They were incubated with the following commercial antibodies: Cytokeratin (Thermofisher), Ki-67 (Dako, Trappes, France). In another set of experiments, tissue sections were used to assess proliferating JEG3-Luc cells within tissue sections.

Antibody arrays

Antibody-array was used to compare the expression profile and levels of angiogenesis-related proteins in sera collected from the five different groups of female mice. Antibody array experiment was assessed using Mouse Angiogenesis Array kit (R&D Systems; USA). Briefly, nitrocellulose membranes were incubated in blocking solution for 1 hour at RT on a rocking platform shaker. Membrane were then incubated with 100 μ l of serum and 15 μ l of detection antibody cocktail overnight at 4°C. After three washes using the washing buffer; membrane were incubated with streptavidin-HRP for 30min at room temperature. After three washes the antibody-antigen complex was detected using the ECL plus detection system (Amersham Pharmacia Biotech). The intensities of immunoreactive bands were measured by scanning the photographic film and analyzing the images on a desktop computer using ImageJ software. The Chemidoc analyzing system was also used (Image Lab version 4.0.1).

Statistical Analysis

Statistical comparisons were made using Student's t-test and one-way ANOVA. All data were checked for normality and equal variance. When normality failed, a nonparametric test followed by Dunn's or Bonferroni's test was used. (SigmaPlot and SigmaStat, Jandel Scientific Software). All data are expressed as means SE ($P < 0.001$, 0.01, and 0.05).

Results

EG-VEGF circulating levels and placental expression are increased in CHM and choriocarcinoma

We have previously shown that EG-VEGF is secreted by the syncytiotrophoblast and that its levels are elevated during the first trimester of pregnancy. Here, we compared its circulating and placental levels in a cohort of normal (n=20), CHM (n=38) and choriocarcinoma (n=3) patients. **Fig. 1A** shows that EG-VEGF levels were slightly but significantly higher in the CHM group the normal group ($P<0.05$). The mean value was increased by almost 1.5-fold in CHM patients. More importantly, mean value in patients who were diagnosed for choriocarcinoma were significantly elevated compared to normal individuals and CHM patients (**Fig 1A**). **Fig. 1B** shows representative control, CHM and choriocarcinoma placental sections stained for EG-VEGF. EG-VEGF protein expression was markedly increased in CHM placentas and was mostly localized to the syncytiotrophoblast layer. Choriocarcinoma exhibited stronger staining for EG-VEGF as compared to normal and CMH tissues.

As EG-VEGF acts via PROKR1 and PROKR2, we wondered whether these receptors are also deregulated in this pathology. We compared the levels of expression of PROKR1 and PROKR2 in the same placental samples. **Supplemental Fig.1** reports placental sections from normal, CHM and choriocarcinoma patients. There were strong increases in the intensity of PROKR1 and PROKR2 staining in CHM and choriocarcinoma placental sections as compared to normal ones.

EG-VEGF activates key tumor signaling pathways and increases choricarcinoma cell proliferation

We have previously shown that EG-VEGF increases normal trophoblast proliferation suggesting its potential involvement in choriocarcinoma cell proliferation. We determined its effect on the proliferation of the tumor trophoblastic cell line, JEG3. First, we demonstrated that JEG3 expresses both PROKR1 and PROKR2 receptors and that their expression is up-regulated by EG-VEGF (**Supplement Fig 2A and 2B**). **Fig. 2A** shows that EG-VEGF significantly increases JEG3 cell proliferation. EG-VEGF effect was abolished in the presence of PROKR1 or PROKR2 antagonists, suggesting that both receptors are involved in the EG-VEGF mediated-proliferative effect of JEG3 cells.

Nevertheless, when antagonists were used alone, we observed a decrease in JEG3 proliferation. This observation was in line with reports from *Ngan et al 2007* (E. S. Ngan et al., 2007) who demonstrated that PROKR2 knockdown in glioblastoma cells induced cell apoptosis, suggesting that tumor cells exhibit high sensitivity to the absence of EG-VEGF receptors. To exclude the hypothesis that this effect is due to side effects of PROKR1 and PROKR2 antagonists, we performed the same experiment using siRNAs for both receptors. **Supplemental Fig. 3** substantiates the effects observed using the antagonists, suggesting the importance of both receptors even in the absence of exogenous EG-VEGF.

To get more insight into the mechanism by which EG-VEGF induces the proliferation and survival of choriocarcinoma cells, we investigated its effects on key signaling pathways involved in these processes. **Fig. 2B** shows that EG-VEGF induces the phosphorylation of AKT and MAPKs upon 10 min of treatment. Because Src phosphorylation is associated to tumor cell aggressiveness, we investigated EG-VEGF effect on its phosphorylation in JEG3 cells. **Fig. 2B** shows that EG-VEGF induces Src phosphorylation after 10min of treatment.

Effects of EG-VEGF on choriocarcinoma cell migration and invasion

Given the importance of cell migration and invasion in the process of tumor progression and metastasis, we investigated the effects of EG-VEGF on JEG3 migration and invasion in the absence or presence of receptor antagonists.

EG-VEGF effect on JEG3 migration

Cell migration is the first process in tumor cell acquisition of a metastatic character. We examined the effect of EG-VEGF on JEG3 migration. **Fig. 3A** shows representative photographs of JEG3 at (T0) and (T24) after wounding and subsequent incubation in the absence or the presence of EG-VEGF (5, 10 and 25 ng/ml). Following 24 h incubation, EG-VEGF induced JEG3 cell migration at all concentrations tested. The closure of the wound reached 80% in cells treated with 10ng/ml of EG-VEGF as compared to 60% of closure in the controls. **Fig. 3B and 3C** show that EG-VEGF effect on JEG3 migration was abolished in the presence of PROKR1 and PROKR2 antagonists. The quantification is reported in **Fig.3D**

EG-VEGF effect on JEG3 invasion

Cell invasion is the key process that allows tumor cell to colonize other organs during the process of tumorigenesis. We determined the degree of invasion of pre-labeled JEG3 cells through Matrigel using the BD FluoroBlok cell culture inserts. The effect of EG-VEGF was also tested in the presence of the PROKR1 and PROKR2 antagonists. **Fig. 4A** shows that EG-VEGF significantly increased JEG3 invasion and that this effect was reversed in the presence of PROKR1 and PROKR2 antagonists, suggesting that EG-VEGF mediates its effect on JEG3 invasion through PROKR1 and PROKR2 activation. Quantification of the number of invading cells in each condition is reported in **Fig. 4B**.

Effect of EG-VEGF on tumor trophoblastic cells invasion using 3D culture system

It was particularly relevant to determine EG-VEGF effect on JEG3 differentiation and invasion in a system in which the tumor architecture is maintained. Tumor cells cultured as spheroids form a topology similar to the one observed *in vivo* (Nath & Devi, 2016). Hence, we determined the effect of EG-VEGF on JEG3 spreading in the spheroid system. **Fig. 5A** shows representative photographs of JEG3 spheroids at the time of their incubation with EG-VEGF (**a-f**) and 24h later (**g-l**). EG-VEGF treatment resulted in a significant increase in JEG3 spreading within the collagen. EG-VEGF effect was abolished in the presence of PROKR1 and PROKR2 antagonists. Spreading ratio was calculated as the ratio of the diameter of the spheroid and the size of the central core of the same spheroid. Interestingly, while EG-VEGF treatment decreased the size of the core of the spheroid, antagonist treatment increased this size and decreased both basal and EG-VEGF-induced cell spreading. Quantification of the degree of JEG3 spreading in each condition is reported in **Fig. 5B**.

Effect of EG-VEGF on JEG3 cell protease activity

A critical element of tumor progression is remodeling of extracellular matrix (ECM) by matrix metalloproteinases (MMPs). Trophoblast cells are known to express high levels of MMP-2 and MMP-9. We measured MMP-2 and MMP-9 production in culture media collected from JEG3 cultures after treatment with EG-VEGF (10 and 25ng/ml). Zymography was used to assess the MMP-2 and MMP-9 activity. **Fig. 5C** shows that MMP2 was more abundant than MMP9 in JEG3 cells and that EG-VEGF treatment significantly increased both activities.

Characterization of EG-VEGF role in choriocarcinoma development and progression *in vivo*

The above clinical and *in vitro* studies strongly suggested that EG-VEGF might contribute to the overall development and progression of choriocarcinoma *in vivo*. To test this hypothesis, we first developed an animal model of choriocarcinoma that mimics choriocarcinoma development in human.

Development and characterization of a mouse model of choriocarcinoma

To mimic to the best manner choriocarcinoma development and progression from the placenta, we injected JEG3-Luc cells orthotopically within the placenta of SCID mice at 7.5 dpc. Mice were monitored for tumor development and for tumor progression in other organs until 19.5 dpc (see flowchart in supplemental Fig.S4). To determine whether placental environment contributes to the metastasis of choriocarcinoma cells, we compared JEG3-Luc cells injection into the placenta versus their injection into the uterine horn of non-gravid mice. **Fig.6A**, shows that JEG3 cell injection in the gravid placentas lead to more aggressive tumor development as compared to their injection within the uterine horn in **Fig.6B**. There was an important tumor development and metastasis in multiple organs including the placenta, intestine, mammary glands, spleen, vagina and liver in **Fig.6A**. These data suggest that placental environment and vascularization contribute to choriocarcinoma metastasis. More importantly, we have also observed that gestations of all gravid mice injected with JEG3-luc cells were not successful, as all fetuses were dead at 19.5dpc with resorption of all placentas (**Supplemental Fig. 5A**).

Effects of PROKR1 and PROKR2 antagonists on choriocarcinoma development and progression *in vivo*

To get more insight into the role of EG-VEGF in choriocarcinoma development and progression *in vivo*, we treated gravid JEG3-luc mice by PROKR1 or PROKR 2 antagonists at three time points during tumor progression. **Fig. 6C** shows that mice injected with either antagonist exhibited significant decrease in tumor development and progression. These data suggest a remarkable potential of both antagonists to reduce tumor development and metastasis. Quantification of at least three mice per condition shows that PROKR1 or PROKR2 antagonists significantly decreased the intensity of ROI compared to their vehicle, respectively **Fig. 6D**. More importantly, both in PROKR1 and PROKR 2 antagonists-treated

JEG3-luc mice we observed a maintenance of the gestation with few resorbed placentas, (Supplemental Fig. 5D and E).

In situ analyses of placentas collected from JEG3-luc mice and from JEG3-Luc PROKR1 or JEG3-Luc PROKR2 mice

Histological comparison of placentas collected from mice injected with JEG3-Luc, or JEG3-Luc+PROKR1antagonist or +PROKR2 antagonist is reported on **Fig 7A**. Placentas collected from mice injected with JEG3-luc cells exhibited strong histological changes with loss of all placental structures and zones (**Fig. 7Ad, Ae, Af**), compared to placenta collected from mice injected with matrigel (**Fig. 7Aa, Ab, Ac**). Interestingly, histological analyses of placentas collected from mice injected with JEG3-Luc +PROKR1 or +PROKR2 antagonists exhibited minor placental changes, as all placental zones and structures were conserved, (**Fig. 7Ag, Ah, Ai**) and (**Fig. 7Aj, Ak, Ae**), respectively. To better characterize these changes, we stained the same placenta by a specific Ki67 antibody that recognizes only human proliferative cells. No nuclear staining was observed in placenta collected from mice injected with matrigel (**Fig 7Ba and Bb**). In placentas collected from mice injected with JEG3-luc cells, almost all cells were positively stained with Ki67, confirming the presence of increased number of proliferative JEG3 cells. (**Fig 7Bc and Bd**). Placentas collected from JEG3-Luc +PROKR1 and +PROKR2 placentas exhibited low Ki67 staining that was limited to some placental vasculature, (**Fig 7Be and Bf**) and (**Fig 7Bg and Bh**), respectively.

PROKR1 and PROKR2 antagonist's treatments reverse the pattern of altered proangiogenic factors in JEG3 treated mice *in vivo*.

To determine whether circulating angiogenic factor(s) were affected upon JEG3 cells injection in the placentas of the gravid mice, and to determine whether PROKR1 and PROKR2 antagonist treatments reversed any of these effects, we used an antibody array specific for a selection of angiogenic factors. Membranes were incubated with sera collected from four groups of gravid mice; control mice injected with matrigel into their placentas (CTL), mice injected with JEG3 cells (JEG3-luc), mice injected with JEG3 cells and treated with PROKR1 antagonist (JEG3-luc+PROKR1a) or PROKR2 antagonist (JEG3-luc+PROKR2a). Densitometric analysis showed that the levels of three angiogenic factors, MMP-9, Nov and proliferin, were significantly affected upon JEG3-luc cells injection. MMP-9, was significantly increased, while both Nov and proliferin were significantly reduced. Importantly, the expression of the three proteins was significantly reversed when mice were treated by PROKR1 or PROKR2 antagonists, **Fig. 7C, 7D**. These data are in line with the

reported roles for MMP-9 and Nov proteins in tumor development. MMP-9 is well established as pro-tumoral protein (Farina & Mackay, 2014), while Nov is known as an inhibitor of cancer cell proliferation (Bleau et al., 2007). Nov overexpression results in reduced tumor size in glioma cell xenografts (Gupta et al., 2001). The decrease in the angiogenic hormone proliferin is in line with the observation that mice injected by JEG3-luc cells had an arrested gestation. In fact, proliferin is secreted specifically by the trophoblast giant cells and ensures the establishment of the fetomaternal circulation early on during gestation. Interestingly, treated mice with either antagonist exhibited higher levels of proliferin secretion, confirming the beneficial effect of these antagonists on the pregnancy maintenance and progress. The fine mechanism by which these angiogenic factors are locally regulated within the placenta are still to be investigated.

Discussion

The present work demonstrates the direct involvement of EG-VEGF in the development and progression of choriocarcinoma and brings evidence for the control of choriocarcinoma progression through the use of EG-VEGF receptor antagonists. Hence, we propose EG-VEGF as a key placental growth factor that should be ranked among the important etiological actors of choriocarcinomas. These statements are based on three observations. First, we showed that EG-VEGF circulating and placental levels are increased in CHM and in choriocarcinoma patients. These results are of great interest in terms of the potential use of this molecule as a prognostic and follow-up biomarker of placental cancer development. EG-VEGF specificity for the placenta, its control of trophoblast proliferation, and its regulation by hCG further support these statements (Brouillet et al., 2013). Second, we showed that EG-VEGF is a survival factor for choriocarcinoma cells and a strong activator of their migration and invasion. These results were observed *in vitro* using the JEG3 cell line, but clearly reflect what might occur *in vivo* during choriocarcinoma development and metastasis. The JEG3 cells represent the extravillous trophoblastic cells that are the putative cells of origin of gestational choriocarcinoma. Third, we took advantage of the animal model we developed and of the EG-VEGF receptors to demonstrate that this placental factor contributes to choriocarcinoma development and progression in the gravid mouse.

Since its identification, EG-VEGF has been associated to the development of multiple types of cancer. EG-VEGF has been proposed as a potential prognostic factor in colorectal, gastrointestinal, and neuroblastoma cancer (Goi et al., 2004; E. S. Ngan et al., 2007). In relation to the reproductive system, EG-VEGF has been reported as an indicator of ovarian cancer progression and as a good marker of its unfavorable prognosis (Zhang et al., 2003). In prostate cancer, EG-VEGF has been proposed as a target for this cancer treatment (Pasquali et

al., 2006). EG-VEGF identification as a potential indicator of choriocarcinoma development and progression plus the characterization of its receptor's antagonists as potential therapeutic agents, further supports its consideration as a target to treat and or prevent the development of this disease. The discovery of EG-VEGF association to choriocarcinoma development and progression was predictable since this factor exhibits all features of a placental growth factor that controls key developmental aspects of human placentation, such as trophoblast proliferation. EG-VEGF effect on trophoblast proliferation has already been reported by our group using both human placental explants, primary and cell line trophoblastic cells (Hoffmann et al., 2009). Under physiological conditions, EG-VEGF mediated-proliferative effect was only observed during the first trimester of pregnancy, since EG-VEGF levels decreased by the time of the establishment of the fetomaternal circulation (Hoffmann et al., 2006). In contrast, in CHM and choriocarcinoma, maintenance of increased EG-VEGF levels might contribute to the excessive proliferation rate of the trophoblastic cells, a phenomenon that ultimately results in an increased pool of cells acquiring a migratory and invasive phenotype.

EG-VEGF association with the development and progression of choriocarcinoma was confirmed using an animal model that mimics choriocarcinoma development via JEG3-luc cell injection within the placenta. In this model, the route of injection emphasizes the role of the placenta in the tumor progression, since mice injected in the uterine horn did not exhibit the same degree of metastasis. This might obviously be due to the high degree of the vascularization of the placenta which contributes to the hasty dissemination of choriocarcinoma cells into other organs. Previous studies reported the development of animal models of choriocarcinoma mainly through subcutaneous injection of JEG3 cells (Shiu et al., 2000). These studies reported dissemination of JEG3 cells and colonization of blood vessels compared to other injected non-trophoblastic tumour cells (Grummer, Donner, &

Winterhager, 1999; Shih *et al.*, 2011). Nevertheless, these studies were performed in non-gravid mice and cells were not injected orthotopically within the primary site of choriocarcinoma development *ie*, the placenta.

Gravid mice treated with PROKR1 and PROKR2 antagonists showed significant reduction in the size of the tumor development as well as a reduction in the tumor metastasis. Nevertheless, treatment with PROKR2 antagonist exhibited stronger inhibitory effect compared to PROKR1 antagonist. This discrepancy might be due to the fact that JEG3 express much higher levels of PROKR2 compared to PROKR1, and that PROKR2 signaling has been reported to be associated to the control of invasive processes in trophoblast and endothelial cells (Brouillet *et al.*, 2013; Guilini *et al.*, 2010; Hoffmann *et al.*, 2009). Interestingly, *in vivo* use of PROKR2 antagonist has been reported in the literature to alleviate pain and to exhibit strong analgesic effects (Hu *et al.*, 2006). Hence, these data comfort the potential use of these antagonists in the treatment of choriocarcinoma and/or other EG-VEGF-related cancer that occur outside the pregnancy context.

Altogether these studies report the development of a new animal model of choriocarcinoma that served to validate both the clinical observations and the *in vitro* studies demonstrating the role of EG-VEGF in the development and progression of choriocarcinoma. More importantly, the study proposes the antagonization of EG-VEGF effects as a new therapeutic approach against CHM and CC development. These findings might contribute to the reduction of the toxicity of currently used multi-agent chemotherapies.

Acknowledgements

We thank Ms A. Salomon for her technical assistance. We also thank all members of the animal facility for their daily assistance.

Source of findings

We acknowledge the following sources of funding: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (U1036), University Grenoble-Alpes, Commissariat à l'Energie Atomique (DSV/iRTSV/BCI), Région Auvergne-Rhône-Alpes, Ligue Nationale contre le Cancer and Ligue Départementale (Isère) contre le Cancer. Mr Wael Traboulsi was supported by Ligue Nationale contre le Cancer.

Figure legends

Figure 1: EG-VEGF expression in control, CHM and choriocarcinoma patients during the first trimester of pregnancy. Panel A reports EG-VEGF serum levels in normal pregnant women (CTL, n=18); CHM (n=38) and choriocarcinoma patients (n=3) during the first trimester of pregnancy (* $P < 0.05$, by ANOVA followed by Dunn's Method). Panel B reports representative photographs of EG-VEGF immunoreactivity (Ir) in placental villous tissues from women CTL (a), CHM (b) and Choriocarcinoma patient (c). Cytotrophoblast (Ct), Hofbauer cells (Ho), Extravillous trophoblast (EVT), Syncytiotrophoblast (St). Scale bar = 50 μm .

Figure 2: EG-VEGF effect on JEG3 proliferation in the absence or presence of PROKR1 or PROKR2 antagonist. Panel A. reports a graph that summarizes EG-VEGF effect on proliferation/viability of JEG3. Cell proliferation was determined using WST-1 assay after incubation with increasing concentrations of EG-VEGF (0, 5, 10, 25 ng/ml) in the absence or presence of PROKR1 and PROKR2 antagonists (1 μM). * $p < 0.01$ and ** $p < 0.01$). Panel B. reports Western blot analyses of protein extracted from JEG3 cells treated with EG-VEGF (10 ng/ml). Membranes were incubated with antibodies to detect phosphorylation of Akt, p44/42 MAPK and Src. The total (T)-AKT, -p42/44 MAPK and -Src were used as a loading control.

Figure 3: EG-VEGF effect on JEG3 migration in the absence or presence of PROKR1 or PROKR2 antagonists. Panel A shows representative images of wounded JEG3 monolayers at 0 and 24 h post-wounding in presence of increasing concentrations of EG-VEGF (0, 5, 10, 25 ng/ml). Panel B shows representative images of wounded JEG3 monolayers at 0 and 24 h post-wounding in the presence of increasing concentrations of EG-VEGF (0, 5, 10, 25 ng/ml) and the PROKR1 antagonist (1 μM). Panel C shows representative images of wounded JEG3 monolayers at 0 and 24h post-wounding in the presence of increasing concentrations of EG-VEGF (0, 5, 10, 25 ng/ml) and the PROKR2 antagonist (1 μM). Panel D reports a graph that reports percentages of wound closures after 24 h of treatment. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.001$.

Figure 4: EG-VEGF effect on JEG3 invasion in the absence or presence of PROKR1 or PROKR2 antagonists. Panel A shows representative images of pre-labeled JEG3 cells that invaded the filter under control or treated conditions. Cells were treated with EG-VEGF (0, 5,

10 ng/ml), in the absence or presence of PROKR1 antagonist (1 μ M) or PROKR2 antagonist (1 μ M). **Panel B.** Quantification of JEG3 invasion is reported. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.001$, $n = 3$.

Figure 5: EG-VEGF effect on JEG3 invasion in 3D culture system. **Panel A** shows representative images of JEG3 cells spheroid at t0 (a, b, c, d, e, f) and 24 h (g, h, i, j, k, l) after their treatment with EG-VEGF in absence or presence of PROKR1 and PROKR2 antagonists. **Panel B.** reports the quantification of JEG3 spreading in each condition. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.001$, $n = 3$). **Panel C.** reports representative zymograms of matrix-metalloproteinases, MMP2 (72 kDa) and MMP9 (92 kDa) activity in conditioned medium collected from JEG3 cells treated or not with EG-VEGF.

Figure 6: Bioluminescence images of SCID mice injected with JEG3-luc cells in the absence or presence of PROKR1 and PROKR2 antagonists. **Panels A and B** show representative images that illustrate the bioluminescence of gravid mice injected by JEG3-luc in their placenta (a) or in their uterine horn (b). Photographs in (c) and (d) report images of the same mice after their surgery. **Panel C** reports representative images of gravid mice injected in their placenta by either JEG3-luc cells (a), or JEG3-luc plus vehicle for the antagonist's treatments (b); or JEG3-luc plus PROKR1 antagonist (500 μ g/kg) (c); or by JEG3-luc cells plus PROKR2 antagonist (100mg/Kg) (d). All mice were injected with JEG3-luc within the placenta at 7.5 dpc and imaged at 19.5 dpc. **Panel D** reports quantification of the values of photon flux (p/sec/cm²/sr) for each group of mice.

Figure 7: Effects of PROKR1 and PROKR2 antagonists on placental development and on circulating angiogenic factors in JEG3-injected mice. **Panel A** reports histology of placentas collected from, Matrigel, JEG3-luc, JEG3-luc+ PROKR1 antagonist and from JEG3-luc+PROKR2 antagonist-injected placentas. Photographs (a) (b) and (c) on reports histology of placentas collected from mice that were injected by matrigel alone. **Photographs (d) (e) and (f)** report photographs of placentas that were injected with JEG3 cells. Photographs in (g) (h) and (i) report histology of placentas collected from mice that were injected by JEG3 cells and treated by PROKR1 antagonist. Photographs in (j) (k) and (l) report histology of placentas collected from mice that were injected by JEG3 cells and treated by PROKR1 antagonist. Photographs on (b, c); (e,f); (h,i) and (k,e) are higher magnifications of photographs in a, d, g, and j, respectively. **Panel B** reports Ki67 staining of placentas collected from mice that were injected with, Matrigel alone, JEG3-luc, JEG3-luc+ PROKR1 antagonist and from JEG3-luc+PROKR2 antagonist-injected placentas. Photographs (a) (b)

on reports Ki67 staining of placentas collected from mice that were injected by matrigel alone. **Photographs (c) (d)** report photographs of placentas that were injected with JEG3 cells. Photographs in **(e) (f)** report Ki67 staining of placentas collected from mice that were injected by JEG3 cells and treated by PROKR1 antagonist. Photographs in **(g) (h)** report histology report Ki67 staining of placentas collected from mice that were injected by JEG3 cells and treated by PROKR1 antagonist. Photographs on **(b); (d); (f)** and **(h)** are higher magnifications of photographs in **a, c, e,** and **g,** respectively. **Panel C** reports representative antibody microarray blots of key angiogenic factors assessed in sera collected from SCID mice injected with JEG3-luc cells and treated or not with PROKR1 or PROKR2 antagonists. The graph on **Panel D** below reports the quantification of the intensity of the bands of three angiogenic factors that showed significant difference between the groups. Data are presented as mean $\pm$ SEM. * $p < 0.05$.

Figure S1: PROKR1 and PROKR2 expression in control, CHM and choriocarcinoma patients during the first trimester of pregnancy. Representative photographs of PROKR1 and PROKR2 stainings in CTL patient are shown in (a) and (b). Photographs in c and d illustrate stainings for PROKR1 and PROKR2 in CHM patients, respectively. Photographs in (e) and (f) illustrate stainings for PROKR1 and PROKR2 in choriocarcinoma patient. Photographs in g and h show negative controls for PROKR1 and PROKR2 stainings respectively. Cytotrophoblast (Ct), Hofbauer cells (Ho), Extravillous trophoblast (EVT), Syncytiotrophoblast (St). Scale bar = 50 μ m.

Figure S2: EG-VEGF effect on PROKR1 and PROKR2 expression. Panel A and B. report Western blot analysis of protein extracted from JEG3 cells treated with increasing concentrations of EG-VEGF. Membranes were incubated with PROKR1 (A) and PROKR2 (B) antibodies, respectively. Standardization of protein signals was performed using antibodies against β -actin. Quantification of the intensity of the bands is illustrated in panels C and D, respectively below. Values overwritten with different letters are significantly different from each other. * $P < 0.05$.

Figure S3: EG-VEGF effect on JEG3 proliferation in the absence or presence of siRNA for PROKR1 or PROKR2. JEG3 proliferation was determined using WST-1 assay after their incubation with increasing concentrations of EG-VEGF (0, 5, 10, 25 ng/ml) in the absence or presence of siRNA for PROKR1 and PROKR2 * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$).

Figure S4: Experimental procedures. The flow chart shows the experimental procedures performed at certain time-points during the study. The gravid mice were randomly assigned to be injected either with matrigel alone, JEG3 cells in matrigel, JEG3-luc, JEG3-luc+ PROKR1 antagonist or JEG3-luc+PROKR2 antagonist. Mice were imaged using IVIS imaging system and sacrificed at 19.5dpc. Placenta and maternal blood were collected.

Figure S5: JEG3-luc injected mice exhibit arrested gestation. **Table1** compares matrigel alone, JEG3-luc, JEG3-luc+ PROKR1 antagonist and from JEG3-luc+PROKR2 antagonist injected mice for, their number of embryo at injection, and resorbed placentas at 19.5 dpc.

References

- Alfaidy, N., Gupta, S., DeMarco, C., Caniggia, I., & Challis, J. R. (2002). Oxygen regulation of placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2: physiological and pathological implications. *J Clin Endocrinol Metab*, 87(10), 4797-4805. doi: 10.1210/jc.2002-020310
- Alfaidy, N., Li, W., MacIntosh, T., Yang, K., & Challis, J. (2003). Late gestation increase in 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 expression in human fetal membranes: a novel intrauterine source of cortisol. *J Clin Endocrinol Metab*, 88(10), 5033-5038. doi: 10.1210/jc.2002-021915
- Altieri, A., Franceschi, S., Ferlay, J., Smith, J., & La Vecchia, C. (2003). Epidemiology and aetiology of gestational trophoblastic diseases. *Lancet Oncol*, 4(11), 670-678.
- Bleau, A. M., Planque, N., Lazar, N., Zambelli, D., Ori, A., Quan, T., . . . Perbal, B. (2007). Antiproliferative activity of CCN3: involvement of the C-terminal module and post-translational regulation. *J Cell Biochem*, 101(6), 1475-1491. doi: 10.1002/jcb.21262
- Brouillet, S., Hoffmann, P., Feige, J. J., & Alfaidy, N. (2012). EG-VEGF: a key endocrine factor in placental development. *Trends Endocrinol Metab*, 23(10), 501-508. doi: 10.1016/j.tem.2012.05.006
- Brouillet, S., Murthi, P., Hoffmann, P., Salomon, A., Sergent, F., De Mazancourt, P., . . . Alfaidy, N. (2013). EG-VEGF controls placental growth and survival in normal and pathological pregnancies: case of fetal growth restriction (FGR). *Cell Mol Life Sci*, 70(3), 511-525. doi: 10.1007/s00018-012-1141-z
- Cagayan, M. S., & Lu-Lasala, L. R. (2006). Management of gestational trophoblastic neoplasia with metastasis to the central nervous system: A 12-year review at the Philippine General Hospital. *J Reprod Med*, 51(10), 785-792.
- Esfandiari, N., & Goldberg, J. M. (2003). Heterophile antibody blocking agent to confirm false positive serum human chorionic gonadotropin assay. *Obstet Gynecol*, 101(5 Pt 2), 1144-1146.
- Farina, A. R., & Mackay, A. R. (2014). Gelatinase B/MMP-9 in Tumour Pathogenesis and Progression. *Cancers (Basel)*, 6(1), 240-296. doi: 10.3390/cancers6010240
- Foulmann, K., Guastalla, J. P., Caminet, N., Trillet-Lenoir, V., Raudrant, D., Golfier, F., & Schott, A. M. (2006). What is the best protocol of single-agent methotrexate chemotherapy in nonmetastatic or low-risk metastatic gestational trophoblastic tumors? A review of the evidence. *Gynecol Oncol*, 102(1), 103-110. doi: 10.1016/j.ygyno.2006.02.038
- Froeling, F. E., & Seckl, M. J. (2014). Gestational trophoblastic tumours: an update for 2014. *Curr Oncol Rep*, 16(11), 408. doi: 10.1007/s11912-014-0408-y
- Goi, T., Fujioka, M., Satoh, Y., Tabata, S., Koneri, K., Nagano, H., . . . Yamaguchi, A. (2004). Angiogenesis and tumor proliferation/metastasis of human colorectal cancer cell line SW620 transfected with endocrine glands-derived-vascular endothelial growth factor, as a new angiogenic factor. *Cancer Res*, 64(6), 1906-1910.
- Grummer, R., Donner, A., & Winterhager, E. (1999). Characteristic growth of human choriocarcinoma xenografts in nude mice. *Placenta*, 20(7), 547-553. doi: 10.1053/plac.1999.0406
- Guilini, C., Urayama, K., Turkeri, G., Dedeoglu, D. B., Kurose, H., Messaddeq, N., & Nebigil, C. G. (2010). Divergent roles of prokineticin receptors in the endothelial cells: angiogenesis and fenestration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 298(3), H844-852. doi: 10.1152/ajpheart.00898.2009
- Gupta, N., Wang, H., McLeod, T. L., Naus, C. C., Kyurkchiev, S., Advani, S., . . . Weichselbaum, R. R. (2001). Inhibition of glioma cell growth and tumorigenic potential by CCN3 (NOV). *Mol Pathol*, 54(5), 293-299.
- Hoffmann, P., Feige, J. J., & Alfaidy, N. (2006). Expression and oxygen regulation of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor/prokineticin-1 and its receptors in human placenta during early pregnancy. *Endocrinology*, 147(4), 1675-1684. doi: 10.1210/en.2005-0912
- Hoffmann, P., Saoudi, Y., Benharouga, M., Graham, C. H., Schaal, J. P., Mazouni, C., . . . Alfaidy, N. (2009). Role of EG-VEGF in human placentation: Physiological and pathological implications. *J Cell Mol Med*, 13(8B), 2224-2235. doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00554.x

- Hu, W. P., Zhang, C., Li, J. D., Luo, Z. D., Amadesi, S., Bunnett, N., & Zhou, Q. Y. (2006). Impaired pain sensation in mice lacking prokineticin 2. *Mol Pain*, 2, 35. doi: 10.1186/1744-8069-2-35
- Kohler, P. O., Bridson, W. E., Hammond, J. M., Weintraub, B., Kirschner, M. A., & Van Thiel, D. H. (1971). Clonal lines of human choriocarcinoma cells in culture. *Acta Endocrinol Suppl (Copenh)*, 153, 137-153.
- LeCouter, J., Kowalski, J., Foster, J., Hass, P., Zhang, Z., Dillard-Telm, L., . . . Ferrara, N. (2001). Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium. *Nature*, 412(6850), 877-884. doi: 10.1038/35091000
- Li, M., Bullock, C. M., Knauer, D. J., Ehlert, F. J., & Zhou, Q. Y. (2001). Identification of two prokineticin cDNAs: recombinant proteins potently contract gastrointestinal smooth muscle. *Mol Pharmacol*, 59(4), 692-698.
- Lin, D. C., Bullock, C. M., Ehlert, F. J., Chen, J. L., Tian, H., & Zhou, Q. Y. (2002). Identification and molecular characterization of two closely related G protein-coupled receptors activated by prokineticins/endocrine gland vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*, 277(22), 19276-19280. doi: 10.1074/jbc.M202139200
- Louwen, F., Muschol-Steinmetz, C., Reinhard, J., Reitter, A., & Yuan, J. (2012). A lesson for cancer research: placental microarray gene analysis in preeclampsia. *Oncotarget*, 3(8), 759-773. doi: 10.18632/oncotarget.595
- Lurain, J. R. (2002). Treatment of gestational trophoblastic tumors. *Curr Treat Options Oncol*, 3(2), 113-124.
- Lurain, J. R., Singh, D. K., & Schink, J. C. (2006). Primary treatment of metastatic high-risk gestational trophoblastic neoplasia with EMA-CO chemotherapy. *J Reprod Med*, 51(10), 767-772.
- Monnier, J., & Samson, M. (2010). Prokineticins in angiogenesis and cancer. *Cancer Lett*, 296(2), 144-149. doi: 10.1016/j.canlet.2010.06.011
- Nath, S., & Devi, G. R. (2016). Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. *Pharmacol Ther*, 163, 94-108. doi: 10.1016/j.pharmthera.2016.03.013
- Ngan, E. S., Sit, F. Y., Lee, K., Miao, X., Yuan, Z., Wang, W., . . . Tam, P. K. (2007). Implications of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor/prokineticin-1 signaling in human neuroblastoma progression. *Clin Cancer Res*, 13(3), 868-875. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2176
- Olsen, T. G., Hubert, P. R., & Nycum, L. R. (2001). Falsely elevated human chorionic gonadotropin leading to unnecessary therapy. *Obstet Gynecol*, 98(5 Pt 1), 843-845.
- Pasquali, D., Rossi, V., Staibano, S., De Rosa, G., Chieffi, P., Prezioso, D., . . . Sinisi, A. A. (2006). The endocrine-gland-derived vascular endothelial growth factor (EG-VEGF)/prokineticin 1 and 2 and receptor expression in human prostate: Up-regulation of EG-VEGF/prokineticin 1 with malignancy. *Endocrinology*, 147(9), 4245-4251. doi: 10.1210/en.2006-0614
- Samson, M., Peale, F. V., Jr., Frantz, G., Rioux-Leclercq, N., Rajpert-De Meyts, E., & Ferrara, N. (2004). Human endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor: expression early in development and in Leydig cell tumors suggests roles in normal and pathological testis angiogenesis. *J Clin Endocrinol Metab*, 89(8), 4078-4088. doi: 10.1210/jc.2003-032024
- Sasaki, S., Sasaki, Y., & Iino, K. (2010). Recurrent gestational trophoblastic disease in a case of suspected quiescent gestational trophoblastic disease: a case report. *J Reprod Med*, 55(7-8), 317-320.
- Savage, P., Kelpandides, I., Tuthill, M., Short, D., & Seckl, M. J. (2015). Brain metastases in gestational trophoblast neoplasia: an update on incidence, management and outcome. *Gynecol Oncol*, 137(1), 73-76. doi: 10.1016/j.ygyno.2015.01.530
- Sergent, F., Hoffmann, P., Brouillet, S., Garnier, V., Salomon, A., Murthi, P., . . . Alfaidy, N. (2016). Sustained Endocrine Gland-Derived Vascular Endothelial Growth Factor Levels Beyond the First Trimester of Pregnancy Display Phenotypic and Functional Changes Associated With the Pathogenesis of Pregnancy-Induced Hypertension. *Hypertension*, 68(1), 148-156. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07442
- Seror, J., Chabbert-Buffet, N., Millot, F., Lahlou, N., Uzan, S., & Berkane, N. (2009). False-positive immunometric assay results in the detection of phantom human chorionic gonadotropin: a

- situation with possible severe iatrogenic consequences. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 147(2), 239-240. doi: 10.1016/j.ejogrb.2009.08.009
- Shih Ie, M. (2011). Trophoblastic vasculogenic mimicry in gestational choriocarcinoma. *Mod Pathol*, 24(5), 646-652. doi: 10.1038/modpathol.2010.231
- Shiu, S. Y., Xi, S. C., Xu, J. N., Mei, L., Pang, S. F., Yao, K. M., & Wong, J. T. (2000). Inhibition of malignant trophoblastic cell proliferation in vitro and in vivo by melatonin. *Life Sci*, 67(17), 2059-2074.
- Smith, H. O. (2003). Gestational trophoblastic disease epidemiology and trends. *Clin Obstet Gynecol*, 46(3), 541-556.
- Soper, J. T. (2003). Role of surgery and radiation therapy in the management of gestational trophoblastic disease. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 17(6), 943-957.
- Stevens, F. T., Katzorke, N., Tempfer, C., Kreimer, U., Bizjak, G. I., Fleisch, M. C., & Fehm, T. N. (2015). Gestational Trophoblastic Disorders: An Update in 2015. *Geburtshilfe Frauenheilkd*, 75(10), 1043-1050. doi: 10.1055/s-0035-1558054
- Xu, P., Alfaidy, N., & Challis, J. R. (2002). Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in human placenta and fetal membranes in relation to preterm and term labor. *J Clin Endocrinol Metab*, 87(3), 1353-1361. doi: 10.1210/jcem.87.3.8320
- Zavadil, M., Feyereisl, J., Safar, P., Pan, M., & Turyna, R. (2006). [Syndrome of persistent low levels of human chorionic gonadotrophin (hCG)]. *Ceska Gynekol*, 71(2), 136-142.
- Zhang, L., Yang, N., Conejo-Garcia, J. R., Katsaros, D., Mohamed-Hadley, A., Fracchioli, S., . . . Coukos, G. (2003). Expression of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor in ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res*, 9(1), 264-272.

Figure 1

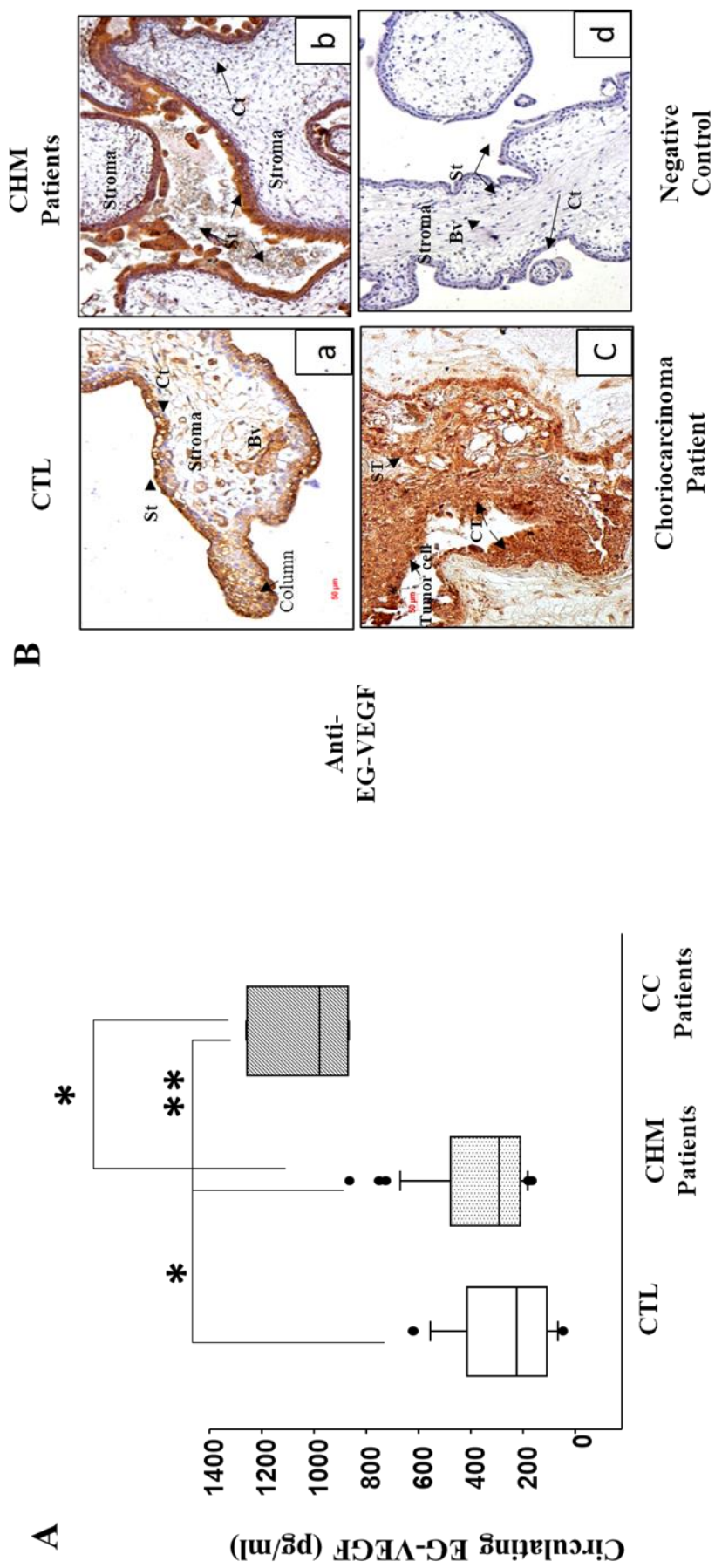


Figure 2

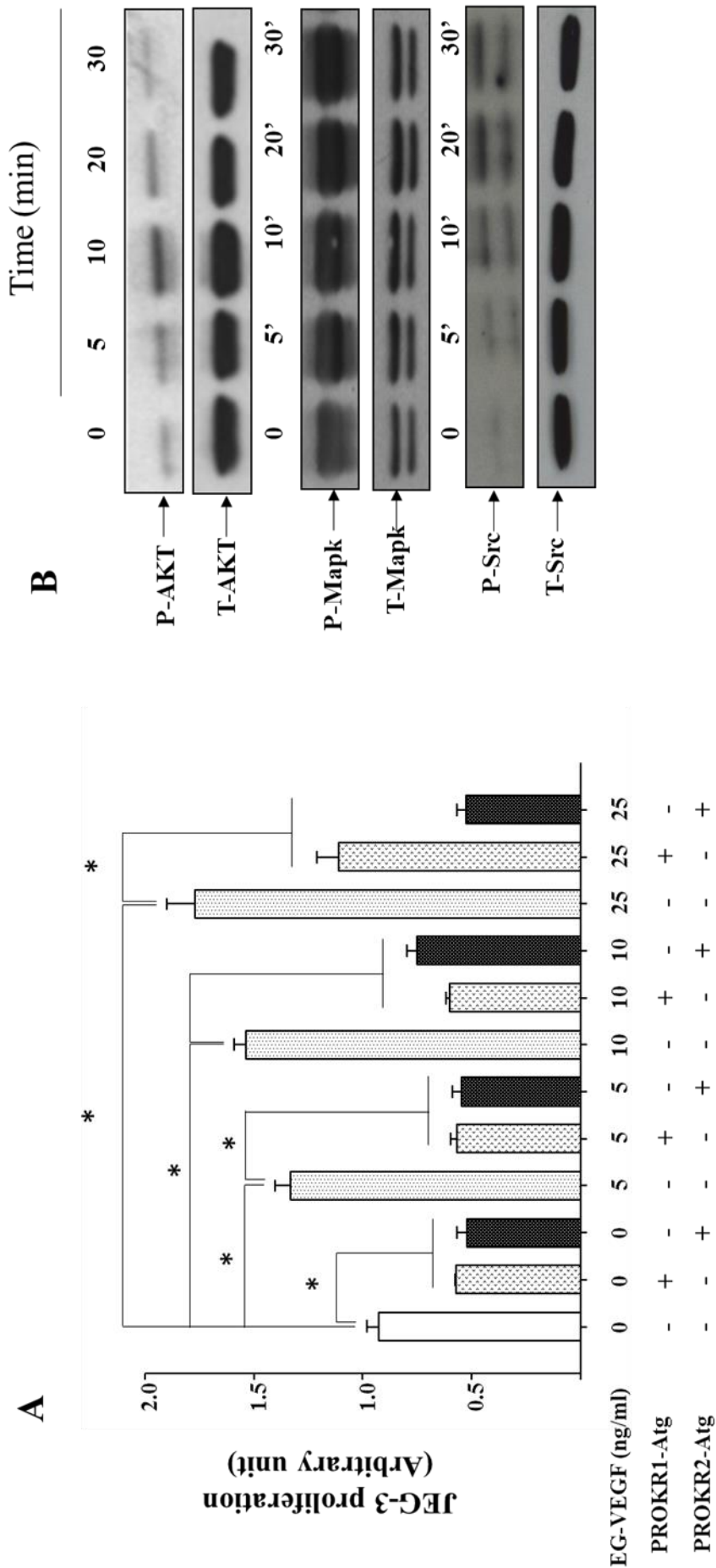


Figure 3

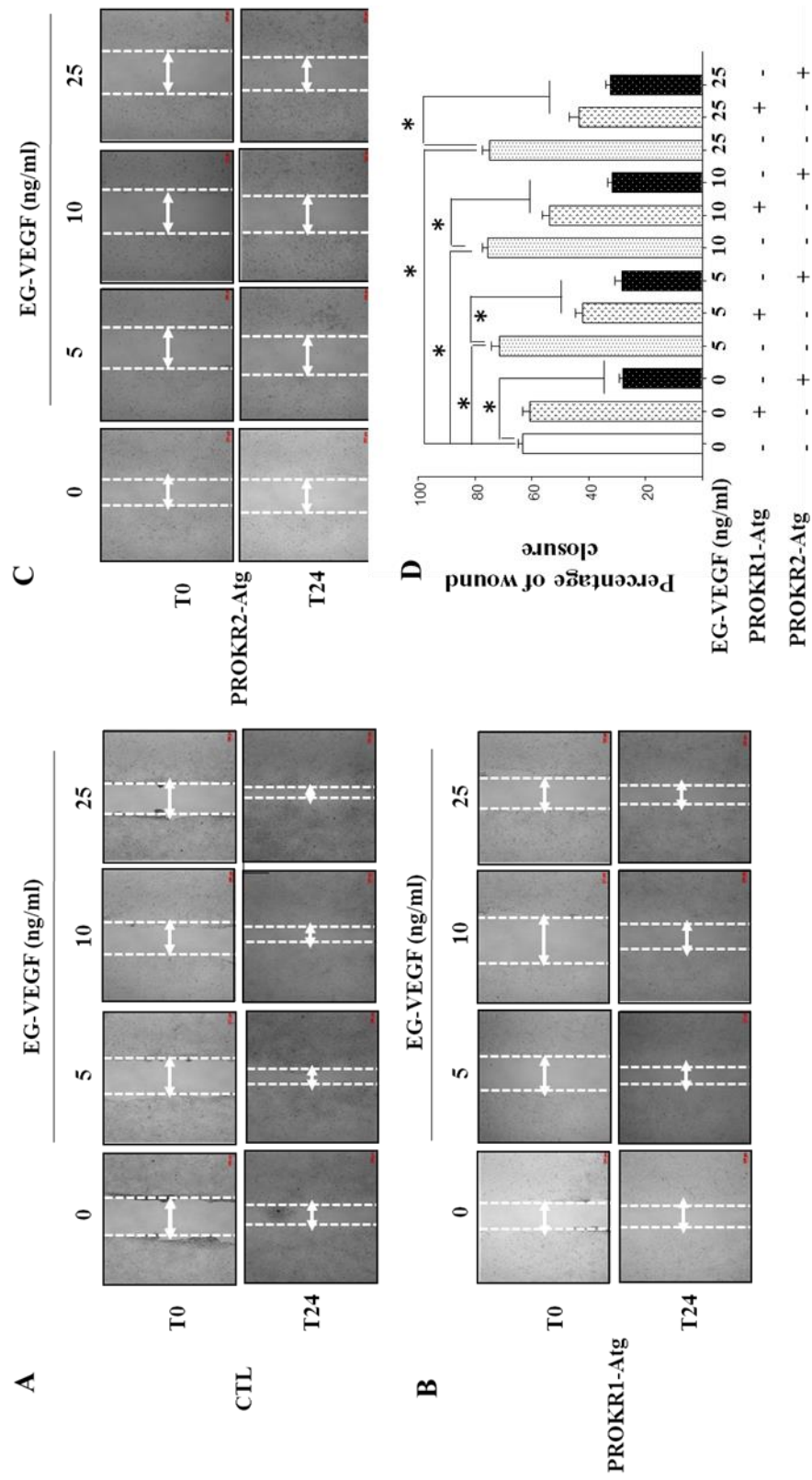


Figure 4

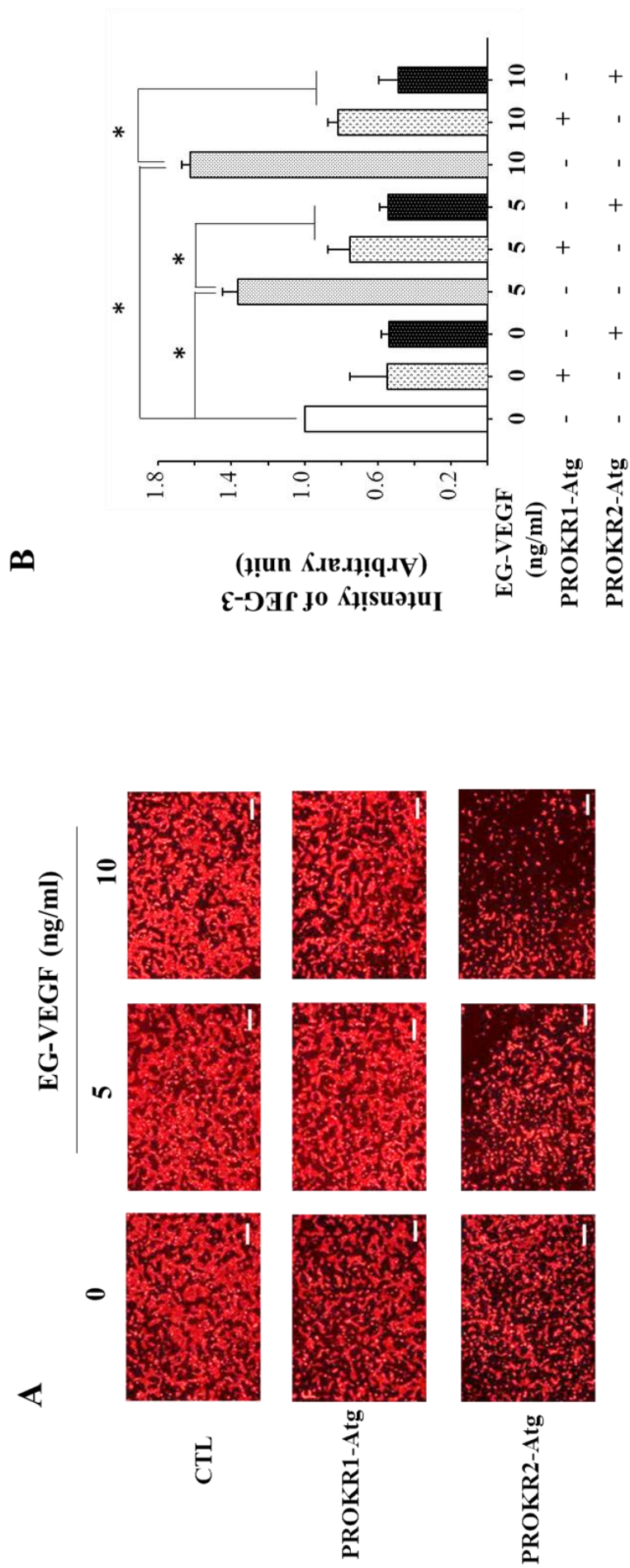


Figure 5

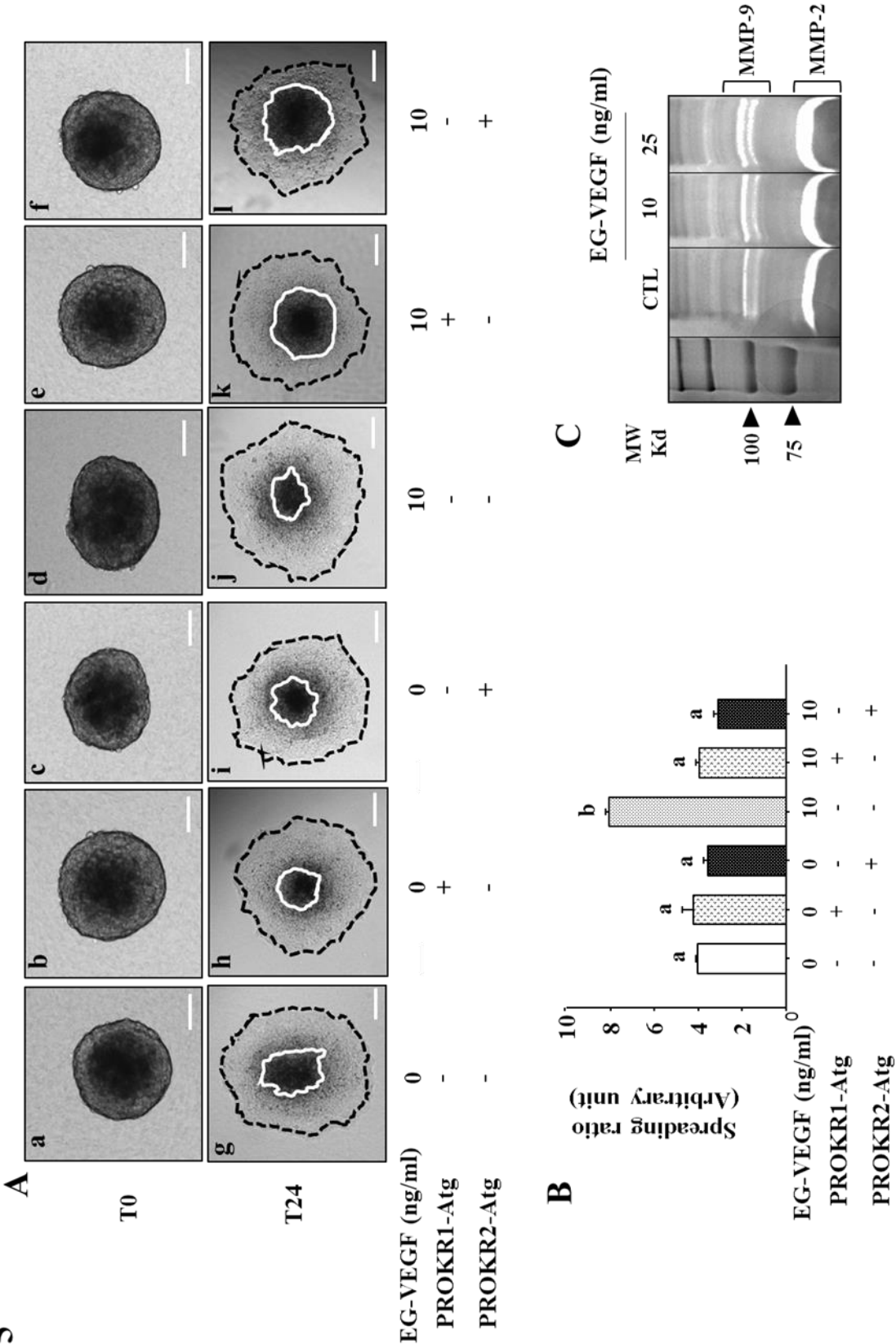
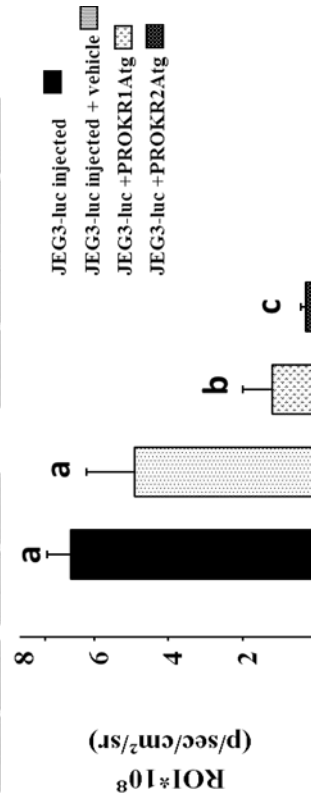
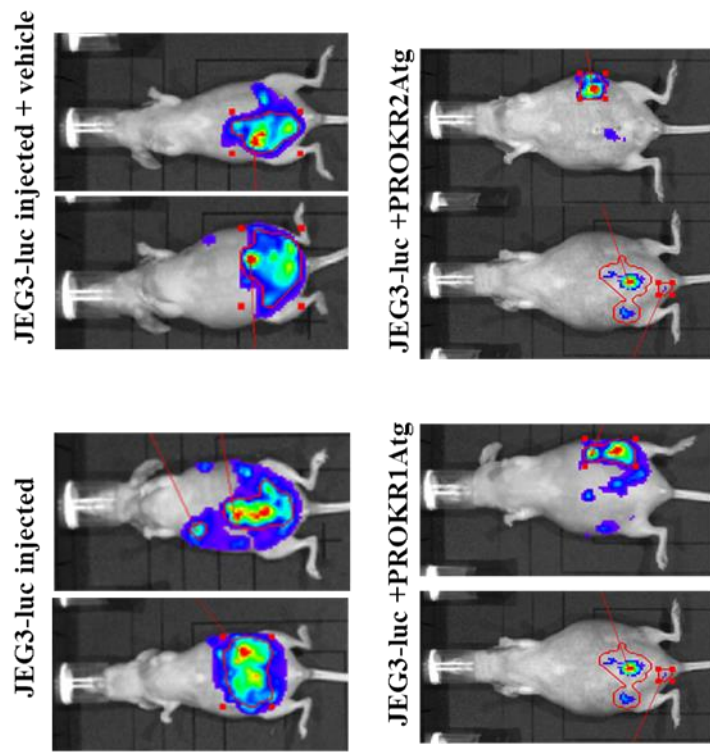
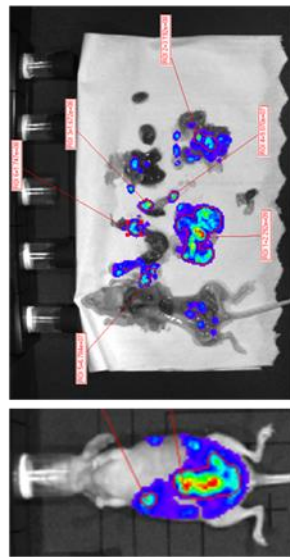


Figure 6

C



A



B

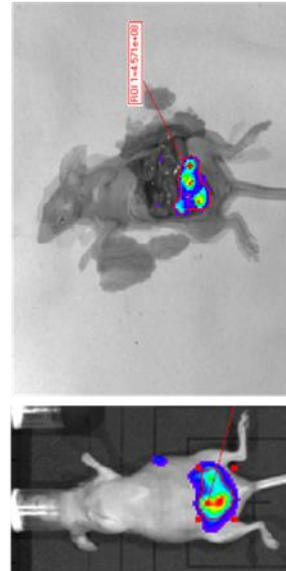


Figure 7

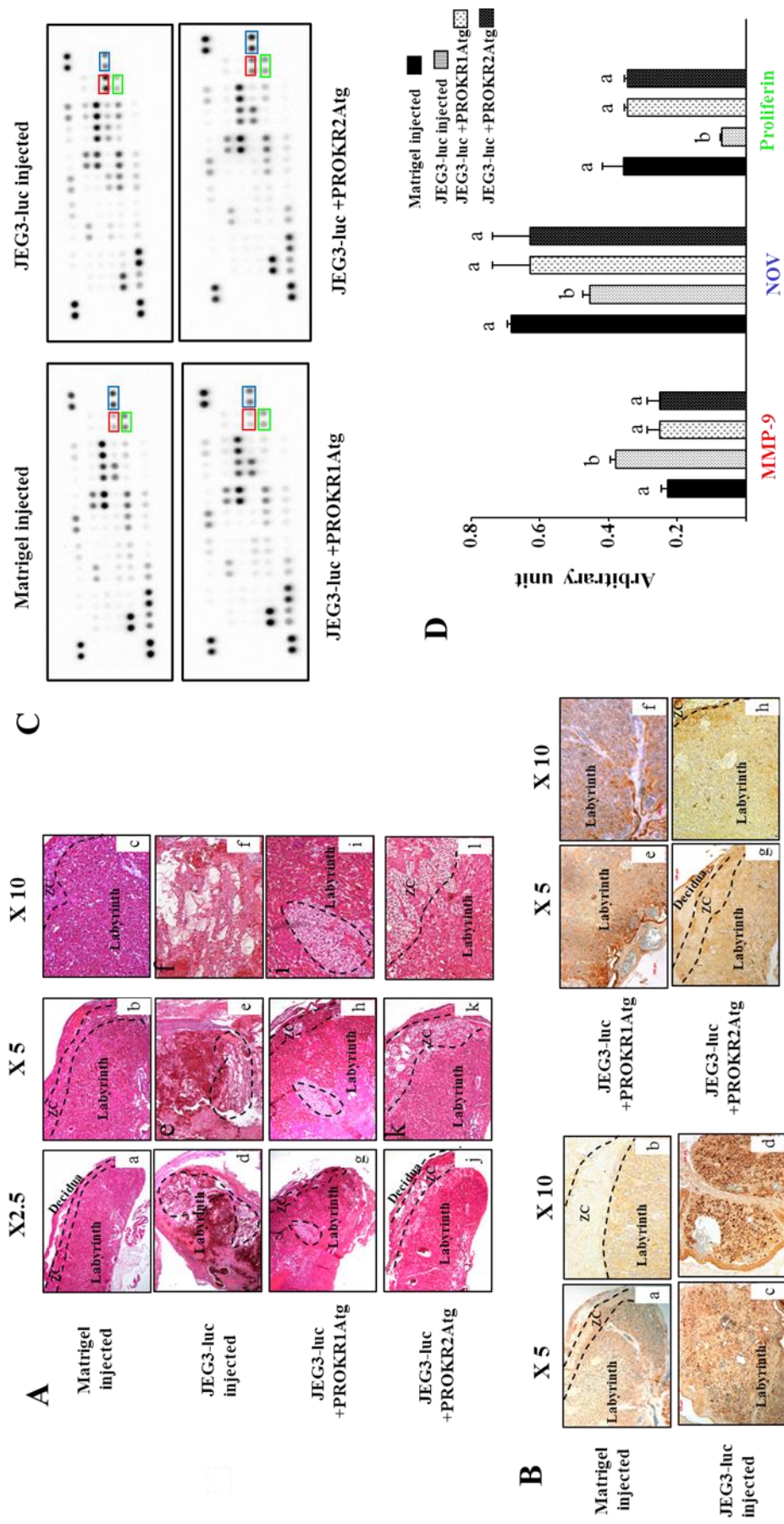


Figure S1

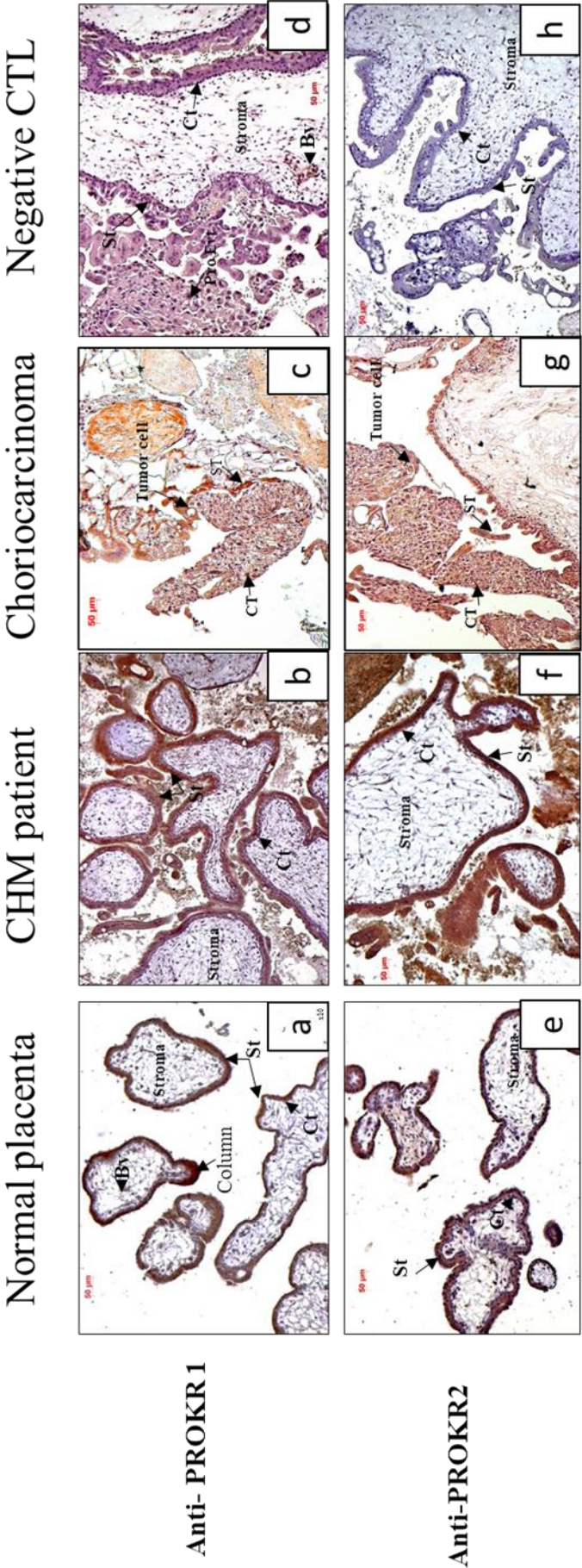


Figure S2

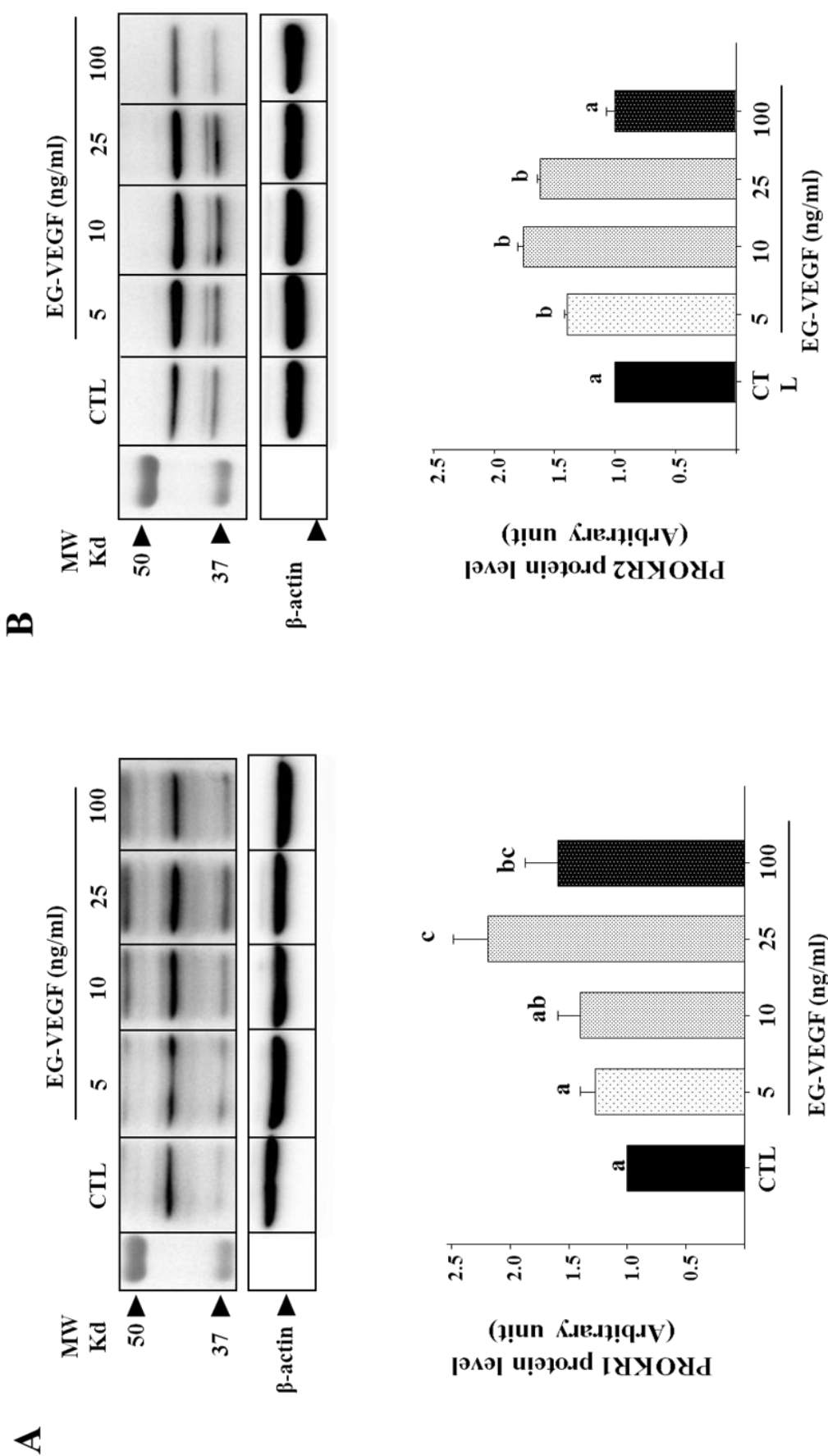


Figure S3

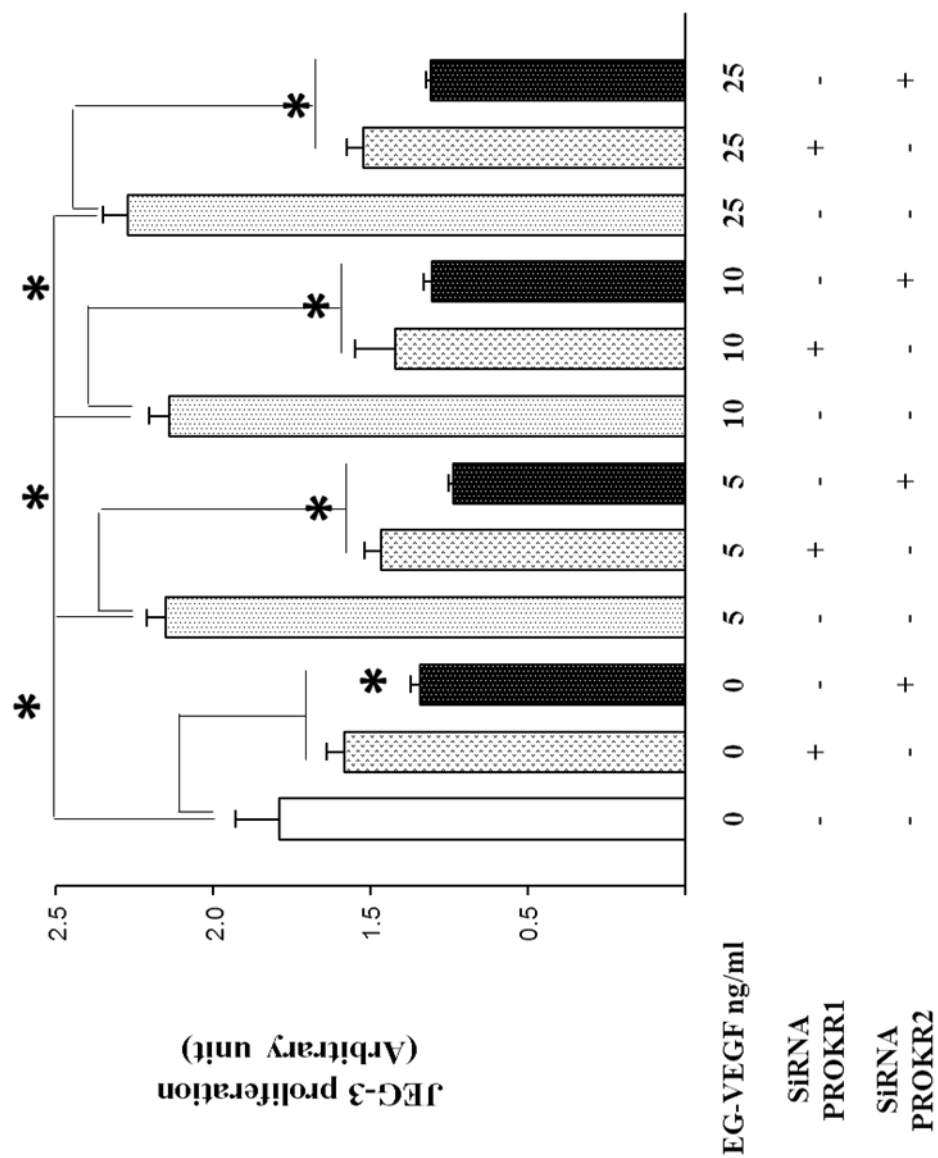


Figure S4

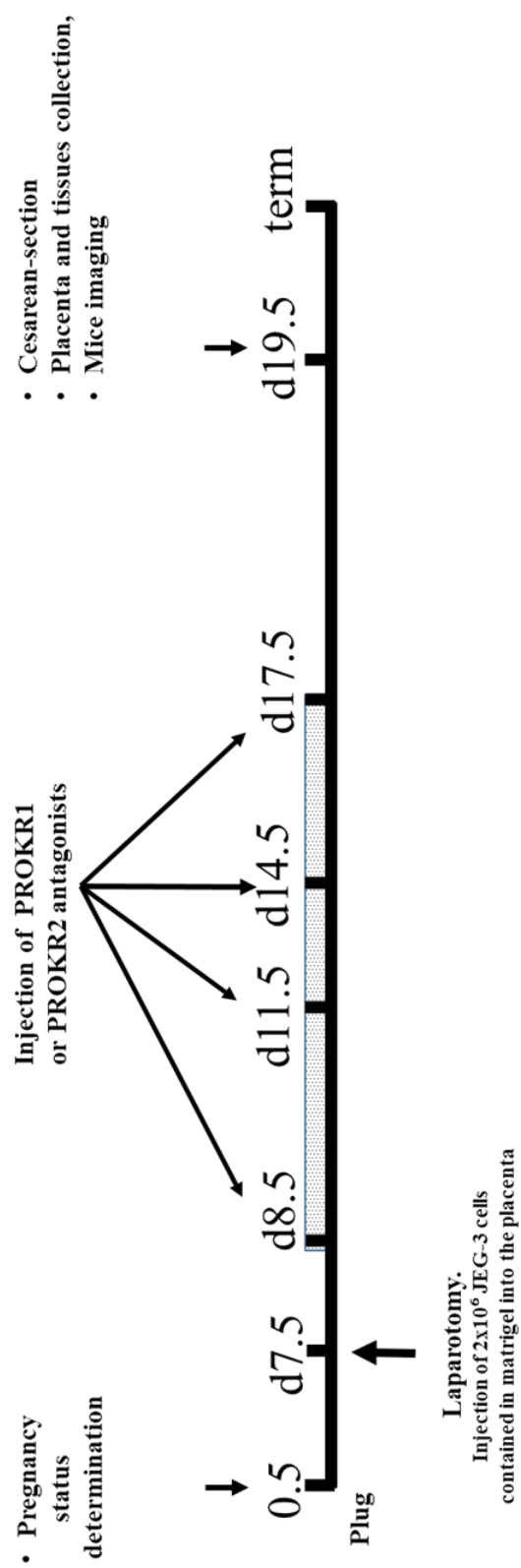


Figure S5

A

Mice injected with JEG-3-Luc	Embryo at surgery	Resorbed fetuses at 19.5 jpc
1	7	7 (100%)
2	8	8 (100%)
3	8	8 (100%)
4	9	9 (100%)
5	7	7 (100%)
Total	39	39(100%)

B

Mice injected with Matrigel	Embryo at surgery	Resorbed fetuses at 19.5 jpc
1	8	0 (0%)
2	8	0 (0%)
3	8	0 (0%)
4	10	0 (0%)
5	9	0 (0%)
Total	43	0 (0%)

C

Mice injected with JEG-3-Luc + vehicle	Embryo at surgery	Resorbed fetuses at 19.5 jpc
1	10	0 (0%)
2	8	0 (0%)
3	9	0 (0%)
4	8	0 (0%)
5	10	0 (0%)
Total	45	0 (0%)

D

Mice injected with JEG-3-luc + PROKR1atg	Embryo at surgery	Resorbed fetuses at 19.5 jpc
1	7	2(28.5%)
2	8	2 (25%)
3	8	2 (25%)
4	9	2(22.2%)
5	8	2 (25%)
Total	40	10(25%)

E

Mice injected with JEG-3-luc + PROKR2atg	Embryo at surgery	Resorbed fetuses at 19.5 jpc
1	7	2 (28.5%)
2	10	2 (20%)
3	9	2 (22.2%)
4	9	2 (22.2%)
5	8	2 (25%)
Total	43	10 (23.2%)

Table 1

Clinical characteristics of normal and pathological pregnancies			
Maternal characteristics	Normal Gestations (n=18)	Hydatidiform Mole (n=38)	Choriocarcinoma (n=3)
Maternal age (years)	24,8 (18-30)	31,2 (19-50)	39
Gestational age at sampling (weeks)	12-14	12-14	12
βhCG at sampling (mIU/mL)	9052 (± 1950)	5487- 242400	1077379
Menarche (years)	13(± 1.0)	14.1(± 1.7)	12
Age of first pregnancy (years)	23(± 2.0)	23.9(± 7.9)	21
Parity	0-3	0-7	3

2. Résumé des résultats

2.1 Augmentation des niveaux circulants et de l'expression placentaire de l'EG-VEGF dans les MHC et dans le choriocarcinome.

Nous avons précédemment démontré que l'EG-VEGF est sécrété par le syncytiotrophoblaste et que ses niveaux sont plus élevés au cours du premier trimestre de la grossesse. Ici, nous avons comparé les niveaux circulants et placentaires de ce facteur dans une cohorte de patientes normales (n = 20), MHC (n = 38) ou un choriocarcinome (n = 3). Nos résultats montrent que les niveaux d'EG-VEGF étaient significativement plus élevés dans le groupe de MHC par rapport au groupe normal ($P < 0.05$). De Plus; dans les cas des patientes diagnostiquées pour un choriocarcinome, nos résultats montrent une augmentation significative des niveaux d'EG-VEGF par rapport aux patientes normales et aux patientes avec une MHC.

En plus de l'augmentation du taux circulant, l'expression placentaire d'EG-VEGF a été fortement augmentée dans les placentas des patientes MHC. Dans le choriocarcinome le marquage d'EG-VEGF était plus intense comparé aux tissus normaux et MHC.

Comme EG-VEGF agit par l'intermédiaire de ses deux récepteurs PROKR1 et PROKR2, nous avons comparé sur la même cohorte leurs niveaux. Nos résultats montrent une forte augmentation de l'expression protéique placentaire de PROKR1 et PROKR2 dans les MHC et le choriocarcinome par rapport aux tissus normaux.

2.2 EG-VEGF active les voies de signalisation tumorales et augmente la prolifération des cellules du Choriocarcinome.

Nous avons précédemment montré qu'EG-VEGF augmente la prolifération du trophoblaste normale suggérant son implication potentielle dans la prolifération des cellules du choriocarcinome. Nous avons déterminé son effet sur la prolifération des cellules JEG3. Dans un premier temps, nous avons démontré que les cellules JEG3 expriment les deux récepteurs PROKR1 et PROKR2 et qu'EG-VEGF induit significativement leur expression. Nos résultats montrent aussi qu'EG-VEGF augmente de manière significative la prolifération des cellules JEG3. Cet effet a été aboli en présence des antagonistes des deux récepteurs PROKR1 et PROKR2, suggérant l'implication des deux récepteurs dans les effets de l'EG-VEGF sur la prolifération des cellules tumorales. Afin de mieux caractériser le mécanisme par lequel EG-VEGF induit la prolifération et la survie des cellules du choriocarcinome, nous avons déterminé ses effets sur les voies de signalisations clés impliquées dans ces processus. Nos résultats ont montré qu'EG-VEGF induit la phosphorylation de plusieurs protéines comme

l'AKT et les MAPKinases p42 et p44. La phosphorylation de la protéine Src étant souvent associée à l'agressivité des cellules tumorales, nous avons déterminé l'effet de l'EG-VEGF sur sa phosphorylation dans les cellules JEG3. Nos résultats montrent une augmentation significative de la phosphorylation de Src après traitement par EG-VEGF.

2.3 EG-VEGF augmente la migration et l'invasion des cellules du choriocarcinome en culture 2D et 3D.

Du fait de l'importance de la migration et l'invasion cellulaire dans le processus de la progression tumorale et des métastases, nous avons étudié l'effet de l'EG-VEGF sur la migration et l'invasion des JEG3, en absence ou en présence des antagonistes des deux récepteurs de l'EG-VEGF. Nos résultats montrent qu'après 24 heures d'incubation, EG-VEGF induit la migration des cellules JEG3 à toutes les concentrations testées (5, 10 et 25 ng/ml). La fermeture de la blessure est de 80% dans les cellules traitées en présence 10 ng /ml d'EG-VEGF et de 60% dans les cellules contrôles non traitées. L'effet de l'EG-VEGF sur la migration a été aboli en présence des antagonistes des deux récepteurs, PROKR1 et PROKR2.

Nous avons ensuite déterminé le degré d'invasion des cellules JEG3 sous l'effet d'EG-VEGF et ce en absence ou en présence des antagonistes de PROKR1 et PROKR2. Nos résultats ont montré qu'EG-VEGF augmente d'une manière significative l'invasion des cellules JEG3 et que cet effet est inversé en présence des antagonistes des deux récepteurs. L'effet de l'EG-VEGF sur l'invasion des cellules JEG3 a été entrepris dans un second système de culture mimant au plus près l'architecture tumorale observée *in vivo*

Il est bien établi que les cellules tumorales mises en culture sous forme de sphéroïdes forment une topologie similaire à celle observée *in vivo* (Nath & Devi, 2016). Ainsi, nous avons déterminé l'effet de l'EG-VEGF sur l'invasion des JEG3 en utilisant le système de sphéroïdes cellulaires formé à partir de ces cellules. Le traitement de ces sphéroïdes avec l'EG-VEGF a induit une augmentation significative de l'invasion des cellules JEG3 au sein du collagène. Cet effet a été aboli en présence des antagonistes de PROKR1 et PROKR2.

2.4 Développement et caractérisation du modèle murin du choriocarcinome.

Nos études *in-vitro* et cliniques cités ci-dessus suggèrent fortement qu'EG-VEGF peut contribuer au développement et à la progression du choriocarcinome *in-vivo*. Pour tester cette hypothèse, nous avons développé un modèle animal de choriocarcinome qui imite au plus près le développement tumoral du choriocarcinome chez la femme.

Dans ce contexte, les cellules JEG3 ont été rendues luciférase positives et ont été injectées de manière orthotopique dans le placenta de souris SCID. Afin de déterminer si l'environnement

placentaire contribue à la métastase des cellules du choriocarcinome, nous avons comparé l'injection des cellules JEG3-Luc dans le placenta par rapport à leur injection dans la corne utérine des souris non gravides. Nos résultats ont montré que l'injection de cellules JEG3 dans les placentas des souris gravides conduit au développement d'une tumeur plus agressive. Nous avons pu observer un développement tumoral rapide avec des métastases importantes dans plusieurs organes, y compris le placenta, l'intestin, les glandes mammaires, la rate, le vagin et le foie. Ces résultats suggèrent fortement que l'environnement placentaire contribue à la métastase du choriocarcinome.

2.5 Effets des antagonistes des récepteurs PROKR1 et PROKR2 sur le développement et la progression du choriocarcinome *in vivo*.

Pour mieux caractériser le rôle de l'EG-VEGF dans le développement et la progression du choriocarcinome *in-vivo*, nous avons traité les souris gravides injectées par JEG3-luc, par les antagonistes des récepteurs PROKR1 ou PROKR2. D'une manière intéressante, les souris injectées avec l'un ou l'autre des antagonistes ont montré une diminution significative dans le développement et la progression tumorale. Ces données suggèrent un fort potentiel de ces deux antagonistes à contrôler le développement des tumeurs et réduire le degré des métastases. De plus nous avons pu observer chez les souris traitées avec l'un ou l'autre des antagonistes de PROKR1 et PROKR 2 un maintien de la gestation avec peu de placentas résorbés à terme de la gestation.

2.6 Analyse *in situ* des placentas de souris traitées avec les antagonistes des récepteurs PROKR1 ou PROKR2.

Nous avons par la suite comparé l'histologie des placentas collectés chez les souris injectées avec les cellules JEG3-Luc seules et celles injectées avec JEG3-Luc et traitées avec l'antagoniste PROKR1 ou PROKR2. Les Placentas collectés chez les souris injectées avec des cellules JEG3-luc seules ont montré des remaniements histologiques importants avec une perte de toutes les structures et les zones placentaires. De façon intéressante l'étude histologique des placentas des souris injectées avec des cellules JEG3-Luc et traitées avec les antagonistes de PROKR1 ou PROKR2 ont subi des remaniements moins importants de toutes les structures et les zones placentaires. Afin de mieux caractériser et suivre les cellules JEG3 humaines injectées chez la souris, nous avons marqué ces mêmes placentas avec l'anticorps Ki67, spécifique des cellules humaines prolifératives. Nos résultats ont montré que le marquage est très important dans les placentas collectés chez les souris injectées par les JEG3-luc. En revanche, ce marquage était beaucoup plus faible dans les placentas collectés

chez les souris traitées avec l'un ou l'autre antagoniste. Ce marquage était limité à certains vaisseaux placentaires, indiquant une faible présence des cellules JEG3 prolifératives.

2.7 Altération de l'expression de facteurs pro-angiogéniques chez les souris traitées *in vivo*.

Afin de déterminer si l'expression de certains facteurs angiogéniques a été altérée suite à l'injection de cellules JEG3-Luc, et suite au traitement de ces souris par les antagonistes PROKR1 ou PROKR2, nous avons comparé les niveaux d'expression d'un panel de 57 facteurs angiogènes dans les sera collectés chez les différents groupes de souris (Figure 37). La technique « Antibody array » a été utilisée. L'analyse densitométrique de l'intensité des 57 facteurs a montré que les niveaux de trois facteurs angiogéniques, MMP-9, NOV et proliférine, ont été altérés de façon significative lors de l'injection des cellules JEG3-luc et que ces niveaux étaient corrigés par le traitement avec les antagonistes (Figure 37). MMP-9, a été augmentée chez les souris injectées avec les cellules JEG3, alors que les deux autres facteurs, NOV et proliférine étaient significativement diminués. Ces données sont en accord avec les rôles des deux protéines MMP-9 et NOV dans le développement tumoral. En effet, MMP-9 est une protéine pro-tumorale (Farina & Mackay, 2014), tandis que NOV est une protéine qui contrôlerait négativement la prolifération des cellules cancéreuses (Bleau et al., 2007). La baisse de l'expression de la proliférine chez les souris injectées par les cellules JEG3 est plausible car la proliférine est aussi une hormone produite par les cellules géantes trophoblastiques du placenta. Le maintien de son expression est corrélé à la poursuite de la gestation. Or, les souris injectées par les cellules JEG3-luc ont subi un arrêt de leur gestation. De façon intéressante, les souris traitées avec l'un ou l'autre des antagonistes avaient un niveau élevé de proliférine, confirmant un maintien de la gestation et donc un effet bénéfique de ces molécules.

Expression des facteurs angiogéniques

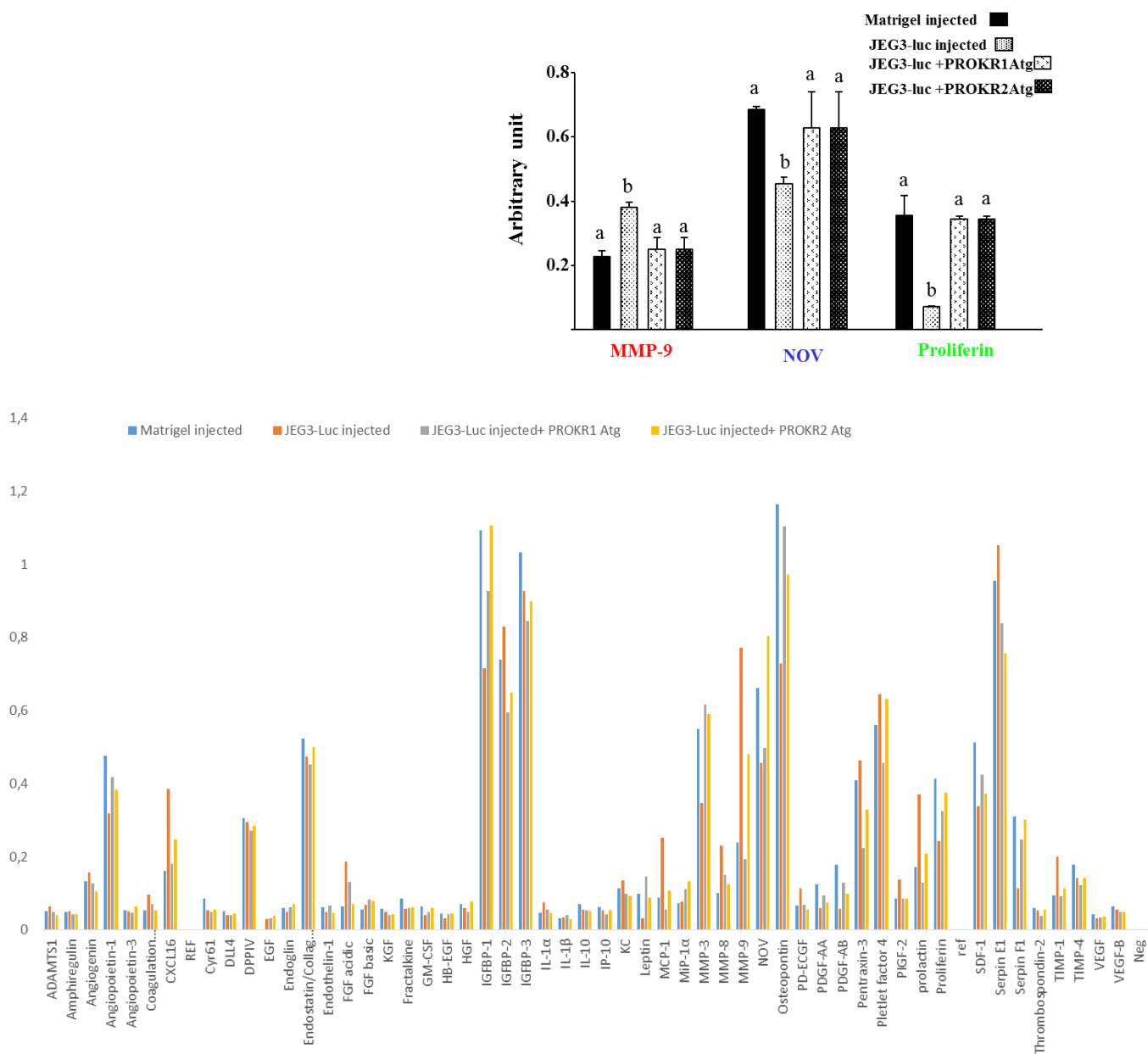


Figure 37. Expression de certains facteurs angiogéniques chez les différents groupes de souris.

3. Conclusion

Dans ce travail, nous avons apporté des évidences en support de l'implication du facteur placentaire EG-VEGF dans le développement et la progression du choriocarcinome. Ces conclusions se sont basées sur trois études différentes mais complémentaires. L'étude clinique rapportant des taux élevés de l'EG-VEGF dans les MHC et dans le choriocarcinome, avec comme potentiel clinique l'utilisation de ce facteur circulant dans la détection de patientes MHC à risque de développer un choriocarcinome, mais aussi dans le suivi, à long terme, de patientes ayant eu un choriocarcinome.

L'EG-VEGF pourrait être proposé comme dosage complémentaire de celui de l'hCG. L'étude *in vitro* a démontré les effets directs de l'EG-VEGF sur les cellules trophoblastiques tumorales et elle a apporté les preuves que ce facteur, bien que facteur placentaire avec un rôle physiologique établi, contribue aux processus du développement et de la progression du cancer placentaire. Néanmoins, la confirmation que la dérégulation de l'EG-VEGF dans ce type de cancer est cause ou conséquence de son développement, reste à démontrer. En fin, l'étude basée sur le développement d'un nouveau modèle animal pour démontrer le rôle de l'EG-VEGF dans la progression de ce type de cancer a été capitale. En effet, En absence d'un modèle animal qui représente le mieux le choriocarcinome, nous avons développé dans cette étude un nouveau modèle murin du choriocarcinome par injection des cellules cancéreuses dans le placenta de souris gravides. Grâce à ce modèle, l'implication de l'EG-VEGF dans la progression du choriocarcinome a été confirmé et ce par l'utilisation des antagonistes pour ses récepteurs PROKR1 et PROKR2.

4. Discussion des résultats

4.1 Choix des cellules JEG3

Plusieurs lignées cellulaires ont été établies suite à l'isolation de cellules à partir de tissus choriocarcinomateux. Ces cellules ont le plus souvent un caryotype anormal, para-triploïde XXY. Aussi, ces cellules ont gardé certaines propriétés de cellules trophoblastiques, comme la sécrétion hormonale de l'hCG, l'hPL et la progestérone, ainsi que l'expression de la cytokératine 7 (KRT7), marqueur spécifique des trophoblastes. Les trois lignées les plus communément utilisées sont les lignées JAR, JEG, et BeWo. En raison de leur potentiel de fusion cellulaire, les BeWo sont le plus utilisées pour représenter les cellules syncytiotrophoblastiques. A l'inverse, les JEG et les JAR ont un phénotype plus invasif et représenteraient plus les trophoblastes extravilleux. Nous avons adopté les JEG3 comme modèle cellulaire dans cette étude car ces cellules sont plus agressives que les cellules JAR

dans les processus d'invasion cellulaires. Les JAR auraient gardé un phénotype intermédiaire entre les cytotrophoblastes villeux et extravilleux (Hannan, Paiva, Dimitriadis, & Salamonsen, 2010). Par ailleurs, la caractérisation des cellules JEG3 dans notre groupe a montré que ces cellules présentent le caractère de cellules qui ont subi une transition mésenchymateuse du fait de leur expression de nouvelles protéines comme la N-cadhérine et la vimentine. En revanche, elles ont gardé l'expression de la cytokératine 7 (voir figure S1 de l'article 2).

4.2 Effets différentiels de l'EG-VEGF sur cellules trophoblastiques normales et tumorales.

Au cours de la dernière décennie, notre équipe s'est intéressée à la caractérisation du rôle de l'EG-VEGF dans la placentation normale au cours du premier trimestre de la grossesse. Le croisement de l'ensemble des résultats suggérait fortement que l'EG-VEGF est un nouveau facteur du développement de la villosité placentaire avec des effets positifs directs sur la prolifération des trophoblastes villeux, ainsi que sur la croissance de l'endothélium microvasculaire fœtal (Brouillet, Hoffmann, Feige, et al., 2012; Brouillet et al., 2013; Hoffmann et al., 2009). En revanche, ce même facteur contrôlait négativement l'invasion précoce des trophoblastes extravilleux au cours du premier trimestre de la grossesse. Plusieurs facteurs placentaires ont été décrits pour exercer les mêmes fonctions que l'EG-VEGF au cours du premier trimestre les qualifiant de facteurs de croissance villositaires du premier trimestre. Le contrôle de l'invasion précoce des TEV serait un phénomène physiologique normal qui permet le maintien de l'embryon en développement dans un environnement hypoxique, car ce dernier ne serait pas armé, à cet âge gestationnel, d'enzymes antioxydantes.

Nos résultats cliniques démontrant une élévation de l'EG-VEGF dans les MHC et dans le choriocarcinome pourraient supposer que l'élévation de l'EG-VEGF a été une conséquence de la pathologie et qu'il a été élevé dans le but d'exercer un effet inhibiteur sur les cellules tumorales. Cette hypothèse a été vite abandonnée suite aux résultats obtenus *in vitro* quand l'effet de l'EG-VEGF a été testé sur les cellules JEG3. Dans ce système tumoral, EG-VEGF exerce toujours un effet prolifératif sur ces cellules trophoblastiques, mais au lieu d'inhiber leur migration et invasion, il contribue à l'augmentation de ces processus. Les effets positifs de l'EG-VEGF sur la tumorigenèse placentaire ont été confirmés dans le modèle animal avec la régression de la progression tumorale quand les effets d'EG-VEGF ont été antagonisés. L'ensemble de ces résultats mettent le doigt sur un phénomène de plus en plus décrit dans la littérature pour les actions différentielles de différents facteurs selon que l'on considère un contexte physiologique ou tumoral, les cellules JEG3 expriment plus de PROKR favorisant leur homo-dimérisation et/ou hétéro-dimérisation et induisant des réponses différentielles à un

même ligand, l'EG-VEGF. Les taux élevés d'EG-VEGF dans les choriocarcinomes induisent des effets plus importants sur la migration la prolifération et la survie cellulaire. De plus, à l'inverse de ses effets sur le contrôle de la migration et l'invasion des cellules normales, EG-VEGF induit l'invasion des cellules tumorales (Fong, Rossant, Gertsenstein, & Breitman, 1995). EG-VEGF serait un facteur à rajouter à cette liste.

Plusieurs hypothèses peuvent être dressées pour expliquer ce phénomène dans le cas de l'EG-VEGF. La première serait due à l'expression différentielle des récepteurs à l'EG-VEGF dans les cellules normales et tumorales. En effet, nous avons observé que les cellules JEG3 expriment des niveaux plus élevés de PROKR2 par rapport à PROKR1 (Figure 38). Aussi, des résultats issus de nos travaux, mais aussi de la littérature ont démontrés que le PROKR2 est impliqué dans la médiation des processus de la migration et l'invasion cellulaire (Brouillet et al., 2010). Une augmentation de la signalisation EG-VEGF du fait de l'expression d'un plus grand nombre de récepteurs PROKR2 serait en faveur de la potentialisation des processus tumoraux. Par ailleurs, Il a été récemment rapporté que PROKR2 peut dimmêriser en formant des homo-dimères ou des hétéro-dimères avec PROKR1 (Marsango, Bonaccorsi di Patti, Barra, & Miele, 2011). Cette dimmêrisation serait responsable de l'altération des affinités de liaison des ligands aux récepteurs et/ou de signalisation intracellulaire engendrant des effets différents en réponse à l'EG-VEGF (Maggio et al., 1999; Maggio, Innamorati, & Parenti, 2007) (Figure 39).

La deuxième hypothèse pourrait être expliquée par une perte de contrôle de la signalisation intracellulaire induite par EG-VEGF dans les JEG3 et/ou à la potentialisation de ses effets par d'autres protagonistes propres à la cellule tumorale.

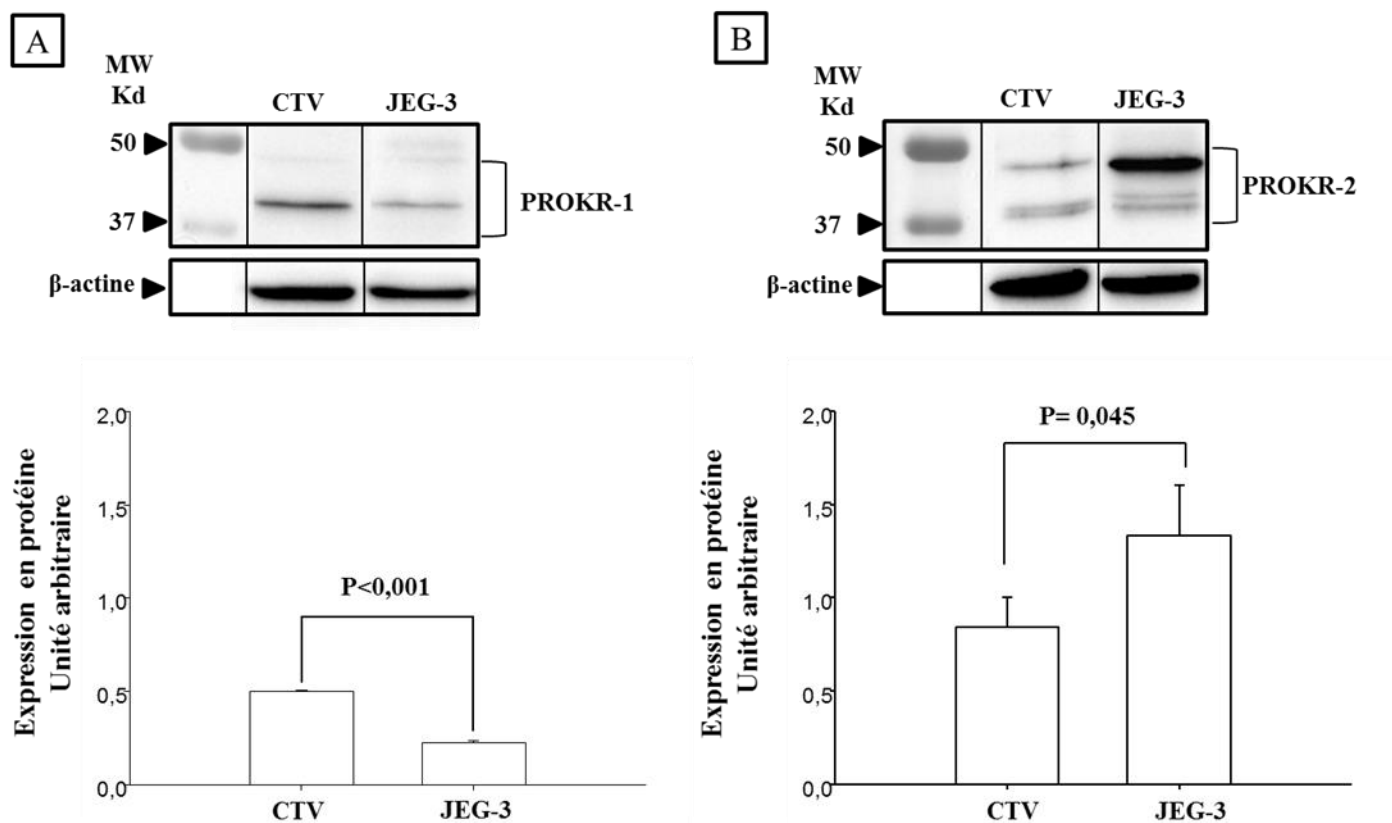


Figure 38: Expression des deux récepteurs PROKR1 (A) et PROKR2 (B) dans les cellules trophoblastique normales (CTV) et dans les cellules tumorales, les JEG3. Les cellules JEG3 expriment plus de PROKR2 et moins de récepteurs PROKR1 que les cellules trophoblastiques normales.

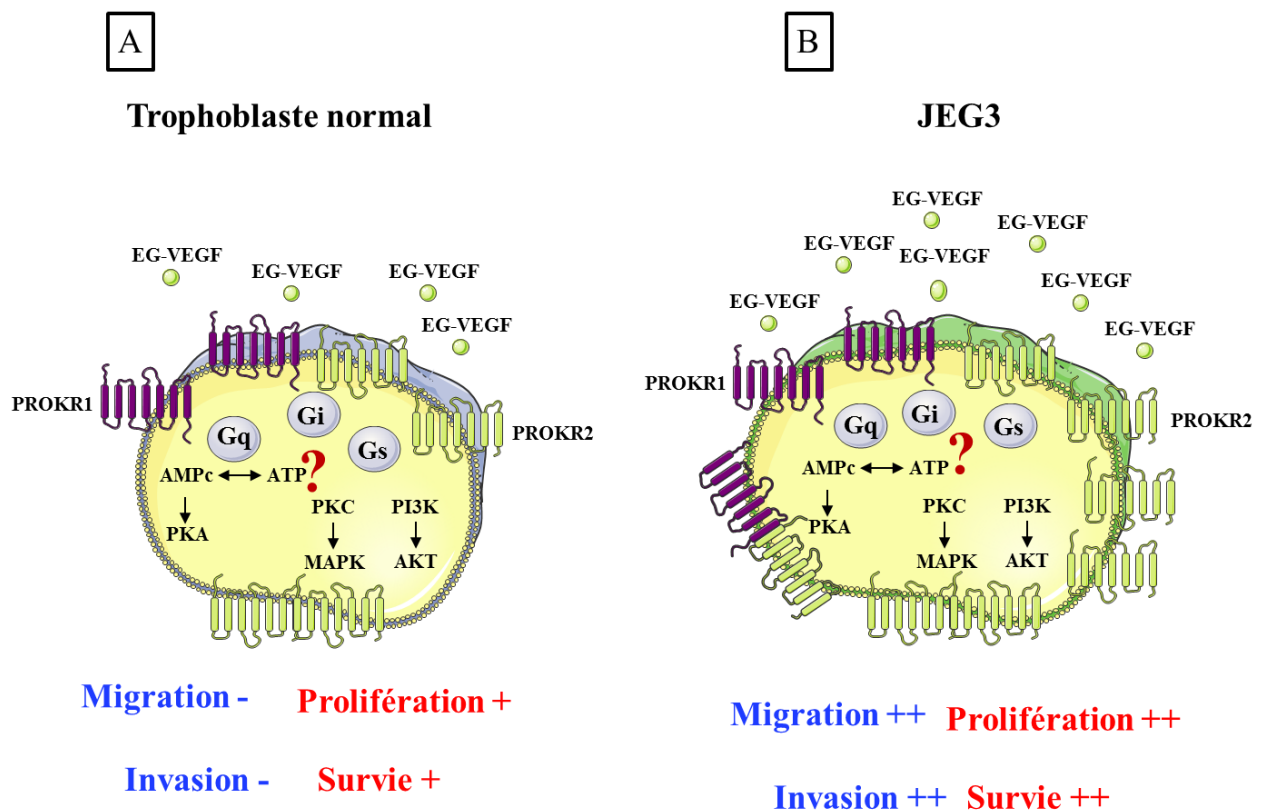


Figure 39 : Effet de l'EG-VEGF sur les cellules normales trophoblastiques (A) et les cellules tumorales JEG3 (B).

(A) Dans le cas d'une grossesse normale EG-VEGF augmente la prolifération et la survie des cellules trophoblastiques. Cependant, EG-VEGF contrôle l'invasion trophoblastique précoce. Ces processus sont induits via l'activation de plusieurs protéines G en réponse au ligand EG-VEGF. (B) dans le cas d'un développement tumoral, les cellules JEG3 expriment plus de PROKR favorisant leur homo-dimérisation et/ou hétéro-dimérisation et induisant des réponses différentielle à un même ligand, l'EG-VEGF. Les taux élevés d'EG-VEGF dans les choriocarcinomes induisent des effets plus importants sur la migration la prolifération et la survie cellulaire. De plus, à l'inverse de ses effets sur le contrôle de la migration et l'invasion des cellules normales, EG-VEGF induit l'invasion des cellules tumorales

4.3 Avantages de l'utilisation des antagonistes PROKR1 et PROKR2 in-vivo.

Les antagonistes PC7 et PKRA505 ont été développés par deux groupes différents du Dr F. Balboni (Université de Cagliari, Italie) et du Dr QY Zhou (Université de Californie à Irvine, CA, USA) et nous ont été donnés dans le cadre de collaboration. Il s'agit d'antagonistes non peptidiques qui ne sont pas commercialisés à ce jour. De façon intéressante, leur utilisation *in vivo* n'a rapportée aucun effet toxique. A l'inverse, ces antagonistes auraient des effets analgésiques avec des rôles bien démontrés dans le contrôle du nociception induite dans les pathologies inflammatoires (Hu et al., 2006). L'ensemble de ces caractéristiques bénéfiques associées à l'utilisation de ces antagonistes nous a incités à les utiliser *in vivo* pour le traitement de nos souris gestantes. Par ailleurs, des résultats préliminaires obtenus par notre groupe ont montré que l'injection de l'un ou l'autre des antagonistes chez des souris gestantes n'affecte pas les paramètres clés de la gestation (Abstract GFP 2015).

De façon intéressante, les souris traitées par l'un ou l'autre des antagonistes ont pu maintenir une gestation presque normale avec significativement moins de fœtus résorbés par rapport aux souris contrôles. Les résultats obtenus par injection de PROKR2 semblent plus intéressants dans le contrôle de la progression tumorale comparés à ceux obtenus avec l'antagoniste PROKR1. Deux explications possibles à ces résultats, la première serait liée aux affinités croisées des deux antagonistes pour les récepteurs PROKR1 et PROKR2. En effet, autant l'antagoniste PC7 présenterait une meilleure spécificité pour PROKR1, l'antagoniste PROKR2 aurait une très bonne affinité pour PROKR2 et une moindre affinité au récepteur PROKR1, laissant un doute sur sa spécificité. Dans le cas du traitement par l'antagoniste PROKR2, une inhibition de la signalisation médiée par les deux récepteurs serait assurée, alors que seule la signalisation médiée par PROKR1 serait inhibée lors du traitement par l'antagoniste PROKR1.

La deuxième explication est qu'il est bien établi qu'à l'inverse de l'activation de PROKR1, l'activation de PROKR2 est associée à la médiation d'effets biologiques en rapport avec la migration et l'invasion. Au vu des résultats obtenus dans l'étude *in vivo*, le récepteur PROKR2 serait le récepteur qui médierait la progression tumorale du choriocarcinome induite par l'EG-VEGF et le PROKR1 serait responsable de son développement. Des expériences complémentaires utilisant des antagonistes beaucoup plus spécifiques seraient nécessaires pour confirmer ces suggestions.

EG-VEGF induit le clivage de la VE-cadhérine: Nouveau mécanisme de la progression du choriocarcinome.

II Contexte et présentation de la publication

Il est bien établi que la migration trans-endothéliale des cellules tumorales est un événement clé au cours des métastases (Voura, Sandig, & Siu, 1998). Ce processus implique de multiples interactions entre les cellules tumorales et l'endothélium. Au cours de ces interactions, les cellules tumorales migrent à travers les cellules endothéliales pour gagner la circulation sanguine et atteindre les différents sites métastatiques. L'intégrité de la barrière endothéliale normale est maintenue par des jonctions serrées et adhérentes bien organisées (Dejana, 2004). Les altérations dans les jonctions adhérentes affectent directement la motilité des cellules endothéliales, leur morphogénèse ainsi que leur perméabilité vasculaire (Dejana & Vestweber, 2013). De façon intéressante, il a été bien documenté que des anomalies structurales existent dans la vascularisation tumorale avec l'apparition de nombreuses « ouvertures, fenestrae » endothéliales, de vésicules et trans-cellulaires ainsi que de larges jonctions inter-endothéliales et de membranes basales discontinues ou absentes (Baluk et al., 2005).

La VE-cadhérine étant la protéine majeure des jonctions adhérentes endothéliales, elle appartient à la famille des cadhérines qui sont exclusivement exprimées par les cellules endothéliales. La VE-cadhérine est composée d'un fragment extracellulaire formé des 5 domaines responsables des interactions multimériques, un domaine transmembranaire court (21 acides aminés) et un domaine cytoplasmique de 163 aa. qui à son tour interagit avec les caténines pour renforcer l'adhérence cellulaire (Lampugnani et al., 1992). De nombreux médiateurs inflammatoires endogènes, comme l'histamine, la thrombine, le TNF, et les facteurs angiogéniques comme VEGF peuvent augmenter la perméabilité microvasculaire en ciblant la VE-cadhérine (Lambeng et al., 2005; M. T. Lin, Yen, Lin, & Kuo, 2003). Parmi les mécanismes moléculaires régulant les propriétés adhésives de la VE-cadhérine est la phosphorylation de tyrosine, en particulier sur le site Y685 (Bouillet et al., 2014; Sidibe, Polena, Pernet-Gallay, et al., 2014; Vilgrain et al., 2013; Wallez et al., 2007). Des études réalisées dans notre laboratoire ont montré que le VEGF augmente la perméabilité des cellules endothéliales suite à la phosphorylation de la VE-cadhérine sur son site tyrosine 685 conduisant à la libération de sa forme soluble (sVE). De façon intéressante, les niveaux de la sVE sont augmentés dans de multiples pathologies du système vasculaire endothéliales, (Bouillet et al., 2014; Herodin et al., 2016; Vilgrain et al., 2013).

Le choriocarcinome est une tumeur hautement métastatique représentant un modèle parfait pour la compréhension des mécanismes de la métastase impliquant l'invasion des cellules trophoblastiques. Dans ce type de cancer, les cellules métastatiques se retrouvent dans des organes éloignés du site du développement de la tumeur comme le cerveau. Ces observations suggèrent fortement le passage de ces cellules dans la circulation sanguine, et donc le passage à travers la barrière endothéliale.

Dans cette étude, nous avons cherché à comprendre le mécanisme par lequel les cellules trophoblastiques tumorales atteignent la circulation maternelle. Plusieurs arguments sont en faveur de l'hypothèse selon laquelle les cellules tumorales libéreraient des facteurs agissant sur la cellule endothéliale pour augmenter sa perméabilité. L'ensemble de ses arguments étaient fondés sur des observations et résultats obtenus au sein de notre groupe.

- 1- Les cellules tumorales du choriocarcinome secrètent significativement plus d'EG-VEGF, facteur dont nous avons démontré l'implication dans le développement et la progression tumorale.
- 2- L'EG-VEGF est un facteur angiogène qui augmente la perméabilité des cellules endothéliales, dont les cellules endothéliales microvasculaires placentaires.
- 3- Les récepteurs de l'EG-VEGF sont fortement exprimés dans les cellules endothéliales.
- 4- L'EG-VEGF augmente la phosphorylation de la protéine Src dans plusieurs systèmes (Evans et al., 2008). Src étant une des protéines clés du maillon responsable de la phosphorylation de la VE-cadhérine en position Y687

Au total, ces résultats suggèrent fortement que l'EG-VEGF libéré par les cellules tumorales peut contribuer à l'augmentation de la perméabilité des cellules endothéliales environnantes via la phosphorylation de la VE-cadhérine sur le site Y687.

La présente étude a été conçue pour élucider le mécanisme par lequel EG-VEGF contribue au développement et à la progression du choriocarcinome. Ceci a été réalisé grâce à la détermination de l'effet de l'EG-VEGF sur le clivage VE-cadhérine dans les cellules endothéliales macrovasculaires, les HUVEC.

EG-VEGF induces VE-cadherin cleavage: new insights into the mechanism of choriocarcinoma progression.

W. Traboulsi^{1,2,3*}, H. Polena^{1,2,3*}, A. Khalil-Mgharbel^{1,2,3}, S. Brouillet^{1,2,3,4}, O. Nicoud^{1,2,3}, M. Benlahfid⁵, T. Aboussaouira⁵, M. Benharouga^{2,3,6}, Isabelle Vilgrain^{1,2,3#}, Nadia Alfaidy^{1,2,3,#}

1 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 1036, Grenoble. France.

2 Université Grenoble-Alpes, 38000, Grenoble, France.

3 Commissariat à l'Energie Atomique (CEA), BIG -**Institut de Biosciences et Biotechnologies de Grenoble**. BCI-Biologie du Cancer et de l'infection, Grenoble, France.

4 Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble, Hôpital Couple-Enfant, Centre Clinique et Biologique d'Assistance Médicale à la Procréation-CECOS, 38700, La Tronche, France.

5. University Hassan II, Casablanca. Faculty of Medicine and Pharmacy. Ibn Rochd Hospital of Casablanca, Obstetrics and Gynecology department, Morocco.

6 Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 5249, Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, Grenoble, France.

* Co-first authorship

Co-last authorship

Running title: EG-VEGF induces VE-cadherin cleavage

To whom correspondence should be addressed:

Nadia Alfaidy, INSERM U1036

INSERM U1036: Biologie du Cancer et de l'Infection

Unité mixte INSERM-UJF-CEA-CNRS U1036

Institut de Biosciences et Biotechnologie de Grenoble : BIG

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

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

or

ivilgrain@cea.fr

Abstract

Choriocarcinoma (CC) is the most aggressive placental cancer that often develops from complete hydatidiform moles (CHM). Nevertheless, the mechanism by which CC develops and metastasizes is still unknown. We have recently reported that circulating levels of the specific placental factor EG-VEGF are increased in CHM and CC, and that EG-VEGF increased endothelial cells permeability (ECP), a process thought to contribute to tumor cell dissemination. ECP is ensured by the integrity of a specific endothelial adhesion molecule, VE-cadherin. A soluble form of VE-cadherin (sVE), upon its phosphorylation at Y685 site and cleavage, is associated to several human vascular diseases. We hypothesized that EG-VEGF contributes to CC progression through a direct effect on VE-cadherin cleavage and that increased sVE levels could be used as a biomarker of CHM and CC. Sera from a cohort of CHM and CC patients were used to compare the levels of circulating sVE pregnant women. Primary human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were used to determine the effects of the JEG3-conditioned media (CM), a choriocarcinoma cell line, and EG-VEGF on VE-cadherin cleavage and to decipher the mechanism by which this factor increased ECP. We demonstrated that sVE levels were significantly increased in CHM and that JEG3-CM and EG-VEGF **i)** increased HUVECs permeability, an effect prevented by Src inhibitor, saracatinib, **ii)** induced tyrosine phosphorylation of VE-cadherin at Y685 site, **iii)** increased sVE release in HUVEC-CM. Altogether these findings provide the first evidence of sVE-cadherin elevation in CHM women and demonstrate a potential mechanism by which EG-VEGF contribute to CC progression.

Key Words: Choriocarcinoma, permeability, EG-VEGF, prokineticin-1, endothelial cells, VE-cadherin.

Introduction

Choriocarcinoma (CC) is a rare malignant disease with an estimated incidence of 2 to 7 in 100,000 pregnancies in North America and Europe. This number reaches 5 to 202 in 100,000 pregnancies in Asia (Altieri et al., 2003; Smith, 2003). CC often develops from complete (CHM), or partial hydatidiform (PHM) moles (Froeling & Seckl, 2014; Stevens et al., 2015). Though, CHM patients are at higher risk (20%) of developing CC compared to PHM ones (1.5%) (Froeling & Seckl, 2014; Stevens et al., 2015). CC is characterized by its elevated degree of metastasis (Savage et al., 2015), likely due to the high proliferative index and to the intrinsic invasive properties of the trophoblast cells (Louwen et al., 2012). Nevertheless, the mechanism by which CHM or PHM progress into CC is still to be investigated.

It is well established that trans-endothelial migration of tumor cells is a key event during cancer metastasis. This process involves multiple interactions between tumor cells and the endothelium, where tumor cells migrate through the endothelial cells to reach the metastatic sites through the systemic circulation. Normal endothelial barrier integrity is maintained by organized tight and adherents junctions that restrict the lateral diffusion of membrane lipids and proteins and the para-cellular exchange of solutes (Dejana, 2004). Alterations in adherents junction assembly influence endothelial cell motility, vascular morphogenesis and permeability (Dejana & Vestweber, 2013). The major cell–cell adhesion molecule at endothelial adherent junctions is the protein VE-cadherin, a cadherin family member that is exclusively expressed by endothelial cells. VE-cadherin consists of one extracellular fragment exhibiting 5 domains responsible for multimeric interactions, one short transmembrane domain (21 amino acids) and a cytoplasmic domain of 163 a.a. which in turn interacts with catenins to strengthen cell-cell adhesion (Lampugnani et al., 1992). Numerous endogenous inflammatory mediators including histamine, thrombin, TNF α , platelet-activating factor and activated leukocytes and angiogenic factors such as VEGF have been shown to increase microvascular permeability by targeting VE-cadherin (Lambeng et al., 2005; M. T. Lin et al., 2003; Nwariaku et al., 2002; Shasby, Ries, Shasby, & Winter, 2002). Among the molecular mechanisms that regulate VE-cadherin adhesive properties is its tyrosine phosphorylation, especially at the Y685 site upon cytokines and growth factors challenges (Bouillet et al., 2014; Sidibe, Polena, Pernet-Gallay, et al., 2014; Sidibe, Polena, Razanajatovo, et al., 2014; Vilgrain et al., 2013). We have recently shown that VEGF increased endothelial cell permeability through VE-cadherin phosphorylation at this site leading to the cleavage of its

adhesive extracellular domain found as a soluble form in blood (sVE). Importantly, sVE levels have been reported to be increased in several human disease associated with endothelial dysfunctions (Bouillet & Vilgrain, 2014; Herodin et al., 2016; Vilgrain et al., 2013).

We have recently demonstrated that the human placenta produces a specific angiogenic factor named, EG-VEGF (Endocrine Gland derived Vascular Endothelial Growth Factor). EG-VEGF is also called prokineticin 1 and constitutes the canonical member of a class of proteins called prokineticin family. Human EG-VEGF exerts its effects via two G protein-coupled receptors, PROKR1 and PROKR2 (LeCouter et al., 2001). EG-VEGF is mainly produced by the endocrine unit of the placenta, the syncytiotrophoblast (Brouillet, Hoffmann, Feige, et al., 2012; Hoffmann et al., 2009). During the first trimester of pregnancy, we demonstrated that EG-VEGF controls multiple processes of placental development including endothelial cell's proliferation, migration, tube-like organization and permeability (Brouillet et al., 2010). Importantly, we have recently demonstrated that EG-VEGF levels are significantly increased in CHM and CC patients and that the blockage of its action using specific antagonists of its receptors significantly reduced CC progression (*Traboulsi et al, submitted*).

Altogether these findings strongly suggested that EG-VEGF might contribute to the impaired endothelial functions observed in this disease, leading to the acceleration of the dissemination of tumor trophoblastic cells. Although VEGF has been shown to act on endothelial cell during tumorigenesis, its effects on the permeability of endothelial cell might well occur during or outside pregnancy. In the opposite, EG-VEGF appears as a more pregnancy-specific factor, with significant increased levels in choriocarcinoma.

The present study was designed to determine the mechanism by which EG-VEGF contributes to the development and progression of CC. This was performed through the investigation of EG-VEGF effect on VE-cadherin cleavage in HUVEC endothelial cells.

Results

Soluble VE-cadherin is increased in CHM and CC patients

Because sVE was reported to be increased in several human diseases that are associated with vascular permeability, we determined its levels in the same cohort that was used to report EG-VEGF levels in CHM and CC (*Traboulsi et al, submitted*). **Figure 1** reports comparisons of sVE levels in normal and CHM patient using both Western blot analysis (panel **A**) and a specific Elisa for sVE detection (panel **B**). There was a significant increase in sVE in CHM and CC patients compared to normal ones. Interestingly, sVE levels were also significantly increased in CC compared to CHM.

EG-VEGF increases endothelial cell permeability via the activation of the tyrosine kinase Src

The effect of EG-VEGF on endothelial cell permeability was observed in HPEC cells, a microvascular cell line isolated from the human placenta (Brouillet et al., 2010). Nevertheless, neither its effect on the macrovascular system nor the mechanism by which this factor affects cellular permeability have been investigated. Here, we determined the effect of EG-VEGF on the permeability of HUVEC, a cell type of the macrovascular system. We previously shown that HUVEC cells express both PROKR1 and PROKR2 receptors (Brouillet et al., 2010). HUVEC's integrity was evaluated by determining its trans-endothelial electrical resistance (TEER) in the absence or presence of EG-VEGF.

Because EG-VEGF has been shown to activate the tyrosine kinase Src (Evans et al., 2008), a well-documented kinase involved involved in VE-cadherin cleavage, we evaluated the effect of EG-VEGF on HUVEC permeability in the absence or presence of Saracatinib, an inhibitor of Src tyrosine kinase. **Figure 2.** reports the percentage of increase in the permeability of a monolayer of HUVEC in response to EG-VEGF (1-10 ng/ml) alone, or in the presence of Saracatinib. TEER was recorded for 35 min. A significant decrease in the HUVEC resistance was observed at both concentrations tested. This effect was significantly reduced upon concomitant incubation with Saracatininb. These data suggest that the EG-VEGF induced-HUVEC's permeability is dependent upon Src activity.

EG-VEGF mediates VE-cadherin junction's breakdown

Since EG-VEGF increased HUVEC's permeability, we hypothesized that this factor may regulate the integrity of adherent junctions. Analysis of the subcellular localization of VE-cadherin by immunofluorescence demonstrated that EG-VEGF treatment induced a dose and time dependent intercellular gaps formation on the endothelial cell monolayer as seen by a discontinuous VE-cadherin staining in the periphery of the cells (**Figures 3A and 4A**). Quantitative analyses of EG-VEGF effects are reported on **Figures 3B and 4B**. The observed changes in VE-cadherin immunostaining suggested a potential post-translational modification of the protein such as the cleavage of its extracellular adhesive domain.

EG-VEGF induces intracellular VE-cadherin phosphorylation at the tyrosine Y685

The rapid kinetic of the EG-VEGF effect on HUVEC's permeability suggested the involvement of a post-translational signaling pathway. Because tyrosine phosphorylation is known to be involved in endothelial cell-cell dissociation, we determined whether EG-VEGF induced tyrosine phosphorylations in HUVEC cells.

VEGF (10 and 50 ng/ml) was used as a positive control of tyrosine kinases activation. As shown in **Figure 5A**, VEGF and EG-VEGF induced an increase in the panel of tyrosine phosphorylated proteins within 20 min of treatment. EG-VEGF either at 1 or 10 ng/ml gave similar pattern to that observed with VEGF alone. The anti-phosphotyrosine antibody detected a protein panel ranging from 200 to 40 kDa.

Among activated tyrosine kinases, the involvement of the tyrosine kinase Src has been well documented in the control of the endothelial cell-cell dissociation (Gorbunova, Gavrilovskaya, Pepini, & Mackow, 2011). Hence, we determined the status of Src activation upon EG-VEGF stimulation in HUVECs using the anti-phospho Y418 site antibody. As shown in **Figures 5 B-C**, Src was significantly activated upon VEGF treatment. EG-VEGF, used at concentrations even lower than those used for VEGF was able to further activate the tyrosine kinase Src.

Because the tyrosine 685 in the cytoplasmic domain of VE-cadherin is a preferred substrate for the tyrosine kinase Src, we thus determined whether VE-cadherin was tyrosine phosphorylated at site Y685 upon EG-VEGF challenge. As shown in **Figures 5D-5E**, VE-cadherin phosphorylation level was barely detectable in the control condition, while it was

significantly increased upon VEGF and EG-VEGF treatments. Altogether these data strongly suggest that EG-VEGF, like VEGF can activate tyrosine kinase pathways including Src which leads to VE-cadherin tyrosine phosphorylation at the site 685 in HUVEC cells.

We previously demonstrated that VE-cadherin tyrosine phosphorylation at site Y685 preceded VE-cadherin extracellular domain cleavage (Vilgrain et al., 2013; Wallez et al., 2007), we then determined EG-VEGF effect on the content of sVE in the conditioned media of treated HUVECs. As shown in **Figure 6A**, the level of sVE was barely detectable in untreated cells, while the amount of sVE increased in a dose-dependent manner upon EG-VEGF treatment starting at 0.5 ng/ml to reach a plateau between 1 and 25 ng/ml (**Figure 6B**).

To determine whether the EG-VEGF effect was dependent upon Src activation, HUVECs were treated with increasing concentrations of Saracatinib in the presence of EG-VEGF (at 1 ng/ml). As shown in **Figure 6 C-D**, a dose-dependent inhibition of EG-VEGF-induced sVE release by Saracatinib was observed. The level of sVE reached almost the basal level at the concentration of 25 μ M. This new result is in agreement with the above data shown in **Figure 2**, reporting the inhibition of HUVEC's permeability upon EG-VEGF treatment.

JEG3 conditioned media induces sVE-cadherin cleavage

To get more insights into the involvement of EG-VEGF in VE-cleavage in the context of choriocarcinoma disease, we treated HUVEC cells with conditioned media of the human choriocarcinoma cell line, JEG3 cells. To ensure the tumor origin of JEG3 cells, we first compared the expression levels of markers for the epithelial to mesenchymal transition of JEG3 cells to those of primary cytotrophoblast cells (CTV). **Figure S1** shows that JEG3 acquired new markers of EMT, such as N-cadherin and vimentin compared to CTV. However, these cells conserved the expression of cytokeratin, a marker of trophoblast cells. Interestingly, we also demonstrated that JEG3 cells produce high levels of EG-VEGF in their culture media that was further increased under hypoxic environment, a condition akin of tumor development, **Figure 7A**. When JEG3 culture media was used to treat HUVEC cells for 24 or 48 h, we observed a strong increase in the release of sVE in the culture media. Importantly, the effect of JEG3-CM on sVE release was decreased when the JEG3-CM was preincubated with EG-VEGF blocking antibodies, **Figure 7B**.

DISCUSSION

Vascular system disorganization is a well-recognized phenomenon that accompany tumor development and progression (McDonald & Baluk, 2005). Though, the mechanisms underlying the endothelium increased permeability and loss of integrity are still to be determined in these pathologies. Here, we demonstrated that the placental factor EG-VEGF contributes to the loss of macrovascular endothelial cell's integrity with significant increase in their permeability, along with an increase in the cleavage of the main endothelial cell adhesion molecule, VE-cadherin.

In the context of normal placental development, EG-VEGF effects on the proliferation and organization of the microvascular intra-villi endothelial cells account for this factor's effects on the vascularization and subsequent angiogenesis of the placenta during early pregnancy. The potential effect of EG-VEGF on VE-cadherin during this developmental period might explain the active angiogenesis that occur within the intra-villi, ensuring the growth and the expanding of the vascular network. In this study we demonstrated that EG-VEGF affected the organization of the macrovascular system, a route that is often taken by tumor cells to colonize other sites during metastasis.

Gestational choriocarcinoma is characterized by fast dissemination of trophoblast cells into other sites such as the lung, liver, vagina and the brain. Nevertheless, no studies have dissected the mechanism by which these cells disseminate. Here, we brought evidence that beside the intrinsic invasive feature of trophoblastic cells, they have the capacity to produce specific factors such as EG-VEGF that might contribute to the rapid metastasis, through its direct effects on the macrovascular system. Our recent studies demonstrating that EG-VEGF levels were increased early on in the pregnant women who developed CHM and CC substantiate these statements. More importantly, we demonstrated that circulating sVE is also elevated in these patients. This is the first study that reports concomitant increase in EG-VEGF and sVE-cadherin levels early on during pregnancy.

In a previous report (Wallez et al., 2007), we demonstrated that VEGF, an angiogenic factor that activates tyrosine kinase receptors, induced the cleavage of VE-cadherin in endothelial cells. Here we demonstrate for the first time that EG-VEGF, another angiogenic factor that acts *via* GPCR receptors can also target VE-cadherin at the Y685 site and induces its cleavage. The molecular events involved in this mechanism are not completely elucidated but it is known that the cleavage is dependent upon Src activation which induces VE-cadherin

tyrosine phosphorylation at site Y685 (Wallez et al., 2007). One major barrier in understanding the actual process is the unknown primary crystal structure of the whole protein VE-cadherin. However, it can be suggested that tyrosine phosphorylation is part of the folding process of VE-cadherin as reported for various protein kinases (N. Y. Lee & Koland, 2005). Thus the covalent modification of the protein might lead to a greater sensitivity to extracellular proteases.

As for VEGF, we demonstrated that EG-VEGF also activates Src in HUVEC cells. Activation of Src by EG-VEGF was already reported in previous studies (Evans et al., 2008; Su, Lin, Chen, & Kuo, 2014). Nevertheless, Src phosphorylation by EG-VEGF in HUVEC cells has never been reported. Because EG-VEGF receptors belong to GPCRs that lack intrinsic tyrosine kinase activity, the activation of Src by EG-VEGF might result from cross-communication between different signaling pathways as it has been shown for several other receptors (Cattaneo et al., 2014). Further investigations are required to identify the likely pathways involved in this process.

In relation to the pathology of CC, the present study brings new insights into the underlying mechanisms of increased permeability and loss of integrity in choriocarcinoma vasculature. Among other factors EG-VEGF might directly be involved in the vascular dysfunction observed in CC through its action on the cleavage of VE-cadherin.

Our findings strongly suggest that vascular dysfunction in CC might well be due to a destabilization of endothelial cell adhesion upon the cleavage of its major adhesion molecule, the VE-cadherin. **Figure 8** illustrates a proposed model for trophoblast-secreted-EG-VEGF effect on HUVEC cell permeability in normal and CC pregnancies.

Altogether these findings provide the first evidence of sVE elevation in pregnant women who develop CHM and are at higher risk of developing CC, suggesting the potential use of these factors, independently or in combination to predict CC occurrence. More importantly, this study demonstrates the mechanism by which EG-VEGF increases endothelial cells permeability and shed light on one of the causative factors that might affect the vascular system in CC women .

Materiel and methods

Reagents

Recombinant human Endocrine Gland Derived-Vascular Endothelial Growth Factor (EG-VEGF) was obtained from (Peprotech, France). Src kinase inhibitor Saracatinib (Molekula, UK) was used in this study. Sodium orthovanadate and H₂O₂ were purchased from Sigma Aldrich. Commercially available antibodies were purchased from different sources: mouse monoclonal anti-VE-cadherin extracellular fragment (clone BV9) from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA), mouse monoclonal anti-phosphotyrosine 4G10 (Millipore), mouse polyclonal anti- β actin (Sigma Aldrich, CA, USA), rabbit polyclonal anti c-Src (Invitrogen, USA). The rabbit polyclonal anti-VE-phospho 685 VE-cadherin is produced by the laboratory and described in (*Sidibe et al., 2012*). Horseradish peroxidase-conjugated purified rabbit anti-mouse IgG was from Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Enhanced chemiluminescence detection reagents were purchased from Perkin-Elmer (Courtaboeuf, France). Nitrocellulose was obtained from Schleicher and Schuell (Ecquevilly, France). The micro-bicinchoninic acid protein assay reagent kit was from Fischer-Scientific (France).

Sera from normal, CHM and CC patients

Sera (n=38) from patients with CHM or choriocarcinoma (n=3) were collected at Ibn Rochd hospital in Casablanca, Morocco. Normal sera was also collected from first trimester normal pregnant women (n=18). Collection and processing were approved by the local hospital ethics committee, and informed patient consent was obtained in all cases. **Table 1** reports all clinical information for pathological pregnancies.

Cell culture

Human endothelial cells

Primary endothelial cells were obtained from human umbilical vein (HUVECs) and grown to reach confluence in M199 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FCS), 2% Low Serum Growth Supplement LSGS (Cascade Biologics, USA) as previously described (Garnier-Raveaud et al., 2001). The 80% confluent HUVECs (passages 2 or 4) were used for

most experiments. Confluent cells in 60 mm dishes were serum-starved in 1% fetal calf serum in M 199 for 24 h prior experiments. Before EG-VEGF stimulation, the cells were serum-starved for 2 h, and then pre-treated for 15 min with sodium pervanadate (10 μ M) and/or inhibitors. HUVECs were stimulated with increasing concentrations of EG-VEGF for the indicated time period. The media were then collected and the cells were harvested in 500 μ l of ice- cold homogenization buffer, homogenized and sonicated for 20 seconds as described in (Sidibe et al., 2012). Cell lysates were collected after centrifugation for 15 min at 4°C at 14,000 g. The protein concentration was measured using the micro-bicinchoninic acid protein assay and the cell lysates were stored at -80°C until their use.

For sVE generation analysis, media were collected, centrifuged at 1000 rpm / 5 min to remove all debris and then concentrated approximately fifteen-fold using Centriprep Centrifugal Filter Units with an Ultracel YM-30 membrane.

Primary trophoblast culture

Villous cytotrophoblast cells were established from first-trimester human placentas at 8–10 week of gestation (wg). Villous cytotrophoblast cells (VCT) were isolated from first-trimester chorionic villi by differential trypsin digestion according to previous published protocols (Hands Schuh et al., 2006; Kliman, Nestler, Sermasi, Sanger, & Strauss, 1986; Tarrade et al., 2001). After Percoll gradient fractionation, cells were diluted to a concentration of 10^6 cells/ml in DMEM supplemented with 10% FCS, 2 mM glutamine, 100 IU/ml penicillin, and 100 g/ml streptomycin and plated on 35 mm (3 ml/3 x 10^6 cells) or 60 mm (8 ml/8 x 10^6 cells) culture plates (Dutscher; France). VCT were incubated overnight in 5% CO₂ at 37°C and washed three times to eliminate non-adherent cells. Conditioned media from primary cultures were collected and centrifuged and the supernatants stored at -20°C until use. Protein extracts were prepared as previously described (Alfaidy et al., 2003).

JEG3 cell line culture.

JEG-3 (ATCC® HTB-36™) is one of six clonally derived lines isolated from the Woods strain of the Erwin-Turner tumor by Kohler and associates (Kohler et al., 1971). JEG3 was used as choriocarcinoma cell line model. JEG-3 were used between 4 and 10 passages and grown in Dulbecco's modified Eagle's medium DMEM-F12 supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin, and amphotericin B (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Cells were maintained at 37°C under normoxic (20% O₂) or hypoxic (1.5%

O2) conditions. Conditioned media from JEG-3 cultures were collected and centrifuged. The supernatants stored at -20°C until use. In a separate series of experiments HUVEC cells were incubated in the presence of JEG3 cells conditioned media that were preincubated for 24 or 48h in the presence of EG-VEGF blocking antibody (Covalab, France).

Measurement of Endothelial Monolayer Permeability:

Measurement of Trans-endothelial electrical resistance (TEER) was performed as previously described (Brouillet et al., 2010). HUVEC were seeded onto Vitrogen-coated Transwell polystyrene filters (Corning, Dutsher France), and grown to confluence for 10-11 days. Growth medium was replaced every other day. 24h before the experiment, confluent endothelial monolayers were serum-starved. Experiments were initiated by washing the upper and lower compartments with warmed (37°C) 20 mM Tris-buffered saline, pH 7.4, supplemented with 25 mM glucose and 0.1% BSA (150 µl/upper and 600µl/ lower compartments). The inserts were allowed to equilibrate for 30 min at 37°C before initiating the experiments. After equilibration, the buffer was removed from the inserts and fresh buffer containing various treatments were added to the upper compartment. EG-VEGF or EG-VEGF+saracatinib-induced changes in the resistance of the endothelial monolayers were measured using MilliCell® ERS (Millipore, MA USA) at 35 min after adding the treatments.

Immunofluorescent staining of VE-cadherin protein.

VE-cadherin expression was examined using first passage primary endothelial cells. HUVEC cells were seeded on glass cover slips and grown to confluence. Cells were first fixed with 95% ethanol at 4°C for 30 min and then acetone for 1 minute at room temperature. Cells were dried for 3 min and then incubated with pY685-VE-cadherin antibody developed in the laboratory mouse anti-human mAb VE cadherin (1:1000) diluted with PBS for 1 h (Sidibe et al., 2012). The cells on the cover slip were then washed with PBS solution three times. Goat anti-mouse IgG secondary antibody (Alexa Fluor 488 conjugate (Jackson Immuno research Inc, USA) was used at 1:200. Cover slips were mounted with vectashield mounting medium specific for fluorescence (vector Lab Inc, France). Stained cell cover slips were examined by use of Zeiss fluorescent microscopy.

Western blotting:

Proteins (10 to 30 µg) from the endothelial cell extracts were analyzed by SDS-PAGE (12 % Acrylamide, 0.8% bis-acrylamide) and Western blotting. The blots were subsequently incubated for 1h with antibodies to phosphotyrosine (1 µg/ml) phosphoY685 VE-cadherin (1 µg/ml). After being washed, the blots were incubated for 1 h with horseradish- peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse IgG and anti-rabbit IgG respectively diluted in PBS containing 0.05 % (v/v) Tween 20. Immunoreactive proteins were visualized by chemiluminescence. All Western blot bands have been subjected to densitometry and data are expressed in arbitrary units as the mean $\pm$ SEM. For sVE analysis, 5 µL of the concentrated media were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting using an anti-VE-cadherin antibody directed against the extracellular domain of the protein. The Western blot bands were subjected to densitometry and data are expressed in arbitrary units / µg of total protein concentration of the corresponding cell lysates. Western blotting analysis was also used to characterize JEG3 acquisition of markers for epithelial to mesenchymal cell transition. Antibodies against Vimemtin (1:1000) (thermofisher); N-cadherin and cytokeratin (1:1.000) (Thermofisher).were used according to the protocol previously described by our group (Hoffmann et al., 2006).

ELISA for soluble VE-cadherin detection in human serum

The assay is a sandwich enzyme immunoassay using a monoclonal antibody and an enzyme-linked polyclonal antibody specific for sVE-cadherin, as described previously (Vilgrain et al., 2013). The calculations were performed independently. Raw data (OD) measured by the plate reader were plotted against nominal standard concentrations to construct the standard calibration curves. Concentration values of unknown samples were interpolated from these curves using an unweighted linear regression of the data. Throughout the study, the percent of coefficients of variation (%CV) of standards were from 1.26 to 9.54%. The patient's sera (5 µL) were diluted 1:50 dilution in 0.5% Triton X100-containing PBS. Individual serum concentrations for VE-cadherin are reported in ng/ml.

Statistical analysis:

Each experiment was performed at least three times under similar conditions. Values

represent the mean $\pm$ SEM of three determinations from three different wells or dishes in the same experiment. Statistical comparisons were made using one-way ANOVA test and Student's t test. Calculations were performed using SigmaStat (Jandel Scientific Software, San Rafael, CA, USA)

Acknowledgments.

The project was supported by the French National Institute of Health and Medical Research (INSERM), the French National Cancer Institute and the French Atomic Energy and Alternative Energies Commission (CEA), Les Entreprises contre le Cancer (GEFLUC). Wael Traboulsi was a PhD fellow from Ligue Contre le Cancer. Helena Polena was supported by the foundation ARC pour la Recherche sur le Cancer.

Conflict of interest: Nothing to disclose

Author contributions:

WT, HP, SB and ON designed, performed and analyzed experiments shown in Figures 3, 4, 5 and 6. AKM performed experiments shown in Figure 1. MB designed, performed and analyzed experiments shown in Figure 2. NA and IV conceived and coordinated the study and wrote the paper. All authors reviewed the results and approved the final version of the manuscript.

Figure legends

Figure 1: Comparison of sVE circulating levels expression in control, CHM and choriocarcinoma patients during the first trimester of pregnancy

Panel A reports comparison of sVE levels in sera collected from normal pregnant women (CTL, n=18); CHM (n=38) and choriocarcinoma patients (n=3) during the first trimester of pregnancy using Western blotting analysis. **Panel B** reports the same analyses using ELISA test specific for sVE detection. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ by ANOVA followed by Dunn's Method). The study protocol was approved by the University Hospital ethics committee, and written informed consent was obtained from each participant. (See **Table 1** for clinical records). Data are expressed as mean $\pm$ SEM.

Figure 2: EG-VEGF induced endothelial permeability is impaired by Src inhibitor

HUVECs were seeded onto Vitrogen- coated Transwell filters and grown to reach confluency. The cells were treated with either buffer (CTL), or saracatinib alone (10 μ M), EG-VEGF alone at 1 and 10 ng/ml or in the association with Saracatinib. Endothelial cells resistance was measured using MilliCell ERS, 35 min after the treatments. Each experiment was performed at least three times under identical or similar conditions with comparable results. Values represent the mean $\pm$ SEM. Statistical comparisons were made using one-way ANOVA test and Student's t test. Calculations were performed using SigmaStat.

Figure 3: EG-VEGF induced a dose response VE cadherin disassembly and gap formation in HUVEC cells

Panel A reports photographs of immunofluorescence staining of HUVECs cells with VE-cadherin antibody upon treatment with EG-VEGF, at different concentrations. Arrowheads show the disruption of VE-cadherin staining and intercellular gaps. **Panel B** reports percentage of endothelial gap formation induced by EG-VEGF at various concentrations. Values overwritten with different letters are significantly different from each other. Scale bars=20 μ m.

Figure 4: EG-VEGF induced VE-cadherin disassembly and gap formation in time dependent manner

Panel A reports photographs of immunofluorescence staining of HUVECs cells with VE-cadherin, after treatment with EG-VEGF (10 ng/ml) at 30, 60 and 120 min. Arrowheads show the disruption of VE-cadherin staining and intercellular gaps. **Panel B** reports percentage of endothelial gap formation induced by EG-VEGF at various time periods. Values overwritten with different letters are significantly different from each other. Scale bars=20µm.

Figure 5: Effect of EG-VEGF on cell signaling

Confluent HUVEC monolayers were treated either with VEGF (10, 50 ng/ml) or EG-VEGF (1, 10, 25 ng/ml). 10 µg of total cell extracts were analyzed by SDS-PAGE and Western - blotting using either anti-phosphotyrosine antibody (**5A**), anti-phosphoSrc antibody (**5B**) or antiphosphoY685-VE-cadherin (**D**). Panels, **5C and 5E** report quantification of the levels of phosphotyrosines, phosphoSrc and phosphoY685, respectively. β-actin was used for standardization (* p < 0.05). Data are mean ± SEM.

Figure 6: EG-VEGF induces VE-cadherin cleavage upon Src activation in HUVEC cells

HUVEC conditioned media were collected and analyzed as described in Material and Methods. **Panel A** reports a representative blot of EG-VEGF effect on sVE release upon EG-VEGF treatment for 20 min. **Panel B** reports a quantification of three independent experiments. **Panel C** reports a representative blot of EG-VEGF (1ng/ml) effect on VE-cadherin cleavage, in the absence or presence of saracatinib (1 to 25µM). **Panel D** reports a quantification of three independent experiments. (** p < 0.01). Data are mean ± SEM.

Figure 7: EG-VEGF secretion by JEG3 cells under normal and hypoxic conditions, and effect of JEG3 conditioned media (CM) on sVE release

Panel A reports a comparison of the levels of EG-VEGF in the CM of JEG3 cells that were incubated under normal or hypoxic (1-3%) conditions. **Panel B** reports a Western blot analysis that reports the effect of JEG3-CM on sVE release by HUVEC cells after 24 or 48h of incubation (* p < 0.05). Data are mean ± SEM.

Figure 8: A proposed model for EG-VEGF effect on HUVEC cell permeability in normal and pathological pregnancies, such as choriocarcinoma

Panel A reports a cartoon with the proposed model of the mechanism by which EG-VEGF induces VE-cadherin cleavage in HUVEC cells. **Panel B** reports a cartoon with normal trophoblast cells releasing normal amounts of EG-VEGF that regulate endothelial cells permeability upon Src protein phosphorylation. **Panel C** reports a pathological condition of pregnancy, ie: choriocarcinoma that is associated with increased secretion of EG-VEGF by trophoblast cells. In this condition, we propose that increased EG-VEGF levels will lead to exaggerated activation of PROKR1 and PROKR2 receptors in HUVEC cells, which leads to strong phosphorylation of Src protein. Src phosphorylation leads in turn to the phosphorylation of VE-cadherin at Y685 and the cleavage of the extracellular domain of this protein. The proposed model brings new insights into the mechanism by which tumor trophoblast cells reach the circulatory vascular system to colonize new sites.

Figure S1: Comparisons of the levels of expression of protein markers of tumor acquisition in JEG3 and primary cytotrophoblast cells (CTV) using Western blot analysis **Panel A** reports comparison of the levels of N-cadherin protein expression in JEG3 vs CTV. **Panel B** reports a comparison of the levels of vimentin protein expression in JEG3 vs CTV. **Panel C** reports a comparison of the levels of cytokeratin-7 expression in JEG3 vs CTV. α -actin was used for standardization.

References

- Alfaidy, N., Li, W., MacIntosh, T., Yang, K., & Challis, J. (2003). Late gestation increase in 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 expression in human fetal membranes: a novel intrauterine source of cortisol. *J Clin Endocrinol Metab*, 88(10), 5033-5038. doi: 10.1210/jc.2002-021915
- Altieri, A., Franceschi, S., Ferlay, J., Smith, J., & La Vecchia, C. (2003). Epidemiology and aetiology of gestational trophoblastic diseases. *Lancet Oncol*, 4(11), 670-678.
- Bouillet, L., Sidibe, A., Polena, H., Mannic, T., Deroux, A., Stidder, B., . . . Vilgrain, I. (2014). [Endothelial junctions: exploiting their instability in the development of biomarkers for vascular remodelling]. *Med Sci (Paris)*, 30(6-7), 633-635. doi: 10.1051/medsci/20143006012
- Bouillet, L., & Vilgrain, I. (2014). VE-cadherin, a potential marker for endothelial cell activation during hereditary angioedema attacks. *J Allergy Clin Immunol*, 134(1), 241. doi: 10.1016/j.jaci.2014.04.016
- Brouillet, S., Hoffmann, P., Benharouga, M., Salomon, A., Schaal, J. P., Feige, J. J., & Alfaidy, N. (2010). Molecular characterization of EG-VEGF-mediated angiogenesis: differential effects on microvascular and macrovascular endothelial cells. *Mol Biol Cell*, 21(16), 2832-2843. doi: 10.1091/mbc.E10-01-0059
- Brouillet, S., Hoffmann, P., Feige, J. J., & Alfaidy, N. (2012). EG-VEGF: a key endocrine factor in placental development. *Trends Endocrinol Metab*, 23(10), 501-508. doi: 10.1016/j.tem.2012.05.006
- Cattaneo, F., Guerra, G., Parisi, M., De Marinis, M., Tafuri, D., Cinelli, M., & Ammendola, R. (2014). Cell-surface receptors transactivation mediated by G protein-coupled receptors. *Int J Mol Sci*, 15(11), 19700-19728. doi: 10.3390/ijms151119700
- Dejana, E. (2004). Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(4), 261-270. doi: 10.1038/nrm1357
- Dejana, E., & Vestweber, D. (2013). The role of VE-cadherin in vascular morphogenesis and permeability control. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 116, 119-144. doi: 10.1016/B978-0-12-394311-8.00006-6
- Evans, J., Catalano, R. D., Morgan, K., Critchley, H. O., Millar, R. P., & Jabbour, H. N. (2008). Prokineticin 1 signaling and gene regulation in early human pregnancy. *Endocrinology*, 149(6), 2877-2887. doi: 10.1210/en.2007-1633
- Froeling, F. E., & Seckl, M. J. (2014). Gestational trophoblastic tumours: an update for 2014. *Curr Oncol Rep*, 16(11), 408. doi: 10.1007/s11912-014-0408-y
- Garnier-Raveaud, S., Usson, Y., Cand, F., Robert-Nicoud, M., Verdeti, J., & Faury, G. (2001). Identification of membrane calcium channels essential for cytoplasmic and nuclear calcium elevations induced by vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *Growth Factors*, 19(1), 35-48.
- Gorbunova, E. E., Gavrilovskaya, I. N., Pepini, T., & Mackow, E. R. (2011). VEGFR2 and Src kinase inhibitors suppress Andes virus-induced endothelial cell permeability. *J Virol*, 85(5), 2296-2303. doi: 10.1128/JVI.02319-10
- Hands Schuh, K., Guibourdenche, J., Guesnon, M., Laurendeau, I., Evain-Brion, D., & Fournier, T. (2006). Modulation of PAPP-A expression by PPAR γ in human first trimester trophoblast. *Placenta*, 27 Suppl A, S127-134. doi: 10.1016/j.placenta.2005.10.012
- Herodin, F., Voir, D., Vilgrain, I., Courcon, M., Drouet, M., & Boittin, F. X. (2016). Soluble Vascular Endothelial Cadherin as a New Biomarker of Irradiation in Highly Irradiated Baboons with Bone Marrow Protection. *Health Phys*, 110(6), 598-605. doi: 10.1097/HP.0000000000000481
- Hoffmann, P., Feige, J. J., & Alfaidy, N. (2006). Expression and oxygen regulation of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor/prokineticin-1 and its receptors in human placenta during early pregnancy. *Endocrinology*, 147(4), 1675-1684. doi: 10.1210/en.2005-0912
- Hoffmann, P., Saoudi, Y., Benharouga, M., Graham, C. H., Schaal, J. P., Mazouni, C., . . . Alfaidy, N. (2009). Role of EG-VEGF in human placentation: Physiological and pathological implications. *J Cell Mol Med*, 13(8B), 2224-2235. doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00554.x

- Kliman, H. J., Nestler, J. E., Sermasi, E., Sanger, J. M., & Strauss, J. F., 3rd. (1986). Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinology*, 118(4), 1567-1582. doi: 10.1210/endo-118-4-1567
- Kohler, P. O., Bridson, W. E., Hammond, J. M., Weintraub, B., Kirschner, M. A., & Van Thiel, D. H. (1971). Clonal lines of human choriocarcinoma cells in culture. *Acta Endocrinol Suppl (Copenh)*, 153, 137-153.
- Lambeng, N., Wallez, Y., Rampon, C., Cand, F., Christe, G., Gulino-Debrac, D., . . . Huber, P. (2005). Vascular endothelial-cadherin tyrosine phosphorylation in angiogenic and quiescent adult tissues. *Circ Res*, 96(3), 384-391. doi: 10.1161/01.RES.0000156652.99586.9f
- Lampugnani, M. G., Resnati, M., Raiteri, M., Pigott, R., Pisacane, A., Houen, G., . . . Dejana, E. (1992). A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts. *J Cell Biol*, 118(6), 1511-1522.
- LeCouter, J., Kowalski, J., Foster, J., Hass, P., Zhang, Z., Dillard-Telm, L., . . . Ferrara, N. (2001). Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium. *Nature*, 412(6850), 877-884. doi: 10.1038/35091000
- Lee, N. Y., & Koland, J. G. (2005). Conformational changes accompany phosphorylation of the epidermal growth factor receptor C-terminal domain. *Protein Sci*, 14(11), 2793-2803. doi: 10.1110/ps.051630305
- Lin, M. T., Yen, M. L., Lin, C. Y., & Kuo, M. L. (2003). Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis by resveratrol through interruption of Src-dependent vascular endothelial cadherin tyrosine phosphorylation. *Mol Pharmacol*, 64(5), 1029-1036. doi: 10.1124/mol.64.5.1029
- Louwen, F., Muschol-Steinmetz, C., Reinhard, J., Reitter, A., & Yuan, J. (2012). A lesson for cancer research: placental microarray gene analysis in preeclampsia. *Oncotarget*, 3(8), 759-773. doi: 10.18632/oncotarget.595
- McDonald, D. M., & Baluk, P. (2005). Imaging of angiogenesis in inflamed airways and tumors: newly formed blood vessels are not alike and may be wildly abnormal: Parker B. Francis lecture. *Chest*, 128(6 Suppl), 602S-608S. doi: 10.1378/chest.128.6_suppl.602S-a
- Nwariaku, F. E., Liu, Z., Zhu, X., Turnage, R. H., Sarosi, G. A., & Terada, L. S. (2002). Tyrosine phosphorylation of vascular endothelial cadherin and the regulation of microvascular permeability. *Surgery*, 132(2), 180-185.
- Savage, P., Kelpandides, I., Tuthill, M., Short, D., & Seckl, M. J. (2015). Brain metastases in gestational trophoblast neoplasia: an update on incidence, management and outcome. *Gynecol Oncol*, 137(1), 73-76. doi: 10.1016/j.ygyno.2015.01.530
- Shasby, D. M., Ries, D. R., Shasby, S. S., & Winter, M. C. (2002). Histamine stimulates phosphorylation of adherens junction proteins and alters their link to vimentin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 282(6), L1330-1338. doi: 10.1152/ajplung.00329.2001
- Sidibe, A., Mannic, T., Arboles, M., Subileau, M., Gulino-Debrac, D., Bouillet, L., . . . Vilgrain, I. (2012). Soluble VE-cadherin in rheumatoid arthritis patients correlates with disease activity: evidence for tumor necrosis factor alpha-induced VE-cadherin cleavage. *Arthritis Rheum*, 64(1), 77-87. doi: 10.1002/art.33336
- Sidibe, A., Polena, H., Pernet-Gallay, K., Razanajatovo, J., Mannic, T., Chaumontel, N., . . . Vilgrain, I. (2014). VE-cadherin Y685F knock-in mouse is sensitive to vascular permeability in recurrent angiogenic organs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 307(3), H455-463. doi: 10.1152/ajpheart.00774.2013
- Sidibe, A., Polena, H., Razanajatovo, J., Mannic, T., Chaumontel, N., Bama, S., . . . Vilgrain, I. (2014). Dynamic phosphorylation of VE-cadherin Y685 throughout mouse estrous cycle in ovary and uterus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 307(3), H448-454. doi: 10.1152/ajpheart.00773.2013
- Smith, H. O. (2003). Gestational trophoblastic disease epidemiology and trends. *Clin Obstet Gynecol*, 46(3), 541-556.
- Stevens, F. T., Katzorke, N., Tempfer, C., Kreimer, U., Bizjak, G. I., Fleisch, M. C., & Fehm, T. N. (2015). Gestational Trophoblastic Disorders: An Update in 2015. *Geburtshilfe Frauenheilkd*, 75(10), 1043-1050. doi: 10.1055/s-0035-1558054

- Su, M. T., Lin, S. H., Chen, Y. C., & Kuo, P. L. (2014). Gene-gene interactions and gene polymorphisms of VEGFA and EG-VEGF gene systems in recurrent pregnancy loss. *J Assist Reprod Genet*, 31(6), 699-705. doi: 10.1007/s10815-014-0223-2
- Tarrade, A., Lai Kuen, R., Malassine, A., Tricottet, V., Blain, P., Vidaud, M., & Evain-Brion, D. (2001). Characterization of human villous and extravillous trophoblasts isolated from first trimester placenta. *Lab Invest*, 81(9), 1199-1211.
- Vilgrain, I., Sidibe, A., Polena, H., Cand, F., Mannic, T., Arboleas, M., . . . Berger, F. (2013). Evidence for post-translational processing of vascular endothelial (VE)-cadherin in brain tumors: towards a candidate biomarker. *PLoS One*, 8(12), e80056. doi: 10.1371/journal.pone.0080056
- Wallez, Y., Cand, F., Cruzalegui, F., Wernstedt, C., Souchelnytskyi, S., Vilgrain, I., & Huber, P. (2007). Src kinase phosphorylates vascular endothelial-cadherin in response to vascular endothelial growth factor: identification of tyrosine 685 as the unique target site. *Oncogene*, 26(7), 1067-1077. doi: 10.1038/sj.onc.1209855

Figure 1

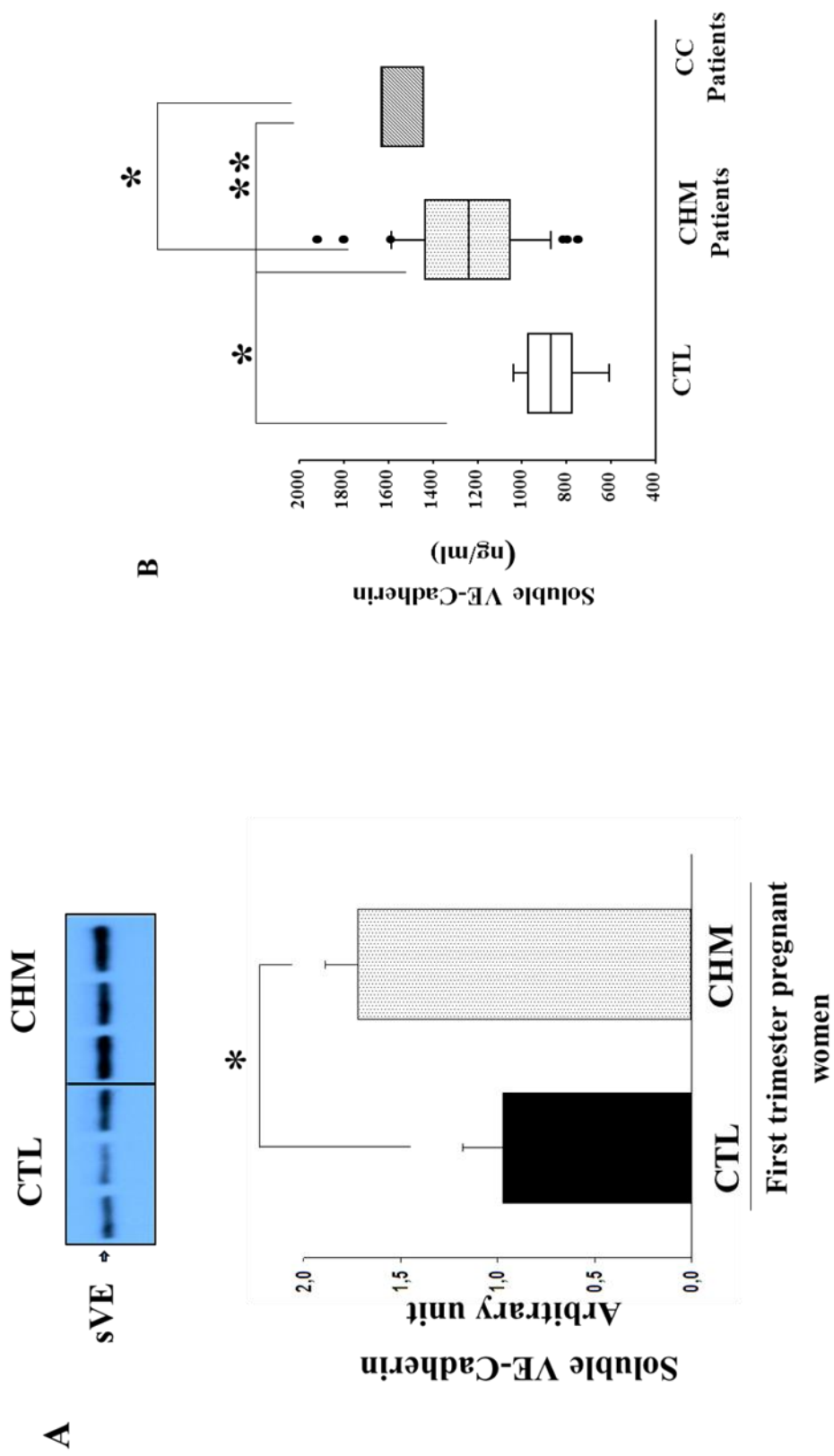


Figure 2

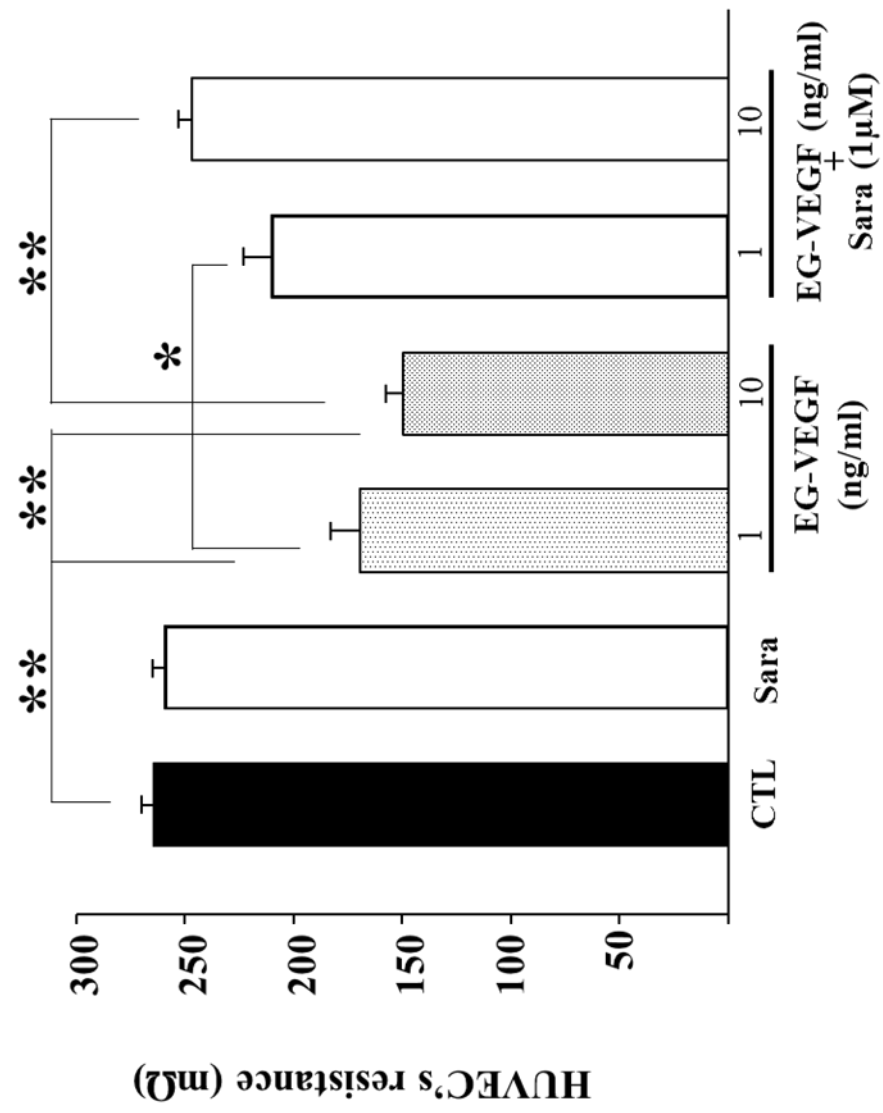


Figure 3

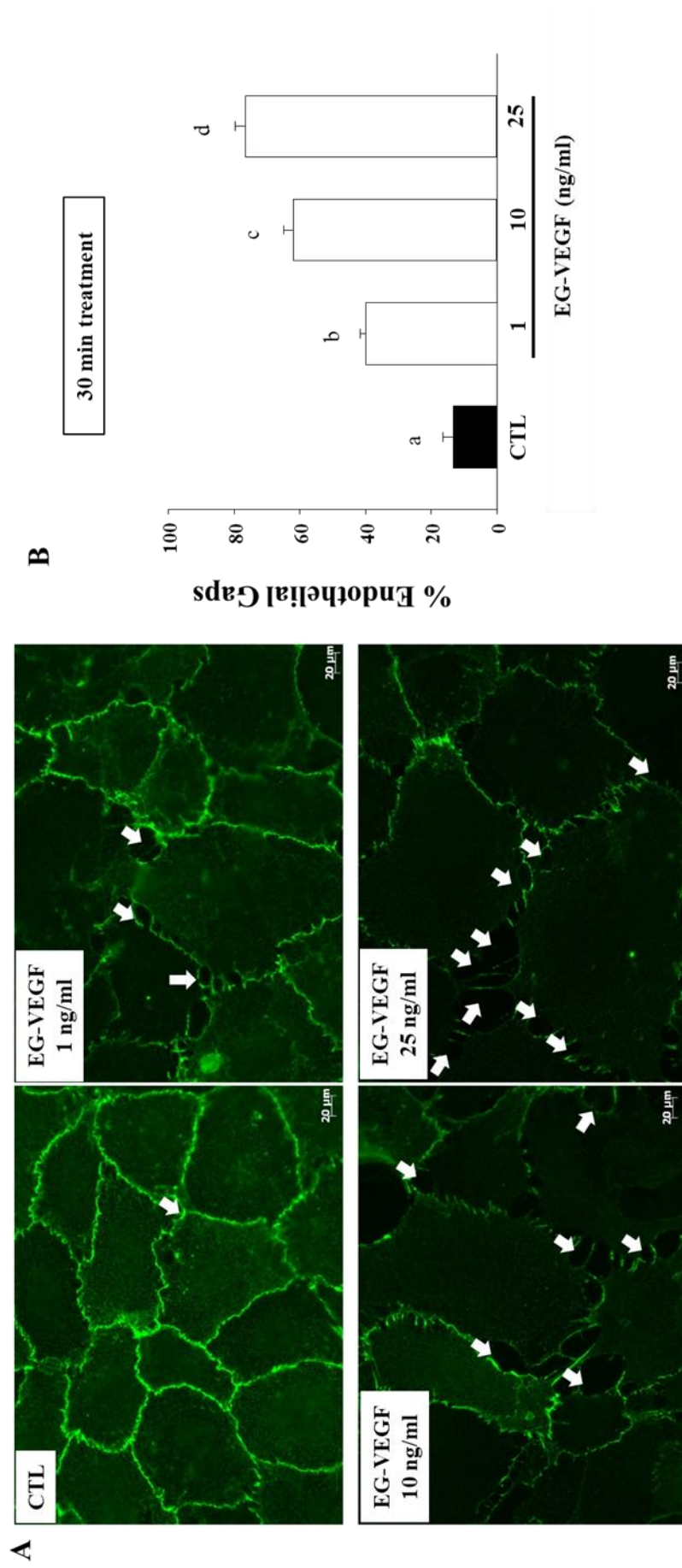
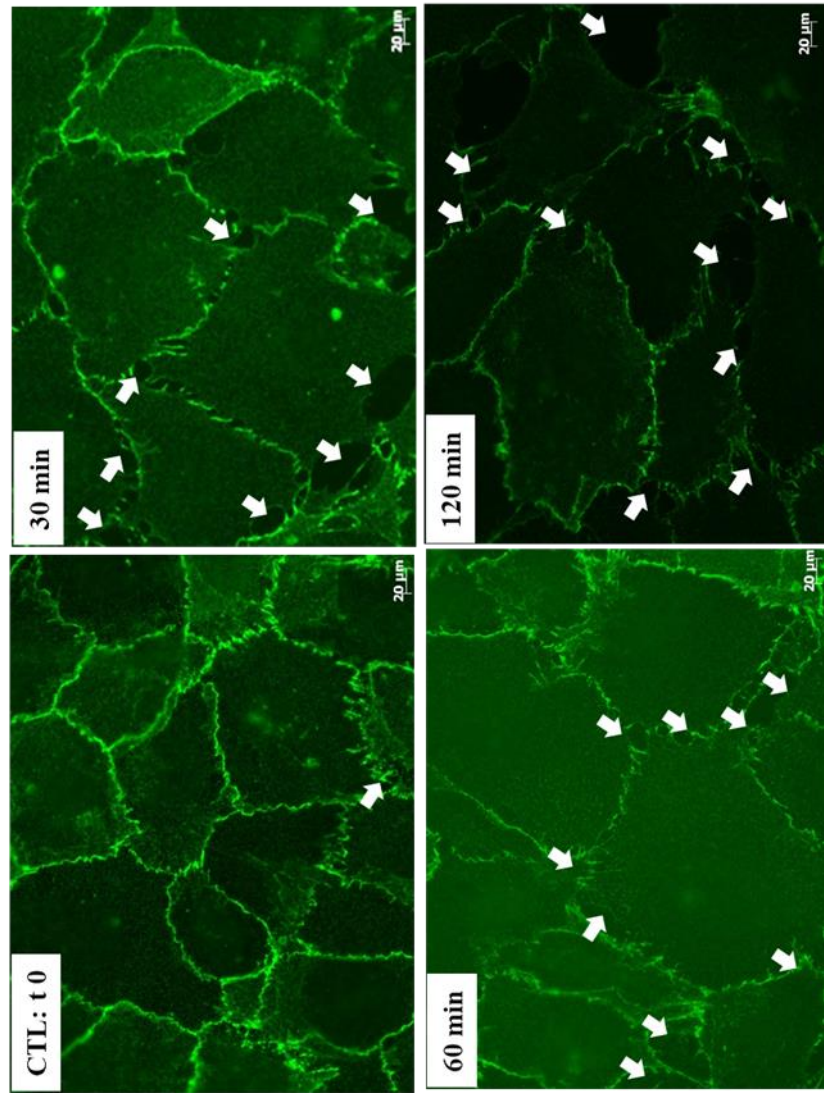


Figure 4

A



B

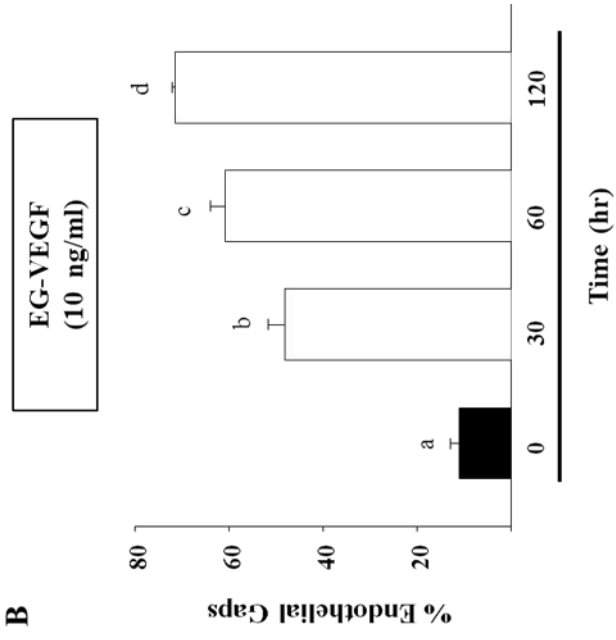


Figure 5

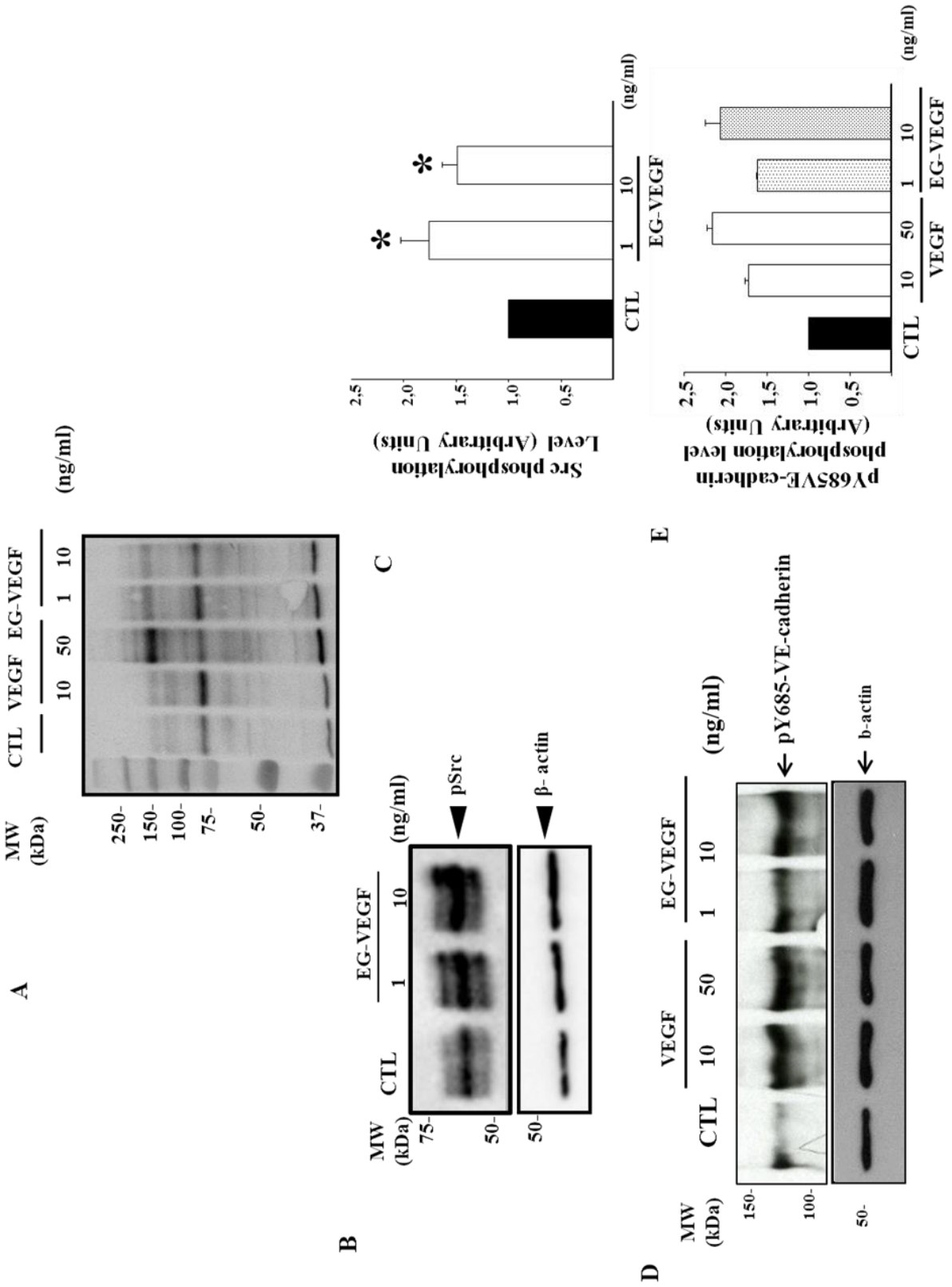


Figure 6

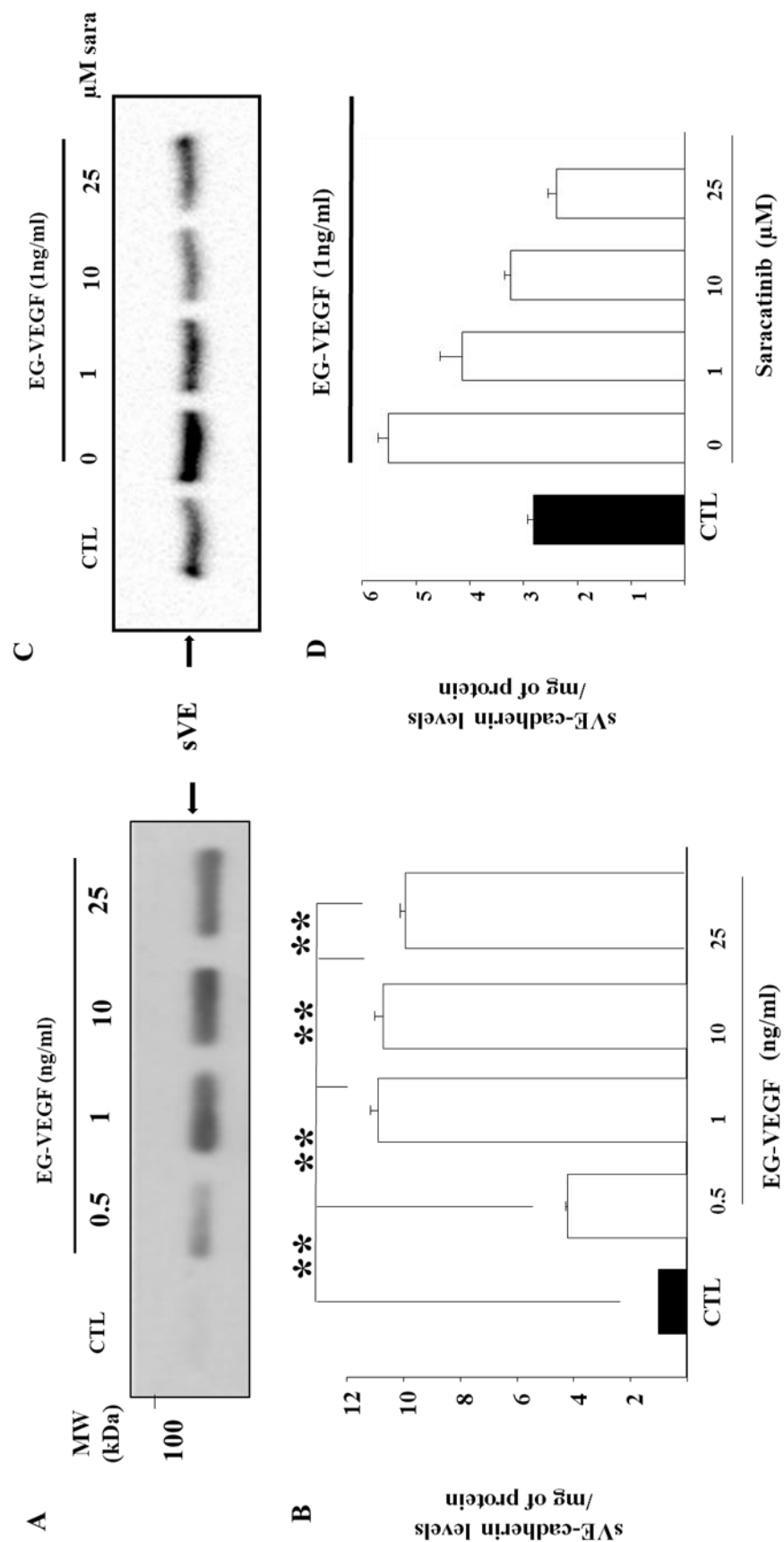
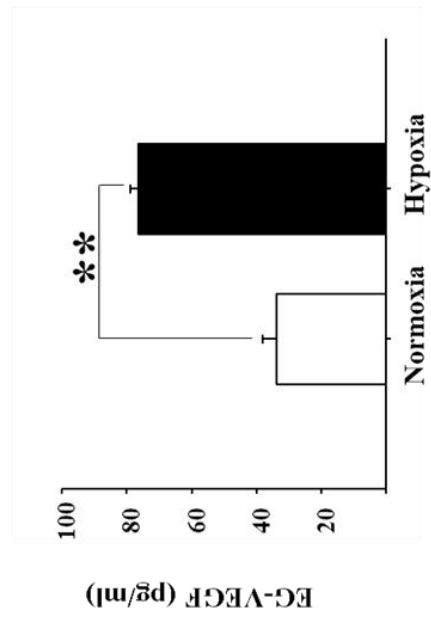


Figure 7

A



B

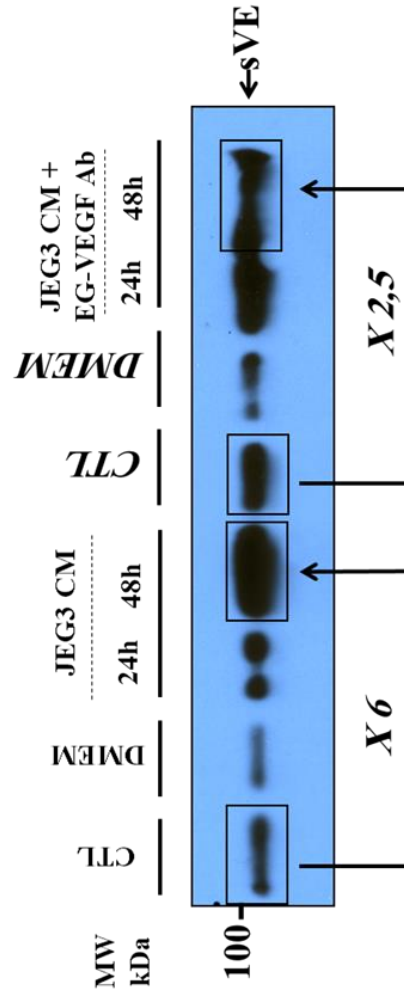


Figure 8

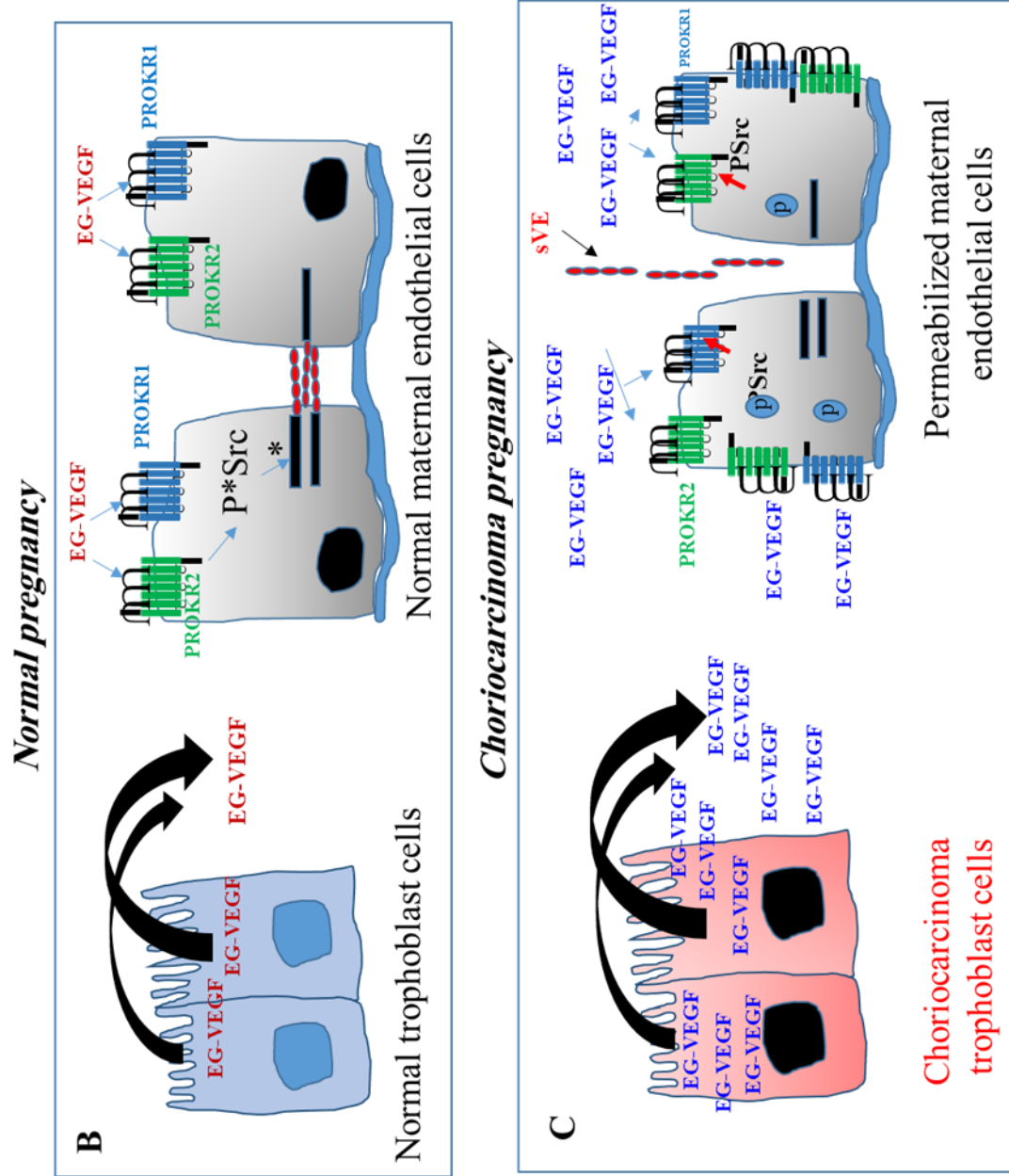


Figure S1

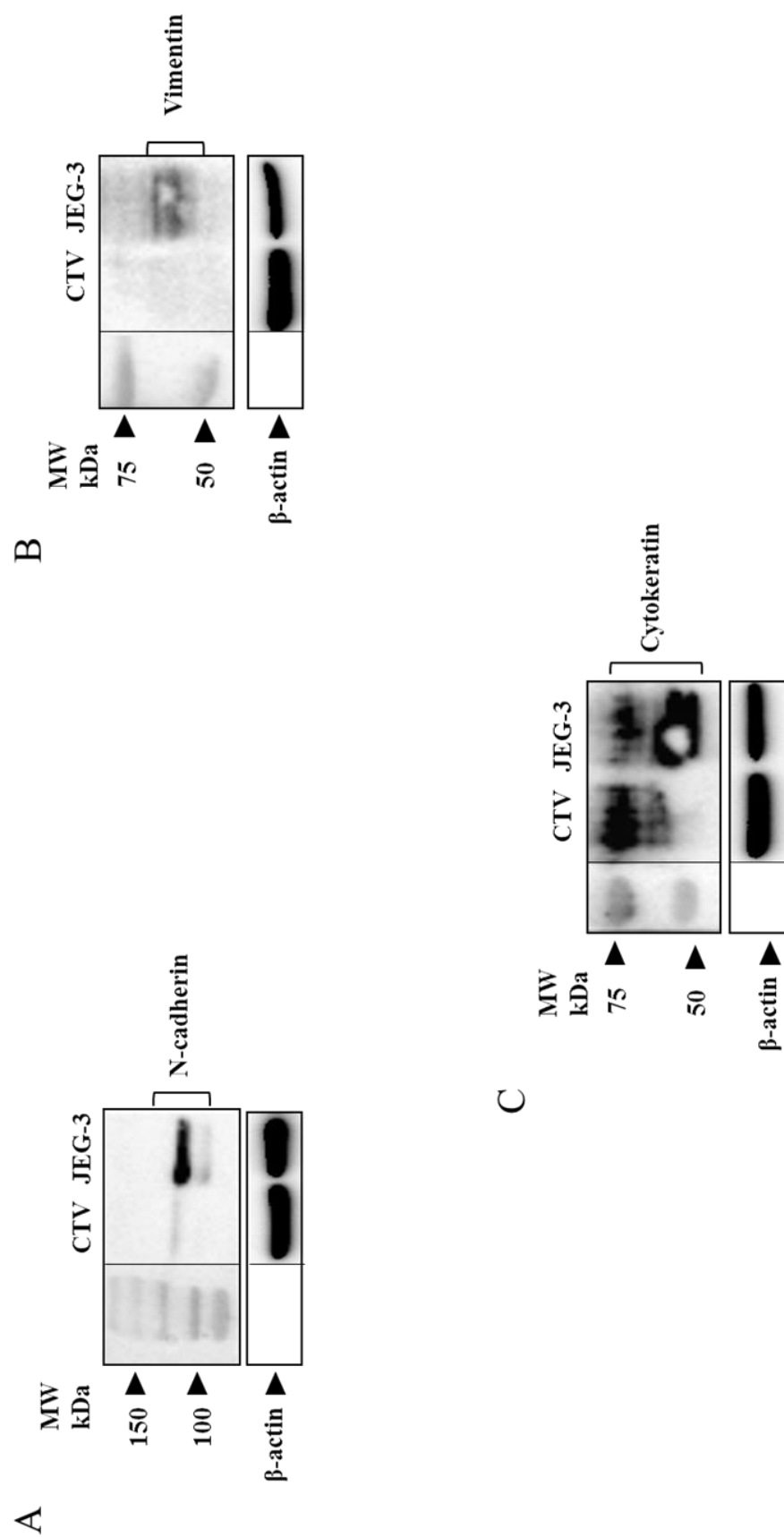


Table 1

Clinical characteristics of normal and pathological pregnancies			
Maternal characteristics	Normal Gestations (n=18)	Hydatidiform Mole (n=38)	Choriocarcinoma (n=3)
Maternal age (years)	24.8 (18-30)	31.2 (19-50)	39
Gestational age at sampling (weeks)	12-14	12-14	12
β hCG at sampling (mIU/mL)	9052 ($\pm$ 1950)	5487- 242400	1077379
Menarche (years)	13($\pm$ 1.0)	14.1($\pm$ 1.7)	12
Age of first pregnancy (years)	23($\pm$ 2.0)	23.9($\pm$ 7.9)	21
Parity	0-3	0-7	3

2. Résumé des résultats.

2.1 Augmentation des niveaux circulants de la sVE chez les patientes ayant des MHC ou choriocarcinome.

Comme il a déjà été démontré que les niveaux circulants de la partie soluble de la VE-cadhérine (sVE) ont été augmentés dans des pathologies associées à la perméabilité vasculaire ; nous avons comparé les niveaux circulants de la sVE dans la même cohorte de patientes utilisées dans la première étude. Sur cette cohorte nous avons montré que les niveaux d'EG-VEGF étaient significativement plus augmentés dans les les MHC et les choriocarcinomes. Ici, nous démontrons une augmentation significative des taux de la sVE chez les patientes avec des MHC et choriocarcinome par rapport à des patientes normales.

2.2 EG-VEGF augmente la perméabilité des cellules endothéliales via l'activation de la tyrosine kinase Src:

L'effet de l'EG-VEGF sur la perméabilité des cellules endothéliales a été observé dans les cellules HPEC, une lignée de cellules micro-vasculaires du placenta humain (Brouillet et al., 2010). Néanmoins, ni son effet sur le système macro-vasculaire, ni le mécanisme par lequel ce facteur contrôle la perméabilité des cellules n'ont été étudiés. Ici, nous avons déterminé l'effet de l'EG-VEGF sur la perméabilité des cellules HUVEC (cellules endothéliales humaine isolées à partir du cordon ombilical). Nous avons démontré précédemment que les HUVEC expriment les deux récepteurs de l'EG-VEGF PROKR1 et PROKR2 (Brouillet et al., 2010). La perméabilité des cellules HUVEC a été évaluée en déterminant la résistance électrique Trans-endothéliale (TEER) en l'absence ou en présence de l'EG-VEGF. Dans d'autres systèmes il avait été montré que l'EG-VEGF active la tyrosine kinase Src (Evans et al., 2008). De façon intéressante il a aussi été montré que l'activation de la protéine Src serait impliquée dans la dissociation des cellules endothéliales et le clivage de la VE-cadhérine (Vilgrain et al., 2013). Dans cette étude nous avons déterminé l'effet de l'EG-VEGF sur la perméabilité cellulaire en présence ou absence de Saracatinib, un inhibiteur de tyrosine kinase Src. Nos résultats montrent une augmentation de la perméabilité de la monocouche des cellules endothéliales au bout de 35 min d'incubation en présence de différentes concentrations de l'EG-VEGF (1-10 ng / ml). Cet effet a été significativement diminué en présence de Sacaratinib. Ces données démontrent que l'EG-VEGF induit la perméabilité des cellules HUVEC et que cet effet dépend de l'activation de Src.

2.3 EG-VEGF affecte l'organisation des jonctions cellulaires adhérentes via la désorganisation de la VE-cadhérine.

Comme EG-VEGF augmentait la perméabilité cellulaire des cellules HUVEC, nous avons recherché un effet sur les jonctions cellulaires adhérentes. L'analyse de la localisation

subcellulaire de la VE-cadhérine par la technique d'immuno-fluorescence a montré que le traitement EG-VEGF induisait des « gap » intercellulaires au niveau de la monocouche des cellules endothéliales. Cet effet a augmenté en fonction du temps et de la dose d'EG-VEGF utilisée. Une discontinuité du marquage de la VE-cadhérine est clairement observée à la périphérie des cellules HUVEC. Ces résultats suggèrent que la VE-cadhérine subit des modifications post-traductionnelle suite au traitement par l'EG-VEGF.

2.4 EG-VEGF induit la phosphorylation sur tyrosine des protéines intracellulaires des HUVEC.

La cinétique rapide de l'effet de l'EG-VEGF sur la perméabilité des HUVEC suggérait l'implication d'une voie de signalisation post-traductionnelle. Étant donné que les phosphorylations sur les tyrosines sont connues pour être impliquées dans la dissociation des cellules endothéliales, nous avons déterminé si l'EG-VEGF induisait la phosphorylation des protéines tyrosines dans les cellules HUVEC. Nos résultats ont montré que VEGF (contrôle positif) et EG-VEGF induisaient une augmentation de la phosphorylation de l'ensemble du panel des protéines tyrosines après 20 minutes de traitement. Parmi les tyrosines kinases établies pour être activées dans ce système figure la tyrosine kinase Src. Nous avons étudié l'activation de Src suite à une stimulation des HUVEC par EG-VEGF. Le Western blot montre une activation significative de Src après traitement par l'EG-VEGF. Au total, ces résultats suggèrent fortement que l'EG-VEGF, comme le VEGF peut activer les protéines tyrosine kinases.

2.5 EG-VEGF induit la phosphorylation de la VE-cadhérine sur la tyrosine Y685:

Il est bien établi que la tyrosine 685 du domaine cytoplasmique de la VE-cadhérine est un substrat de la tyrosine kinase Src. Nous avons déterminé si le traitement des cellules HUVEC par l'EG-VEGF induisait une phosphorylation sur cette tyrosine. Nos résultats montrent que comme le VEGF, l'EG-VEGF induit la phosphorylation de cette tyrosine sur le site 685. La phosphorylation de la tyrosine Y685 est associée au clivage du domaine extracellulaire de la VE-Cadhérine. Nous avons analysé le contenu en sVE-cadhérine (fraction extracellulaire soluble de la Ve-Cadhérine) du milieu conditionné des HUVEC traitées avec l'EG-VEGF. Le résultat du Western blot montre une augmentation significative de la sVE-Cadhérine en présence de différentes concentrations de l'EG-VEGF. Ces résultats montrent que l'EG-VEGF peut induire le clivage de la VE-Cadhérine, mécanisme certainement à la base de la perméabilité cellulaire confirmée par l'expérience d'immunofluorescence sur la monocouche cellulaire.

Finalement, pour déterminer si l'effet de l'EG-VEGF est dépendant de l'activation de Src, les HUVEC ont été traitées avec des concentrations croissantes de Saracatinib en présence de l'EG-VEGF. Les résultats montrent une inhibition dose-dépendante de l'effet de l'EG-VEGF sur le clivage de la VE-Cadhérine confirmant son implication directe dans la phosphorylation de Src. Par ailleurs, ces résultats rapportent pour la première fois la phosphorylation de Src par l'EG-VEGF dans un autre système, ie la cellule endothéliale du macrovaisseau.

2.6 Le milieu conditionné des JEG3 induit le clivage de la VE-cadhérine:

Afin de déterminer l'implication de l'EG-VEGF dans le clivage de la VE dans le contexte du choriocarcinome, nous avons traité des cellules HUVEC avec le milieu conditionné de la lignée cellulaire du choriocarcinome humain, les cellules JEG3. Nous avons démontré auparavant que les JEG3 sont capables de produire et libérer de l'EG-VEGF, surtout en hypoxie, environnement favorable au développement tumoral. Nos résultats montrent une augmentation de la libération de la sVE par les cellules endothéliales suite au traitement avec le milieu conditionné des JEG3. De façon intéressante, le prétraitement des milieux JEG3 conditionnés des anticorps bloquants anti- EG-VEGF, diminuait le clivage de la VE cadhérine. Ces résultats démontrent que l'EG-VEGF, parmi d'autres facteurs sécrétés par les cellules tumorales, contribue au clivage de la VE –cadhérine.

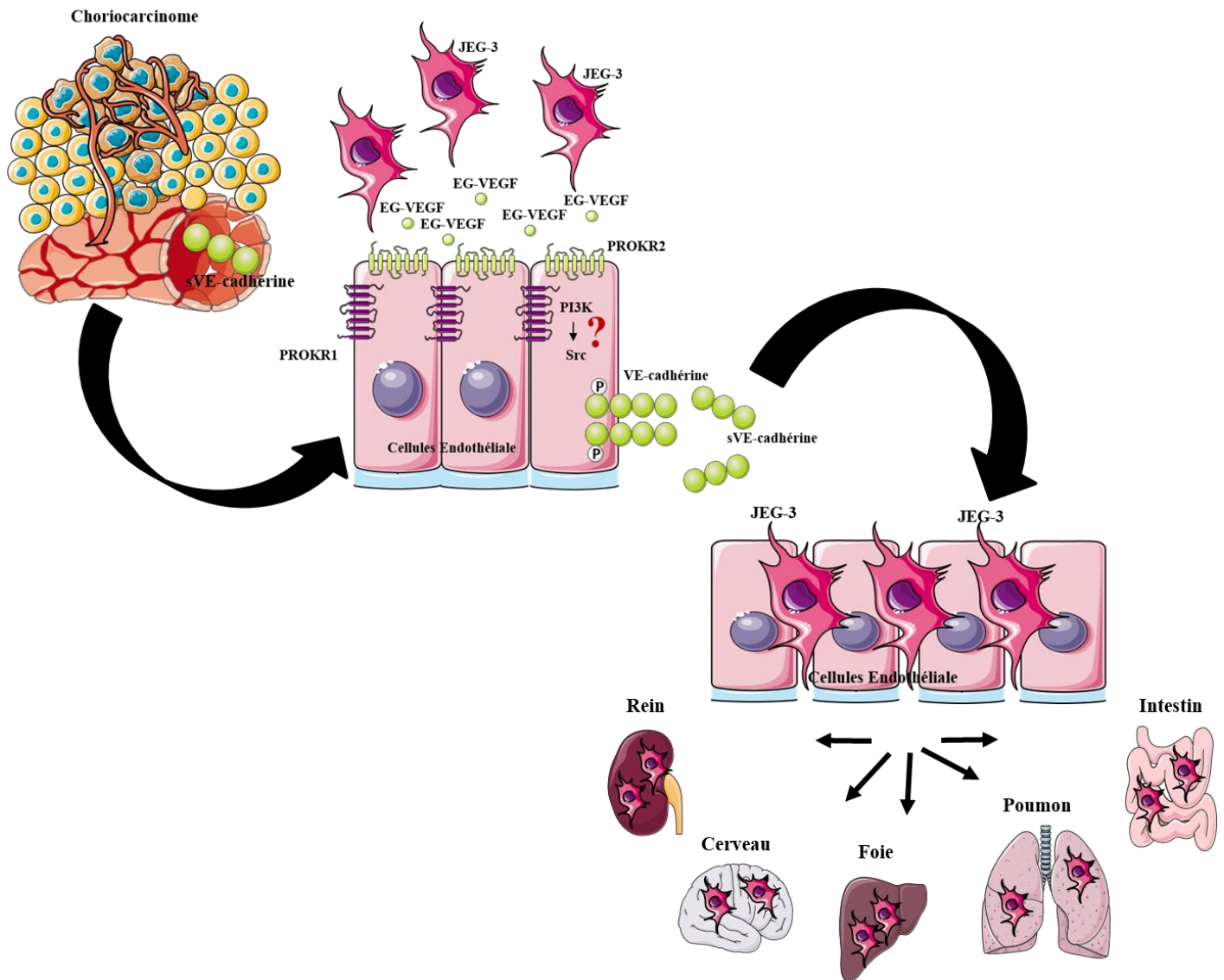


Figure 40 : Schéma récapitulatif du mécanisme de la progression tumorale du choriocarcinome médiée par l'EG-VEGF. Dans les cellules endothéliales EG-VEGF agit sur ces récepteurs PROKR1 et/ou PROKR2 pour induire la phosphorylation de Src, qui à son tour induit la phosphorylation de la VE-Cadhérine sur sa tyrosine 685. La phosphorylation de la tyrosine induit le clivage de la VE-Cadhérine dont la partie soluble se trouve dans la circulation maternelle. Le clivage de la VE-Cadhérine augmenterait la perméabilité du système vasculaire et causerait une désorganisation vasculaire favorable au passage des cellules tumorales à travers l'endothélium pour gagner la circulation et les sites métastatiques.

3. Conclusion

L'ensemble des résultats présentés dans cette partie du travail va contribuer de façon majeure à l'avancement de notre compréhension des mécanismes de la progression tumorale dans la pathologie du choriocarcinome. La notion du clivage de la VE-cadhérine est très récente. Par ailleurs, l'association entre le clivage de la VE-cadhérine et le développement et/ou la progression tumorale est très peu connue. L'investigation du clivage de la VE-cadhérine dans ce type de cancer est très intéressante, car il s'agit d'un cancer très métastatique et pour lequel aucun mécanisme n'a été proposé pour expliquer l'accès rapide des cellules tumorales à des sites très éloignés.

Il existe au moins deux explications plausibles à ce phénomène : la première serait due au caractère invasif intrinsèque de la cellule trophoblastique, lui conférant la capacité de désorganiser un endothélium vasculaire comme observé en physiologie lors de l'établissement de la circulation fœto-maternelle. La deuxième explication serait en rapport avec les facteurs que secrète la cellule tumorale trophoblastique lors de l'acquisition de son caractère malin. En effet, la capacité invasive des trophoblastes et en particulier tumoraux serait assurée par les facteurs pro tumoraux sécrétés localement, comme l'EG-VEGF. Nos résultats ont clairement démontré que ce facteur exerce des effets directs sur la perméabilité endothéliale, assurant ainsi l'extravasation des cellules tumorales vers la circulation maternelle. Si ces résultats se confirment par des expériences complémentaires démontrant des corrélations directes entre les niveaux de l'EG-VEGF, ceux de la sVE et la progression tumorale, nous aurons la certitude que nos résultats contribueront de façon majeure à la compréhension d'un des mécanismes de la progression tumorale et de la désorganisation du système vasculaire dans le choriocarcinome. Ces mécanismes peuvent probablement être transposables à d'autres cancers dans lesquelles, une augmentation des niveaux d'EG-VEGF a été observée (Figure 40).

4. Discussion des résultats

4.1 Phosphorylation de la tyrosine Y685 suite à l'activation de récepteurs couplés aux protéines G.

La phosphorylation des tyrosines intracellulaires est bien établie pour être le résultat de l'activation de récepteurs à activité tyrosine kinase comme le récepteur du VEGF, le VEGFR2. Ici, nous avons démontré pour la première fois que les récepteurs de la famille des RCPG et en particulier ceux de l'EG-VEGF, peuvent induire la phosphorylation des tyrosines Y685 dans les cellules endothéliales. Ces résultats peu communs pour les signalisations des

RCPG, ne sont pour autant pas surprenant pour le système EG-VEGF/PROKR1 PROKR2. En effet plusieurs voies de signalisations intracellulaires ont été rapportées suite à la liaison de l'EG-VEGF à son récepteur, incluant celle qui médierait la phosphorylation de Src. Aussi, l'activation de Src par l'EG-VEGF peut résulter d'une communication croisée entre les différentes voies de signalisations, comme démontré pour plusieurs autres récepteurs (Cattaneo et al., 2014). Des études récentes ont démontré que l'activation de Src peut être induite par PI3k, principale protéine activée dans la signalisation de l'EG-VEGF (Lopez-Illasaca, Crespo, Pellici, Gutkind, & Wetzker, 1997). Des expériences complémentaires seront nécessaires pour mieux disséquer le mécanisme de la phosphorylation de la tyrosine Y685 depuis la liaison du ligand EG-VEGF à ses récepteurs.

4.2 Lequel des récepteurs à l'EG-VEGF est impliqué dans le contrôle de perméabilité des cellules endothéliales.

L'existence de deux récepteurs capables de lier l'EG-VEGF soulève la question de savoir lequel des deux est le médiateur des effets sur la perméabilité cellulaire. Dans le système micro vasculaire placentaire, des études récentes de notre équipe ont montré que PROKR1 était associé aux effets angiogènes de l'EG-VEGF, alors que PROKR2 était responsable de ses effets sur la perméabilité cellulaire. L'ensemble de ces données est en accord avec les travaux récemment publiés par l'équipe de Nebigil, où le même rôle différentiel des PROKRs a été établi dans les cardiomyocytes (Guilini et al., 2010; Urayama et al., 2009; Urayama et al., 2007). Ces résultats suggèrent que dans les HUVECs la perméabilité induite par l'EG-VEGF serait due à l'activation du récepteur PROKR2. Des expériences utilisant les siRNA PROKR1 ou PROKR2 sont en cours afin de déterminer le type de récepteur impliqué dans la médiation de ces effets dans les cellules endothéliales macrovasculaires. Aussi, des expériences supplémentaires seraient nécessaires afin d'identifier les protéines G impliquées dans le processus de perméabilité dans les HUVEC. Des données de notre laboratoire ont montré que les HUVEC possèdent plus de transcrits de protéines G, incluant les Gα1 et Gα11 que Gα12 (Brouillet et al., 2010).

Perspectives

1. Utilisation des inhibiteurs de Src *in-vivo* dans le modèle animal du choriocarcinome développé au laboratoire.

A afin de confirmer et de mieux caractériser le rôle de l'EG-VEGF dans la progression et la métastase des cellules tumorales d'origine trophoblastique, nous prévoyons de traiter les souris gravides injectées par les cellules JEG3-luc par les inhibiteurs de Src et de suivre le développement tumorale placentaire et sa progression, *in vivo*. Dans ce modèle, nous serons aussi en mesure de déterminer les effets de l'inhibiteur de Src sur le maintien de l'intégrité du système vasculaire *in vivo*. Par ailleurs, le traitement par l'inhibiteur de la phosphorylation de Src permettra de caractériser, non seulement le rôle de l'EG-VEGF dans la progression tumorale, mais aussi celui d'autres facteurs décrits pour phosphoryler cette protéine comme le VEGF, premier facteur décrit dans le clivage de la VE-Cadhérine suite à la phosphorylation de Src.

2. Indentification du rôle de la protéine NOV dans le contrôle de la progression tumorale.

Nous avons démontré dans le modèle animale de choriocarcinome que le traitement par les deux antagonistes des récepteurs à l'EG-VEGF avaient un effet sur l'expression de certains facteurs angiogènes comme la protéine NOV impliquée dans le contrôle de la prolifération des cellules cancéreuses (Gupta et al., 2001). Ces résultats intéressants seraient à caractériser *in vitro* dans les cellules JEG3, mais aussi dans un système de cellules endothéliales, car l'EG-VEGF est surtout un facteur pro-angiogène.

3. Exploitation du modèle animal du choriocarcinome

Le modèle animal développé au cours de mon projet de thèse est un nouveau modèle pour l'étude du développement et la progression d'un cancer très agressif, le choriocarcinome. Ce modèle est maintenant bien établi au sein de notre laboratoire et sera bientôt protégé par un brevet. L'exploitation de ce modèle ne s'arrêtera pas à la fin de ma thèse, mais continuera avec deux nouveaux projets au sein de notre groupe. Les deux projets s'intéressent à la caractérisation du rôle de la protéine NLRP7 dans le développement placentaire normal et pathologique: cas du choriocarcinome. En effet, des mutations dans le gène *NLRP7* seraient étroitement associées au développement de ce cancer (Fisher et al., 2002; Judson, Hayward, Sheridan, & Bonthron, 2002; Kinoshita, Wang, Hasegawa, Imamura, & Suda, 2005; Murdoch et al., 2006). Cependant, leur impact sur la progression de ce cancer est inconnu. Les mutations rapportées à ce jour semblent avoir des effets, perte ou gain de fonction de la protéine NLRP7.

Afin de mieux caractériser la fonction de cette protéine dans le développement placentaire normal et pathologique, les projets en cours visent à caractériser le rôle de cette protéine via son **invalidation, sa surexpression ou à travers l'introduction de mutations** ; dans un système *in vitro*, et ensuite *in vivo* par l'utilisation du modèle développé.

Dans ces projets des cellules HTR surexprimant NLRP7 ; des cellules JEG3 invalidées pour l'expression du NLRP7 « CRISPER CAS9 » et cellules HTR et JEG3 transfectées par du NLRP7 portant des mutations les plus communes seront injectées chez les souris SCID gravides en suivant le même protocole que j'ai développé. Ces expériences permettront de mieux caractériser la progression du choriocarcinome en étudiant les mutations en cause de son développement.

Communications et publications

Communications orales et posters :

- Communication **orale** au congrès du Groupe de la Francophonie Placentaire (GFP), Juin 2015 à Genève.

W. Traboulsi, H. Bouffetal, T Aboussaouira, N. Samouh, M. benharouga, JJ feige and N. Alfaidy.

Dérégulation de l'EG-VEGF et de ses récepteurs dans les moles hydatiformes complets : Rôle potentiel dans le développement tumoral placentaire.

- Communication **orale** au congrès du Groupe de la Francophonie Placentaire (GFP), septembre 2014 à Paris.

W. Traboulsi, H. Bouffetal, T Aboussaouira, N. Samouh, M. benharouga, JJ feige and N. Alfaidy.

Caractérisation du rôle de l'EG-VEGF dans le développement tumoral placentaire: Etudes in vitro et in vivo.

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

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

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

Posters:

- Communication sous forme d'affiche au congrès de l'ESGO (European Society of Gynaecological Oncology), Octobre 2015 à Nice.

W. Traboulsi, H. Bouffetal, T Aboussaouira, N. Samouh, M. benharouga, JJ feige and N. Alfaidy..

EG-VEGF and its receptors are deregulated in invasive moles: Potential role in placental tumor development.

- Communication sous forme d'affiche au congrès de l'IFPA (International Federation of Placenta Associations), septembre 2014 à Paris.

W. Traboulsi, H. Bouffetal, T Aboussaouira, N. Samouh, M. benharouga, JJ feige and N. Alfaidy.

EG-VEGF and its receptors are deregulated in choriocarcinoma: Potential role in placental tumor development.

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

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

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

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

W. Traboulsi, H. Bouffetal, T Aboussaouira, N. Samouh, M. benharouga, JJ feige and N. Alfaidy.

Dérégulation de l'EG-VEGF et de ses récepteurs dans les moles hydatiformes complets : Rôle potentiel dans le développement tumoral placentaire.

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

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

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

Références :

- Abraham, S., Yeo, M., Montero-Balaguer, M., Paterson, H., Dejana, E., Marshall, C. J., & Mavria, G. (2009). VE-Cadherin-mediated cell-cell interaction suppresses sprouting via signaling to MLC2 phosphorylation. *Curr Biol*, 19(8), 668-674. doi: 10.1016/j.cub.2009.02.057
- Ahamed, E., Short, D., North, B., Savage, P. M., & Seckl, M. J. (2012). Survival of women with gestational trophoblastic neoplasia and liver metastases: is it improving? *J Reprod Med*, 57(5-6), 262-269.
- Alazzam, M., Tidy, J., Hancock, B. W., & Osborne, R. (2009). First line chemotherapy in low risk gestational trophoblastic neoplasia. *Cochrane Database Syst Rev*(1), CD007102. doi: 10.1002/14651858.CD007102.pub2
- Alfaidy, N., Gupta, S., DeMarco, C., Caniggia, I., & Challis, J. R. (2002). Oxygen regulation of placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2: physiological and pathological implications. *J Clin Endocrinol Metab*, 87(10), 4797-4805. doi: 10.1210/jc.2002-020310
- Alfaidy, N., Li, W., MacIntosh, T., Yang, K., & Challis, J. (2003). Late gestation increase in 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 expression in human fetal membranes: a novel intrauterine source of cortisol. *J Clin Endocrinol Metab*, 88(10), 5033-5038. doi: 10.1210/jc.2002-021915
- Allias, F., Bolze, P. A., Gaillot-Durand, L., Devouassoux-Shisheboran, M., & reseau des maladies trophoblastiques, g. (2014). [Gestational trophoblastic disease]. *Ann Pathol*, 34(6), 434-447. doi: 10.1016/j.annpat.2014.09.004
- Altieri, A., Franceschi, S., Ferlay, J., Smith, J., & La Vecchia, C. (2003). Epidemiology and aetiology of gestational trophoblastic diseases. *Lancet Oncol*, 4(11), 670-678.
- Aplin, J. D. (1991). Implantation, trophoblast differentiation and haemochorial placentation: mechanistic evidence in vivo and in vitro. *J Cell Sci*, 99 (Pt 4), 681-692.
- Arima, T., Imamura, T., Amada, S., Tsuneyoshi, M., & Wake, N. (1994). Genetic origin of malignant trophoblastic neoplasms. *Cancer Genet Cytogenet*, 73(2), 95-102.
- Azuma, C., Saji, F., Tokugawa, Y., Kimura, T., Nobunaga, T., Takemura, M., . . . Tanizawa, O. (1991). Application of gene amplification by polymerase chain reaction to genetic analysis of molar mitochondrial DNA: the detection of anuclear empty ovum as the cause of complete mole. *Gynecol Oncol*, 40(1), 29-33.
- Balboni, G., Lazzari, I., Trapella, C., Negri, L., Lattanzi, R., Giannini, E., . . . Salvadori, S. (2008). Triazine compounds as antagonists at Bv8-prokineticin receptors. *J Med Chem*, 51(23), 7635-7639. doi: 10.1021/jm800854e
- Baluk, P., Hashizume, H., & McDonald, D. M. (2005). Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Curr Opin Genet Dev*, 15(1), 102-111. doi: 10.1016/j.gde.2004.12.005
- Battersby, S., Critchley, H. O., Morgan, K., Millar, R. P., & Jabbour, H. N. (2004). Expression and regulation of the prokineticins (endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor and Bv8) and their receptors in the human endometrium across the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*, 89(5), 2463-2469. doi: 10.1210/jc.2003-032012
- Baulieu, J. L., Lepape, J., Baulieu, F., & Besnard, J. C. (1982). Falsely elevated results of radioimmunoassays using double antibody method: arguments for a third anti-rabbit IgG antibody present in certain human sera. *Eur J Nucl Med*, 7(3), 121-126.

- Baumeister, U., Funke, R., Ebnet, K., Vorschmitt, H., Koch, S., & Vestweber, D. (2005). Association of Csk to VE-cadherin and inhibition of cell proliferation. *EMBO J*, 24(9), 1686-1695. doi: 10.1038/sj.emboj.7600647
- Berglund, L., & Holmberg, N. G. (1989). Heterophilic antibodies against rabbit serum causing falsely elevated gonadotropin levels. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 68(4), 377-378.
- Berkowitz, R. S., Cramer, D. W., Bernstein, M. R., Cassells, S., Driscoll, S. G., & Goldstein, D. P. (1985). Risk factors for complete molar pregnancy from a case-control study. *Am J Obstet Gynecol*, 152(8), 1016-1020.
- Berx, G., & van Roy, F. (2009). Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1(6), a003129. doi: 10.1101/cshperspect.a003129
- Binker, M. G., Binker-Cosen, A. A., Richards, D., Oliver, B., & Cosen-Binker, L. I. (2009). EGF promotes invasion by PANC-1 cells through Rac1/ROS-dependent secretion and activation of MMP-2. *Biochem Biophys Res Commun*, 379(2), 445-450. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.12.080
- Birukova, A. A., Tian, Y., Dubrovskiy, O., Zebda, N., Sarich, N., Tian, X., . . . Birukov, K. G. (2012). VE-cadherin trans-interactions modulate Rac activation and enhancement of lung endothelial barrier by iloprost. *J Cell Physiol*, 227(10), 3405-3416. doi: 10.1002/jcp.24041
- Bleau, A. M., Planque, N., Lazar, N., Zambelli, D., Ori, A., Quan, T., . . . Perbal, B. (2007). Antiproliferative activity of CCN3: involvement of the C-terminal module and post-translational regulation. *J Cell Biochem*, 101(6), 1475-1491. doi: 10.1002/jcb.21262
- Blehschmidt, K., Mylonas, I., Mayr, D., Schiessl, B., Schulze, S., Becker, K. F., & Jeschke, U. (2007). Expression of E-cadherin and its repressor snail in placental tissue of normal, preeclamptic and HELLP pregnancies. *Virchows Arch*, 450(2), 195-202. doi: 10.1007/s00428-006-0343-x
- Boisbouvier, J., Albrand, J. P., Blackledge, M., Jaquinod, M., Schweitz, H., Lazdunski, M., & Marion, D. (1998). A structural homologue of colipase in black mamba venom revealed by NMR floating disulphide bridge analysis. *J Mol Biol*, 283(1), 205-219. doi: 10.1006/jmbi.1998.2057
- Boscato, L. M., & Stuart, M. C. (1988). Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays. *Clin Chem*, 34(1), 27-33.
- Bouillet, L., Sidibe, A., Polena, H., Mannic, T., Deroux, A., Stidder, B., . . . Vilgrain, I. (2014). [Endothelial junctions: exploiting their instability in the development of biomarkers for vascular remodelling]. *Med Sci (Paris)*, 30(6-7), 633-635. doi: 10.1051/medsci/20143006012
- Bouillet, L., & Vilgrain, I. (2014). VE-cadherin, a potential marker for endothelial cell activation during hereditary angioedema attacks. *J Allergy Clin Immunol*, 134(1), 241. doi: 10.1016/j.jaci.2014.04.016
- Boulberdaa, M., Urayama, K., & Nebigil, C. G. (2011). Prokineticin receptor 1 (PKR1) signalling in cardiovascular and kidney functions. *Cardiovasc Res*, 92(2), 191-198. doi: 10.1093/cvr/cvr228
- Braga, V. M., Del Maschio, A., Machesky, L., & Dejana, E. (1999). Regulation of cadherin function by Rho and Rac: modulation by junction maturation and cellular context. *Mol Biol Cell*, 10(1), 9-22.
- Brosens, I. A., Robertson, W. B., & Dixon, H. G. (1970). The role of the spiral arteries in the pathogenesis of pre-eclampsia. *J Pathol*, 101(4), Pvi.
- Brouillet, S., Hoffmann, P., Benharouga, M., Salomon, A., Schaal, J. P., Feige, J. J., & Alfaidy, N. (2010). Molecular characterization of EG-VEGF-mediated angiogenesis:

- differential effects on microvascular and macrovascular endothelial cells. *Mol Biol Cell*, 21(16), 2832-2843. doi: 10.1091/mbc.E10-01-0059
- Brouillet, S., Hoffmann, P., Chauvet, S., Salomon, A., Chamboredon, S., Sergent, F., . . . Alfaidy, N. (2012). Revisiting the role of hCG: new regulation of the angiogenic factor EG-VEGF and its receptors. *Cell Mol Life Sci*, 69(9), 1537-1550. doi: 10.1007/s00018-011-0889-x
- Brouillet, S., Hoffmann, P., Feige, J. J., & Alfaidy, N. (2012). EG-VEGF: a key endocrine factor in placental development. *Trends Endocrinol Metab*, 23(10), 501-508. doi: 10.1016/j.tem.2012.05.006
- Brouillet, S., Murthi, P., Hoffmann, P., Salomon, A., Sergent, F., De Mazancourt, P., . . . Alfaidy, N. (2013). EG-VEGF controls placental growth and survival in normal and pathological pregnancies: case of fetal growth restriction (FGR). *Cell Mol Life Sci*, 70(3), 511-525. doi: 10.1007/s00018-012-1141-z
- Bullock, C. M., Li, J. D., & Zhou, Q. Y. (2004). Structural determinants required for the bioactivities of prokineticins and identification of prokineticin receptor antagonists. *Mol Pharmacol*, 65(3), 582-588. doi: 10.1124/mol.65.3.582
- Burton, G. J., Skepper, J. N., Hempstock, J., Cindrova, T., Jones, C. J., & Jauniaux, E. (2003). A reappraisal of the contrasting morphological appearances of villous cytotrophoblast cells during early human pregnancy; evidence for both apoptosis and primary necrosis. *Placenta*, 24(4), 297-305.
- Cagayan, M. S., & Lu-Lasala, L. R. (2006). Management of gestational trophoblastic neoplasia with metastasis to the central nervous system: A 12-year review at the Philippine General Hospital. *J Reprod Med*, 51(10), 785-792.
- Carmeliet, P., & Collen, D. (1999). Role of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptors in vascular development. *Curr Top Microbiol Immunol*, 237, 133-158.
- Carmeliet, P., Lampugnani, M. G., Moons, L., Breviario, F., Compennolle, V., Bono, F., . . . Dejana, E. (1999). Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell*, 98(2), 147-157.
- Cattaneo, F., Guerra, G., Parisi, M., De Marinis, M., Tafuri, D., Cinelli, M., & Ammendola, R. (2014). Cell-surface receptors transactivation mediated by g protein-coupled receptors. *Int J Mol Sci*, 15(11), 19700-19728. doi: 10.3390/ijms151119700
- Chen, B. J., Cheng, C. J., & Chen, W. Y. (2013). Transformation of a post-cesarean section placental site nodule into a coexisting epithelioid trophoblastic tumor and placental site trophoblastic tumor: a case report. *Diagn Pathol*, 8, 85. doi: 10.1186/1746-1596-8-85
- Chen, J., Kuei, C., Sutton, S., Wilson, S., Yu, J., Kamme, F., . . . Liu, C. (2005). Identification and pharmacological characterization of prokineticin 2 beta as a selective ligand for prokineticin receptor 1. *Mol Pharmacol*, 67(6), 2070-2076. doi: 10.1124/mol.105.011619
- Cheng, M. Y., Bullock, C. M., Li, C., Lee, A. G., Bermak, J. C., Belluzzi, J., . . . Zhou, Q. Y. (2002). Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus. *Nature*, 417(6887), 405-410. doi: 10.1038/417405a
- Cheng, M. Y., Lee, A. G., Culbertson, C., Sun, G., Talati, R. K., Manley, N. C., . . . Sapolsky, R. M. (2012). Prokineticin 2 is an endangering mediator of cerebral ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(14), 5475-5480. doi: 10.1073/pnas.1113363109
- Ciocca, D. R., & Calderwood, S. K. (2005). Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones*, 10(2), 86-103.

- Cole, L. A. (1997). Immunoassay of human chorionic gonadotropin, its free subunits, and metabolites. *Clin Chem*, 43(12), 2233-2243.
- Cook, B. D., Ferrari, G., Pintucci, G., & Mignatti, P. (2008). TGF-beta1 induces rearrangement of FLK-1-VE-cadherin-beta-catenin complex at the adherens junction through VEGF-mediated signaling. *J Cell Biochem*, 105(6), 1367-1373. doi: 10.1002/jcb.21935
- Cronier, L., Bois, P., Herve, J. C., & Malassine, A. (1995). Effect of human chorionic gonadotrophin on chloride current in human syncytiotrophoblasts in culture. *Placenta*, 16(7), 599-609.
- Cross, J. C., Nakano, H., Natale, D. R., Simmons, D. G., & Watson, E. D. (2006). Branching morphogenesis during development of placental villi. *Differentiation*, 74(7), 393-401. doi: 10.1111/j.1432-0436.2006.00103.x
- Cross, J. C., Werb, Z., & Fisher, S. J. (1994). Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. *Science*, 266(5190), 1508-1518.
- Dejana, E. (2004). Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(4), 261-270. doi: 10.1038/nrm1357
- Dejana, E., Orsenigo, F., & Lampugnani, M. G. (2008). The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J Cell Sci*, 121(Pt 13), 2115-2122. doi: 10.1242/jcs.017897
- Dejana, E., & Vestweber, D. (2013). The role of VE-cadherin in vascular morphogenesis and permeability control. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 116, 119-144. doi: 10.1016/B978-0-12-394311-8.00006-6
- Demir, R., Kaufmann, P., Castellucci, M., Erben, T., & Kotowski, A. (1989). Fetal vasculogenesis and angiogenesis in human placental villi. *Acta Anat (Basel)*, 136(3), 190-203.
- Deng, L., Zhang, J., Wu, T., & Lawrie, T. A. (2013). Combination chemotherapy for primary treatment of high-risk gestational trophoblastic tumour. *Cochrane Database Syst Rev*(1), CD005196. doi: 10.1002/14651858.CD005196.pub4
- Denison, F. C., Battersby, S., King, A. E., Szuber, M., & Jabbour, H. N. (2008). Prokineticin-1: a novel mediator of the inflammatory response in third-trimester human placenta. *Endocrinology*, 149(7), 3470-3477. doi: 10.1210/en.2007-1695
- Dericks-Tan, J. S., Jost, A., Schwedes, U., & Taubert, H. D. (1984). Pseudohypergonadotropinemia and pseudohyperprolactinemia induced by heterophilic antibodies? *Klin Wochenschr*, 62(6), 265-273.
- Downs, K. M., & Bertler, C. (2000). Growth in the pre-fusion murine allantois. *Anat Embryol (Berl)*, 202(4), 323-331. doi: 10.1007/s004290002020323.429
- Dreyfus, M., Tissier, I., & Philippe, E. (2000). [Gestational trophoblastic diseases. Classification, epidemiology and genetic data]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*, 29(2), 125-130.
- Dunand, C., Hoffmann, P., Sapin, V., Blanchon, L., Salomon, A., Sergent, F., . . . Alfaidy, N. (2014). Endocrine gland-derived endothelial growth factor (EG-VEGF) is a potential novel regulator of human parturition. *Biol Reprod*, 91(3), 73. doi: 10.1095/biolreprod.114.119990
- Eddie, S. L., Childs, A. J., Kinnell, H. L., Brown, P., Jabbour, H. N., & Anderson, R. A. (2015). Prokineticin Ligands and Receptors Are Expressed in the Human Fetal Ovary and Regulate Germ Cell Expression of COX2. *J Clin Endocrinol Metab*, 100(9), E1197-1205. doi: 10.1210/jc.2015-2330
- Esfandiari, N., & Goldberg, J. M. (2003). Heterophile antibody blocking agent to confirm false positive serum human chorionic gonadotropin assay. *Obstet Gynecol*, 101(5 Pt 2), 1144-1146.

- Esser, S., Lampugnani, M. G., Corada, M., Dejana, E., & Risau, W. (1998). Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *J Cell Sci*, 111 (Pt 13), 1853-1865.
- Evans, J., Catalano, R. D., Brown, P., Sherwin, R., Critchley, H. O., Fazleabas, A. T., & Jabbour, H. N. (2009). Prokineticin 1 mediates fetal-maternal dialogue regulating endometrial leukemia inhibitory factor. *FASEB J*, 23(7), 2165-2175. doi: 10.1096/fj.08-124495
- Evans, J., Catalano, R. D., Morgan, K., Critchley, H. O., Millar, R. P., & Jabbour, H. N. (2008). Prokineticin 1 signaling and gene regulation in early human pregnancy. *Endocrinology*, 149(6), 2877-2887. doi: 10.1210/en.2007-1633
- Farina, A. R., & Mackay, A. R. (2014). Gelatinase B/MMP-9 in Tumour Pathogenesis and Progression. *Cancers (Basel)*, 6(1), 240-296. doi: 10.3390/cancers6010240
- Ferrara, N., & Davis-Smyth, T. (1997). The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*, 18(1), 4-25. doi: 10.1210/edrv.18.1.0287
- Ferrara, N., LeCouter, J., Lin, R., & Peale, F. (2004). EG-VEGF and Bv8: a novel family of tissue-restricted angiogenic factors. *Biochim Biophys Acta*, 1654(1), 69-78. doi: 10.1016/j.bbcan.2003.07.001
- Fisher, R. A., Hodges, M. D., & Newlands, E. S. (2004). Familial recurrent hydatidiform mole: a review. *J Reprod Med*, 49(8), 595-601.
- Fisher, R. A., Hodges, M. D., Rees, H. C., Sebire, N. J., Seckl, M. J., Newlands, E. S., . . . Castrillon, D. H. (2002). The maternally transcribed gene p57(KIP2) (CDNK1C) is abnormally expressed in both androgenetic and biparental complete hydatidiform moles. *Hum Mol Genet*, 11(26), 3267-3272.
- Fisher, R. A., Lawler, S. D., Povey, S., & Bagshawe, K. D. (1988). Genetically homozygous choriocarcinoma following pregnancy with hydatidiform mole. *Br J Cancer*, 58(6), 788-792.
- Fisher, R. A., & Newlands, E. S. (1993). Rapid diagnosis and classification of hydatidiform moles with polymerase chain reaction. *Am J Obstet Gynecol*, 168(2), 563-569.
- Fleming, E. L., Garrett, L., Growdon, W. B., Callahan, M., Nevadunsky, N., Ghosh, S., . . . Berkowitz, R. S. (2008). The changing role of thoracotomy in gestational trophoblastic neoplasia at the New England Trophoblastic Disease Center. *J Reprod Med*, 53(7), 493-498.
- Floridon, C., Nielsen, O., Holund, B., Sunde, L., Westergaard, J. G., Thomsen, S. G., & Teisner, B. (2000). Localization of E-cadherin in villous, extravillous and vascular trophoblasts during intrauterine, ectopic and molar pregnancy. *Mol Hum Reprod*, 6(10), 943-950.
- Fong, G. H., Rossant, J., Gertsenstein, M., & Breitman, M. L. (1995). Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*, 376(6535), 66-70. doi: 10.1038/376066a0
- Forbes, K., Westwood, M., Baker, P. N., & Aplin, J. D. (2008). Insulin-like growth factor I and II regulate the life cycle of trophoblast in the developing human placenta. *Am J Physiol Cell Physiol*, 294(6), C1313-1322. doi: 10.1152/ajpcell.00035.2008
- Ford, C. E., Skiba, N. P., Bae, H., Daaka, Y., Reuveny, E., Shekter, L. R., . . . Hamm, H. E. (1998). Molecular basis for interactions of G protein betagamma subunits with effectors. *Science*, 280(5367), 1271-1274.
- Foulmann, K., Guastalla, J. P., Caminet, N., Trillet-Lenoir, V., Raudrant, D., Golfier, F., & Schott, A. M. (2006). What is the best protocol of single-agent methotrexate chemotherapy in nonmetastatic or low-risk metastatic gestational trophoblastic tumors? A review of the evidence. *Gynecol Oncol*, 102(1), 103-110. doi: 10.1016/j.ygyno.2006.02.038

- Fowler, D. J., Lindsay, I., Seckl, M. J., & Sebire, N. J. (2007). Histomorphometric features of hydatidiform moles in early pregnancy: relationship to detectability by ultrasound examination. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 29(1), 76-80. doi: 10.1002/uog.3880
- Fraser, H. M., Bell, J., Wilson, H., Taylor, P. D., Morgan, K., Anderson, R. A., & Duncan, W. C. (2005). Localization and quantification of cyclic changes in the expression of endocrine gland vascular endothelial growth factor in the human corpus luteum. *J Clin Endocrinol Metab*, 90(1), 427-434. doi: 10.1210/jc.2004-0843
- Froeling, F. E., & Seckl, M. J. (2014). Gestational trophoblastic tumours: an update for 2014. *Curr Oncol Rep*, 16(11), 408. doi: 10.1007/s11912-014-0408-y
- Fukuhara, S., Sako, K., Minami, T., Noda, K., Kim, H. Z., Kodama, T., . . . Mochizuki, N. (2008). Differential function of Tie2 at cell-cell contacts and cell-substratum contacts regulated by angiopoietin-1. *Nat Cell Biol*, 10(5), 513-526. doi: 10.1038/ncb1714
- Gaengel, K., Niaudet, C., Hagikura, K., Lavina, B., Muhl, L., Hofmann, J. J., . . . Betsholtz, C. (2012). The sphingosine-1-phosphate receptor S1PR1 restricts sprouting angiogenesis by regulating the interplay between VE-cadherin and VEGFR2. *Dev Cell*, 23(3), 587-599. doi: 10.1016/j.devcel.2012.08.005
- Gao, M. Z., Zhao, X. M., Sun, Z. G., Hong, Y., Zhao, L. W., & Zhang, H. Q. (2011). Endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor concentrations in follicular fluid and serum may predict ovarian hyperstimulation syndrome in women undergoing controlled ovarian hyperstimulation. *Fertil Steril*, 95(2), 673-678. doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.09.044
- Garnier-Raveaud, S., Usson, Y., Cand, F., Robert-Nicoud, M., Verdeti, J., & Faury, G. (2001). Identification of membrane calcium channels essential for cytoplasmic and nuclear calcium elevations induced by vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *Growth Factors*, 19(1), 35-48.
- Garnier, V., Traboulsi, W., Salomon, A., Brouillet, S., Fournier, T., Winkler, C., . . . Alfaidy, N. (2015). PPARgamma controls pregnancy outcome through activation of EG-VEGF: new insights into the mechanism of placental development. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 309(4), E357-369. doi: 10.1152/ajpendo.00093.2015
- Gavard, J., & Gutkind, J. S. (2006). VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nat Cell Biol*, 8(11), 1223-1234. doi: 10.1038/ncb1486
- Genbacev, O., Zhou, Y., Ludlow, J. W., & Fisher, S. J. (1997). Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science*, 277(5332), 1669-1672.
- Georgiades, P., Ferguson-Smith, A. C., & Burton, G. J. (2002). Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae. *Placenta*, 23(1), 3-19. doi: 10.1053/plac.2001.0738
- Giampietro, C., Taddei, A., Corada, M., Sarra-Ferraris, G. M., Alcalay, M., Cavallaro, U., . . . Dejana, E. (2012). Overlapping and divergent signaling pathways of N-cadherin and VE-cadherin in endothelial cells. *Blood*, 119(9), 2159-2170. doi: 10.1182/blood-2011-09-381012
- Giannotta, M., Trani, M., & Dejana, E. (2013). VE-cadherin and endothelial adherens junctions: active guardians of vascular integrity. *Dev Cell*, 26(5), 441-454. doi: 10.1016/j.devcel.2013.08.020
- Goi, T., Fujioka, M., Satoh, Y., Tabata, S., Koneri, K., Nagano, H., . . . Yamaguchi, A. (2004). Angiogenesis and tumor proliferation/metastasis of human colorectal cancer cell line SW620 transfected with endocrine glands-derived-vascular endothelial growth factor, as a new angiogenic factor. *Cancer Res*, 64(6), 1906-1910.

- Golfier, F., Massardier, J., Guastalla, J. P., Trillet-Lenoir, V., Frappart, L., Mathian, B., . . . Raudrant, D. (2010). [Management of gestational trophoblastic disease]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*, 39(3 Suppl), F25-32. doi: 10.1016/j.jgyn.2010.02.015
- Gorbunova, E. E., Gavrilovskaya, I. N., Pepini, T., & Mackow, E. R. (2011). VEGFR2 and Src kinase inhibitors suppress Andes virus-induced endothelial cell permeability. *J Virol*, 85(5), 2296-2303. doi: 10.1128/JVI.02319-10
- Graves, J. A. (1998). Genomic imprinting, development and disease--is pre-eclampsia caused by a maternally imprinted gene? *Reprod Fertil Dev*, 10(1), 23-29.
- Grazia Lampugnani, M., Zanetti, A., Corada, M., Takahashi, T., Balconi, G., Breviario, F., . . . Dejana, E. (2003). Contact inhibition of VEGF-induced proliferation requires vascular endothelial cadherin, beta-catenin, and the phosphatase DEP-1/CD148. *J Cell Biol*, 161(4), 793-804. doi: 10.1083/jcb.200209019
- Grummer, R., Donner, A., & Winterhager, E. (1999). Characteristic growth of human choriocarcinoma xenografts in nude mice. *Placenta*, 20(7), 547-553. doi: 10.1053/plac.1999.0406
- Guilini, C., Urayama, K., Turkeri, G., Dedeoglu, D. B., Kurose, H., Messaddeq, N., & Nebigil, C. G. (2010). Divergent roles of prokineticin receptors in the endothelial cells: angiogenesis and fenestration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 298(3), H844-852. doi: 10.1152/ajpheart.00898.2009
- Guimiot, F., Teixeira, L., Dode, C., Delezoide, A. L., & Hardelin, J. P. (2011). [Kallmann syndrome - a fetopathological sequence]. *Med Sci (Paris)*, 27(2), 135-137. doi: 10.1051/medsci/2011272135
- Gupta, N., Wang, H., McLeod, T. L., Naus, C. C., Kyurkchiev, S., Advani, S., . . . Weichselbaum, R. R. (2001). Inhibition of glioma cell growth and tumorigenic potential by CCN3 (NOV). *Mol Pathol*, 54(5), 293-299.
- Hancock, B. W., Nazir, K., & Everard, J. E. (2006). Persistent gestational trophoblastic neoplasia after partial hydatidiform mole incidence and outcome. *J Reprod Med*, 51(10), 764-766.
- Handschuh, K., Guibourdenche, J., Guesnon, M., Laurendeau, I., Evain-Brion, D., & Fournier, T. (2006). Modulation of PAPP-A expression by PPARgamma in human first trimester trophoblast. *Placenta*, 27 Suppl A, S127-134. doi: 10.1016/j.placenta.2005.10.012
- Handschuh, K., Guibourdenche, J., Tsatsaris, V., Guesnon, M., Laurendeau, I., Evain-Brion, D., & Fournier, T. (2007). Human chorionic gonadotropin expression in human trophoblasts from early placenta: comparative study between villous and extravillous trophoblastic cells. *Placenta*, 28(2-3), 175-184. doi: 10.1016/j.placenta.2006.01.019
- Hannan, N. J., Paiva, P., Dimitriadis, E., & Salamonsen, L. A. (2010). Models for study of human embryo implantation: choice of cell lines? *Biol Reprod*, 82(2), 235-245. doi: 10.1095/biolreprod.109.077800
- Harris, L. K. (2010). Review: Trophoblast-vascular cell interactions in early pregnancy: how to remodel a vessel. *Placenta*, 31 Suppl, S93-98. doi: 10.1016/j.placenta.2009.12.012
- Harris, L. K., & Aplin, J. D. (2007). Vascular remodeling and extracellular matrix breakdown in the uterine spiral arteries during pregnancy. *Reprod Sci*, 14(8 Suppl), 28-34. doi: 10.1177/1933719107309588
- Hayashi, M., Majumdar, A., Li, X., Adler, J., Sun, Z., Vertuani, S., . . . Claesson-Welsh, L. (2013). VE-PTP regulates VEGFR2 activity in stalk cells to establish endothelial cell polarity and lumen formation. *Nat Commun*, 4, 1672. doi: 10.1038/ncomms2683
- Hermant, B., Bibert, S., Concord, E., Dublet, B., Weidenhaupt, M., Vernet, T., & Gulino-Debrac, D. (2003). Identification of proteases involved in the proteolysis of vascular

- endothelium cadherin during neutrophil transmigration. *J Biol Chem*, 278(16), 14002-14012. doi: 10.1074/jbc.M300351200
- Herodin, F., Voir, D., Vilgrain, I., Courcon, M., Drouet, M., & Boittin, F. X. (2016). Soluble Vascular Endothelial Cadherin as a New Biomarker of Irradiation in Highly Irradiated Baboons with Bone Marrow Protection. *Health Phys*, 110(6), 598-605. doi: 10.1097/HP.0000000000000481
- Herren, B., Levkau, B., Raines, E. W., & Ross, R. (1998). Cleavage of beta-catenin and plakoglobin and shedding of VE-cadherin during endothelial apoptosis: evidence for a role for caspases and metalloproteinases. *Mol Biol Cell*, 9(6), 1589-1601.
- Hoffmann, P., Feige, J. J., & Alfaidy, N. (2006). Expression and oxygen regulation of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor/prokineticin-1 and its receptors in human placenta during early pregnancy. *Endocrinology*, 147(4), 1675-1684. doi: 10.1210/en.2005-0912
- Hoffmann, P., Feige, J. J., & Alfaidy, N. (2007). Placental expression of EG-VEGF and its receptors PKR1 (prokineticin receptor-1) and PKR2 throughout mouse gestation. *Placenta*, 28(10), 1049-1058. doi: 10.1016/j.placenta.2007.03.008
- Hoffmann, P., Saoudi, Y., Benharouga, M., Graham, C. H., Schaal, J. P., Mazouni, C., . . . Alfaidy, N. (2009). Role of EG-VEGF in human placentation: Physiological and pathological implications. *J Cell Mol Med*, 13(8B), 2224-2235. doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00554.x
- Horn, L. C., Kowalzik, J., Bilek, K., Richter, C. E., & Eienkel, J. (2006). Prognostic value of trophoblastic proliferation in complete hydatidiform moles in predicting persistent disease. *Pathol Res Pract*, 202(3), 151-156. doi: 10.1016/j.prp.2005.11.009
- Hou, J. L., Wan, X. R., Xiang, Y., Qi, Q. W., & Yang, X. Y. (2008). Changes of clinical features in hydatidiform mole: analysis of 113 cases. *J Reprod Med*, 53(8), 629-633.
- Hu, W. P., Zhang, C., Li, J. D., Luo, Z. D., Amadesi, S., Bunnett, N., & Zhou, Q. Y. (2006). Impaired pain sensation in mice lacking prokineticin 2. *Mol Pain*, 2, 35. doi: 10.1186/1744-8069-2-35
- Jaattela, M. (1999). Escaping cell death: survival proteins in cancer. *Exp Cell Res*, 248(1), 30-43. doi: 10.1006/excr.1999.4455
- Jacobson, O., Weiss, I. D., Niu, G., Balboni, G., Congiu, C., Onnis, V., . . . Chen, X. (2011). Prokineticin receptor 1 antagonist PC-10 as a biomarker for imaging inflammatory pain. *J Nucl Med*, 52(4), 600-607. doi: 10.2967/jnumed.110.084772
- Jauniaux, E., Watson, A. L., Hempstock, J., Bao, Y. P., Skepper, J. N., & Burton, G. J. (2000). Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress. A possible factor in human early pregnancy failure. *Am J Pathol*, 157(6), 2111-2122. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64849-3
- Jones, C. J., & Fox, H. (1991). Ultrastructure of the normal human placenta. *Electron Microsc Rev*, 4(1), 129-178.
- Joubert, F. J., & Strydom, D. J. (1980). Snake venom. The amino acid sequence of protein A from *Dendroaspis polylepis polylepis* (black mamba) venom. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, 361(12), 1787-1794.
- Judson, H., Hayward, B. E., Sheridan, E., & Bonthron, D. T. (2002). A global disorder of imprinting in the human female germ line. *Nature*, 416(6880), 539-542. doi: 10.1038/416539a
- Kajii, T., & Ohama, K. (1977). Androgenetic origin of hydatidiform mole. *Nature*, 268(5621), 633-634.
- Kaser, A., Winklmayr, M., Lepperdinger, G., & Kreil, G. (2003). The AVIT protein family. Secreted cysteine-rich vertebrate proteins with diverse functions. *EMBO Rep*, 4(5), 469-473. doi: 10.1038/sj.embor.embor830

- Kaufmann, P., Black, S., & Huppertz, B. (2003). Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biol Reprod*, 69(1), 1-7. doi: 10.1095/biolreprod.102.014977
- King, A., Wooding, P., Gardner, L., & Loke, Y. W. (1993). Expression of perforin, granzyme A and TIA-1 by human uterine CD56+ NK cells implies they are activated and capable of effector functions. *Hum Reprod*, 8(12), 2061-2067.
- Kinoshita, T., Wang, Y., Hasegawa, M., Imamura, R., & Suda, T. (2005). PYPAF3, a PYRIN-containing APAF-1-like protein, is a feedback regulator of caspase-1-dependent interleukin-1 β secretion. *J Biol Chem*, 280(23), 21720-21725. doi: 10.1074/jbc.M410057200
- Kisliouk, T., Podlovni, H., & Meidan, R. (2005). Unique expression and regulatory mechanisms of EG-VEGF/prokineticin-1 and its receptors in the corpus luteum. *Ann Anat*, 187(5-6), 529-537. doi: 10.1016/j.aanat.2005.07.005
- Kisliouk, T., Podlovni, H., Spanel-Borowski, K., Ovadia, O., Zhou, Q. Y., & Meidan, R. (2005). Prokineticins (endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor and BV8) in the bovine ovary: expression and role as mitogens and survival factors for corpus luteum-derived endothelial cells. *Endocrinology*, 146(9), 3950-3958. doi: 10.1210/en.2005-0297
- Kliman, H. J., Nestler, J. E., Sermasi, E., Sanger, J. M., & Strauss, J. F., 3rd. (1986). Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinology*, 118(4), 1567-1582. doi: 10.1210/endo-118-4-1567
- Kohler, P. O., Bridson, W. E., Hammond, J. M., Weintraub, B., Kirschner, M. A., & Van Thiel, D. H. (1971). Clonal lines of human choriocarcinoma cells in culture. *Acta Endocrinol Suppl (Copenh)*, 153, 137-153.
- Lage, J. M., Mark, S. D., Roberts, D. J., Goldstein, D. P., Bernstein, M. R., & Berkowitz, R. S. (1992). A flow cytometric study of 137 fresh hydropic placentas: correlation between types of hydatidiform moles and nuclear DNA ploidy. *Obstet Gynecol*, 79(3), 403-410.
- LaMarca, H. L., Dash, P. R., Vishnuthavan, K., Harvey, E., Sullivan, D. E., Morris, C. A., & Whitley, G. S. (2008). Epidermal growth factor-stimulated extravillous cytotrophoblast motility is mediated by the activation of PI3-K, Akt and both p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases. *Hum Reprod*, 23(8), 1733-1741. doi: 10.1093/humrep/den178
- Lambeng, N., Wallez, Y., Rampon, C., Cand, F., Christe, G., Gulino-Debrac, D., . . . Huber, P. (2005). Vascular endothelial-cadherin tyrosine phosphorylation in angiogenic and quiescent adult tissues. *Circ Res*, 96(3), 384-391. doi: 10.1161/01.RES.0000156652.99586.9f
- Lampugnani, M. G., Orsenigo, F., Gagliani, M. C., Tacchetti, C., & Dejana, E. (2006). Vascular endothelial cadherin controls VEGFR-2 internalization and signaling from intracellular compartments. *J Cell Biol*, 174(4), 593-604. doi: 10.1083/jcb.200602080
- Lampugnani, M. G., Resnati, M., Raiteri, M., Pigott, R., Pisacane, A., Houen, G., . . . Dejana, E. (1992). A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts. *J Cell Biol*, 118(6), 1511-1522.
- Lampugnani, M. G., Zanetti, A., Breviario, F., Balconi, G., Orsenigo, F., Corada, M., . . . Dejana, E. (2002). VE-cadherin regulates endothelial actin activating Rac and increasing membrane association of Tiam. *Mol Biol Cell*, 13(4), 1175-1189. doi: 10.1091/mbc.01-07-0368
- Lawler, S. D., Fisher, R. A., & Dent, J. (1991). A prospective genetic study of complete and partial hydatidiform moles. *Am J Obstet Gynecol*, 164(5 Pt 1), 1270-1277.

- Le Bouteiller, P., & Mallet, V. (1997). HLA-G and pregnancy. *Rev Reprod*, 2(1), 7-13.
- LeCouter, J., & Ferrara, N. (2003). EG-VEGF and Bv8. a novel family of tissue-selective mediators of angiogenesis, endothelial phenotype, and function. *Trends Cardiovasc Med*, 13(7), 276-282.
- LeCouter, J., Kowalski, J., Foster, J., Hass, P., Zhang, Z., Dillard-Telm, L., . . . Ferrara, N. (2001). Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium. *Nature*, 412(6850), 877-884. doi: 10.1038/35091000
- LeCouter, J., Lin, R., Tejada, M., Frantz, G., Peale, F., Hillan, K. J., & Ferrara, N. (2003). The endocrine-gland-derived VEGF homologue Bv8 promotes angiogenesis in the testis: Localization of Bv8 receptors to endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(5), 2685-2690. doi: 10.1073/pnas.0337667100
- Lee, N. Y., & Koland, J. G. (2005). Conformational changes accompany phosphorylation of the epidermal growth factor receptor C-terminal domain. *Protein Sci*, 14(11), 2793-2803. doi: 10.1110/ps.051630305
- Lee, Y. L., Chan, Y. L., Chow, W. N., Ng, E. H., Lee, K. F., Yeung, W. S., & Ho, P. C. (2009). Endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor stimulates proliferation and tube formation in human uterine microvascular endothelial cell through the mitogen-activated protein kinase but not through the Akt pathway. *Fertil Steril*, 91(5 Suppl), 2163-2171. doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.03.076
- Li, J. D., Hu, W. P., & Zhou, Q. Y. (2012). The circadian output signals from the suprachiasmatic nuclei. *Prog Brain Res*, 199, 119-127. doi: 10.1016/B978-0-444-59427-3.00028-9
- Li, M., Bullock, C. M., Knauer, D. J., Ehlert, F. J., & Zhou, Q. Y. (2001). Identification of two prokineticin cDNAs: recombinant proteins potently contract gastrointestinal smooth muscle. *Mol Pharmacol*, 59(4), 692-698.
- Lin, D. C., Bullock, C. M., Ehlert, F. J., Chen, J. L., Tian, H., & Zhou, Q. Y. (2002). Identification and molecular characterization of two closely related G protein-coupled receptors activated by prokineticins/endocrine gland vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*, 277(22), 19276-19280. doi: 10.1074/jbc.M202139200
- Lin, M. T., Yen, M. L., Lin, C. Y., & Kuo, M. L. (2003). Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis by resveratrol through interruption of Src-dependent vascular endothelial cadherin tyrosine phosphorylation. *Mol Pharmacol*, 64(5), 1029-1036. doi: 10.1124/mol.64.5.1029
- Lin, R., LeCouter, J., Kowalski, J., & Ferrara, N. (2002). Characterization of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor signaling in adrenal cortex capillary endothelial cells. *J Biol Chem*, 277(10), 8724-8729. doi: 10.1074/jbc.M110594200
- Lopez-Ilasaca, M., Crespo, P., Pellici, P. G., Gutkind, J. S., & Wetzker, R. (1997). Linkage of G protein-coupled receptors to the MAPK signaling pathway through PI 3-kinase gamma. *Science*, 275(5298), 394-397.
- Louwen, F., Muschol-Steinmetz, C., Reinhard, J., Reitter, A., & Yuan, J. (2012). A lesson for cancer research: placental microarray gene analysis in preeclampsia. *Oncotarget*, 3(8), 759-773. doi: 10.18632/oncotarget.595
- Luk, W. Y., & Friedlander, M. (2013). A fibroid or cancer? A rare case of mixed choriocarcinoma and epithelioid trophoblastic tumour. *Case Rep Obstet Gynecol*, 2013, 492754. doi: 10.1155/2013/492754
- Luplertlop, N., Misse, D., Bray, D., Deleuze, V., Gonzalez, J. P., Leardkamolkarn, V., . . . Veas, F. (2006). Dengue-virus-infected dendritic cells trigger vascular leakage through metalloproteinase overproduction. *EMBO Rep*, 7(11), 1176-1181. doi: 10.1038/sj.embor.7400814

- Lurain, J. R. (2002). Treatment of gestational trophoblastic tumors. *Curr Treat Options Oncol*, 3(2), 113-124.
- Lurain, J. R. (2010). Gestational trophoblastic disease I: epidemiology, pathology, clinical presentation and diagnosis of gestational trophoblastic disease, and management of hydatidiform mole. *Am J Obstet Gynecol*, 203(6), 531-539. doi: 10.1016/j.ajog.2010.06.073
- Lurain, J. R. (2011). Gestational trophoblastic disease II: classification and management of gestational trophoblastic neoplasia. *Am J Obstet Gynecol*, 204(1), 11-18. doi: 10.1016/j.ajog.2010.06.072
- Lurain, J. R., Singh, D. K., & Schink, J. C. (2006). Primary treatment of metastatic high-risk gestational trophoblastic neoplasia with EMA-CO chemotherapy. *J Reprod Med*, 51(10), 767-772.
- Maggio, R., Barbier, P., Colelli, A., Salvadori, F., Demontis, G., & Corsini, G. U. (1999). G protein-linked receptors: pharmacological evidence for the formation of heterodimers. *J Pharmacol Exp Ther*, 291(1), 251-257.
- Maggio, R., Innamorati, G., & Parenti, M. (2007). G protein-coupled receptor oligomerization provides the framework for signal discrimination. *J Neurochem*, 103(5), 1741-1752. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.04896.x
- Makrydimas, G., Sebire, N. J., Thornton, S. E., Zagorianakou, N., Lolis, D., & Fisher, R. A. (2002). Complete hydatidiform mole and normal live birth: a novel case of confined placental mosaicism: case report. *Hum Reprod*, 17(9), 2459-2463.
- Maldonado-Perez, D., Evans, J., Denison, F., Millar, R. P., & Jabbour, H. N. (2007). Potential roles of the prokineticins in reproduction. *Trends Endocrinol Metab*, 18(2), 66-72. doi: 10.1016/j.tem.2006.12.002
- Mangili, G., Parazzini, F., Maggi, R., & Spolti, N. (1993). Repeated gestational trophoblastic disease after natural and heterologous assisted conception. A case report. *J Reprod Med*, 38(5), 405-406.
- Marco, D. E., Cannas, S. A., Montemurro, M. A., Hu, B., & Cheng, S. Y. (2009). Comparable ecological dynamics underlie early cancer invasion and species dispersal, involving self-organizing processes. *J Theor Biol*, 256(1), 65-75. doi: 10.1016/j.jtbi.2008.09.011
- Marsango, S., Bonaccorsi di Patti, M. C., Barra, D., & Miele, R. (2011). Evidence that prokineticin receptor 2 exists as a dimer in vivo. *Cell Mol Life Sci*, 68(17), 2919-2929. doi: 10.1007/s00018-010-0601-6
- Masuda, Y., Takatsu, Y., Terao, Y., Kumano, S., Ishibashi, Y., Suenaga, M., . . . Fujino, M. (2002). Isolation and identification of EG-VEGF/prokineticins as cognate ligands for two orphan G-protein-coupled receptors. *Biochem Biophys Res Commun*, 293(1), 396-402. doi: 10.1016/S0006-291X(02)00239-5
- Masumoto, K. H., Nagano, M., Takashima, N., Hayasaka, N., Hiyama, H., Matsumoto, S., . . . Shigeyoshi, Y. (2006). Distinct localization of prokineticin 2 and prokineticin receptor 2 mRNAs in the rat suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci*, 23(11), 2959-2970. doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.04834.x
- Matsui, H., Iitsuka, Y., Suzuka, K., Seki, K., & Sekiya, S. (2001). Subsequent pregnancy outcome in patients with spontaneous resolution of HCG after evacuation of hydatidiform mole: comparison between complete and partial mole. *Hum Reprod*, 16(6), 1274-1277.
- Matsumoto, S., Yamazaki, C., Masumoto, K. H., Nagano, M., Naito, M., Soga, T., . . . Shigeyoshi, Y. (2006). Abnormal development of the olfactory bulb and reproductive system in mice lacking prokineticin receptor PKR2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(11), 4140-4145. doi: 10.1073/pnas.0508881103

- McCarthy, R. C., Ryan, F. J., & McKenzie, C. M. (1988). Interference in immunoassays caused by IgM anti-mouse IgG antibodies. *Arch Pathol Lab Med*, 112(9), 901-907.
- McDonald, D. M., & Baluk, P. (2005). Imaging of angiogenesis in inflamed airways and tumors: newly formed blood vessels are not alike and may be wildly abnormal: Parker B. Francis lecture. *Chest*, 128(6 Suppl), 602S-608S. doi: 10.1378/chest.128.6_suppl.602S-a
- McGrath, S., Short, D., Harvey, R., Schmid, P., Savage, P. M., & Seckl, M. J. (2010). The management and outcome of women with post-hydatidiform mole 'low-risk' gestational trophoblastic neoplasia, but hCG levels in excess of 100 000 IU l(-1). *Br J Cancer*, 102(5), 810-814. doi: 10.1038/sj.bjc.6605529
- McNeish, I. A., Strickland, S., Holden, L., Rustin, G. J., Foskett, M., Seckl, M. J., & Newlands, E. S. (2002). Low-risk persistent gestational trophoblastic disease: outcome after initial treatment with low-dose methotrexate and folinic acid from 1992 to 2000. *J Clin Oncol*, 20(7), 1838-1844.
- Micalizzi, D. S., Farabaugh, S. M., & Ford, H. L. (2010). Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 15(2), 117-134. doi: 10.1007/s10911-010-9178-9
- Mihu, C. M., Susman, S., Rus Ciuca, D., Mihu, D., & Costin, N. (2009). Aspects of placental morphogenesis and angiogenesis. *Rom J Morphol Embryol*, 50(4), 549-557.
- Mollay, C., Wechselberger, C., Mignogna, G., Negri, L., Melchiorri, P., Barra, D., & Kreil, G. (1999). Bv8, a small protein from frog skin and its homologue from snake venom induce hyperalgesia in rats. *Eur J Pharmacol*, 374(2), 189-196.
- Monnier, J., Piquet-Pellorce, C., Feige, J. J., Musso, O., Clement, B., Turlin, B., . . . Samson, M. (2008). Prokineticin 2/Bv8 is expressed in Kupffer cells in liver and is down regulated in human hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 14(8), 1182-1191.
- Monnier, J., Quillien, V., Piquet-Pellorce, C., Leberre, C., Preisser, L., Gascan, H., & Samson, M. (2008). Prokineticin 1 induces CCL4, CXCL1 and CXCL8 in human monocytes but not in macrophages and dendritic cells. *Eur Cytokine Netw*, 19(4), 166-175. doi: 10.1684/ecn.2008.0138
- Monnier, J., & Samson, M. (2010). Prokineticins in angiogenesis and cancer. *Cancer Lett*, 296(2), 144-149. doi: 10.1016/j.canlet.2010.06.011
- Mullen, C. A. (1998). Review: analogies between trophoblastic and malignant cells. *Am J Reprod Immunol*, 39(1), 41-49.
- Murakami, M., Nguyen, L. T., Zhuang, Z. W., Moodie, K. L., Carmeliet, P., Stan, R. V., & Simons, M. (2008). The FGF system has a key role in regulating vascular integrity. *J Clin Invest*, 118(10), 3355-3366. doi: 10.1172/JCI35298
- Murdoch, S., Djuric, U., Mazhar, B., Seoud, M., Khan, R., Kuick, R., . . . Slim, R. (2006). Mutations in NALP7 cause recurrent hydatidiform moles and reproductive wastage in humans. *Nat Genet*, 38(3), 300-302. doi: 10.1038/ng1740
- Murphy, S. P., Choi, J. C., & Holtz, R. (2004). Regulation of major histocompatibility complex class II gene expression in trophoblast cells. *Reprod Biol Endocrinol*, 2, 52. doi: 10.1186/1477-7827-2-52
- Nagano, H., Goi, T., Koneri, K., Hirono, Y., Katayama, K., & Yamaguchi, A. (2007). Endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor (EG-VEGF) expression in colorectal cancer. *J Surg Oncol*, 96(7), 605-610. doi: 10.1002/jso.20716
- Nath, S., & Devi, G. R. (2016). Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. *Pharmacol Ther*, 163, 94-108. doi: 10.1016/j.pharmthera.2016.03.013

- Neer, E. J. (1995). Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell*, 80(2), 249-257.
- Negri, L., Lattanzi, R., Giannini, E., Colucci, M. A., Mignogna, G., Barra, D., . . . Melchiorri, P. (2005). Biological activities of Bv8 analogues. *Br J Pharmacol*, 146(5), 625-632. doi: 10.1038/sj.bjp.0706376
- Negri, L., Lattanzi, R., Giannini, E., & Melchiorri, P. (2007). Bv8/Prokineticin proteins and their receptors. *Life Sci*, 81(14), 1103-1116. doi: 10.1016/j.lfs.2007.08.011
- Neubauer, N. L., Latif, N., Kalakota, K., Marymont, M., Small, W., Jr., Schink, J. C., & Lurain, J. R. (2012). Brain metastasis in gestational trophoblastic neoplasia: an update. *J Reprod Med*, 57(7-8), 288-292.
- Newlands, E. S., Holden, L., Seckl, M. J., McNeish, I., Strickland, S., & Rustin, G. J. (2002). Management of brain metastases in patients with high-risk gestational trophoblastic tumors. *J Reprod Med*, 47(6), 465-471.
- Ngan, E. S., Lee, K. Y., Yeung, W. S., Ngan, H. Y., Ng, E. H., & Ho, P. C. (2006). Endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor is expressed in human peri-implantation endometrium, but not in endometrial carcinoma. *Endocrinology*, 147(1), 88-95. doi: 10.1210/en.2005-0543
- Ngan, E. S., Sit, F. Y., Lee, K., Miao, X., Yuan, Z., Wang, W., . . . Tam, P. K. (2007). Implications of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor/prokineticin-1 signaling in human neuroblastoma progression. *Clin Cancer Res*, 13(3), 868-875. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2176
- Ngan, E. S., & Tam, P. K. (2008). Prokineticin-signaling pathway. *Int J Biochem Cell Biol*, 40(9), 1679-1684. doi: 10.1016/j.biocel.2008.03.010
- Ngan, H. Y., Seckl, M. J., Berkowitz, R. S., Xiang, Y., Golfier, F., Sekharan, P. K., & Lurain, J. R. (2015). Update on the diagnosis and management of gestational trophoblastic disease. *Int J Gynaecol Obstet*, 131 Suppl 2, S123-126. doi: 10.1016/j.ijgo.2015.06.008
- Ngan, S., & Seckl, M. J. (2007). Gestational trophoblastic neoplasia management: an update. *Curr Opin Oncol*, 19(5), 486-491. doi: 10.1097/CCO.0b013e3282dc94e5
- Noal, S., Joly, F., & Leblanc, E. (2010). [Management of gestational trophoblastic disease]. *Gynecol Obstet Fertil*, 38(3), 193-198. doi: 10.1016/j.gyobfe.2010.01.011
- Nwariaku, F. E., Liu, Z., Zhu, X., Turnage, R. H., Sarosi, G. A., & Terada, L. S. (2002). Tyrosine phosphorylation of vascular endothelial cadherin and the regulation of microvascular permeability. *Surgery*, 132(2), 180-185.
- Olsen, T. G., Hubert, P. R., & Nycum, L. R. (2001). Falsely elevated human chorionic gonadotropin leading to unnecessary therapy. *Obstet Gynecol*, 98(5 Pt 1), 843-845.
- Orsenigo, F., Giampietro, C., Ferrari, A., Corada, M., Galaup, A., Sigismund, S., . . . Dejana, E. (2012). Phosphorylation of VE-cadherin is modulated by haemodynamic forces and contributes to the regulation of vascular permeability in vivo. *Nat Commun*, 3, 1208. doi: 10.1038/ncomms2199
- Osada, H., Iitsuka, Y., Matsui, H., & Sekiya, S. (1995). A complete hydatidiform mole coexisting with a normal fetus was confirmed by variable number tandem repeat (VNTR) polymorphism analysis using polymerase chain reaction. *Gynecol Oncol*, 56(1), 90-93. doi: 10.1006/gyno.1995.1015
- Ozalp, S. S., & Oge, T. (2013). Gestational trophoblastic diseases in Turkey. *J Reprod Med*, 58(1-2), 67-71.
- Palmer, J. R. (1994). Advances in the epidemiology of gestational trophoblastic disease. *J Reprod Med*, 39(3), 155-162.
- Pasquali, D., Rossi, V., Staibano, S., De Rosa, G., Chieffi, P., Prezioso, D., . . . Sinisi, A. A. (2006). The endocrine-gland-derived vascular endothelial growth factor (EG-

- VEGF)/prokineticin 1 and 2 and receptor expression in human prostate: Up-regulation of EG-VEGF/prokineticin 1 with malignancy. *Endocrinology*, 147(9), 4245-4251. doi: 10.1210/en.2006-0614
- Pattillo, R. A., Sasaki, S., Katayama, K. P., Roesler, M., & Mattingly, R. F. (1981). Genesis of 46,XY hydatidiform mole. *Am J Obstet Gynecol*, 141(1), 104-105.
- Peinado, H., Olmeda, D., & Cano, A. (2007). Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer*, 7(6), 415-428. doi: 10.1038/nrc2131
- Pijnenborg, R., Bland, J. M., Robertson, W. B., & Brosens, I. (1983). Uteroplacental arterial changes related to interstitial trophoblast migration in early human pregnancy. *Placenta*, 4(4), 397-413.
- Pijnenborg, R., Robertson, W. B., Brosens, I., & Dixon, G. (1981). Review article: trophoblast invasion and the establishment of haemochorial placentation in man and laboratory animals. *Placenta*, 2(1), 71-91.
- Pitteloud, N., Zhang, C., Pignatelli, D., Li, J. D., Raivio, T., Cole, L. W., . . . Crowley, W. F., Jr. (2007). Loss-of-function mutation in the prokineticin 2 gene causes Kallmann syndrome and normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(44), 17447-17452. doi: 10.1073/pnas.0707173104
- Potter, M. D., Barbero, S., & Cheresch, D. A. (2005). Tyrosine phosphorylation of VE-cadherin prevents binding of p120- and beta-catenin and maintains the cellular mesenchymal state. *J Biol Chem*, 280(36), 31906-31912. doi: 10.1074/jbc.M505568200
- Rabiet, M. J., Plantier, J. L., Rival, Y., Genoux, Y., Lampugnani, M. G., & Dejana, E. (1996). Thrombin-induced increase in endothelial permeability is associated with changes in cell-to-cell junction organization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 16(3), 488-496.
- Red-Horse, K., Rivera, J., Schanz, A., Zhou, Y., Winn, V., Kapidzic, M., . . . Fisher, S. J. (2006). Literature watch. Cytotrophoblast induction of arterial apoptosis and lymphangiogenesis in an in vivo model of human placentation. *Lymphat Res Biol*, 4(4), 229-242. doi: 10.1089/lrb.2006.4407
- Redman, C. W. (1997). Cytotrophoblasts: masters of disguise. *Nat Med*, 3(6), 610-611.
- Rossant, J., & Cross, J. C. (2001). Placental development: lessons from mouse mutants. *Nat Rev Genet*, 2(7), 538-548. doi: 10.1038/35080570
- Rudini, N., Felici, A., Giampietro, C., Lampugnani, M., Corada, M., Swirsding, K., . . . Dejana, E. (2008). VE-cadherin is a critical endothelial regulator of TGF-beta signalling. *EMBO J*, 27(7), 993-1004. doi: 10.1038/emboj.2008.46
- Saharinen, P., Eklund, L., Miettinen, J., Wirkkala, R., Anisimov, A., Winderlich, M., . . . Alitalo, K. (2008). Angiopoietins assemble distinct Tie2 signalling complexes in endothelial cell-cell and cell-matrix contacts. *Nat Cell Biol*, 10(5), 527-537. doi: 10.1038/ncb1715
- Samson, M., Peale, F. V., Jr., Frantz, G., Rioux-Leclercq, N., Rajpert-De Meyts, E., & Ferrara, N. (2004). Human endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor: expression early in development and in Leydig cell tumors suggests roles in normal and pathological testis angiogenesis. *J Clin Endocrinol Metab*, 89(8), 4078-4088. doi: 10.1210/jc.2003-032024
- Sasaki, S., Sasaki, Y., & Iino, K. (2010). Recurrent gestational trophoblastic disease in a case of suspected quiescent gestational trophoblastic disease: a case report. *J Reprod Med*, 55(7-8), 317-320.
- Savage, P., Kelpandides, I., Tuthill, M., Short, D., & Seckl, M. J. (2015). Brain metastases in gestational trophoblast neoplasia: an update on incidence, management and outcome. *Gynecol Oncol*, 137(1), 73-76. doi: 10.1016/j.ygyno.2015.01.530

- Schweitz, H., Bidard, J. N., & Lazdunski, M. (1990). Purification and pharmacological characterization of peptide toxins from the black mamba (*Dendroaspis polylepis*) venom. *Toxicon*, 28(7), 847-856.
- Schweitz, H., Pacaud, P., Diochot, S., Moinier, D., & Lazdunski, M. (1999). MIT(1), a black mamba toxin with a new and highly potent activity on intestinal contraction. *FEBS Lett*, 461(3), 183-188.
- Sebire, N. J., Fisher, R. A., Foskett, M., Rees, H., Seckl, M. J., & Newlands, E. S. (2003). Risk of recurrent hydatidiform mole and subsequent pregnancy outcome following complete or partial hydatidiform molar pregnancy. *BJOG*, 110(1), 22-26.
- Sebire, N. J., Fisher, R. A., & Rees, H. C. (2003). Histopathological diagnosis of partial and complete hydatidiform mole in the first trimester of pregnancy. *Pediatr Dev Pathol*, 6(1), 69-77. doi: 10.1007/s10024-002-0079-9
- Sebire, N. J., Foskett, M., Short, D., Savage, P., Stewart, W., Thomson, M., & Seckl, M. J. (2007). Shortened duration of human chorionic gonadotrophin surveillance following complete or partial hydatidiform mole: evidence for revised protocol of a UK regional trophoblastic disease unit. *BJOG*, 114(6), 760-762. doi: 10.1111/j.1471-0528.2007.01320.x
- Sebire, N. J., Makrydimas, G., Agnantis, N. J., Zagorianakou, N., Rees, H., & Fisher, R. A. (2003). Updated diagnostic criteria for partial and complete hydatidiform moles in early pregnancy. *Anticancer Res*, 23(2C), 1723-1728.
- Sebire, N. J., & Seckl, M. J. (2008). Gestational trophoblastic disease: current management of hydatidiform mole. *BMJ*, 337, a1193. doi: 10.1136/bmj.a1193
- Seckl, M. J., Fisher, R. A., Salerno, G., Rees, H., Paradinas, F. J., Foskett, M., & Newlands, E. S. (2000). Choriocarcinoma and partial hydatidiform moles. *Lancet*, 356(9223), 36-39. doi: 10.1016/S0140-6736(00)02432-6
- Seckl, M. J., Sebire, N. J., & Berkowitz, R. S. (2010). Gestational trophoblastic disease. *Lancet*, 376(9742), 717-729. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60280-2
- Seckl, M. J., Sebire, N. J., Fisher, R. A., Golfier, F., Massuger, L., Sessa, C., & Group, E. G. W. (2013). Gestational trophoblastic disease: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 24 Suppl 6, vi39-50. doi: 10.1093/annonc/mdt345
- Sergent, F., Hoffmann, P., Brouillet, S., Garnier, V., Salomon, A., Murthi, P., . . . Alfaidy, N. (2016). Sustained Endocrine Gland-Derived Vascular Endothelial Growth Factor Levels Beyond the First Trimester of Pregnancy Display Phenotypic and Functional Changes Associated With the Pathogenesis of Pregnancy-Induced Hypertension. *Hypertension*, 68(1), 148-156. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07442
- Seror, J., Chabbert-Buffet, N., Millot, F., Lahlou, N., Uzan, S., & Berkane, N. (2009). False-positive immunometric assay results in the detection of phantom human chorionic gonadotropin: a situation with possible severe iatrogenic consequences. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 147(2), 239-240. doi: 10.1016/j.ejogrb.2009.08.009
- Shasby, D. M., Ries, D. R., Shasby, S. S., & Winter, M. C. (2002). Histamine stimulates phosphorylation of adherens junction proteins and alters their link to vimentin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 282(6), L1330-1338. doi: 10.1152/ajplung.00329.2001
- Shen, D. H., Khoo, U. S., Ngan, H. Y., Ng, T. Y., Chau, M. T., Xue, W. C., & Cheung, A. N. (2003). Coexisting epithelioid trophoblastic tumor and choriocarcinoma of the uterus following a chemoresistant hydatidiform mole. *Arch Pathol Lab Med*, 127(7), e291-293. doi: 10.1043/1543-2165(2003)127<e291:CETTAC>2.0.CO;2
- Shi, Q. J., Lei, Z. M., Rao, C. V., & Lin, J. (1993). Novel role of human chorionic gonadotropin in differentiation of human cytotrophoblasts. *Endocrinology*, 132(3), 1387-1395. doi: 10.1210/endo.132.3.7679981

- Shih Ie, M. (2011). Trophoblastic vasculogenic mimicry in gestational choriocarcinoma. *Mod Pathol*, 24(5), 646-652. doi: 10.1038/modpathol.2010.231
- Shih, I. M., & Kurman, R. J. (2001). Placental site trophoblastic tumor--past as prologue. *Gynecol Oncol*, 82(3), 413-414. doi: 10.1006/gyno.2001.6356
- Shiu, S. Y., Xi, S. C., Xu, J. N., Mei, L., Pang, S. F., Yao, K. M., & Wong, J. T. (2000). Inhibition of malignant trophoblastic cell proliferation in vitro and in vivo by melatonin. *Life Sci*, 67(17), 2059-2074.
- Shrivastava, S., Kataki, A. C., Barmon, D., Deka, P., Bhuyan, C., & Bhargav, S. J. (2014). Gestational trophoblastic neoplasia: A 6 year retrospective study. *South Asian J Cancer*, 3(1), 33-37. doi: 10.4103/2278-330X.126516
- Sidibe, A., Mannic, T., Arboleas, M., Subileau, M., Gulino-Debrac, D., Bouillet, L., . . . Vilgrain, I. (2012). Soluble VE-cadherin in rheumatoid arthritis patients correlates with disease activity: evidence for tumor necrosis factor alpha-induced VE-cadherin cleavage. *Arthritis Rheum*, 64(1), 77-87. doi: 10.1002/art.33336
- Sidibe, A., Polena, H., Pernet-Gallay, K., Razanajatovo, J., Mannic, T., Chaumontel, N., . . . Vilgrain, I. (2014). VE-cadherin Y685F knock-in mouse is sensitive to vascular permeability in recurrent angiogenic organs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 307(3), H455-463. doi: 10.1152/ajpheart.00774.2013
- Sidibe, A., Polena, H., Razanajatovo, J., Mannic, T., Chaumontel, N., Bama, S., . . . Vilgrain, I. (2014). Dynamic phosphorylation of VE-cadherin Y685 throughout mouse estrous cycle in ovary and uterus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 307(3), H448-454. doi: 10.1152/ajpheart.00773.2013
- Smit, M. J., Vischer, H. F., Bakker, R. A., Jongejan, A., Timmerman, H., Pardo, L., & Leurs, R. (2007). Pharmacogenomic and structural analysis of constitutive G protein-coupled receptor activity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 47, 53-87. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105126
- Smith, H. O. (2003). Gestational trophoblastic disease epidemiology and trends. *Clin Obstet Gynecol*, 46(3), 541-556.
- Soga, T., Matsumoto, S., Oda, T., Saito, T., Hiyama, H., Takasaki, J., . . . Furuichi, K. (2002). Molecular cloning and characterization of prokineticin receptors. *Biochim Biophys Acta*, 1579(2-3), 173-179.
- Soper, J. T. (2003). Role of surgery and radiation therapy in the management of gestational trophoblastic disease. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 17(6), 943-957.
- Stevens, F. T., Katzorke, N., Tempfer, C., Kreimer, U., Bizjak, G. I., Fleisch, M. C., & Fehm, T. N. (2015). Gestational Trophoblastic Disorders: An Update in 2015. *Geburtshilfe Frauenheilkd*, 75(10), 1043-1050. doi: 10.1055/s-0035-1558054
- Strickland, S., & Richards, W. G. (1992). Invasion of the trophoblasts. *Cell*, 71(3), 355-357.
- Su, M. T., Lin, S. H., Chen, Y. C., & Kuo, P. L. (2014). Gene-gene interactions and gene polymorphisms of VEGFA and EG-VEGF gene systems in recurrent pregnancy loss. *J Assist Reprod Genet*, 31(6), 699-705. doi: 10.1007/s10815-014-0223-2
- Szulman, A. E., & Surti, U. (1978). The syndromes of hydatidiform mole. I. Cytogenetic and morphologic correlations. *Am J Obstet Gynecol*, 131(6), 665-671.
- Taddei, A., Giampietro, C., Conti, A., Orsenigo, F., Breviario, F., Pirazzoli, V., . . . Dejana, E. (2008). Endothelial adherens junctions control tight junctions by VE-cadherin-mediated upregulation of claudin-5. *Nat Cell Biol*, 10(8), 923-934. doi: 10.1038/ncb1752
- Takeichi, M. (2011). Self-organization of animal tissues: cadherin-mediated processes. *Dev Cell*, 21(1), 24-26. doi: 10.1016/j.devcel.2011.06.002

- Tanaka, N., Ikawa, M., Mata, N. L., & Verma, I. M. (2006). Choroidal neovascularization in transgenic mice expressing prokineticin 1: an animal model for age-related macular degeneration. *Mol Ther*, 13(3), 609-616. doi: 10.1016/j.ymthe.2005.08.024
- Tao, Y., Pinzi, V., Bourhis, J., & Deutsch, E. (2007). Mechanisms of disease: signaling of the insulin-like growth factor 1 receptor pathway--therapeutic perspectives in cancer. *Nat Clin Pract Oncol*, 4(10), 591-602. doi: 10.1038/ncponc0934
- Tarrade, A., Lai Kuen, R., Malassine, A., Tricottet, V., Blain, P., Vidaud, M., & Evain-Brion, D. (2001). Characterization of human villous and extravillous trophoblasts isolated from first trimester placenta. *Lab Invest*, 81(9), 1199-1211.
- Tsai, H. J. (2006). Phantom HCG and clinical management. *Taiwan J Obstet Gynecol*, 45(1), 92-94. doi: 10.1016/S1028-4559(09)60203-5
- Tse, K. Y., & Ngan, H. Y. (2012). Gestational trophoblastic disease. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 26(3), 357-370. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2011.11.009
- Tu, L. H., Yu, L. L., Xiong, C. L., & Zhang, H. P. (2012). Potential role of prokineticin 2 in experimental varicocele-induced rat testes. *Urology*, 80(4), 952 e915-959. doi: 10.1016/j.urology.2012.05.033
- Turowski, P., Martinelli, R., Crawford, R., Wateridge, D., Papageorgiou, A. P., Lampugnani, M. G., . . . Greenwood, J. (2008). Phosphorylation of vascular endothelial cadherin controls lymphocyte emigration. *J Cell Sci*, 121(Pt 1), 29-37. doi: 10.1242/jcs.022681
- Ulker, V., Gurkan, H., Tozki, H., Karaman, V., Ozgur, H., Numanoglu, C., . . . Uyguner, Z. O. (2013). Novel NLRP7 mutations in familial recurrent hydatidiform mole: are NLRP7 mutations a risk for recurrent reproductive wastage? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 170(1), 188-192. doi: 10.1016/j.ejogrb.2013.06.028
- Urayama, K., Dedeoglu, D. B., Guilini, C., Frantz, S., Ertl, G., Messaddeq, N., & Nebigil, C. G. (2009). Transgenic myocardial overexpression of prokineticin receptor-2 (GPR73b) induces hypertrophy and capillary vessel leakage. *Cardiovasc Res*, 81(1), 28-37. doi: 10.1093/cvr/cvn251
- Urayama, K., Guilini, C., Messaddeq, N., Hu, K., Steenman, M., Kurose, H., . . . Nebigil, C. G. (2007). The prokineticin receptor-1 (GPR73) promotes cardiomyocyte survival and angiogenesis. *FASEB J*, 21(11), 2980-2993. doi: 10.1096/fj.07-8116com
- Urayama, K., Guilini, C., Turkeri, G., Takir, S., Kurose, H., Messaddeq, N., . . . Nebigil, C. G. (2008). Prokineticin receptor-1 induces neovascularization and epicardial-derived progenitor cell differentiation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28(5), 841-849. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.162404
- Venkatesh, D., Fredette, N., Rostama, B., Tang, Y., Vary, C. P., Liaw, L., & Urs, S. (2011). RhoA-mediated signaling in Notch-induced senescence-like growth arrest and endothelial barrier dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 31(4), 876-882. doi: 10.1161/ATVBAHA.110.221945
- Vicovac, L., & Aplin, J. D. (1996). Epithelial-mesenchymal transition during trophoblast differentiation. *Acta Anat (Basel)*, 156(3), 202-216.
- Vilgrain, I., Sidibe, A., Polena, H., Cand, F., Mannic, T., Arboleas, M., . . . Berger, F. (2013). Evidence for post-translational processing of vascular endothelial (VE)-cadherin in brain tumors: towards a candidate biomarker. *PLoS One*, 8(12), e80056. doi: 10.1371/journal.pone.0080056
- Vladutiu, A. O., Sulewski, J. M., Pudlak, K. A., & Stull, C. G. (1982). Heterophilic antibodies interfering with radioimmunoassay. A false-positive pregnancy test. *JAMA*, 248(19), 2489-2490.
- Voura, E. B., Sandig, M., & Siu, C. H. (1998). Cell-cell interactions during transendothelial migration of tumor cells. *Microsc Res Tech*, 43(3), 265-275. doi: 10.1002/(SICI)1097-0029(19981101)43:3<265::AID-JEMT9>3.0.CO;2-Z

- Wallez, Y., Cand, F., Cruzalegui, F., Wernstedt, C., Souchelnytskyi, S., Vilgrain, I., & Huber, P. (2007). Src kinase phosphorylates vascular endothelial-cadherin in response to vascular endothelial growth factor: identification of tyrosine 685 as the unique target site. *Oncogene*, 26(7), 1067-1077. doi: 10.1038/sj.onc.1209855
- Wang, S. S., Sherman, M. E., Silverberg, S. G., Carreon, J. D., Lacey, J. V., Jr., Zaino, R., . . . Hildesheim, A. (2006). Pathological characteristics of cervical adenocarcinoma in a multi-center US-based study. *Gynecol Oncol*, 103(2), 541-546. doi: 10.1016/j.ygyno.2006.03.049
- Weis, S., Shintani, S., Weber, A., Kirchmair, R., Wood, M., Cravens, A., . . . Cheresch, D. (2004). Src blockade stabilizes a Flk/cadherin complex, reducing edema and tissue injury following myocardial infarction. *J Clin Invest*, 113(6), 885-894. doi: 10.1172/JCI20702
- Wettschureck, N., & Offermanns, S. (2005). Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev*, 85(4), 1159-1204. doi: 10.1152/physrev.00003.2005
- Williams, D., Hodgetts, V., & Gupta, J. (2010). Recurrent hydatidiform moles. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 150(1), 3-7. doi: 10.1016/j.ejogrb.2010.01.003
- Winderlich, M., Keller, L., Cagna, G., Broermann, A., Kamenyeva, O., Kiefer, F., . . . Vestweber, D. (2009). VE-PTP controls blood vessel development by balancing Tie-2 activity. *J Cell Biol*, 185(4), 657-671. doi: 10.1083/jcb.200811159
- Xu, P., Alfaidy, N., & Challis, J. R. (2002). Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in human placenta and fetal membranes in relation to preterm and term labor. *J Clin Endocrinol Metab*, 87(3), 1353-1361. doi: 10.1210/jcem.87.3.8320
- Yamashita, K., Ishikawa, M., Shimizu, T., & Kuroda, M. (1981). HLA antigens in husband-wife pairs with trophoblastic tumor. *Gynecol Oncol*, 12(1), 68-74.
- Yang, J., & Weinberg, R. A. (2008). Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell*, 14(6), 818-829. doi: 10.1016/j.devcel.2008.05.009
- Yilmaz, M., & Christofori, G. (2009). EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev*, 28(1-2), 15-33. doi: 10.1007/s10555-008-9169-0
- Zavadil, M., Feyereisl, J., Safar, P., Pan, M., & Turyna, R. (2006). [Syndrome of persistent low levels of human chorionic gonadotrophin (hCG)]. *Ceska Gynekol*, 71(2), 136-142.
- Zhang, L., Yang, N., Conejo-Garcia, J. R., Katsaros, D., Mohamed-Hadley, A., Fracchioli, S., . . . Coukos, G. (2003). Expression of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor in ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res*, 9(1), 264-272.

Annexe

Wael Traboulsi, Sophie Brouillet, Frederic Sergent, Houssine Boufettal, Naima Samouh, Touria Aboussaouira, Pascale Hoffmann, Jean Jacques Feige, Mohamed Benharouga and Nadia Alfaidy*

Prokineticins in central and peripheral control of human reproduction

DOI 10.1515/hmbci-2015-0040

Received August 20, 2015; accepted October 2, 2015; previously published online November 17, 2015

Abstract: Prokineticin 1 (PROK1) and (PROK2), are two closely related proteins that were identified as the mammalian homologs of their two amphibian homologs, mamba intestinal toxin (MIT-1) and Bv8. PROKs activate two G-protein linked receptors (prokineticin receptor 1 and 2, PROKR1 and PROKR2). Both PROK1 and PROK2 have been found to regulate a stunning array of biological functions. In particular, PROKs stimulate gastrointestinal motility, thus accounting for their family name “prokineticins”. PROK1 acts as a potent angiogenic mitogen, thus earning its other name, endocrine gland-derived vascular endothelial factor. In contrast, PROK2 signaling pathway

has been shown to be a critical regulator of olfactory bulb morphogenesis and sexual maturation. During the last decade, strong evidences established the key roles of prokineticins in the control of human central and peripheral reproductive processes. PROKs act as main regulators of the physiological functions of the ovary, uterus, placenta, and testis, with marked dysfunctions in various pathological conditions such as recurrent pregnancy loss, and preeclampsia. PROKs have also been associated to the tumor development of some of these organs. In the central system, prokineticins control the migration of GnRH neurons, a key process that controls reproductive functions. Importantly, mutations in PROK2 and PROKR2 are associated to the development of Kallmann syndrome, with direct consequences on the reproductive system. This review describes the finely tuned actions of prokineticins in the control of the central and peripheral reproductive processes. Also, it discusses future research directions for the use of these cytokines as diagnostic markers for several reproductive diseases.

Keywords: EG-VEGF; Kallmann; prokineticin; PROKR1; PROKR2; reproduction.

*Corresponding author: Nadia Alfaidy, Unité INSERM U1036.

Laboratoire BCI-IRTSV, CEA Grenoble 17, rue des Martyrs, 38054 Grenoble cedex 9, France, Phone: +04 38 78 35 01, Fax: +04 38 78 50 58, E-mail: nadia.alfaidy-benharouga@cea.fr; Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 1036, Grenoble, France; University Grenoble-Alpes, 38000, Grenoble, France; and Commissariat à l'Energie Atomique, IRTSV- Biology of Cancer and infection, Grenoble, France

Wael Traboulsi, Frederic Sergent and Jean Jacques Feige: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 1036, Grenoble, France; University Grenoble-Alpes, 38000, Grenoble, France; and Commissariat à l'Energie Atomique, IRTSV-Biology of Cancer and infection, Grenoble, France

Sophie Brouillet and Pascale Hoffmann: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 1036, Grenoble, France; University Grenoble-Alpes, 38000, Grenoble, France; Commissariat à l'Energie Atomique, IRTSV-Biology of Cancer and infection, Grenoble, France; and Department of Obstetrics and Gynaecology, University Hospital of Grenoble, La Tronche, France

Houssine Boufettal, Naima Samouh and Touria Aboussaouira: Faculté de Médecine et de Pharmacie, Unité de Culture Cellulaire, 19 rue Tarek Bnou Ziad, 20360 Casablanca, Morocco; and Service de Gynécologie-Obstétrique, Centre Hospitalier Universitaire Ibn Rochd, 1 rue des Hôpitaux, 20360 Casablanca, Morocco

Mohamed Benharouga: University Grenoble-Alpes, 38000, Grenoble, France; and Commissariat à l'Energie Atomique, Centre National de la Recherche Scientifique, Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, Unité Mixte de Recherche 5249, Grenoble, France

Prokineticins

Prokineticins are a family of peptides that account three members: PROK1 (prokineticin1), PROK2 and PK2L (a longer form of PROK2) [1, 2] (Figure 1). Prokineticins belong to a family of secreted proteins that were initially identified as regulators of the gastrointestinal tract [2]. They have been associated thereafter with multiple biological functions such as angiogenesis [1], neuronal survival [3], circadian rhythm [4, 5] nociception [3], immune response [6, 7], hematopoiesis [6] and spermatogenesis [8].

Discovery of prokineticins

Gastrointestinal smooth muscle motility is regulated by intrinsic and extrinsic neural signals that typically

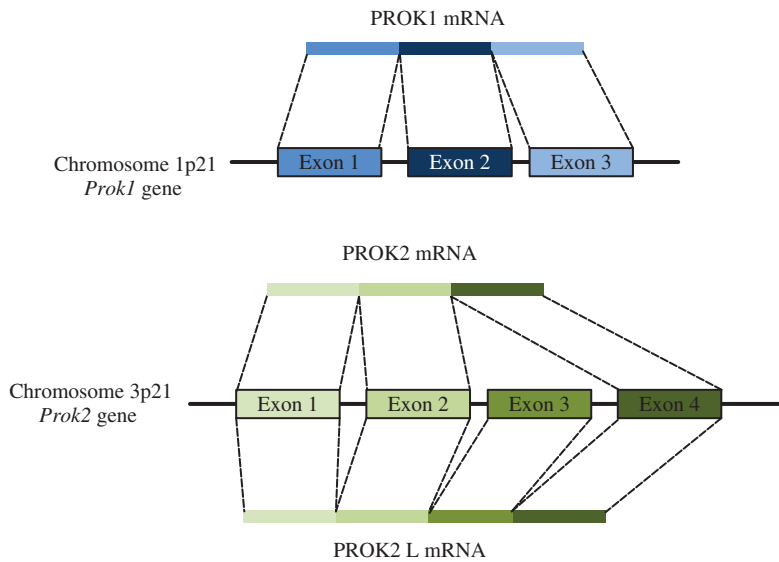


Figure 1: Gene structure and mRNA for *prok1* and *prok2* and *prok2L*.

include neurotransmitters, neuropeptides and hormones. In addition to endogenous agents, new exogenous peptides were identified by Scheweitz et al. [9, 10] and shown to control the gastrointestinal motility. These researchers purified a non-toxic small protein from black mamba venom (*Dendroaspis polyphis*), that they called MIT-1 with a reference to mamba intestinal toxin 1. They demonstrated that this protein could induce the contraction of the ileum in guinea pig [9, 10]. Previous studies conducted by Joubert and Strydom have worked on a similar protein, which they called VPRA for venom protein A [11]. This protein was also called BV8 with reference to *Bombina variegata* and to its molecular weight of 8 kDa [12]. Analysis of protein sequence showed strong similarities between MIT-1 and BV8. This includes a conservation of cysteine and serine residues at position 18 and 22, respectively.

In 2001, Zhou et al. used the DNA sequences encoding MIT-1 and BV8 as probes to look for counterparts in the human genome database. Two orthologues of these peptides were identified [2]. Because of their ability to stimulate the contraction of the gastrointestinal tract in rodents, they were named prokineticins: prokineticin-1 (PROK1) for MIT-1 and prokineticin-2 (PROK2) for BV8 [2].

Prokineticins similarities between different species are particularly important in the N-terminal and central regions. Major differences, were found in the C-terminal region, where a moderate conservation of this area is tolerated to maintain prokineticins activity [13].

PROK1 and PROK2 were shown to be expressed in the gastrointestinal tract and in many other adult and fetal

tissues [2, 14]. Both PROK1 and PROK2 have been found to regulate a stunning array of biological functions throughout the body. In particular, PROK1 acts as a potent angiogenic mitogen on endocrine vascular epithelia, and was recently reported as a key placental factor that controls multiple processes of the establishment of the fetomaternal circulation [15]. In contrast, the PROK2 signaling pathway is associated to the control of the olfactory bulb morphogenesis [16, 17].

PROK1 and PROK2 type of action on the gastrointestinal tract suggested an interaction of the two proteins with membrane receptors. In 2001, Li et al. showed that not only prokineticins act via membrane receptors, but that they belong to the family of G protein coupled receptors [2].

The same year, i.e. 2001, the group of Ferrara described a new angiogenic factor expressed specifically in endocrine tissues (steroids glands, ovaries, testes, adrenal cortex and placenta) and acting on endothelial cells derived from those tissues [18]. This factor was isolated from a human library of secreted proteins that were tested for their ability to induce proliferation of primary cultures of endothelial cells derived from bovine adrenal cortex capillaries [18]. Because of the similarity of its biological activity to the one described for vascular endothelial growth factor (VEGF), the protein was called endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor (EG-VEGF) [19]. Except for the similarities in the biological actions, no structural matches were reported between the two proteins. Sequence analysis of PROK1 and EG-VEGF demonstrated that the two proteins represented the same molecule [8].

Prokineticins genes

In humans, EG-VEGF is transcribed by the gene *prok1* composed of three exons located on chromosome 1p21.1 [2, 19, 20]. To date, no product resulting from alternative splicing has been reported. Conversely, the gene encoding the PROK2 located on chromosome 3p13.3 has four exons and produces by alternative splicing two proteins. The most active form, PROK2, lacks exon 3 and consists of 81 amino acids, while the variant PROK2L comprises all exons and accounts 102 amino acids (Figure 1). Human *prok2* promoter and its murine orthologue are highly conserved in these species suggesting similar transcriptional regulations. However, the divergence in *prok1* gene promoters between the two species suggests specificities in their transcriptional regulations [8, 13, 18].

Prokineticins proteins

The mature PROK1 protein is composed of 86 amino acids and has a relative molecular weight of 8.6 kDa. Its complementary DNA (cDNA) encodes a protein of 105 amino acids including a signal peptide of 19 amino acids. PROK2, is composed of 81 amino acids while the second form, PROK2L contains 102 amino acids. The Human EG-VEGF/PROK1 and BV8/PROK2 share 44% identity [8] and all have 10 cysteines forming five disulfide bridges. Although these proteins show strong structural homologies, their functions remain distinct [20, 21]. Interestingly, in all species, the N-terminal region has a hexa-peptide sequence that is conserved between all family members. The sequence is

AVITGA (Figure 2). Consequently, the family that accounts all members is called “AVIT Family” [20]. The AVITGA sequence is essential for the biological activities and to the binding to PROKR1 and PROKR2 receptors. Substitutions, deletions or insertions within the N-terminal hexapeptide lead to the loss of agonist activity. It was also reported that mutations of this sequence inhibit prokineticins receptor activity [13, 22]. The mutants behave as antagonists of the receptors [13, 22]. To date, no structure of the PROK1 or PROK2 has been proposed. Prokineticins are very basic proteins with a pI (Isoelectric Point) of 8.65 for PROK1; 8.85 for PROK2 and 10.68 for PROK2L. PROK1 binds with high affinity to heparin, suggesting that prokineticins availability could be regulated by their sequestration into the extracellular compartment in vivo [19].

Prokineticins receptors

Three independent research teams identified, simultaneously two G protein coupled receptors (GPCRs) as prokineticin receptors in mammals [23–25]. First, the receptors were named GPR73A and B, then prokineticin 1 receptor (PROKR1) and prokineticin 2 (PROKR2), respectively. Strong identities (80%) with an orphan receptor described in mice, the GPr73 was also reported [23–25]. PROKR1 and PROKR2 share 85% homology in their amino acid sequence but differ in their extracellular N-terminal parts [23–25]. Strong similarities were however found in their transmembrane domains, suggesting similarities in their mechanism of activation [25]. PROKR1 is composed of 393 amino acids, whereas PROKR2 is composed of 384 amino

H1	AVITGACERDVQCGAGTCCAISLWLRGLRMCTPL	GREGEETCHPGSHKVPFFR-KRKHHTCPCLPNLLC	SRFPDGRYRCMSDLKNINF	86
R1	AVITGACERDVQCGAGTCCAISLWLRGLRLCTPL	GREGEETCHPGSHKIPFFR-KRQHHTCPCSPSLC	SRFPDGRYRCSDLNKNVF	86
M1	AVITGACERDVQCGAGTCCAISLWLRGLRLCTPL	GREGEETCHPGSHKIPFLR-KRQHHTCPCSPSLC	SRFPDGRYRCFRDLKNANF	86
Mam	AVITGACERDLQCGKGTCCAVSLWIKSVRVCTPV	GTSGEDCHPASHKIPFSGQRKMHHTCPCAPNLAC	VQTSPKKFKCLSK	80
Bom	AVITGACDKDVQCGSGTCCAASAWSRNIRFCIPL	GNSGEDCHPASHKVPYDG-KLRSSLCPCKSGLTC	SKSGE-KFKCS	77
F1	AVITGACERDVQCGGLGLCAVSLWLRGLRMCAPR	GLEGDECHPFSHKVPYPG-KRQHHTCPCLPHLVC	TRDRDSKYRCDDDFKNVDLYEVGQTLR	94
H2	AVITGACDKDSQCGGGMCCAVSIWVKSIRICTPM	GKLGDSCHPLTRKVPFFG-RRMHHTCPCLPGLAC	LRTSFNRFICLAQK	81
M2	AVITGACDKDSQCGGGMCCAVSIWVKSIRICTPM	GQVGDSCHPLTRKVPFWG-RRMHHTCPCLPGLAC	LRTSFNRFICLARK	81
R2	AVITGACDKDSQCGGGMCCAVSIWVKSIRICTPM	GQVGDSCHPLTRKVPFWG-RRMHHTCPCLPGLAC	LRTSFNRFICLARK	81
B2	AVITGACDRDPQCGGGMCCAVSLWVKSIRICTPM	GKVGDSCHPMTRKVPFLG-RRMHHTCPCLPGLAC	SRTSFNRYTCLAQK	81
F2	AVITGACEKDSQCGGGMCCAVSLWIRSLRMCTPM	GREGDDCHPMSHTVPFFG-KRLHHTCPCLPNLLC	IPMDEGRAKCLSTYKYPDYLL	88

Figure 2: Amino-acid sequences of mature AVIT proteins from different species. All mammalian and fish sequences are deduced from cloned complementary DNAs. Numbers refer to type 1 and type 2 proteins. B, Bull; Bom, bombina; F, fugu; H, human; M, mouse; Mam, black mamba; R, rat (Kaser et al. [20]).

acids [25]. In human, the genes *prokr2* and *prokr1* comprise two exons and are located on two different chromosomes, the chromosome 2q14 and 20p13, respectively. This indicates that these two GPCRs are encoded in the human genome by independent genes [20, 23]. Both prokineticins can act as effective ligands for PROKR1 and PROKR2. Interestingly, striking differential and anatomical expression patterns of these receptors were reported. PROKR2 is abundantly expressed in the brain (olfactory bulb, subventricular zone, preoptic area, the paraventricular nucleus, the arcuate nucleus, and the median eminence) and testes; while PROKR1 is mainly expressed in peripheral tissues such, spleen, prostate, pancreas, heart and blood cells. In the female reproductive system, such as ovaries and placenta, both receptors have been reported to be expressed and to play major roles in the success of the pregnancy [26].

Prokineticins signaling pathways

Prokineticin receptors have been reported to mediate multiple biological actions through the recruitment of different G proteins such as, Gi, Gq and Gs proteins, suggesting the activation of various intracellular signaling cascades (Figure 3). In different systems, PROKs have been shown to induce the signaling pathway of protein kinase C (PKC), mitogen activated protein kinase (MAPK), phosphoinositide 3-kinase (PI3K), serine/threonine kinase (AKT) [23, 25, 27].

Prokineticins expression

Prokineticins and their receptors are expressed in many tissues such as ovary, testis, adrenal gland, placenta, uterus, brain, digestive tract and bone marrow [8, 20, 26, 28, 29]. Prokineticins and their receptors are expressed, either by the same type of cells or by different cell types within the same tissue [8, 20, 26, 28, 29]. In multiple organs prokineticins expression has been shown to be dynamic throughout physiological processes such as, circadian rhythm [30], menstrual cycle [31] and pregnancy [26]. In these systems prokineticins have been shown to be regulated by local effectors and/or endocrine hormones. In the ovaries PROK1 is regulated by human chorionic gonadotropin (hCG), estrogen and FSH [3, 8, 32]. In the placenta PROK1 has been shown to be regulated by hCG, PPAR γ and by hypoxia [15, 33, 34]. In the nervous system, PROK2 is highly expressed with a profile of expression following the circadian rhythm suggesting local regulations of this protein [30, 35]. Nevertheless the type of this regulation is still to be investigated.

PROK/PROKR in the central and peripheral reproductive systems

PROK2/PROKR2 and GnRH neurons migration

A prime role for the PROK2/PROKR2 signalling pathway in the neuroendocrine control of the mammalian reproductive system was incidentally discovered when complete murine knockouts of *prok2* and *prokr2* mirrored the human phenotype of Kallmann Syndrome (KS) [17], a pathology characterized by an absence of pubertal development and an infertility that is associated with a deficit of smell (anosmia or hyposmia). This pathology is often accompanied, with an agenesis of the olfactory bulb due to a failure in the migration of gonadotropin releasing hormone (GnRH) neurons [17, 36] (Figure 4).

Because PROK2/PROKR2 signaling pathway plays an essential role in the embryonic development of the olfactory system [37], it was assumed that both neural and neuroendocrine developmental abnormalities could occur in patients carrying mutations in PROK2/PROKR2 genes. Interestingly, in *prok2* and *prokr2* knockout mice, there was a failure in GnRH secretion that lead to an impairment of sexual development and fertility in both male and female mice [16, 36]. Male *prok2* and *prokr2* knockout mice showed small seminiferous tubules that lack lumens and an absence of haploid spermatocytes and spermatids [36]. Similarly, female *prok2* and *prokr2* knockout mice exhibited disrupted estrus cycles as a consequence of incomplete follicular development [36]. Interestingly, while all *prok2* knockout mice have a dramatic decrease in the olfactory bulb size [16], only half exhibit an asymmetric olfactory bulb development [36], suggesting a potential redundancy between the two ligands, *prok1* and *prok2* in the neurogenesis of the olfactory bulb. In addition to the hypothalamic defect in patients harboring *prok2* mutations, in some patients, persistent oligo/azoospermia has been reported despite gonadotropin treatment. This suggests the possibility of a dual defect, due to a hypothalamic GnRH deficiency and to a primary gonadal defect.

Prokineticins in men reproduction system

The genes encoding for prokineticins are highly expressed in mammalian testis [18, 38]. PROK1 protein is mainly present in the Leydig cells [18, 38], while PROK2 is present within seminiferous tubules in primary spermatocytes [18]. The synthesis of PROK1 protein by Leydig

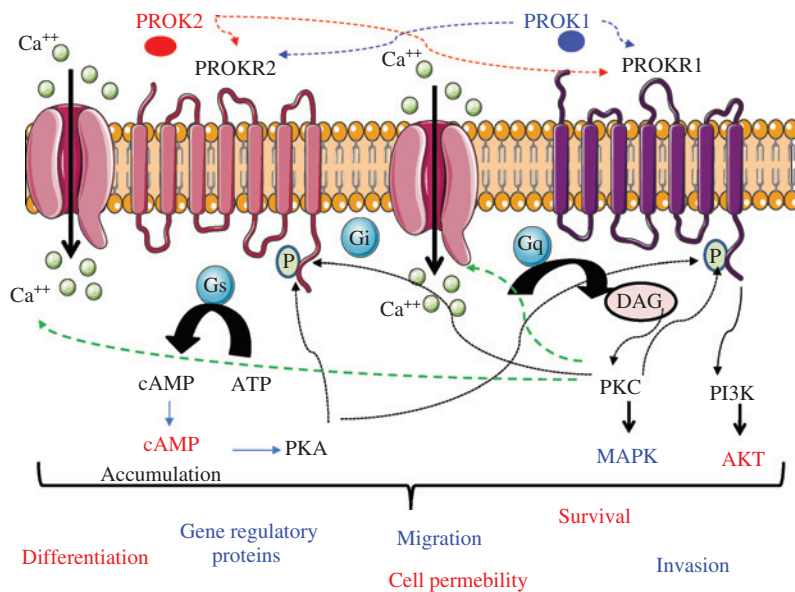


Figure 3: PROKR1 or 2 activation induces different intracellular signaling pathways involved in multiple biological activities.

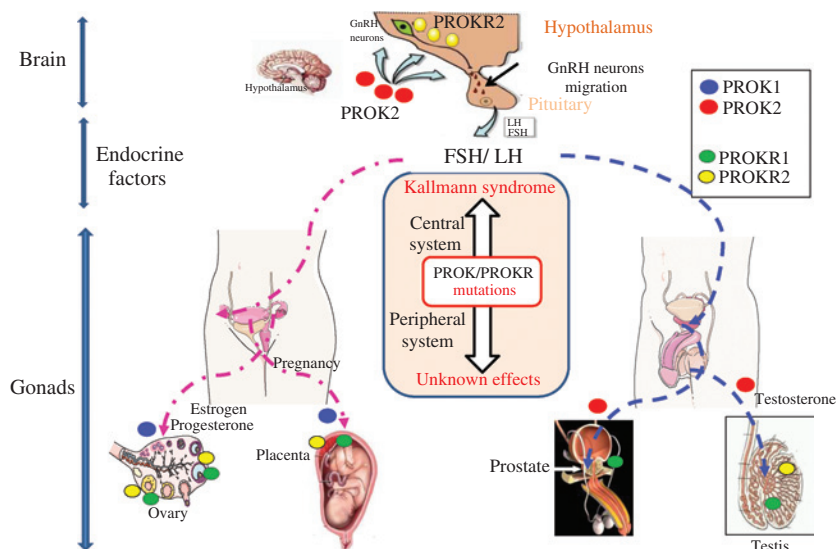


Figure 4: Summary of PROK1, PROK2 and their receptors expression in the central and peripheral systems. PROK1 is mainly associated to the peripheral reproductive system, while PROK2 is associated to the central one. Both receptors mediate the key aspects of prokineticins in the central and peripheral systems. Multiple mutations in the PROK/PROKR system are known to cause Kallmann syndrome. However, little is known about their potential and direct effects in the reproductive peripheral system.

cells has also been associated with a role in testes angiogenesis [39], through an induction of the proliferation, survival and migration of endothelial cells [18]. PROK1 involvement in tumor testis angiogenesis has also been reported [39]. The presence of PROK2 in primary spermatocytes, along with its known angiogenic role in the testis, suggests that prokineticins might play an important role in the spermatogenesis process. Recent data

reported an increase in PROK2 mRNA in testicular varicocele and suggested a potential role of prokineticins in the prediction of the risk of infertility associated with this pathology [40, 41]. In the prostate, PROK1 is predominantly synthesized by the glandular epithelium. In this organ PROK1 has been associated to tumor development, with a tight correlation to the degree of malignancy [40] (Figure 4).

Prokineticins in women reproduction system

Prokineticins and ovaries

PROK2 is undetectable in the female reproductive organs [26, 29, 32, 15]. Contrarily, PROK1 appears to be the major prokineticin member associated to the female reproductive development and functioning. PROK1 transcripts are abundant in the ovarian stroma, especially in hilar region cells that produce steroids [29]. The expression of PROK1 fluctuates according to the ovarian cycle, with an important expression in the granulosa of primordial primary and secondary cells, followed by a decline in the tertiary follicle [32]. Upon ovulation, PROK1 mRNAs increases in the corpus luteum. [32]. PROK1 is abundant in luteal theca cells from 8 days after ovulation and until the end of the luteal phase. PROK1 has also been reported to be increased in atretic follicles [29, 32]. In vitro studies showed that PROK1 increased in response to hCG treatment, but not in response to progesterone, suggesting a role of PROK1 in the corpus luteum formation [32]. The secretion of PROK1 is also detected in the follicular fluid [42]. PROK1 receptors are highly expressed in luteal endothelial cells and induce their proliferation [43]. In addition, injection of PROK1 in the rat ovary induced an intense angiogenic effect [19]. Importantly, abnormal expression of *PROK1* gene is associated with several ovarian diseases, such as polycystic ovarian syndrome [32], as well as the hyperstimulation ovarian syndrome [19, 32, 42].

Prokineticins and pregnancy

In the placenta PROK1 is the unique prokineticin expressed and reported to play a key role in the success of pregnancy (Figure 4). Its circulating levels are significantly increased during pregnancy [26]. The levels in non-pregnant women are about 50 pg/mL. These levels increased five times during the first trimester of pregnancy to reach an average of 250 pg/mL, and decline thereafter to reach 70 pg /mL during the second and third trimesters [15]. These finding strongly suggested that the placenta is a major source of PROK1 [15]. During early pregnancy, increasing number of studies have identified the PROK1/PROKR system as a key actor in the success of embryo implantation [43–45]. An effect of PROK1 on the expression of genes that control pro-implantation processes has been reported in the endometrium [46]. Also, prokineticins have been associated to early pregnancy pathologies such as ectopic pregnancies [47] as well as repeated miscarriages [48–50]. Recently, mutations in *PROK1*, *PROKR1* and *PROKR2* genes have

been reported to be associated with repeated miscarriages [51]; while other variants seemed, in the contrary, to exhibit protective roles in the early stages of pregnancy [50].

Recent finding from our group have also reported strong expression and secretion of PROK1 from the fetal membranes and especially from the trophoblast cells forming the chorion layer [52]. In this organ, PROK1 seems to play a major role in the control of human parturition, both at term and preterm [52]. Prokineticins are also present in the human endometrium, and their expression increases during the implantation window [31]. Interestingly, PROK1 transcripts are no longer detectable in the endometrium after menopause, which comply with the regulation of the expression of this gene by sexual hormones [32].

During pregnancy, the PROK/PROKR system has been established as an important actor of placental development [26]. PROK1 is synthesized by the syncytiotrophoblastic layer and acts on the regulation of key processes of placental development. The peak of PROK1/PROKR1 expression occurs during the first trimester of pregnancy [15] and is consistent with a regulation of their expression by hypoxia, a key parameter of placental development. During the first trimester of pregnancy, PROK1 controls extravillous trophoblastic cell migration, invasion and formation of pseudo-vascular networks, suggesting a local control of the process of spiral arteries remodeling and establishment of the fetomaternal circulation by these proteins [53]. PROK1 effects on extravillous trophoblast cells involve the activation of PROKR2 [53]. PROK1 also acts on fetal endothelial cells within the stroma and increases their proliferation, migration, invasion, and branching [54]. PROK1 control of angiogenic processes seems to be complementary to the actions of the well-studied angiogenic factor, the VEGF. Both factors are expressed in the placenta, by distinct cell types [26, 15, 54]. PROK1 effects on the growth of fetal endothelial cells involve PROKR1, whereas PROKR2 activation induces transcellular permeability [54]. PROK1 actions on the placental endothelial system is consistent with the angiogenic effects described for this protein in other systems [29, 38, 55].

In relation to pregnancy pathologies, PROK1/PROKR system has been reported to be deregulated in preeclampsia and IUGR (intrauterine growth restriction). PROK1 is increased in preeclampsia [53], a serious disease that affects 5–8% of all pregnancies and characterized by high blood pressure and proteinuria appearing in the second half of the pregnancy [56]. This disease can lead the death of the mother and/or the unborn child [57]. PROK1 expression and circulating levels are also enhanced in IUGR [58], a complication that concerns 10% of all pregnancies.

Nevertheless, further studies are needed to determine whether the increase in PROK1 levels is a cause or consequence of these diseases. Recent studies have also associated PROK1 to preterm and term deliveries [59]. The increase in PROK1 transcripts in the myometrium during labor, and the presence of prokineticins and their receptors in the intrauterine tissues ultimately suggest a global action of these proteins in the labor process [52, 59]. In the myometrium, prokineticins induce pro-inflammatory cascades and increase contractility of smooth muscle myometrium cells, two processes involved in the onset of preterm and term labor [59]. In the utero-placental unit, PROK1 and its receptors have been shown to confer intra-uterine quiescence during the last trimester of pregnancy [52]. To date, however no studies have addressed the impact of described mutations of PROK1 and its receptors on the pregnancy outcome. PROK1 knockout mice have not yet been developed to better characterize the role of this new placental factor in the human pregnancy.

Conclusions and perspectives

It is now well established that prokineticins constitute a new family of proteins that plays a key role in the control of both central and peripheral processes of reproduction. These actions occur at the central level through a local control of the major hormone of reproduction, the GnRH; as well as at the level of the peripheral reproductive organs such as ovaries, testis and the placenta. Nevertheless, it is not known whether peripheral reproductive abnormalities are the consequence of the effect of prokineticin's mutations occurring in the central system and/or are the consequence of direct effects of these mutations on the peripheral system. So far, no studies have addressed these aspects and we still do not know whether kallmann couples caring prokineticins mutations exhibit normal pregnancies.

Because of the difficulty to distinguish the effects of the human prokineticin mutations on the central and peripheral reproductive activities, it is mandatory to develop animal models reproducing local mutations in the ovaries, testis and/or placenta. This will allow better characterization of the local role of the prokineticin family in the peripheral reproductive system. Furthermore, it will be interesting to characterize, at the reproductive levels both single and double knockouts of PROK1 and PROK2 proteins.

Acknowledgments: Funding support was provided from Groupement des Entreprises Françaises pour la

Lutte contre le Cancer Comité Isère to Dr. N. Alfaidy and from Cooperation between INSERM (France) and CNRT (Morocco). First author, W. Traboulsi was funded by la Ligue Nationale contre le Cancer for his PhD thesis.

Disclosure: The authors have nothing to disclose.

References

1. LeCouter J, Ferrara N. EG-VEGF and the concept of tissue-specific angiogenic growth factors. *Semin Cell Dev Biol* 2002;13:3–8.
2. Li M, Bullock CM, Knauer DJ, Ehler FJ, Zhou QY. Identification of two prokineticin cDNAs: recombinant proteins potently contract gastrointestinal smooth muscle. *Mol Pharmacol* 2001;59:692–8.
3. Ngan ES, Shum CK, Poon HC, Sham MH, Garcia-Barcelo MM, Lui VC, Tam PK. Prokineticin-1 (Prok-1) works coordinately with glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) to mediate proliferation and differentiation of enteric neural crest cells. *Biochim Biophys Acta* 2008;1783:467–78.
4. Cheng MY, Lee AG, Culbertson C, Sun G, Talati RK, Manley NC, Li X, Zhao H, Lyons DM, Zhou QY, Steinberg GK, Sapolsky RM. Prokineticin 2 is an endangering mediator of cerebral ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;109:5475–80.
5. Hu WP, Zhang C, Li JD, Luo ZD, Amadesi S, Bunnett N, Zhou QY. Impaired pain sensation in mice lacking prokineticin 2. *Mol Pain* 2006;2:35.
6. LeCouter J, Zlot C, Tejada M, Peale F, Ferrara N. Bv8 and endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor stimulate hematopoiesis and hematopoietic cell mobilization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:16813–8.
7. Urayama K, Guilini C, Messaddeq N, Hu K, Steenman M, Kurose H, Ert G, Nebigil CG. The prokineticin receptor-1 (GPR73) promotes cardiomyocyte survival and angiogenesis. *FASEB J* 2007;21:2980–93.
8. Maldonado-Perez D, Evans J, Denison F, Millar RP, Jabbour HN. Potential roles of the prokineticins in reproduction. *Trends Endocrinol Metab* 2007;18:66–72.
9. Schweitz H, Bidard JN, Lazdunski M. Purification and pharmacological characterization of peptide toxins from the black mamba (*Dendroaspis polylepis*) venom. *Toxicon* 1990;28:847–56.
10. Schweitz H, Pacaud P, Diochot S, Moinier D, Lazdunski M. MIT(1), a black mamba toxin with a new and highly potent activity on intestinal contraction. *FEBS Lett* 1999;461:183–8.
11. Joubert FJ, Strydom DJ. Snake venom. The amino acid sequence of protein A from *Dendroaspis polylepis polylepis* (black mamba) venom. *Hoppe Seyler's Z Physiol Chem* 1980;361:1787–94.
12. Mollay C, Wechselberger C, Mignogna G, Negri L, Melchiorri P, Barra D, Kreil G. Bv8, a small protein from frog skin and its homologue from snake venom induce hyperalgesia in rats. *Eur J Pharmacol* 1999;374:189–96.
13. Bullock CM, Li JD, Zhou QY. Structural determinants required for the bioactivities of prokineticins and identification of prokineticin receptor antagonists. *Mol Pharmacol* 2004;65:582–8.
14. Eddie SL, Childs AJ, Kinnell HL, Brown P, Jabbour HN, Anderson RA. Prokineticin ligands and receptors are expressed in the human fetal ovary and regulate germ cell expression of COX2. *J Clin Endocrinol Metab* 2015;100:E1197–205.

15. Hoffmann P, Feige JJ, Alfaidy N. Expression and oxygen regulation of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor/prokineticin-1 and its receptors in human placenta during early pregnancy. *Endocrinology* 2006;147:1675–84.
16. Masumoto KH, Nagano M, Takashima N, Hayasaka N, Hiyama H, Matsumoto S, Inouye ST, Shigeyoshi Y. Distinct localization of prokineticin 2 and prokineticin receptor 2 mRNAs in the rat suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci* 2006;23:2959–70.
17. Matsumoto S, Yamazaki C, Masumoto KH, Nagano M, Naito M, Soga T, Hiyama H, Matsumoto M, Takasaki J, Kamohara M, Matsuo A, Ishii H, Kobori M, Katoh M, Matsushime H, Furuichi K, Shigeyoshi Y. Abnormal development of the olfactory bulb and reproductive system in mice lacking prokineticin receptor PKR2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:4140–5.
18. LeCouter J, Ferrara N. EG-VEGF and Bv8. a novel family of tissue-selective mediators of angiogenesis, endothelial phenotype, and function. *Trends Cardiovasc Med* 2003;13:276–82.
19. LeCouter J, Kowalski J, Foster J, Hass P, Zhang Z, Dillard-Telm L, Frantz G, Rangell L, DeGuzman L, Keller GA, Peale F, Gurney A, Hillan KJ, Ferrara N. Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium. *Nature* 2001;412:877–84.
20. Kaser A, Winklmayr M, Lepperdinger G, Kreil G. The AVIT protein family. Secreted cysteine-rich vertebrate proteins with diverse functions. *EMBO Rep* 2003;4:469–73.
21. Boissbouvier J, Albrand JP, Blackledge M, Jaquinod M, Schweitz H, Lazdunski M, Marion D. A structural homologue of colipase in black mamba venom revealed by NMR floating disulphide bridge analysis. *J Mol Biol* 1998;283:205–19.
22. Negri L, Lattanzi R, Giannini E, Colucci MA, Mignogna G, Barra D, Grohovaz F, Codazzi F, Kaiser A, Kreil G, Melchiorri P. Biological activities of Bv8 analogues. *Br J Pharmacol* 2005;146:625–32.
23. Lin DC, Bullock CM, Ehler FJ, Chen JL, Tian H, Zhou QY. Identification and molecular characterization of two closely related G protein-coupled receptors activated by prokineticins/endocrine gland vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 2002;277:19276–80.
24. Masuda Y, Takatsu Y, Terao Y, Kumano S, Ishibashi Y, Suenaga M, Abe M, Fukusumi S, Watanabe T, Shintani Y, Yamada T, Hinuma S, Inatomi N, Ohtaki T, Onda H, Fujino M. Isolation and identification of EG-VEGF/prokineticins as cognate ligands for two orphan G-protein-coupled receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;293:396–402.
25. Soga T, Matsumoto S, Oda T, Saito T, Hiyama H, Takasaki J, Kamohara M, Ohishi T, Matsushime H, Furuichi K. Molecular cloning and characterization of prokineticin receptors. *Biochim Biophys Acta* 2002;1579:173–9.
26. Brouillet S, Hoffmann P, Feige JJ, Alfaidy N. EG-VEGF: a key endocrine factor in placental development. *Trends Endocrinol Metab* 2012;23:501–8.
27. Chen J, Kuei C, Sutton S, Wilson S, Yu J, Kamme F, Mazur C, Lovenberg T, Liu C. Identification and pharmacological characterization of prokineticin 2 beta as a selective ligand for prokineticin receptor 1. *Mol Pharmacol* 2005;67:2070–6.
28. Boulberdaa M, Urayama K, Nebigil CG. Prokineticin receptor 1 (PKR1) signalling in cardiovascular and kidney functions. *Cardiovasc Res* 2011;92:191–8.
29. Ferrara N, LeCouter J, Lin R, Peale F. EG-VEGF and Bv8: a novel family of tissue-restricted angiogenic factors. *Biochim Biophys Acta* 2004;1654:69–78.
30. Cheng MY, Bullock CM, Li C, Lee AG, Bermak JC, Belluzzi J, Weaver DR, Leslie FM, Zhou QY. Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus. *Nature* 2002;417:405–10.
31. Battersby S, Critchley HO, Morgan K, Millar RP, Jabbour HN. Expression and regulation of the prokineticins (endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor and Bv8) and their receptors in the human endometrium across the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2463–9.
32. Fraser HM, Bell J, Wilson H, Taylor PD, Morgan K, Anderson RA, Duncan WC. Localization and quantification of cyclic changes in the expression of endocrine gland vascular endothelial growth factor in the human corpus luteum. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:427–34.
33. Garnier V, Traboulsi W, Salomon A, Brouillet S, Fournier T, Winkler C, Desvergne B, Hoffmann P, Zhou QY, Congiu C, Onnis V, Benharouga M, Feige JJ, Alfaidy N. PPARgamma controls pregnancy outcome through activation of EG-VEGF: new insights into the mechanism of placental development. *Am J Physiol Endoc Metab* 2015;309:E357–69.
34. Brouillet S, Hoffmann P, Chauvet S, Salomon A, Chamboredon S, Sergeant F, Benharouga M, Feige JJ, Alfaidy N. Revisiting the role of hCG: new regulation of the angiogenic factor EG-VEGF and its receptors. *Cell Mole Life Sci* 2012;69:1537–50.
35. Li JD, Hu WP, Zhou QY. The circadian output signals from the suprachiasmatic nuclei. *Prog Brain Res* 2012;199:119–27.
36. Pitteloud N, Zhang C, Pignatelli D, Li JD, Raivio T, Cole LW, Plummer L, Jacobson-Dickman EE, Mellon PL, Zhou QY, Crowley WF, Jr. Loss-of-function mutation in the prokineticin 2 gene causes Kallmann syndrome and normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:17447–52.
37. Guimiot F, Teixeira L, Dode C, Delezoide AL, Hardelin JP. [Kallmann syndrome – a fetopathological sequence]. *Medecine sciences: M/S* 2011;27:135–7.
38. Monnier J, Samson M. Prokineticins in angiogenesis and cancer. *Cancer Lett* 2010;296:144–9.
39. Samson M, Peale FV, Jr., Frantz G, Rioux-Leclercq N, Rajpert-De Meyts E, Ferrara N. Human endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor: expression early in development and in Leydig cell tumors suggests roles in normal and pathological testis angiogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:4078–88.
40. Pasquali D, Rossi V, Staibano S, De Rosa G, Chieffi P, Prezioso D, Mirone V, Mascolo M, Tramontano D, Bellastella A, Sinisi AA. The endocrine-gland-derived vascular endothelial growth factor (EG-VEGF)/prokineticin 1 and 2 and receptor expression in human prostate: Up-regulation of EG-VEGF/prokineticin 1 with malignancy. *Endocrinology* 2006;147:4245–51.
41. Tu LH, Yu LL, Xiong CL, Zhang HP. Potential role of prokineticin 2 in experimental varicocele-induced rat testes. *Urology* 2012;80:952.e15–9.
42. Gao MZ, Zhao XM, Sun ZG, Hong Y, Zhao LW, Zhang HQ. Endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor concentrations in follicular fluid and serum may predict ovarian hyperstimulation syndrome in women undergoing controlled ovarian hyperstimulation. *Fertil Steril* 2011;95:673–8.
43. Macdonald LJ, Sales KJ, Grant V, Brown P, Jabbour HN, Catalano RD. Prokineticin 1 induces Dickkopf 1 expression and regulates cell proliferation and decidualization in the human endometrium. *Mol Hum Reprod* 2011;17:626–36.

44. Evans J, Catalano RD, Brown P, Sherwin R, Critchley HO, Fazleabas AT, Jabbour HN. Prokineticin 1 mediates fetal-maternal dialogue regulating endometrial leukemia inhibitory factor. *FASEB J* 2009;23:2165–75.
45. Evans J, Catalano RD, Morgan K, Critchley HO, Millar RP, Jabbour HN. Prokineticin 1 signaling and gene regulation in early human pregnancy. *Endocrinology* 2008;149:2877–87.
46. Haouzi D, Mahmoud K, Fourar M, Bendhaou K, Dechaud H, De Vos J, Reme T, Dewailly D, Hamamah S. Identification of new biomarkers of human endometrial receptivity in the natural cycle. *Hum Reprod* 2009;24:198–205.
47. Shaw JL, Denison FC, Evans J, Durno K, Williams AR, Entrican G, Critchley HO, Jabbour HN, Horne AW. Evidence of prokineticin dysregulation in fallopian tube from women with ectopic pregnancy. *Fertil Steril* 2010;94:1601–8.e1.
48. Salter M, Teklenburg G, Molokhia M, Lavery S, Trew G, Aojanpong T, Mardon HJ, Lokugamage AU, Rai R, Landles C, Roelen BA, Quenby S, Kuijk EW, Kavelaars A, Heijnen CJ, Regan L, Macklon NS, Brosens JJ. Natural selection of human embryos: impaired decidualization of endometrium disables embryo-maternal interactions and causes recurrent pregnancy loss. *PloS one* 2010;5:e10287.
49. Su MT, Lin SH, Chen YC, Kuo PL. Gene-gene interactions and risk of recurrent miscarriages in carriers of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor and prokineticin receptor polymorphisms. *Fertil Steril* 2014;102:1071–7.e3.
50. Su MT, Lin SH, Chen YC, Wu LW, Kuo PL. Prokineticin receptor variants (PKR1-I379V and PKR2-V331M) are protective genotypes in human early pregnancy. *Reproduction* 2013;146:63–73.
51. Su MT, Lin SH, Lee IW, Chen YC, Hsu CC, Pan HA, Kuo PL. Polymorphisms of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor gene and its receptor genes are associated with recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod* 2010;25:2923–30.
52. Dunand C, Hoffmann P, Sapin V, Blanchon L, Salomon A, Sergeant F, Benharouga M, Sabra S, Guibourdenche J, Lye SJ, Feige JJ, Alfaidy N. Endocrine gland-derived endothelial growth factor (EG-VEGF) is a potential novel regulator of human parturition. *Biol Reprod* 2014;91:73.
53. Hoffmann P, Saoudi Y, Benharouga M, Graham CH, Schaal JP, Mazouni C, Feige JJ, Alfaidy N. Role of EG-VEGF in human placental: Physiological and pathological implications. *J Cell Mol Med* 2009;13:2224–35.
54. Brouillet S, Hoffmann P, Benharouga M, Salomon A, Schaal JP, Feige JJ, Alfaidy N. Molecular characterization of EG-VEGF-mediated angiogenesis: differential effects on microvascular and macrovascular endothelial cells. *Mol Biol Cell* 2010;21:2832–43.
55. Guilini C, Urayama K, Turkeri G, Dedeoglu DB, Kurose H, Messaddeq N, Nebigil CG. Divergent roles of prokineticin receptors in the endothelial cells: angiogenesis and fenestration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010;298:H844–52.
56. Rigoud V, S TC, Vaiman D. [Preeclampsia]. *Med Sci* 2008;24:1017–9.
57. Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. *Lancet* 2005;365:785–99.
58. Brouillet S, Murthi P, Hoffmann P, Salomon A, Sergeant F, De Mazancourt P, Dakouane-Giudicelli M, Dieudonne MN, Rozenberg P, Vaiman D, Barbaux S, Benharouga M, Feige JJ, Alfaidy N. EG-VEGF controls placental growth and survival in normal and pathological pregnancies: case of fetal growth restriction (FGR). *Cell Mol Life Sci* 2013;70:511–25.
59. Catalano RD, Lannagan TR, Gorowiec M, Denison FC, Norman JE, Jabbour HN. Prokineticins: novel mediators of inflammatory and contractile pathways at parturition? *Mol Hum Reprod* 2010;16:311–9.

PPAR γ controls pregnancy outcome through activation of EG-VEGF: new insights into the mechanism of placental development

Vanessa Garnier,^{1,2,3} Wael Traboulsi,^{1,2,3} Aude Salomon,^{1,2,3} Sophie Brouillet,^{1,2,3,9} Thierry Fournier,^{4,5,6} Carine Winkler,⁷ Beatrice Desvergne,⁷ Pascale Hoffmann,^{1,2,3,10} Qun-Yong Zhou,⁸ Cenzo Congiu,⁹ Valentina Onnis,⁹ Mohamed Benharouga,¹¹ Jean-Jacques Feige,^{1,2,3} and Nadia Alfaidy^{1,2,3}

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 1036, Grenoble, France; ²Université Grenoble-Alpes, Grenoble, France; ³IRTSV-Biology of Cancer and Infection, Commissariat à l'Energie Atomique, Grenoble, France; ⁴Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, UMR-S 1139, Paris, France; ⁵Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France; ⁶PremUP Foundation, Paris, France; ⁷Center for Integrative Genomics, University of Lausanne, Lausanne, Switzerland; ⁸Department of Pharmacology, University of California-Irvine, Irvine, California; ⁹Department of Life and Environmental Sciences, University of Cagliari, Cagliari, Italy; ¹⁰Department of Obstetrics and Gynaecology, University Hospital of Grenoble, La Tronche, France; and ¹¹Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 5249, Grenoble, France

Submitted 25 February 2015; accepted in final form 4 June 2015

Garnier V, Traboulsi W, Salomon A, Brouillet S, Fournier T, Winkler C, Desvergne B, Hoffmann P, Zhou QY, Congiu C, Onnis V, Benharouga M, Feige JJ, Alfaidy N. PPAR γ controls pregnancy outcome through activation of EG-VEGF: new insights into the mechanism of placental development. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 309: E357–E369, 2015. First published June 16, 2015; doi:10.1152/ajpendo.00093.2015.—PPAR γ -deficient mice die at E9.5 due to placental abnormalities. The mechanism by which this occurs is unknown. We demonstrated that the new endocrine factor EG-VEGF controls the same processes as those described for PPAR γ , suggesting potential regulation of EG-VEGF by PPAR γ . EG-VEGF exerts its functions via prokineticin receptor 1 (PROKR1) and 2 (PROKR2). This study sought to investigate whether EG-VEGF mediates part of PPAR γ effects on placental development. Three approaches were used: 1) *in vitro*, using human primary isolated cytotrophoblasts and the extravillous trophoblast cell line (HTR-8/SVneo); 2) *ex vivo*, using human placental explants ($n = 46$ placentas); and 3) *in vivo*, using gravid wild-type PPAR $\gamma^{+/-}$ and PPAR $\gamma^{-/-}$ mice. Major processes of placental development that are known to be controlled by PPAR γ , such as trophoblast proliferation, migration, and invasion, were assessed in the absence or presence of PROKR1 and PROKR2 antagonists. In both human trophoblast cell and placental explants, we demonstrated that rosiglitazone, a PPAR γ agonist, 1) increased EG-VEGF secretion, 2) increased EG-VEGF and its receptors mRNA and protein expression, 3) increased placental vascularization via PROKR1 and PROKR2, and 4) inhibited trophoblast migration and invasion via PROKR2. In the PPAR $\gamma^{-/-}$ mouse placentas, EG-VEGF levels were significantly decreased, supporting an *in vivo* control of EG-VEGF/PROKRs system during pregnancy. The present data reveal EG-VEGF as a new mediator of PPAR γ effects during pregnancy and bring new insights into the fine mechanism of trophoblast invasion.

human pregnancy; peroxisome proliferator-activated receptor- γ knockout; endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor; trophoblast invasion

DURING EARLY PREGNANCY, two key processes of placental development control its growth and the establishment of the fetomaternal circulation (24). The former one occurs early on

during pregnancy to ensure the growth and the branching of the newly formed vasculature (11). The second one establishes the fetomaternal circulation and is achieved by specialized placental cells, the cytotrophoblasts (CT). By the end of the first trimester of pregnancy, CT that are present at the anchoring villi generate multilayered columns of highly invasive cells called extravillous trophoblasts (EVT). EVT invade and transform maternal spiral arteries from high- to low-resistant vessels (38). Failure in these processes is known to be associated with the development of pregnancy pathologies such as early pregnancy loss, fetal growth restriction (FGR), and preeclampsia (PE) (43).

Among the factors reported to control these processes is the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ) (16). PPAR γ is abundantly expressed in the CT and syncytiotrophoblast (ST) of the human placenta as well as in the labyrinthine zone of the rodent placenta (4, 17). DNA binding of PPAR γ to its PPAR response elements requires heterodimerization with another nuclear receptor, the retinoid X receptor (RXR) (41). Genetic studies showed that PPAR γ -deficient mice die on day 9.5 of gestation because of placental abnormalities with defects in trophoblast differentiation and in vascular development (4, 26). The demonstration that placental defects were the unique cause of PPAR $\gamma^{-/-}$ embryonic lethality came from the “Sox2^{Cre}/PPAR $\gamma^{L2/L2}$ ” mouse model, a fully viable PPAR γ -null mouse generated by specific and total epiblastic gene deletion (35). Nevertheless, the mechanism by which PPAR γ controls these processes is still unknown.

We have shown recently that a specific placental angiogenic factor named EG-VEGF (endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor), or prokineticin-1, controls the same processes as those described for PPAR γ , i.e., inhibition of trophoblast invasion during the first trimester of pregnancy and involvement in the development of placental vasculature (9, 23), suggesting that some of PPAR γ 's effects might be mediated by EG-VEGF.

EG-VEGF is highly expressed in the ST layer during early pregnancy (21), acts via two G protein-coupled receptors, prokineticin receptor (PROKR) 1 and PROKR2 (30, 32), and controls both villi growth and the establishment of the fetomaternal circulation (6–8, 23). Within the villi, EG-VEGF in-

Address for reprint requests and other correspondence: N. Alfaidy, Unité INSERM U1036, Laboratoire BCI-IRTSV, CEA Grenoble 17, rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9, France (e-mail: nadia.alfaidy-benharouga@cea.fr).

Table 1. Primers used for real-time RT-PCR

Genes	Forward (5' to 3')	Reverse (5' to 3')
hEG-VEGF	AGG TCC CCT TCT TCA GGA AAC G	TCC AGG CTG TGC TCA GGA AAA G
hGAPDH	ACC CAG AAG ACT GTG GAT GG	TTC TAG ACG GCA GGT CAG GT
mEG-VEGF	TG AGG AAA CGC CAA CAC CAT	CC GGG AAC CTG GAG CAC

hEG-VEGF, human endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor; hGAPDH, human GAPDH; mEG-VEGF, murine EG-VEGF.

creases endothelial proliferation, migration, tube-like formation, and permeability as well as trophoblast proliferation and survival (6–8). At the extravillous side, EG-VEGF is rather an inhibitor of early trophoblast invasion (23). In relation to pregnancy pathologies, we have demonstrated that EG-VEGF levels were increased both in PE and FGR, suggesting that EG-VEGF deregulations might be associated with the development of pregnancy pathologies (7, 8, 23).

Because of the similarities of action between EG-VEGF and PPAR γ to control placental development, we hypothesized that EG-VEGF might mediate part of PPAR γ functions during early pregnancy.

Three approaches were used to verify this hypothesis: 1) an *in vitro* approach using human primary isolated cytotrophoblasts and the EVT cell line (HTR-8/SVneo), 2) an *ex vivo* approach using the human placental explant model, and 3) an *in vivo* approach using wild type, PPAR $\gamma^{+/-}$, and PPAR $\gamma^{-/-}$ mouse placentas.

PATIENTS AND METHODS

Patients and Tissues

Placentae were obtained from 46 singleton pregnancies after elective terminations of pregnancies. First-trimester human placentas from 8 to 10 wk of gestation (wg) were used. Human tissues were collected at the Grenoble University Hospital. Collection and processing were approved by the local hospital ethics committees, and informed patient consent was obtained in all cases.

Mouse Models

Wild-type (WT), PPAR $\gamma^{-/-}$, and PPAR $\gamma^{+/-}$ placentas were collected from female PPAR $\gamma^{+/-}$ mice mated with male PPAR $\gamma^{+/-}$ mice, as described previously. (40). Animal experimentations were approved by the relevant commission of the Canton of Vaud (Switzerland). Because PPAR $\gamma^{-/-}$ mice die at 9.5 days postcoitum (dpc), gravid mice were euthanized at 8.5 dpc. A binocular microscope was used to dissect embryos for DNA sequencing and to discard maternal decidua for further molecular analysis of placental tissues. Embryonic genotyping was performed by PCR amplification using the primers GACCCAGCTCTACAACAGGC (forward) and GGGACAGACCTCACTAACCCGTAACCT (reverse), which amplified a product of 700 bp derived from the PPAR γ WT allele. Placentas were used for RT-PCR analyses for EG-VEGF PROKR1 and PROKR2 expression. For each group four different PPAR $\gamma^{+/-}$ gravid mice were used, and for each gravid mice all placentas were collected for immunohistochemistry and RT-quantitative (q)PCR analysis.

Culture Models

Placental explant culture and treatment. Villous explant cultures were established from first-trimester human placentas at 8–10 wg. Small fragments of placental villi (30–40 mg wet wt) were placed into 48-well plates precoated with 150 μ l/well of diluted Matrigel (Matrigel/DMEM-F-12, 1:1; Becton-Dickinson, Le Pont-de-Claix, France) and polymerized at 37°C for 30 min. Explants were cultured in DMEM Ham's F-12 medium (Invitrogen, Cergy Pontoise, France)

supplemented with 100 μ g/ml streptomycin and 100 U/ml penicillin. After 24 h of culture the medium was changed, and the explants were incubated in the absence or presence of 1 or 10 μ M rosiglitazone (a PPAR γ agonist; Sigma-Aldrich) for 30 min to 24 h and 4 μ M T0070907 (a PPAR γ antagonist) for 8 h. For each placenta, three explants were used for each determination. For statistical analysis, the *n* value represents the number of placentas, not explants. In some experiments, explants were treated with the following compounds: 5,6-dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazole (DRB; 50 μ g/ml) a potent RNA polymerase inhibitor for 24 h.

Isolation and purification of villous cytotrophoblasts. Villous cytotrophoblast cells (VCT) were isolated from first-trimester chorionic villi by differential trypsin digestion according to previous published protocols (20, 25, 45). After Percoll gradient fractionation, cells were diluted to a concentration of 10⁶ cells/ml in DMEM supplemented with 10% FCS, 2 mM glutamine, 100 IU/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin and plated on 35-mm (3 ml/3 $\times$ 10⁶ cells) or 60-mm (8 ml/8 $\times$ 10⁶ cells) culture plates (Techno Plastic Products). VCT were incubated overnight in 5% CO₂ at 37°C and washed three times to eliminate nonadherent cells. VCT cultures were characterized by examining expression of cytokeratin 7, a trophoblast cell marker (95% positive cells), and by the observation of cell aggregates and ST at 48 and 72 h, respectively. After overnight incubation and washes, cells were treated for 24 h with 10 μ M rosiglitazone. Conditioned media from primary cultures were collected and centrifuged and the supernatants stored at –20°C until use.

HTR cell line culture. The HTR-8/SVneo cells were produced by immortalization of HTR-8 cells, an EVT cell line, with the SV40 virus (18). These cells were generously given to us by Dr. C. Graham (Kingston, ON, Canada). Cells were used between 24 and 30 passages and grown in RPMI 1640 supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin, and amphotericin B (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Cells were maintained at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂ in air.

EG-VEGF ELISA

EG-VEGF secretion was measured by ELISA (PeproTech) in the collected media. Two separated standard curves were constructed to allow accurate readings of samples at upper and lower ranges of the assay. The intra-assay coefficient of variability (CV) was 6.7%, and the interassay CV was 8.1%. Detection limit was 16 pg/ml.

RNA Isolation and Real-Time PCR Analysis

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

Immunohistochemistry

Placental explants from 8 to 10 wg were collected and fixed for 24 h at 4°C in 4% (vol/vol) paraformaldehyde, embedded in

paraffin, and cut into 5- μ m sections, as described previously (1). Adjacent sections were stained using specific antibodies, and the avidin-biotin immunoperoxidase detection method was applied. Endogenous peroxidase activity was quenched by pretreatment with 3% (vol/vol) hydrogen peroxide in methanol for 30 min. Polyclonal rabbit antibodies were used to detect EG-VEGF, PROKR1, and PROKR2 (Covalab, Lyon, France). These antibodies were used previously and characterized (6, 9, 21–23). CD31/PECAM and cytokeratin were detected using commercial antibodies (Dako, Trappes, France). For immunohistochemical detection, antibodies were incubated with the tissue sections for 18 h at 4°C and used at final concentrations of 0.33 μ g/ml for anti-EG-VEGF, 0.84 μ g/ml for anti-PROKR1, and 0.84 μ g/ml for anti-PROKR2. The tissue sections were subsequently washed three times with PBS and incubated with biotinylated goat anti-rabbit IgGs (1:400 dilution in blocking solution; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) for 1 h in a humid chamber. After three PBS washes, the slides were incubated with an avidin-biotin complex (Vectastain ABC kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA) for 1 h. After a final PBS wash, the immunoreactive proteins were visualized after the addition of 3,3-diaminobenzidine (Dako) for 2 min and then counterstained with hematoxylin. To quantify capillary length upon CD31 staining, images were processed for morphometric analysis with ImageJ software. A macrocommand was edited to give the total vessel length after binarization, skeletonization, and pixel count of the CD31 staining (39). In another set of experiments, explants were also used to assess the rosiglitazone effect on trophoblast proliferation. To this end, placental explants were immunostained with anti-human Ki-67 antibody (Dako). Proliferation index was determined by assessing the percentage of Ki-67-positive cells in control and rosiglitazone-treated explants (9).

Western Blot Analysis

Placental explants collected from at least six different first-trimester placentas were homogenized in RIPA lysis buffer and

protease inhibitors, as described previously (2). Protein extracts were electrophoretically separated on 0.1% sodium dodecyl sulfate-12% polyacrylamide gels and electrically transferred onto 0.45- μ m nitrocellulose membranes. The membranes were blotted with antibodies against CD31 (Abcam), anti-PCNA (proliferating cell nuclear antigen; DAKO), anti-CD68, a marker for macrophages (Santa Cruz Biotechnology), and PROKR1, PROKR2, and EG-VEGF (in house antibodies). Both PROKR1 and PROKR2 antibodies were used at a final concentration of 0.45 μ g/ml. A specific Western blot protocol was set up to detect EG-VEGF protein (10–17 kDa). Briefly, 100 μ g of placental proteins were separated on 0.1% SDS-17% polyacrylamide gels and electrically transferred onto 0.2 μ m polyvinylidene difluoride membranes (Millipore, Bedford, MA) for 45 min at 90 V. The blots were washed with PBS-Tween 0.1% and incubated overnight in blocking solution (5% skimmed milk in PBS-T). Subsequently, the membranes were immunoblotted with a rabbit antibody against EG-VEGF (0.48 μ g/ml) (Covalab, Lyon, France) overnight. The blots were then rinsed with PBS-T and incubated with goat anti-rabbit IgG (1:3,000) for 1 h. After three PBS-T washes, the antibody-antigen complex was detected using the ECL plus detection system (Amersham Pharmacia Biotech). The intensities of immunoreactive bands were measured by scanning the photographic film and analyzing the images on a desktop computer using ImageJ software. The Chemidoc analyzing system was also used (Image Lab version 4.0.1). To standardize for sample loading, the blots were subsequently stripped using a commercially available kit, following the manufacturer's instructions (Re-blot; Millipore), and reprobbed with an anti- β -actin antibody (Sigma-Aldrich) as an internal control for protein loading.

Wound-Healing Assay

Wound-healing assay was performed using HTR-8 cells. Cells were seeded in complete medium (RPMI 5% FBS) at a density of 2×10^5 cells/well into 24-well plates. At confluence, complete medium was replaced by serum-free medium in the absence or presence of

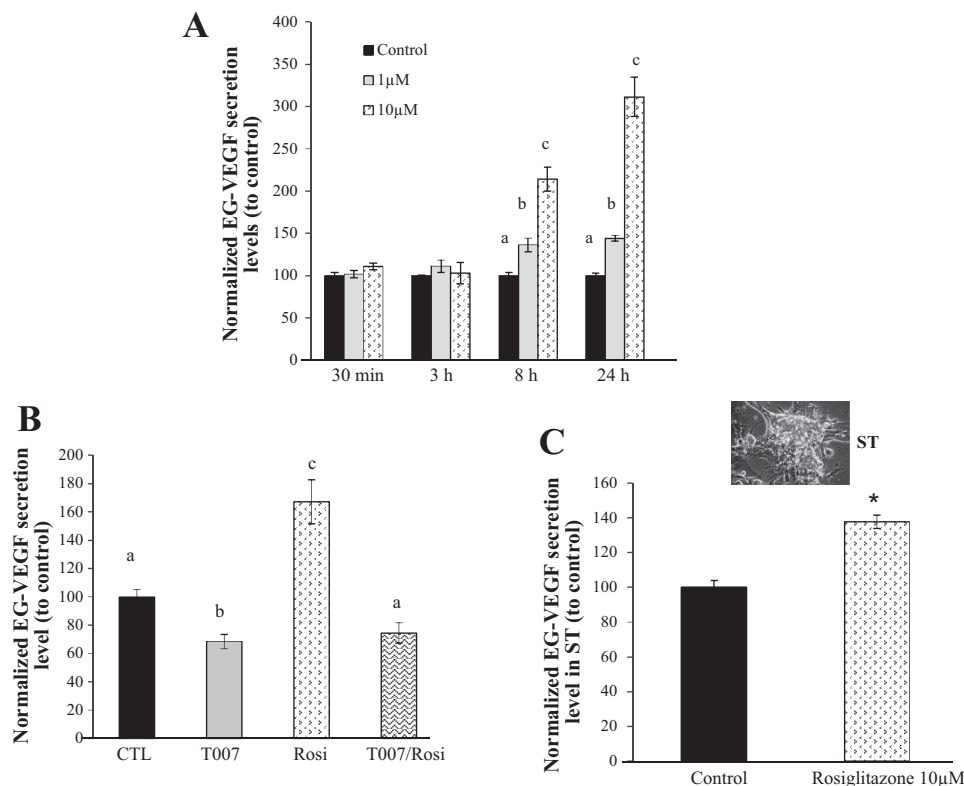


Fig. 1. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ 's (PPAR γ) effect on endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor (EG-VEGF) secretion. **A**: EG-VEGF secretion levels in placental explants after treatment with 1 and 10 μ M rosiglitazone (Rosi) at 30-min, 3-h, 8-h, and 24-h incubation ($n = 6$). EG-VEGF levels were measured by ELISA. **B**: inactivation of PPAR γ by T0070907 (8 h) led to a decrease in EG-VEGF secretion ($n = 4$). CTL, control. **C**: EG-VEGF secretion levels in primary trophoblast cells after treatment with 10 μ M Rosi for 24 h ($n = 4$). Data are presented as means $\pm$ SE. * $P < 0.05$. Values overwritten with different letters are significantly different from each other. ST, syncytiotrophoblast.

rosiglitazone, PROKR2 antagonist, or rosiglitazone plus PROKR2 antagonist. Cells were scratched with a sterile tip to create an artificial wound and allowed to heal for the next 24 h. Photographs were taken at regular time intervals (0, 9, and 24 h). The size of the wound was measured on photographs from three separate experiments. The closing of the wound was analyzed using Scion Image software (version 4.0.2). The results are presented as percentage of wound closure after 9 h of treatment.

Invasion Assay

This test was used for HTR-8/SVneo and the explant model.

HTR-8 invasion. HTR-8 cells were stained with the Vybrant DiI Cell-Labeling Solution (Invitrogen) for 1 h at 37°C. The top chamber of 8- μ m pore size FluoroBlok cell culture inserts (BD Biosciences) was precoated with 100 μ l of 1:25 Matrigel (BD Biosciences); 2×10^4 DiI-stained HTR cells/insert were seeded in 500 μ l of RPMI 1640 medium with 1% FBS. The inserts were placed into 24-well plates containing 750 μ l of RPMI 1640 medium with 15% FBS. Cells were treated with 10 μ M rosiglitazone and with 1 μ M PROKR1 or 1 μ M PROKR2 antagonists or both PROKR1 and PROKR2 antagonists for 24 h. The chambers were then removed and fixed with paraformaldehyde. The membranes of the chambers were excised and placed on glass slides. The cells that invaded the chamber were visualized under the microscope and counted.

Placental explants. One-hundred fifty microliters of ice-cold Matrigel (BD Biosciences, Grenoble, France) was layered into each well of the 48-well plates and allowed to solidify completely at 37°C for 1 h. Placental explants were added and incubated at 37°C for 4 h. Ten micromolar rosiglitazone was added at the time of plating. Daily observations were made under an inverted photomicroscope to document the invasion process.

PROKR1 and -2 cDNA Cloning and BHK Cell Line Transfection

Both PROKR1 and PROKR2 cDNAs were cloned from a human lung cDNA library, fused to an HA tag, and inserted into the pCDNA3.1 eucaryotic plasmid. The plasmids HA-PROKR1 and HA-

PROKR2 were transfected into BHK-21 (CCL-10; American Type Culture Collection). BHK cells were cultured in DMEM-F-12 culture medium supplemented with 5% FBS and methotrexate (0.4 mg/ml) as a selective agent.

Validation of PROKR1 and PROKR2 Antagonists Using the Wound-Healing Assay

BHK cells overexpressing PROKR1 or PROKR2 were subjected to a wound-healing assay (protocol described above) to examine the effects of these antagonists on the cell motility (6, 23). Cells were treated with EG-VEGF in the absence or the presence of PROKR1 antagonist {[2-5-(4-fluorobenzyl)-1-(4-methoxybenzyl)-1,4,5,6-tetrahydro-4,6-dioxo-1,3,5-triazin-2-ylamino-ethyl]guanidine} (1 μ M) (12), a PROKR2 antagonist (1 μ M), or both (9 h at 37°C) (15). For each cell line tested, the experiment was repeated three times.

Statistical Analysis

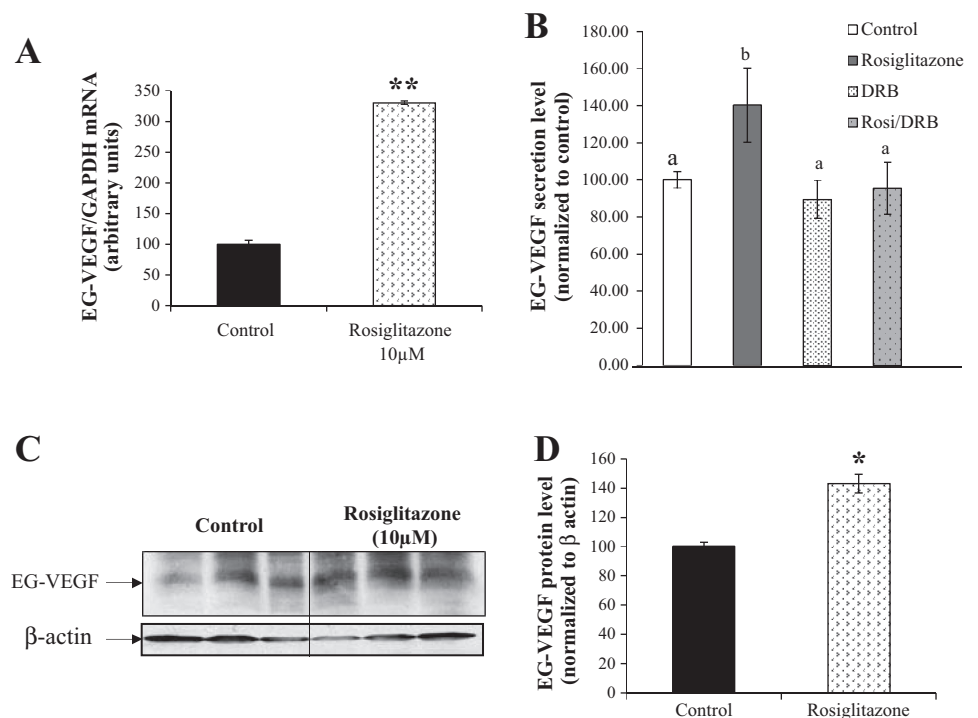
Statistical comparisons were made using Student's *t*-test and one-way ANOVA. All data were checked for normality and equal variance. When normality failed, a nonparametric test followed by Dunn's or Bonferroni's test was used. (SigmaPlot and SigmaStat, Jandel Scientific Software). All data are expressed as means $\pm$ SE ($P < 0.001$, 0.01, and 0.05).

RESULTS

PPAR γ 's Effect on EG-VEGF Secretion

Placental explants were incubated in the absence or the presence of rosiglitazone for 24 h. Secreted EG-VEGF was measured in conditioned media by ELISA. Figure 1A shows a dose response effect of rosiglitazone and a time course effect at 30 min, 3 h, 8 h, and 24 h. Rosiglitazone significantly increased EG-VEGF secretion from 8 h of incubation at both concentrations tested (1 and 10 μ M). To confirm that the observed effect was specific of rosiglitazone, we treated human placental

Fig. 2. PPAR γ 's effect on EG-VEGF placental expression. A: quantification of EG-VEGF mRNA levels in placental explants in response to 10 μ M Rosi ($n = 6$). B: EG-VEGF levels of secretion by placental explants treated or not with 10 μ M Rosi, 50 μ g/ml 5,6-dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazole (DRB; inhibitor of transcription), or both. EG-VEGF levels were measured by ELISA. Values overwriten with different letters are significantly different from each other. C: representative Western blot analysis of EG-VEGF expression after 24 h of treatment with 10 μ M Rosi ($n = 6$). Standardization of protein signals was done with antibodies against β -actin. D: quantification of the intensity of the bands is illustrated in the graph. Data represent means $\pm$ SE. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.



explants by the antagonist T0070907 in the absence or the presence of rosiglitazone. Figure 1B shows that T0070907 significantly reversed rosiglitazone's effect on EG-VEGF secretion. Importantly, we observed that T0070907 also decreased the basal EG-VEGF secretion, suggesting that EG-VEGF is endogenously regulated by PPAR γ . Because EG-VEGF is expressed mainly in the ST layer, we determined the direct effect of rosiglitazone on its secretion by this cell type. Isolated primary cytotrophoblast cells were cultured for 72 h to form a syncytium and then treated with rosiglitazone. Figure 1C shows that rosiglitazone significantly increased EG-VEGF secretion by ST cells.

PPAR γ 's Effect on EG-VEGF Expression

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

Effect of RXR Activation on EG-VEGF Expression

Because one of the four possible types of regulation by the PPAR γ system is its heterodimerization with RXR α (3), we wondered whether RXR α activation had any effect on EG-

VEGF expression. Placental explants were incubated in the absence or the presence of Ro25, a pan-RXR agonist (4 μ M), and/or Ro26, a pan-RXR antagonist (4 μ M). There was no effect independent of synergistic effect of these compounds on EG-VEGF secretion (data not shown).

Effect of PPAR γ on PROKR1 and PROKR2 Expression

Because of the significant effect of PPAR γ activation on EG-VEGF expression in placental explants, we wondered whether this key transcription factor also regulates the expression of EG-VEGF receptors PROKR1 and PROKR2. Figure 3 shows the effect of PPAR γ activation on PROKR1 and PROKR2 expression at the protein level in the placental explants. Figure 3A shows that PPAR γ activation increased PROKR2 (images c and d) but not PROKR1 (images a and b) expression. Figure 3A, images e and f, shows negative controls for PROKR1 and PROKR2 stainings, respectively. This was substantiated by Western blotting analysis, where we observed a significant increase in PROKR2 but not PROKR1 expression. PROKR1 and PROKR2 belong to GPCR protein family and appear on the blots as two to three glycosylated forms, respectively (Fig. 3, B and C).

PPAR γ 's Effect on Villi Growth

To get more insights on the role of PPAR γ activation on the growth of placental villi, we determined the effect of PPAR γ activation on trophoblast proliferation within the villi. It was particularly relevant to study PPAR γ activation's effects on trophoblast proliferation in a system in which the villous tissue architecture is maintained. Placental explants in culture preserve the topology of intact villi and

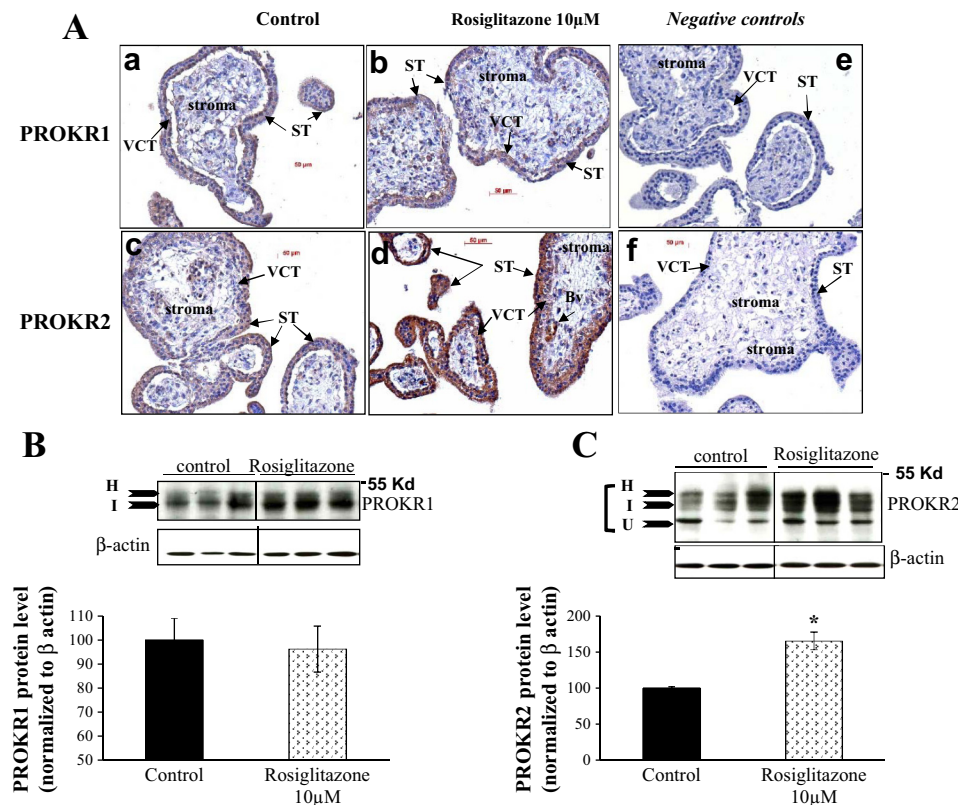


Fig. 3. PPAR γ 's effect on prokineticin receptor (PROKR)1 and PROKR2 expression. A: images of placental explant [8 wk of gestation (wg)] sections immunostained with anti-PROKR1 antibody (images a and b) or anti-PROKR2 antibody (images c and d) in the absence or presence of 10 μ M Rosi ($n = 4$). B: representative Western blot analysis that compares PROKR1 expression between placental explants treated or not with 10 μ M Rosi ($n = 6$ different placentas). Quantification of the intensity of the bands is shown below. C: representative Western blot of PROKR2 expression after overnight of treatment with 10 μ M Rosi. Standardization of protein signals was done with antibodies against β -actin. Quantification of the intensity of the bands is illustrated below (* $P < 0.05$). VCT, villous cytotrophoblast; H, highly glycosylated form; I, intermediate glycosylated form; U, unglycosylated form.

closely mimic the formation of anchoring villi occurring in vivo (10, 23). PPAR γ activation's effects on trophoblast proliferation were assessed using Ki-67 staining. Figure 4A shows representative sections of placental villi (*images a* and *c*) or placental columns (*images b* and *d*) that have been incubated in the absence (*images a* and *b*) or presence of rosiglitazone (*images c* and *d*) and stained for Ki-67. There was a significant increase in the number of Ki-67-positive cytotrophoblasts in chorionic villi but also a significant increase in the number of proliferative CT in the placental columns. The quantification of three independent experiments indicated significant increases in the proliferation rate within the chorionic villi and the placental columns (Fig. 4B). To further quantify the effect of rosiglitazone on the proliferation process, we compared the levels of PCNA expression between control and rosiglitazone-treated ex-

plants. There was a significant increase in PCNA expression in the rosiglitazone condition compared with the control one (Fig. 4C).

Because the microvascular system within the placental villi drives the growth and the development of this unit during the first trimester of pregnancy (13, 14, 47), we wondered whether PPAR γ activation also affected this aspect of placental growth. Figure 4D shows placental explants that have been incubated in the absence or presence of rosiglitazone (10 μ M) and stained for an endothelial cell marker, CD31/PECAM. Rosiglitazone treatment markedly increased CD31 staining, suggesting an increase in the vascularization within the placental villi. In the rosiglitazone-treated placental explants, we observed larger blood vessels compared with vessels present within the control placental villi. There was a significant increase in the total

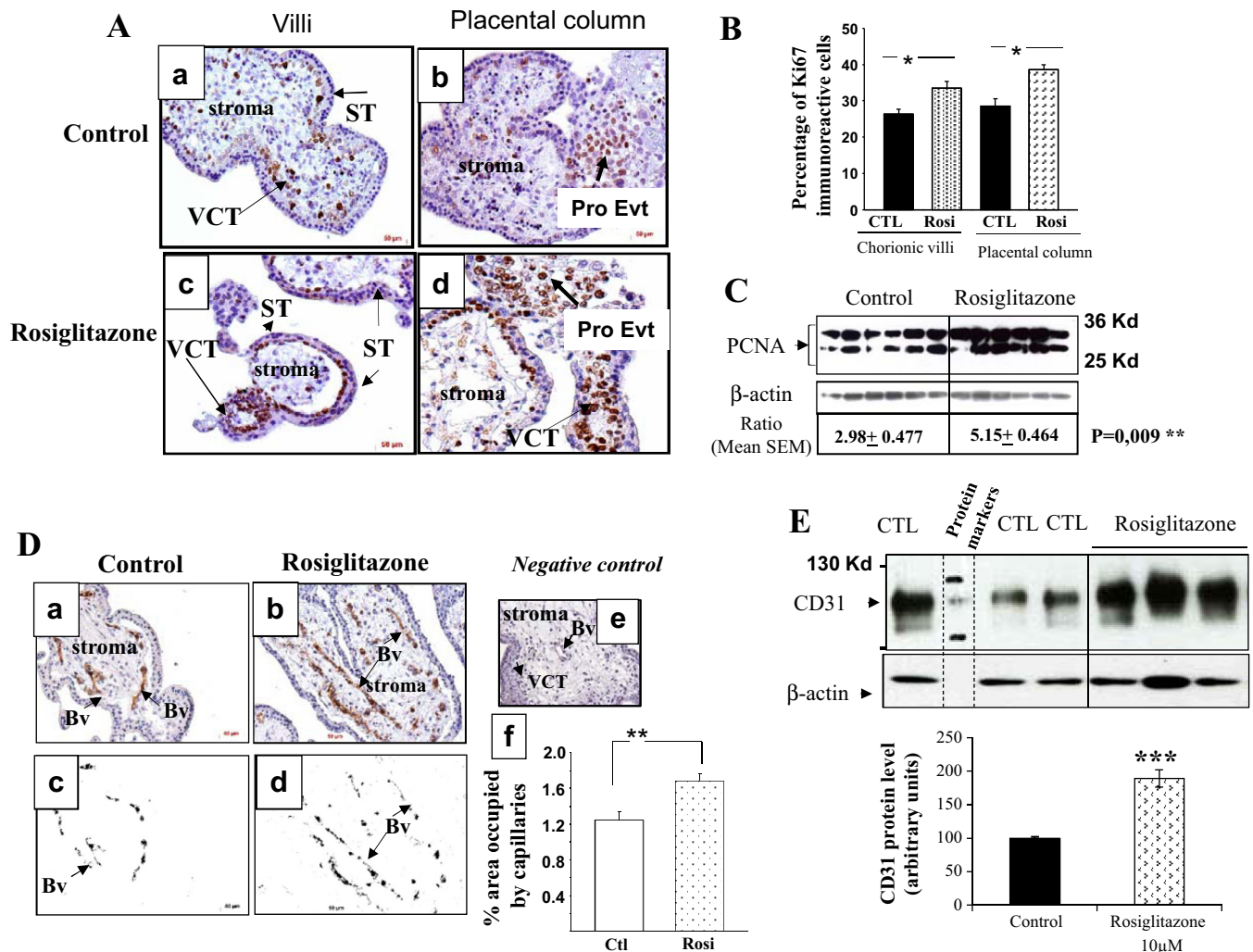


Fig. 4. PPAR γ increases trophoblast proliferation and placental vascularization. **A**: Ki-67 staining in placental explants treated or not with Rosi (10 μ M). *Images a* and *b* show Ki-67 staining in control placental villi and placental column, respectively. *Images c* and *d* show the stainings under Rosi treatment. **B**: %Ki-67-positive cytotrophoblast cells quantified in 3 independent experiments ($n = 6$ control and $n = 6$ Rosi). Data represent %triplicates. Scale bar, 50 μ m. **C**: Western blotting analysis of PCNA expression in control and Rosi-treated placental explants ($n = 6$ control and $n = 6$ Rosi). **D**: representative iamges of CD31 staining in placental explants treated (*image a*) or not (*image b*) with Rosi (10 μ M). *Images c* and *d* are the skeletization of *images a* and *b*, respectively. Black color represents the vascular network. *Image f* (bar graph) represents the %area occupied by capillaries. Six placental explant images were analyzed for each condition. **E**: representative Western blot analysis that compares CD31 protein levels in control placental explants vs. explants treated with 10 μ M Rosi. Quantification of the intensity of the bands is illustrated below. Pro-Evt, proliferative extravillous trophoblasts; Bv, blood vessel. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

capillary length within the villi of rosiglitazone-treated explants compared with the control ones (Fig. 4D, images a–f). Figure 4E shows a Western blot analysis that compared CD31 expression in control and treated explants. There was a significant increase in CD31 protein levels in the treated explants, confirming the in situ increase observed in placental sections.

In Vitro Validation of PROKR1 and PROKR2 Antagonists

EG-VEGF has been shown to inhibit the migration of different cell types (6, 19, 36); we used the wound-healing assay to verify the specificity of PROKR1 and PROKR2 antagonists in BHK cells overexpressing either PROKR1 (BHK-R1) or PROKR2 (BHK-R2) proteins. In BHK-R1 cells,

we demonstrated that EG-VEGF decreased BHK migration and that this effect was abolished in the presence of the PROKR1 antagonist (Fig. 5, A and B) but not in the presence of the PROKR2 antagonist (Fig. 5, C and D). Inversely, in BHK-R2 cells, the EG-VEGF effect was abolished in the presence of the PROKR2 antagonist (Fig. 5, E and F) but not in the presence of the PROKR1 antagonist (Fig. 5, G and H).

EG-VEGF Mediates PPAR γ 's Effect on Placental Vascularization

To determine whether EG-VEGF intervenes in the control of PPAR γ -mediated CD31 increase, we tested the effect of rosiglitazone in the absence or the presence of EG-VEGF receptor antagonists. Figure 6, A and C and B and D, show

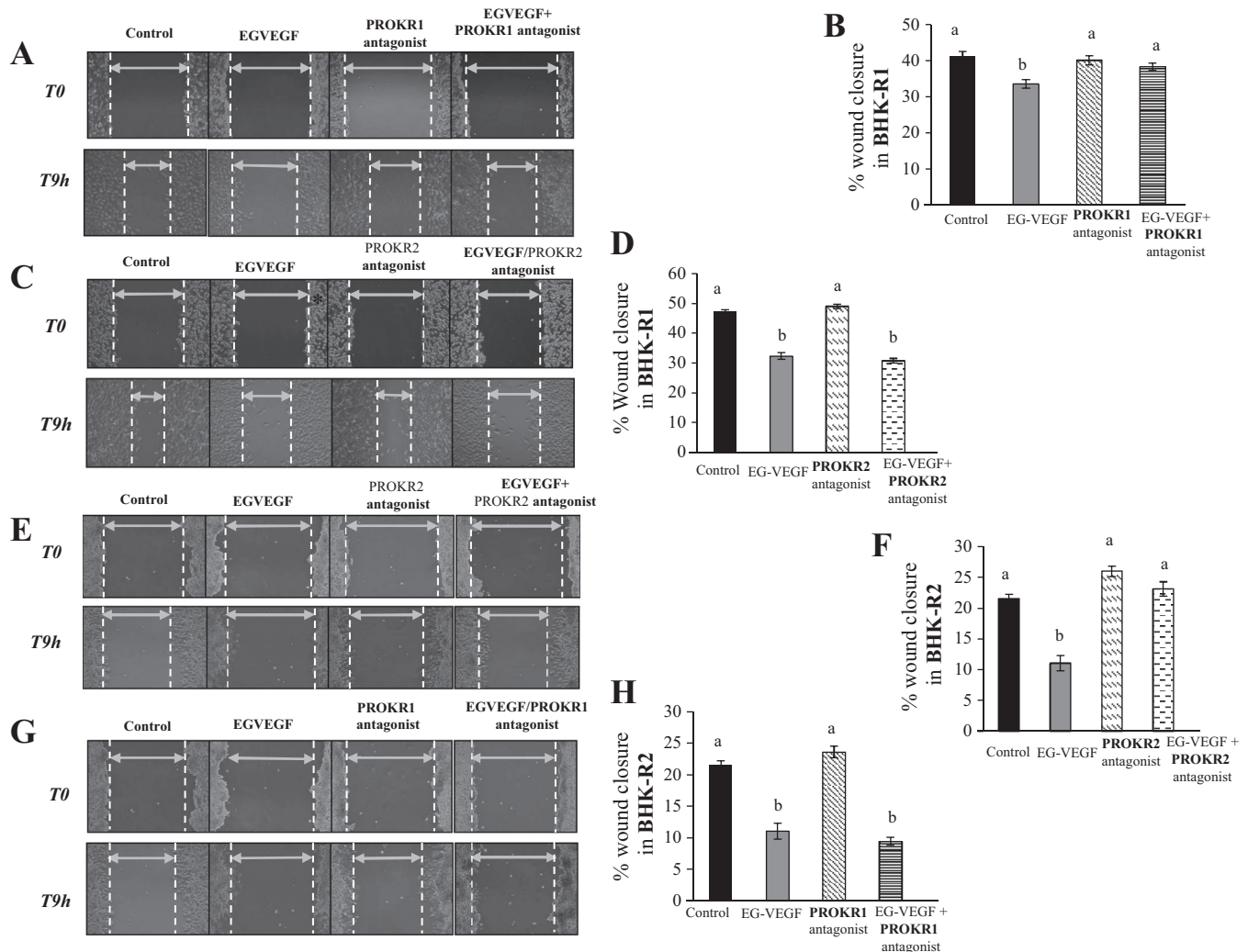


Fig. 5. Characterization of PROKR1 and PROKR2 inhibitory effects in BHK cells overexpressing PROKR1 receptor or PROKR2. A: images of wounded BHK-R1 monolayers at 0 and 9 h postwounding in the absence or presence of PROKR1 antagonist. B: plots showing percentages of wound closure after 9 h of treatment with EG-VEGF in the absence or the presence of PROKR1 antagonist (1 μ M). Bars with different letters are significantly different from each other ($P < 0.05$; $n = 3$). C: images of wounded BHK-R1 monolayers at 0 and 9 h postwounding in the absence or the presence of PROKR2 antagonist. D: plots showing percentages of wound closure after 9 h of treatment with EG-VEGF in the absence or the presence of PROKR2 antagonist (1 μ M). Bars with different letters are significantly different from each other ($P < 0.05$; $n = 3$). E: images of wounded BHK-R2 monolayers at 0 and 9 h postwounding in the absence or the presence of PROKR2 antagonist. F: plots show percentages of wound closure after 9 h of treatment with EG-VEGF in the absence or the presence of PROKR2 antagonist (1 μ M). Bars with different letters are significantly different from each other ($P < 0.05$; $n = 3$). G: images of wounded BHK-R2 monolayers at 0 and 9 h postwounding in the absence or the presence of PROKR1 antagonist. H: plots show percentages of wound closure after 9 h of treatment with EG-VEGF in the absence or the presence of PROKR1 antagonist (1 μ M). Bars with different letters are significantly different from each other ($P < 0.05$; $n = 3$).

that both PROKR1 and PROKR2 antagonists, respectively, decreased rosiglitazone's effects on CD31 protein expression significantly. Altogether, these data suggest that EG-VEGF might mediate some of PPAR γ 's activation effects on the placental endothelium during the first trimester of pregnancy.

EG-VEGF Mediates PPAR γ 's Effect on Trophoblast Invasion

Previous studies have shown that PPAR γ activation controls trophoblast invasion using in vitro models (46); however, a demonstration of this regulation in an ex vivo model such as the explant model has not been performed. Using the placental explant model, we examined the effect of rosiglitazone on trophoblast invasion. Figure 7A shows that rosiglitazone significantly inhibits invasion of EVT into the matrigel within 72 h of culture. This result confirms the inhibition of the invasive process upon PPAR γ activation in trophoblast cells.

Because trophoblast invasion plays a major role in the process that establishes the fetomaternal circulation, we hypothesized that this might also involve angiogenic factors such as EG-VEGF. To verify this hypothesis, we used the HTR-8/SVneo cell. First, we determined the effect of rosiglitazone on PROKR2 expression, a receptor subtype that mediates EG-VEGF's effects on trophoblast invasion (23). Figure 7B shows that rosiglitazone increased PROKR2 protein levels significantly, confirming the effect observed in whole placental explants. To demonstrate whether EG-VEGF is involved in the PPAR γ effect on trophoblast invasion, we determined the percentage of invasion of prelabeled HTR-8/SVneo cells through Matrigel using the BD FluoroBlok cell culture inserts. The effect of rosiglitazone was also tested in the presence of the PROKR2 antagonist. Figure 7C shows that rosiglitazone significantly decreased HTR-8/SVneo cell invasion and that this effect was reversed in the presence of the PROKR2 antagonist, suggesting that part of the rosiglitazone effect on HTR-8/SVneo invasion might be mediated by the EG-VEGF sig-

nal pathway. Quantification of the number of invading cells in each condition is reported in Fig. 7D.

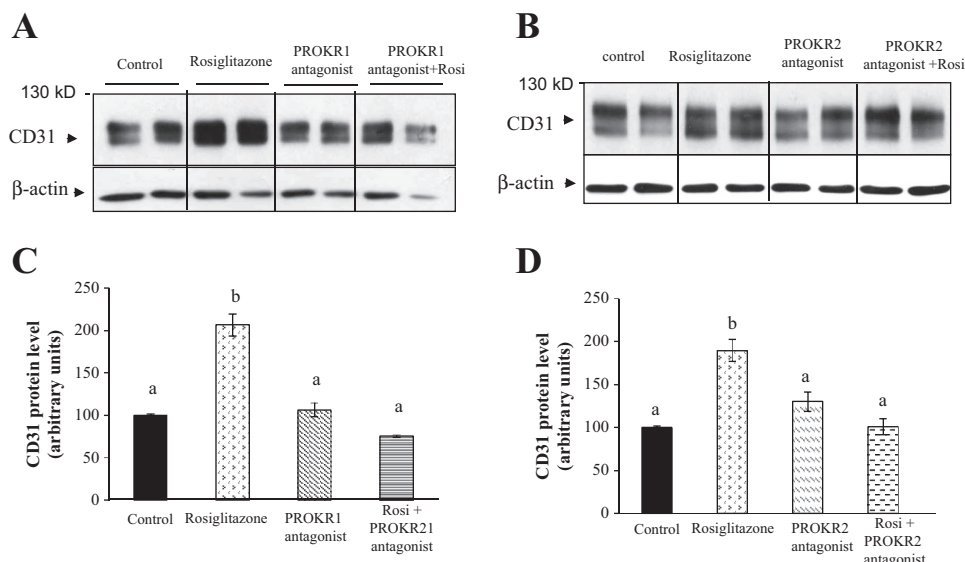
EG-VEGF Mediates PPAR γ 's Effect on Trophoblast Migration

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

EG-VEGF Expression is Decreased in PPAR γ -Knockout Mice

PPAR γ knockout mice (PPAR $\gamma^{-/-}$) die at 9.5 dpc from failure in placental development and vascularization (4, 26). We compared the levels of expression of EG-VEGF in placentas collected at 8.5 dpc from WT (PPAR $\gamma^{+/+}$), PPAR $\gamma^{+/-}$, and PPAR $\gamma^{-/-}$ mice. Figure 9A shows comparisons of the mRNA levels of EG-VEGF in the three groups. There was a significant decrease in EG-VEGF mRNA levels in the PPAR $\gamma^{-/-}$ compared with the WT mice and a trend toward a decrease in the PPAR $\gamma^{+/-}$ mice. We then examined EG-VEGF expression at the protein level by immunohistochemistry. Figure 9B shows representative stainings for EG-VEGF in WT and PPAR $\gamma^{-/-}$ placentas collected at 8.5 dpc. In the WT placentas, EG-VEGF protein was highly expressed in the ectoplacental cone (Ec) and decidua (Fig. 9B, images b, d, and f). In the PPAR $\gamma^{-/-}$ placenta, EG-VEGF staining was decreased both in the Ec and the decidua (images k, m, and o). In the Ec, strong staining was observed in the trophoblast giant cells (Tgc) of the WT placenta that

Fig. 6. EG-VEGF mediates PPAR γ 's effect on placental vascularization. A and B: representative Western blot analyses that compare CD31 protein levels in control placental explants (A) vs. explants treated with 10 μ M Rosi (B) in the absence or presence of PROKR1 antagonist (1 μ M), PROKR2 antagonist (1 μ M), or both during 24 h. C and D: quantification of the intensity of the bands is illustrated ($n = 6$). Standardization of protein signals was done with antibodies against β -actin protein ($P < 0.05$). Values overwriten with different letters are significantly different from each other.



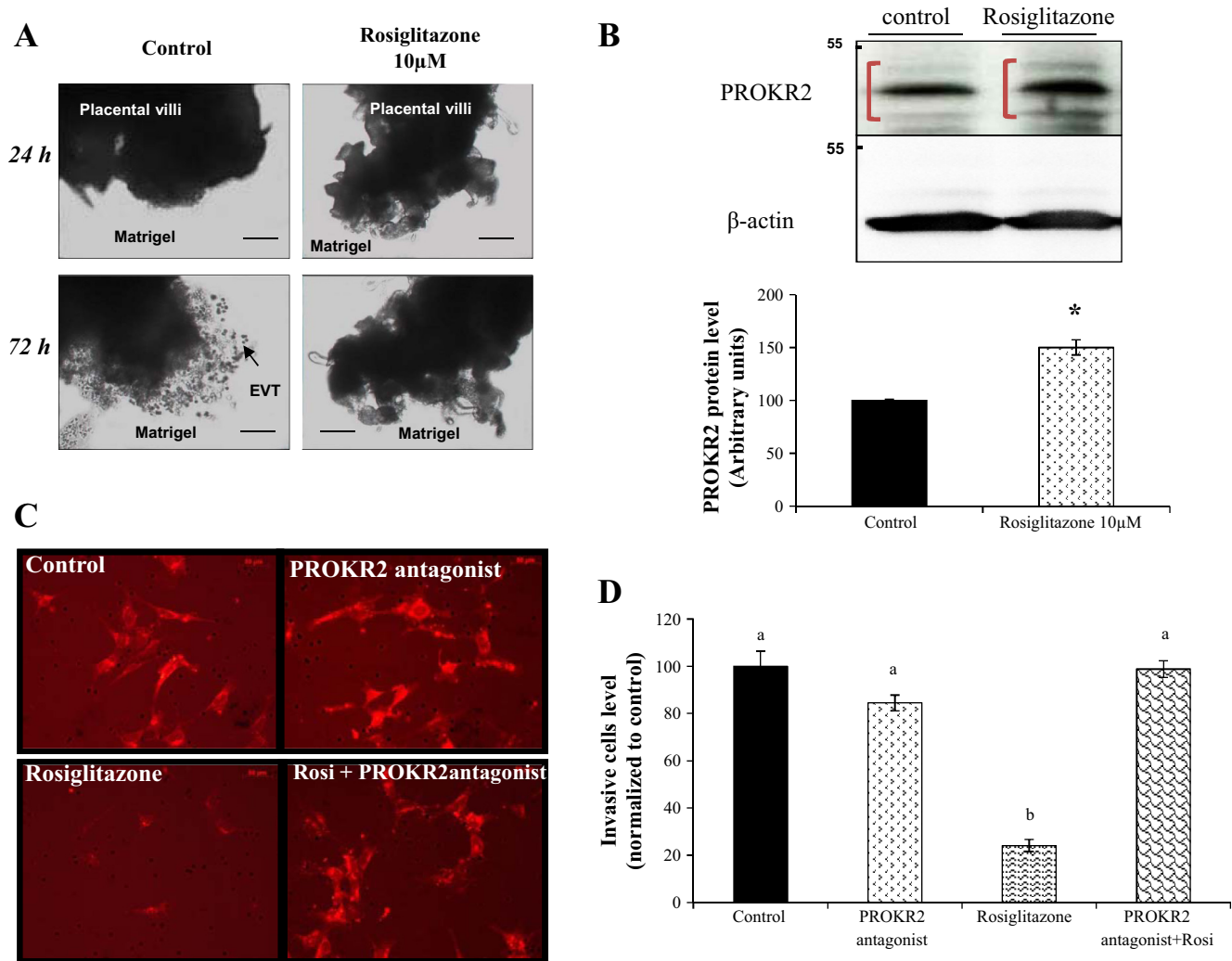


Fig. 7. EG-VEGF mediates PPAR γ 's effect on trophoblast invasion. A: Rosi's effect on extravillous trophoblast (EVT) invasion placental explants ($n = 4$). B: representative Western blot of PROKR2 expression after 24 h of treatment with 10 μ M Rosi in the HTR-8/SVneo cell ($n = 6$). Standardization of protein signals was done with antibodies against β -actin. Quantification of the intensity of the bands is illustrated below. C: representative images of HTR-8/SVneo invasion that has been treated or not with 10 μ M Rosi in the absence or presence of PROKR2 antagonist (1 μ M). D: quantification of HTR-8/SVneo invasion is reported ($n = 6$). Values overwritten with different letters are significantly different from each other. * $P < 0.05$.

was decreased in the PPAR $\gamma^{-/-}$. Fig. 9B, images *a*, *c*, and *e* and images *j*, *l*, and *n* show cytokeratin stainings of the WT and PPAR $\gamma^{-/-}$ placentas, respectively. Figure 9B, images *g-i* and *p-r*, shows negative controls for the EG-VEGF staining.

DISCUSSION

The present study demonstrates a new regulation of EG-VEGF and its receptors by the major nuclear receptor PPAR γ and brings new insights into the mechanism by which PPAR γ might affect placental development, a main cause of PPAR $\gamma^{-/-}$ lethality. These statements were based on the following findings: 1) PPAR γ increased EG-VEGF secretion and its mRNA and protein expression in both primary human trophoblast cells and placental explants, 2) PPAR γ increased PROKR2 expression in placental explants, 3) placental growth controlled by PPAR γ is in part mediated by EG-VEGF via the activation of PROKR1 and PROKR2, 4) trophoblast invasion controlled by PPAR γ

is in part mediated by EG-VEGF via PROKR2, and 5) PPAR $\gamma^{-/-}$ placentas exhibited decreased expression of EG-VEGF compared with WT placentas.

The demonstration that EG-VEGF mediates some of the PPAR γ effects is not unexpected, as both proteins have been reported to play key roles in placental development during early pregnancy and to control similar processes (4, 7, 45). Interestingly, it has been reported that PPAR γ activation by rosiglitazone reversed adverse nicotine effects on the ovary vascularization by increasing EG-VEGF expression (37).

RXR α occupies a central position in the nuclear receptor superfamily, although its activation or inhibition by specific ligands did not affect EG-VEGF expression, suggesting that only endogenous PPAR γ ligands and not RXR ligands are potential activators of EG-VEGF in the placenta. Such mode of activation has been described as one of the four possible types of regulation proposed for the PPAR γ /RXR α system (3).

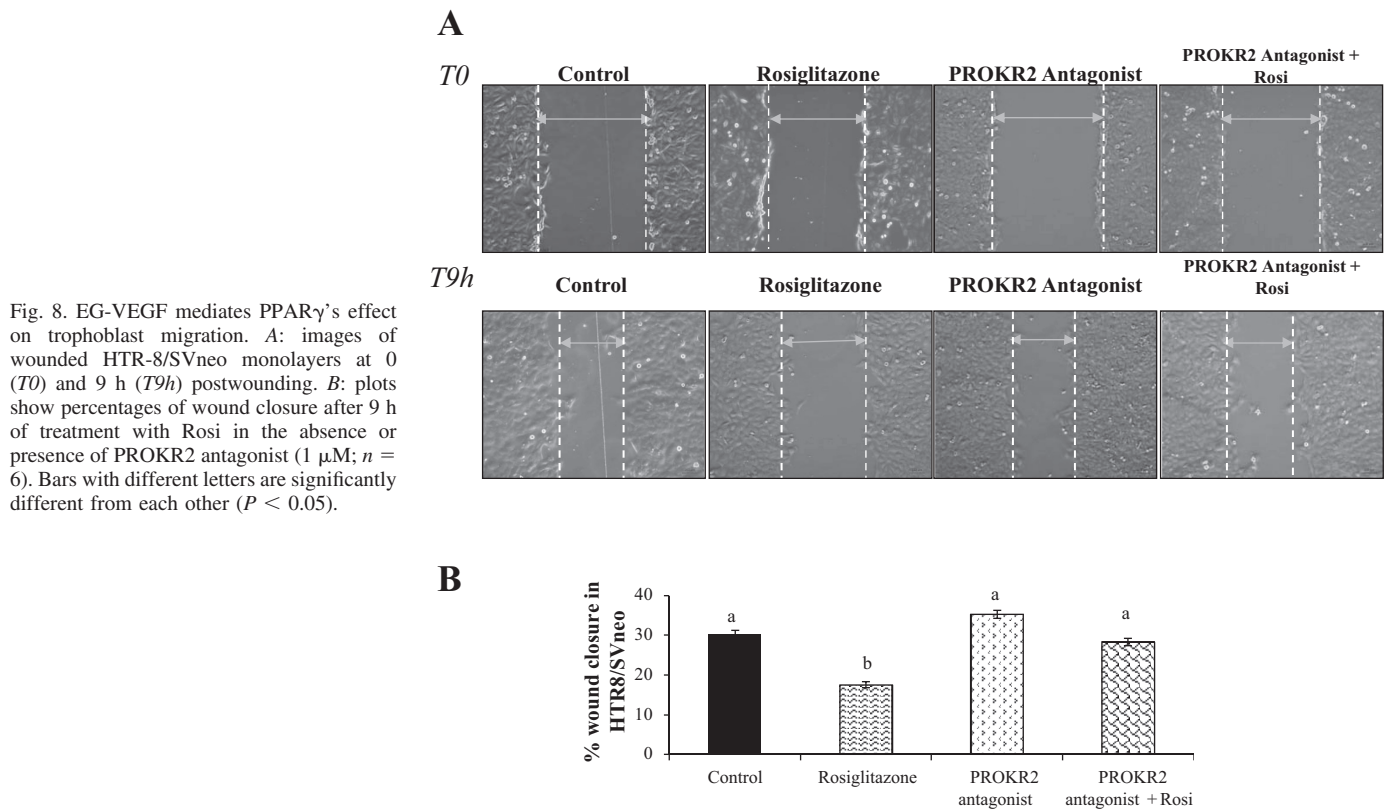


Fig. 8. EG-VEGF mediates PPAR γ 's effect on trophoblast migration. *A*: images of wounded HTR-8/SVneo monolayers at 0 (*T0*) and 9 h (*T9h*) postwounding. *B*: plots show percentages of wound closure after 9 h of treatment with Rosi in the absence or presence of PROKR2 antagonist (1 μ M; *n* = 6). Bars with different letters are significantly different from each other (*P* < 0.05).

Most of the studies that have addressed the consequences of PPAR $\gamma^{-/-}$ on pregnancy outcome have been halted at the report of the mice lethality at 9.5 dpc (4, 26). Because of the difficulty in analyzing placenta at this gestational age, only a brief statement on placental vascular system disorganization was reported in PPAR $\gamma^{-/-}$ mice (4, 26). In vitro studies using human placenta have been focused mainly on the role of PPAR γ in the control of human trophoblast differentiation, including trophoblast invasion and syncytiotrophoblast functions (42). No in vitro studies reported the effect of PPAR γ activation on placental vascularization or its control of trophoblast invasion in an ex vivo model such as the explant model. In a recent study using the BeWo cell line, PPAR γ inactivation increased their proliferation, whereas its activation did not have any effect (28). BeWo cells originate from choriocarcinoma, a cell type that is more often used to mimic syncytiotrophoblast formation rather than cytotrophoblast proliferation, the cell type that represents the proliferative unit of first-trimester placentas. In this study we used explant tissues that contain all of these cell types and showed that rosiglitazone increased the proliferation of cytotrophoblasts at the villi and at the placental column. The discrepancy between our findings and those of Levytska et al. (28) might well be due to the type of material used. Here, we demonstrated that PPAR γ activation increases placental growth via an increase in trophoblast proliferation and vascularization and controls precocious trophoblast invasion. Importantly, we demonstrated that part of these effects is mediated by EG-VEGF. These data further support the hypothesis that PPAR $\gamma^{-/-}$ placental defects might well be due to deregulations in the EG-VEGF/

PROKR functions and validate the role of EG-VEGF during early pregnancy. Increased trophoblast proliferation and villi vascularization as well as decreased EVT invasion upon PPAR γ activation are three processes that we previously showed to be controlled by EG-VEGF (7, 8); hence, EG-VEGF might well be considered an important mediator of PPAR γ 's effects during pregnancy.

The EG-VEGF protein family consists of two members, the canonical member EG-VEGF and its analog BV8 (bombina-variegata-8) (27). These proteins have been reported to control multiple biological processes (5, 7, 29), although the processes that EG-VEGF controls are related mainly to the success of pregnancy (6–8, 23). Importantly, recent data reported that the levels of circulating EG-VEGF were correlated to the quality of embryonic cohorts used in assisted reproductive technologies as well as to the rates of successful pregnancies (8, 31, 44). Hence, one can speculate that the failure in placental development observed in the PPAR $\gamma^{-/-}$ mice might well have occurred during the first stages of placental development. In vivo data showed a significant decrease in EG-VEGF levels in the PPAR $\gamma^{-/-}$ mouse placenta, further suggesting that the embryo's death observed in the PPAR γ mice might be due in part to a failure in EG-VEGF signaling.

The expression of EG-VEGF receptors has also been reported to be increased in pathological human pregnancies such as PE and FGR (8, 23). In PE, recent studies from McCarthy and colleagues (33, 34) have demonstrated that rosiglitazone administration to the reduced uterine perfusion pressure rat model of PE ameliorated key hallmarks of the disease, suggesting potential beneficial effects of PPAR γ activation in the treatment of this pathology. One can then speculate that the

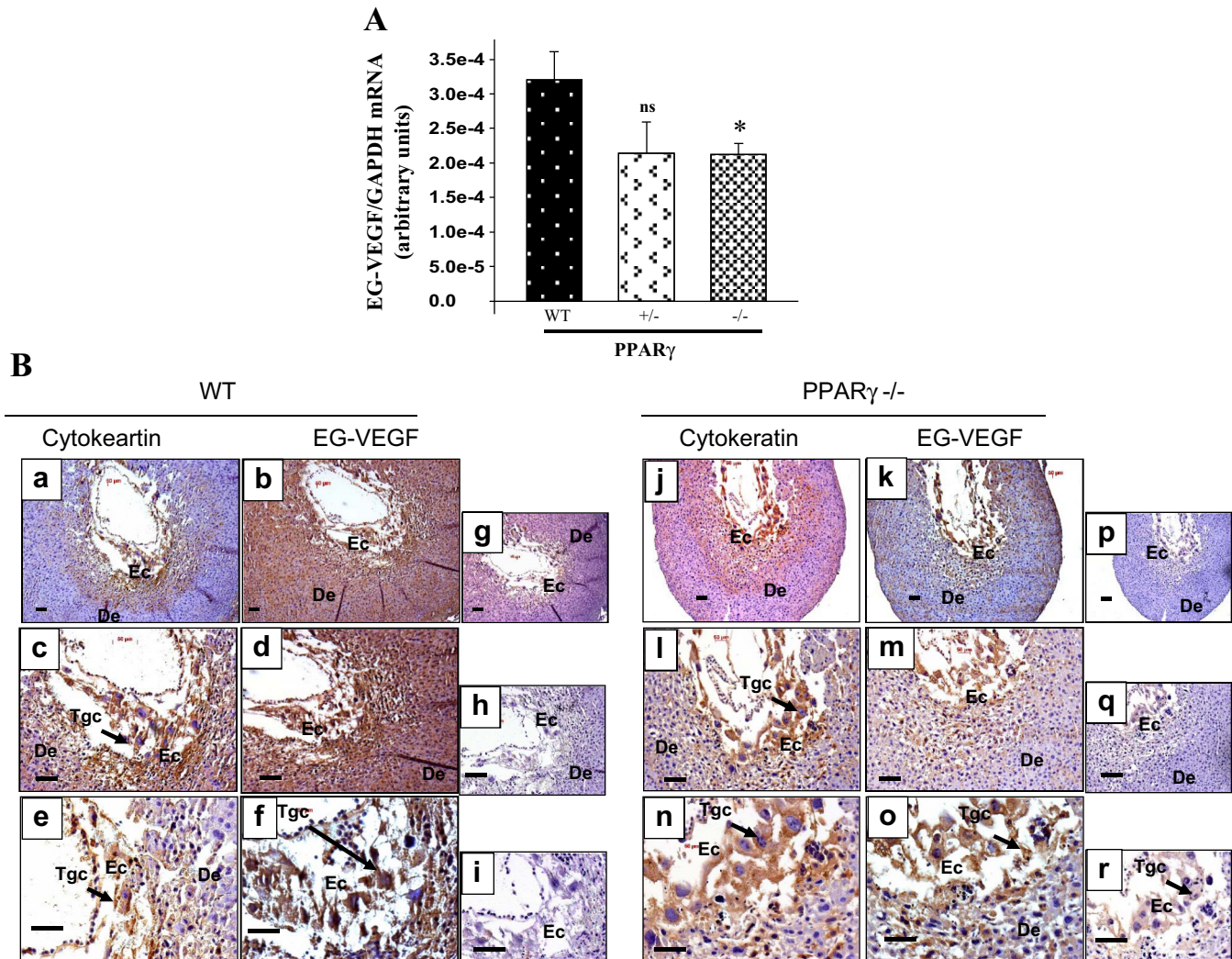


Fig. 9. EG-VEGF mRNA and protein expression in placental tissues from wild-type (WT), PPAR γ ^{+/-}, and PPAR γ ^{-/-} mice. A: graph of the quantification of EG-VEGF mRNA in placenta collected from WT, PPAR γ ^{+/-}, and PPAR γ ^{-/-} mice (* P < 0.05). GAPDH mRNA was used as an internal control. Results are reported as means $\pm$ SE. B: images with stainings for cytokeartin (CK7; images a, c, and e) and EG-VEGF (images b, d, and f) in WT and PPAR γ ^{-/-}, respectively, collected on day 8.5 of gestation. Images g, h, and i show stainings for EG-VEGF in WT and PPAR γ ^{-/-} mice, respectively. Negative controls for EG-VEGF stainings are shown on the right. For each type of mice, 6 placentas were collected from 4 different mice. Ec, ectoplacental cone; De, decidua; Tgc, trophoblast giant cells. Images a, b, g, j, k, and p were taken at $\times 50$ magnification. Images c, d, h, l, m, and q were taken at $\times 100$ magnification. Images e, f, i, n, o, and r were taken at $\times 200$ magnification. Scale bar, 50 μ M. NS, not significant.

increased levels of EG-VEGF in pathological pregnancies might well be the consequence of a prior activation by the PPAR γ system. Further animal and clinical studies are required to verify this hypothesis.

In conclusion, we demonstrated a new regulatory pathway involving a key placental transcription factor and a recently discovered angiogenic factor in the placenta. These findings will contribute to the understanding of the mechanisms behind placental defects responsible for the PPAR γ ^{-/-} embryo's death and will advance our comprehensions of the fine mechanisms that regulate placental development, leading to successful pregnancy outcomes.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank F  d  ric Sergent for technical assistance. We thank the staff of the University of Lausanne, Center for Integrative Genomics, Switzerland Central Animal Facility, for their help with the animal work. We also thank the

Department of Obstetrics and Gynecology of Grenoble Hospital for placental material.

GRANTS

We acknowledge the following sources of funding: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (U1036), University Joseph Fourier, Commissariat    l'Energie Atomique (DSV/iRTSV/BCI), the Region Rh  nes Alpes, and Ligue Internatinal Contre le Cancer.

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

V.G., W.T., A.S., S.B., C.W., C.C., V.O., and M.B. performed experiments; S.B. prepared figures; T.F., Q.-Y.Z., and N.A. conception and design of research; B.D. and P.H. interpreted results of experiments; J.-J.F. approved final version of manuscript.

REFERENCES

- Alfaidy N, Gupta S, DeMarco C, Caniggia I, Challis JR. Oxygen regulation of placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2: physiological and pathological implications. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 4797–4805, 2002.
- Alfaidy N, Li W, MacIntosh T, Yang K, Challis J. Late gestation increase in 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 expression in human fetal membranes: a novel intrauterine source of cortisol. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 5033–5038, 2003.
- Aranda A, Pascual A. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev* 81: 1269–1304, 2001.
- Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, Koder A, Evans RM. PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell* 4: 585–595, 1999.
- Boulberdaa M, Urayama K, Nebigil CG. Prokineticin receptor 1 (PKR1) signalling in cardiovascular and kidney functions. *Cardiovasc Res* 92: 191–198, 2011.
- Brouillet S, Hoffmann P, Benharouga M, Salomon A, Schaal JP, Feige JJ, Alfaidy N. Molecular characterization of EG-VEGF-mediated angiogenesis: differential effects on microvascular and macrovascular endothelial cells. *Mol Biol Cell* 21: 2832–2843, 2010.
- Brouillet S, Hoffmann P, Feige JJ, Alfaidy N. EG-VEGF: a key endocrine factor in placental development. *Trends Endocrinol Metab* 23: 501–508, 2012.
- Brouillet S, Hoffmann P, Thomas-Cadi C, Bergues U, Feige JJ, Alfaidy N, Hennebicq S. [PROK1, prognostic marker of embryo implantation?]. *Gynecol Obstet Fertil* 41: 562–565, 2013.
- Brouillet S, Murthi P, Hoffmann P, Salomon A, Sergent F, De Mazancourt P, Dakouane-Giudicelli M, Dieudonne MN, Rozenberg P, Vaiman D, Barbaux S, Benharouga M, Feige JJ, Alfaidy N. EG-VEGF controls placental growth and survival in normal and pathological pregnancies: case of fetal growth restriction (FGR). *Cell Mol Life Sci* 70: 511–525, 2013.
- Caniggia I, Grisaru-Gravnosky S, Kuliszewsky M, Post M, Lye SJ. Inhibition of TGF-beta 3 restores the invasive capability of extravillous trophoblasts in preeclamptic pregnancies. *J Clin Invest* 103: 1641–1650, 1999.
- Charnock-Jones DS, Kaufmann P, Mayhew TM. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. I. Molecular regulation. *Placenta* 25: 103–113, 2004.
- Congiu C, Onnis V, Deplano A, Salvadori S, Marconi V, Maftai D, Negri L, Lattanzi R, Balboni G. A new convenient synthetic method and preliminary pharmacological characterization of triazinediones as prokineticin receptor antagonists. *Eur J Med Chem* 81: 334–340, 2014.
- Cross JC, Nakano H, Natale DR, Simmons DG, Watson ED. Branching morphogenesis during development of placental villi. *Differentiation* 74: 393–401, 2006.
- Cross JC, Simmons DG, Watson ED. Chorioallantoic morphogenesis and formation of the placental villous tree. *Ann NY Acad Sci* 995: 84–93, 2003.
- Curtis VF, Wang H, Yang PY, McLendon RE, Li XH, Zhou QY, Wang XF. A PK2/Bv8/PROK2 antagonist suppresses tumorigenic processes by inhibiting angiogenesis in glioma and blocking myeloid cell infiltration in pancreatic cancer. *PLoS One* 8: 2013.
- Desvergne B, Michalik L, Wahli W. Be fit or be sick: peroxisome proliferator-activated receptors are down the road. *Mol Endocrinol* 18: 1321–1332, 2004.
- Fournier T, Tsatsaris V, Handschuh K, Evain-Brion D. PPARs and the placenta. *Placenta* 28: 65–76, 2007.
- Graham CH, Hawley TS, Hawley RG, MacDougall JR, Kerbel RS, Khoo N, Lala PK. Establishment and characterization of first trimester human trophoblast cells with extended lifespan. *Exp Cell Res* 206: 204–211, 1993.
- Guilini C, Urayama K, Turkeri G, Dedeoglu DB, Kurose H, Messaddeq N, Nebigil CG. Divergent roles of prokineticin receptors in the endothelial cells: angiogenesis and fenestration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298: H844–H852, 2010.
- Handschuh K, Guibourdenche J, Guesnon M, Laurendeau I, Evain-Brion D, Fournier T. Modulation of PAPP-A expression by PPAR-gamma in human first trimester trophoblast. *Placenta* 27, Suppl A: S127–S134, 2006.
- Hoffmann P, Feige JJ, Alfaidy N. Expression and oxygen regulation of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor/prokineticin-1 and its receptors in human placenta during early pregnancy. *Endocrinology* 147: 1675–1684, 2006.
- Hoffmann P, Feige JJ, Alfaidy N. Placental expression of EG-VEGF and its receptors PKR1 (prokineticin receptor-1) and PKR2 throughout mouse gestation. *Placenta* 28: 1049–1058, 2007.
- Hoffmann P, Saoudi Y, Benharouga M, Graham CH, Schaal JP, Mazouni C, Feige JJ, Alfaidy N. Role of EG-VEGF in human placental: Physiological and pathological implications. *J Cell Mol Med* 13: 2224–2235, 2009.
- Kaufmann P, Mayhew TM, Charnock-Jones DS. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. II. Changes during normal pregnancy. *Placenta* 25: 114–126, 2004.
- Kliman HJ, Nestler JE, Sermasi E, Sanger JM, Strauss JF, 3rd. Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinology* 118: 1567–1582, 1986.
- Kubota N, Terauchi Y, Miki H, Tamemoto H, Yamauchi T, Komada K, Satoh S, Nakano R, Ishii C, Sugiyama T, Eto K, Tsubamoto Y, Okuno A, Murakami K, Sekihara H, Hasegawa G, Naito M, Toyoshima Y, Tanaka S, Shiota K, Kitamura T, Fujita T, Ezaki O, Aizawa S, Kadowaki T, et al. PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell* 4: 597–609, 1999.
- LeCouter J, Kowalski J, Foster J, Hass P, Zhang Z, Dillard-Telm L, Frantz G, Rangell L, DeGuzman L, Keller GA, Peale F, Gurney A, Hillan KJ, Ferrara N. Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium. *Nature* 412: 877–884, 2001.
- Levytska K, Drewlo S, Baczyk D, Kingdom J. PPAR- γ Regulates Trophoblast Differentiation in the BeWo Cell Model. *PPAR Res* 2014: 637251, 2014.
- Li JD, Hu WP, Zhou QY. The circadian output signals from the suprachiasmatic nuclei. *Prog Brain Res* 199: 119–127, 2012.
- Lin DC, Bullock CM, Ehlert FJ, Chen JL, Tian H, Zhou QY. Identification and molecular characterization of two closely related G protein-coupled receptors activated by prokineticins/endocrine gland vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 277: 19276–19280, 2002.
- Maldonado-Perez D, Evans J, Denison F, Millar RP, Jabbour HN. Potential roles of the prokineticins in reproduction. *Trends Endocrinol Metab* 18: 66–72, 2007.
- Masuda Y, Takatsu Y, Terao Y, Kumano S, Ishibashi Y, Suenaga M, Abe M, Fukusumi S, Watanabe T, Shintani Y, Yamada T, Hinuma S, Inatomi N, Ohtaki T, Onda H, Fujino M. Isolation and identification of EG-VEGF/prokineticins as cognate ligands for two orphan G-protein-coupled receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 293: 396–402, 2002.
- McCarthy FP, Drewlo S, English FA, Kingdom J, Johns EJ, Kenny LC, Walsh SK. Evidence implicating peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in the pathogenesis of preeclampsia. *Hypertension* 58: 882–887, 2011.
- McCarthy FP, Drewlo S, Kingdom J, Johns EJ, Walsh SK, Kenny LC. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma as a potential therapeutic target in the treatment of preeclampsia. *Hypertension* 58: 280–286, 2011.
- Nadra K, Quignodon L, Sardella C, Joye E, Mucciolo A, Chrast R, Desvergne B. PPARgamma in placental angiogenesis. *Endocrinology* 151: 4969–4981, 2010.
- Ngan ES, Shum CK, Poon HC, Sham MH, Garcia-Barcelo MM, Lui VC, Tam PK. Prokineticin-1 (Prok-1) works coordinately with glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) to mediate proliferation and differentiation of enteric neural crest cells. *Biochim Biophys Acta* 1783: 467–478, 2008.
- Petrik JJ, Gerstein HC, Cesta CE, Kellenberger LD, Alfaidy N, Holloway AC. Effects of rosiglitazone on ovarian function and fertility in animals with reduced fertility following fetal and neonatal exposure to nicotine. *Endocrine* 36: 281–290, 2009.
- Pijnenborg R, Robertson WB, Brosens I, Dixon G. Review article: trophoblast invasion and the establishment of haemochorial placentation in man and laboratory animals. *Placenta* 2: 71–91, 1981.
- Rampon C, Bouillot S, Climescu-Haulica A, Prandini MH, Cand F, Vandenbrouck Y, Huber P. Protocadherin 12 deficiency alters morphogenesis and transcriptional profile of the placenta. *Physiol Genomics* 34: 193–204, 2008.
- Rieusset J, Seydoux J, Anghel SI, Escher P, Michalik L, Soon Tan N, Metzger D, Chambon P, Wahli W, Desvergne B. Altered growth in male peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARGamma) heterozygous mice: involvement of PPARgamma in a negative feedback regulation of growth hormone action. *Mol Endocrinol* 18: 2363–2377, 2004.

41. Sapin V, Ward SJ, Bronner S, Chambon P, Dolle P. Differential expression of transcripts encoding retinoid binding proteins and retinoic acid receptors during placentation of the mouse. *Dev Dyn* 208: 199–210, 1997.
42. Schaiff WT, Barak Y, Sadovsky Y. The pleiotropic function of PPAR gamma in the placenta. *Mol Cell Endocrinol* 249: 10–15, 2006.
43. Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. *Lancet* 365: 785–799, 2005.
44. Su MT, Lin SH, Chen YC, Kuo PL. Gene-gene interactions and risk of recurrent miscarriages in carriers of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor and prokineticin receptor polymorphisms. *Fertil Steril* 102: 1071–1077.e3, 2014.
45. Tarrade A, Lai Kuen R, Malassiné A, Tricottet V, Blain P, Vidaud M, Evain-Brion D. Characterization of human villous and extravillous trophoblasts isolated from first trimester placenta. *Lab Invest* 81: 1199–1211, 2001.
46. Tarrade A, Schoonjans K, Pavan L, Auwerx J, Rochette-Egly C, Evain-Brion D, Fournier T. PPARGgamma/RXRalpha heterodimers control human trophoblast invasion. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 5017–5024, 2001.
47. Wu L, de Bruin A, Saavedra HI, Starovic M, Trimboli A, Yang Y, Opavska J, Wilson P, Thompson JC, Ostrowski MC, Rosol TJ, Woollett LA, Weinstein M, Cross JC, Robinson ML, Leone G. Extra-embryonic function of Rb is essential for embryonic development and viability. *Nature* 421: 942–947, 2003.



EG-VEGF, BV8, and their receptor expression in human bronchi and their modification in cystic fibrosis: Impact of CFTR mutation (delF508)

Sylvain Chauvet,^{1,2,3} Wael Traboulsi,^{2,3,4} Laura Thevenon,^{2,3,4} Amal Kouadri,^{1,2,3} Jean-Jacques Feige,^{2,3,4} Boubou Camara,⁵ Nadia Alfaidy,^{2,3,4} and Mohamed Benharouga^{1,2,3}

¹Centre National de la Recherche Scientifique, LCBM-UMR 5249, Grenoble, France; ²Commissariat à l'Energie Atomique, DSV-IRTSV, Grenoble, France; ³Grenoble Alpes Université, Grenoble, France; ⁴Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1036, Grenoble, France; and ⁵Centre de Ressources et de Compétences pour la Mucoviscidose, Clinique Universitaire de Pneumologie-Pole Thorax et Vaisseaux, CHU de Grenoble, France

Submitted 15 December 2014; accepted in final form 22 May 2015

Chauvet S, Traboulsi W, Thevenon L, Kouadri A, Feige JJ, Camara B, Alfaidy N, Benharouga M. EG-VEGF, BV8, and their receptor expression in human bronchi and their modification in cystic fibrosis: Impact of CFTR mutation (delF508). *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 309: L314–L322, 2015. First published June 5, 2015; doi:10.1152/ajplung.00382.2014.—Enhanced lung angiogenesis has been reported in cystic fibrosis (CF). Recently, two highly homologous ligands, endocrine gland vascular endothelial growth factor (EG-VEGF) and mammalian Bv8, have been described as new angiogenic factors. Both ligands bind and activate two closely related G protein-coupled receptors, the prokineticin receptor (PROKR) 1 and 2. Yet, the expression, regulation, and potential role of EG-VEGF, BV8, and their receptors in normal and CF lung are still unknown. The expression of the receptors and their ligands was examined using molecular, biochemical, and immunocytochemistry analyses in lungs obtained from CF patients vs. control and in normal and CF bronchial epithelial cells. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) activity was evaluated in relation to both ligands, and concentrations of EG-VEGF were measured by ELISA. At the mRNA level, EG-VEGF, BV8, and PROKR2 gene expression was, respectively, approximately five, four, and two times higher in CF lungs compared with the controls. At the cellular level, both the ligands and their receptors showed elevated expressions in the CF condition. Similar results were observed at the protein level. The EG-VEGF secretion was apical and was approximately two times higher in CF compared with the normal epithelial cells. This secretion was increased following the inhibition of CFTR chloride channel activity. More importantly, EG-VEGF and BV8 increased the intracellular concentration of Ca²⁺ and cAMP and stimulated CFTR-chloride channel activity. Altogether, these data suggest local roles for epithelial BV8 and EG-VEGF in the CF airway peribronchial vascular remodeling and highlighted the role of CFTR activity in both ligand biosynthesis and secretion.

cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; lung angiogenesis; BV8/endocrine gland vascular endothelial growth factor; prokineticin receptors

CYSTIC FIBROSIS (CF) arises from mutations in the gene that encodes for the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) protein (9, 32), an epithelial apical cAMP- and ATP-regulated chloride channel (38). The most frequent mutation, deletion of phenylalanine at position 508 (delF508) in the first nucleotide-binding domain, is detected in ~70% of CF chromosomes (13). The delF508-CFTR protein is mis-

folded, virtually completely blocked, and rapidly eliminated at the endoplasmic reticulum (17).

CFTR protein dysfunction results in abnormal ion transport across the airway epithelium (7), progressively leading to the production of viscous mucus that obstructs the airways, underlying the subsequent inflammatory reactions and infections. Both processes combined with progressive bronchiectasis lead to the development of airway structural abnormalities that include subepithelial fibrosis, remodeling of airway epithelium and submucosal glands, and hyperplasia of airway smooth muscles (4, 31).

Airway remodeling in CF and other obstructive airway disorders is known to result from a long-standing bronchial inflammation (35, 39). Inflammatory mediators and growth factors have the capacity to cause cell infiltration and epithelial injury and to increase bronchial vascularization. The latter is due to the activation of the angiogenic process, which contributes to increase the portal entry for inflammatory cells (40). The magnitude of the vascular remodeling is correlated to the degree of inflammation resulting from infection, since it is not observed, to such extent, in noninfective chronic inflammation (40).

Signs of excessive angiogenesis have been reported in CF patients who develop highly vascularized nasal polyps requiring surgical resection. Moreover, angiogenesis-related complications, such as pulmonary hemorrhage and hemoptysis, are frequent in CF patients (11). Altogether these findings suggest that angiogenesis processes might contribute to the pathogenicity of CF. Nevertheless, the underlying angiogenic mechanisms associated with CF development and its aggravation are still unknown.

In CF patients, the increased pulmonary microvascular density associated with a significant increase in circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) was first reported by Crawford et al. (8). The increase in the circulating VEGF levels was observed in subjects with CF and in subjects with other pulmonary inflammatory disorders. However, in CF, this increase was correlated to the level of bacterial infection and chronic airway inflammation (8).

Hence, elevations in circulating VEGF might promote pulmonary angiogenesis, which participates in the progression of the disease in the lung (27). The production of VEGF, and the induction of angiogenesis, is commonly interpreted as a consequence of the inflammation process. Importantly, Verhaeghe et al. (37) reported that local overproduction of proangiogenic factors in CF fetal human tracheal epithelial cells was sufficient to stimulate angiogenesis. Their results suggest that the intrinsic

Address for reprint requests and other correspondence: M. Benharouga, LCBM-UMR5249, DSV-IRTSV, CEA-Grenoble, 17 rue des Martyrs, F-38054, Grenoble cedex 09, France (e-mail: mohamed.benharouga@cea.fr).

Table 1. Clinical characteristics of control and CF subjects

	Control (n = 10)	CF (n = 10)
Male sex, n	7	8
Female sex, n	3	2
Age, yr	60–67 (10)	42 (1), 21 (6), 31 (3)
CFTR genotype, n		
F508del/F508del	0	7
F508del/2184delA	0	2
delF508/R798	0	1
Bronchial colonization		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	10

n, No. of subjects; CF, cystic fibrosis; CFTR, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator.

sic proangiogenic status of the CF respiratory epithelial cells contributes to the development of lung angiogenesis. Recently, Martin et al. (24) investigated the role of VEGF-A in the peribronchial pulmonary vascularization. They demonstrated that the airway epithelium is the main site of VEGF-A expression that was increased in CF patients and in *Cfr*-deficient mice. Also, they reported that the inhibition of CFTR activity induced a twofold increase in VEGF-A production. Altogether these data suggest that angiogenic factors might contribute the lung pathogenesis of CF.

During the last decade, two highly homologous cysteine-rich peptides, prokineticin 1 (PROK1) and prokineticin 2 (PROK2), were described as new angiogenic factors that are increased in response to stressful conditions such as hypoxia, inflammation, and abnormal vascularization (28). PROK1, also known as endocrine gland vascular endothelial growth factor (EG-VEGF), based on the functional similarities to VEGF, stimulates endocrine gland cell proliferation/migration and promotes angiogenesis in the mouse ovary, placenta, and cardiac tissue (2, 19). PROK2, or mammalian Bv8, is believed to affect behavioral circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus and to promote angiogenesis in the testis and cardiac tissue (6, 18). PROKs bind and activate two closely related G protein-coupled receptors, prokineticin receptor 1 (PROKR1) and 2 (PROKR2), which are 87% identical (21, 34). PROKs stimulate Ca^{2+} mobilization in PROKR-expressing cells, presumably through a receptor/ G_q protein interaction (21, 34). Pertussis toxin inhibits EG-VEGF-induced mitogen-activated protein kinase signaling (21), suggesting that EG-VEGF may also be coupled to G_i proteins. In addition, signal transduction studies showed that these ligands induce cAMP accumulation in PROKR-expressing cells, indicating that PROKR2s are also coupled to G_s proteins (5).

These peptides and their receptors were reported to localize in the brain, dorsal root ganglia neurons, granulocytes, placenta, and testis (12, 29). Yet the expression, localization, regulation, and potential role of EG-VEGF/BV8 and their respective receptors in normal and CF lung angiogenesis are still unknown.

The present work aimed at determining the expression profiles of EG-VEGF/BV8 and their receptors in the lung tissues from CF subjects compared with control nonsmokers. Because the airway epithelium appeared as an important site of EG-VEGF/BV8 and PROKR expression in CF airways, we further studied the impact of CFTR chloride channel activity on EG-VEGF/BV8 synthesis, secretion, and function in established normal and CF airway epithelial cells.

MATERIALS AND METHODS

Human tissues collection. Peripheral human lung tissues (containing noncartilaginous airways) were obtained at the time of lung transplantation from 10 nonsmoking CF adults and from 10 nonsmoking controls undergoing lung resection for peripheral lung cancer (Grenoble Hospital). Clinical characteristics of these patients are provided in Table 1. Lung tissue samples were fixed in 10% neutral buffered formalin by inflation immersion and embedded in paraffin. To reduce the potential sampling bias related to irregular distribution of morphological abnormalities in CF patients, tissues were obtained from two to four blocks, whose locations were chosen randomly. In control subjects, only one block was available for the study. Collection and processing of human lungs conformed to the Declaration of Helsinki and to all rules of the local Committees on Human Research. Informed consent was obtained from each patient.

Immunohistochemistry. In this study, we also used ready 5- μ m paraffin-embedded sections prepared from human CF and non-CF peripheral lung tissues. Slides were generously obtained from Lantuejoul, (Department of Anatomopathology, Grenoble Hospital). Immunohistochemistry was performed as described previously (10). For antigen detection, sections were incubated with the following antibodies: anti-BV8, anti-EGVEGF, anti-PROKR1, and anti-PROKR2 (Covalab). Immunopositive staining was detected using a Vectastain ABC kit (Vector Labs), using DAB as the chromagen (Vector Labs). Slides were counterstained using hematoxylin and eosin (Sigma Aldrich).

Cell culture. We used the human alveolar adenocarcinoma cell line A549 and human bronchiolar epithelial cell lines 16HBE14o- expressing wild-type CFTR (HBE) and CFBE41o- (CFBE) derived from a cystic fibrosis patient, homozygous for the delF508 allele (delF508/delF508) (generous gift from Dieter Gruenert, University of California at San Francisco).

The cells were grown, respectively, in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) and in Eagle's minimal essential medium supplemented with 10% fetal bovine serum (Invitrogen), glutamine, penicillin, and streptomycin at 37°C under 5% CO_2 and routinely grown, respectively, in normal plastic dishes or in plastic dishes coated with an extracellular matrix containing fibronectin, collagen, and bovine serum albumin.

To ensure the development of differentiated monolayers, some experiments were performed after culturing HBE and CFBE cells for 3–5 days at confluence on 12-mm Transwell polycarbonate filters (0.4- μ m pore size). Differentiation of the epithelia was verified by the accumulation of zonula occludens-1 at tight junctions and by trans-epithelial electrical resistance measurement (data not show).

Extraction of total RNA and reverse transcription. Total RNA was extracted from lung tissues. The extraction was performed according

Table 2. Primers used for real-time PCR

ADNc	Primer Sequence 5'→3'	Size, bp
EG-VEGF	FW: AGGTCCCCTTCTTCAGGAAACG BW: TCCAGGCTGTGCTCAGGAAAG	171
Bv8	FW: TGTGACAAGGACTCCCAATGTGGTG BW: CCGCCCAAAAATGGAACCTTACG	141
Bv8L	FW: CTATGGGCAAACTGGGAGAC BW: AGACATGGGCAAGTGATG	1
PROKR1	FW: CGGCATTGGAAACTTCATCT BW: GTGCGCAGGTAGTTGACAGA	338
PROKR2	FW: CACCATGACCCTGTGCTATG BW: ACAGTGGGAAGAAGTCACG	198
18S	FW: AAACGGCTACCACATCCAAG BW: CCTCCAATGGATCCTCGTTA	155

EG-VEGF, endocrine gland vascular endothelial growth factor; PROKR, prokineticin receptor; FW, forward, BW, backward (reverse primer).

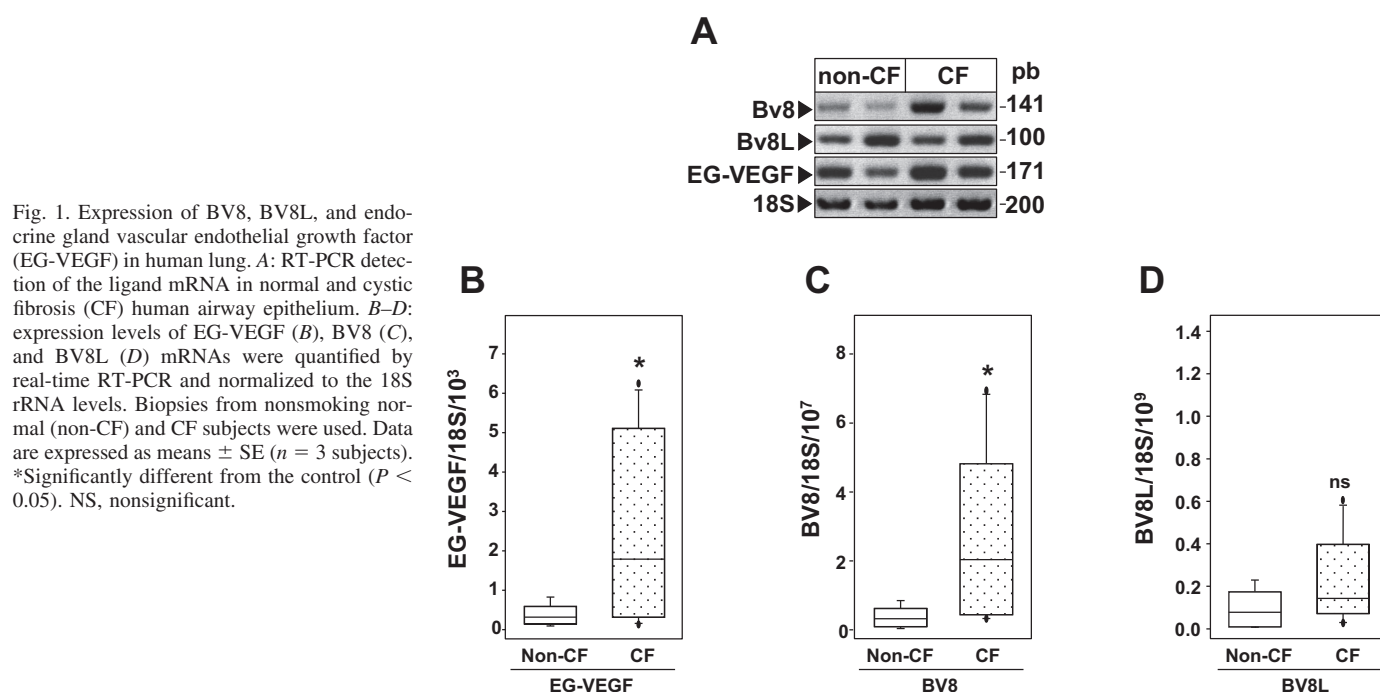


Fig. 1. Expression of BV8, BV8L, and endocrine gland vascular endothelial growth factor (EG-VEGF) in human lung. **A**: RT-PCR detection of the ligand mRNA in normal and cystic fibrosis (CF) human airway epithelium. **B–D**: expression levels of EG-VEGF (**B**), BV8 (**C**), and BV8L (**D**) mRNAs were quantified by real-time RT-PCR and normalized to the 18S rRNA levels. Biopsies from nonsmoking normal (non-CF) and CF subjects were used. Data are expressed as means $\pm$ SE ($n = 3$ subjects). *Significantly different from the control ($P < 0.05$). NS, nonsignificant.

to the manufacturer's protocol (RNAagents; Promega). Total RNA (1 μ g) was used in reverse transcription using Superscript II-RNaseH reverse transcriptase under conditions recommended by the manufacturer (Invitrogen).

Quantitative polymerase chain reaction. BV8, BV8L, EG-VEGF, PROKR1, and PROKR2 mRNAs and 18S rRNA expressions were quantified by real-time PCR using a Light Cycler apparatus (Bio-Rad). The PCR was performed using the primers shown in Table 2

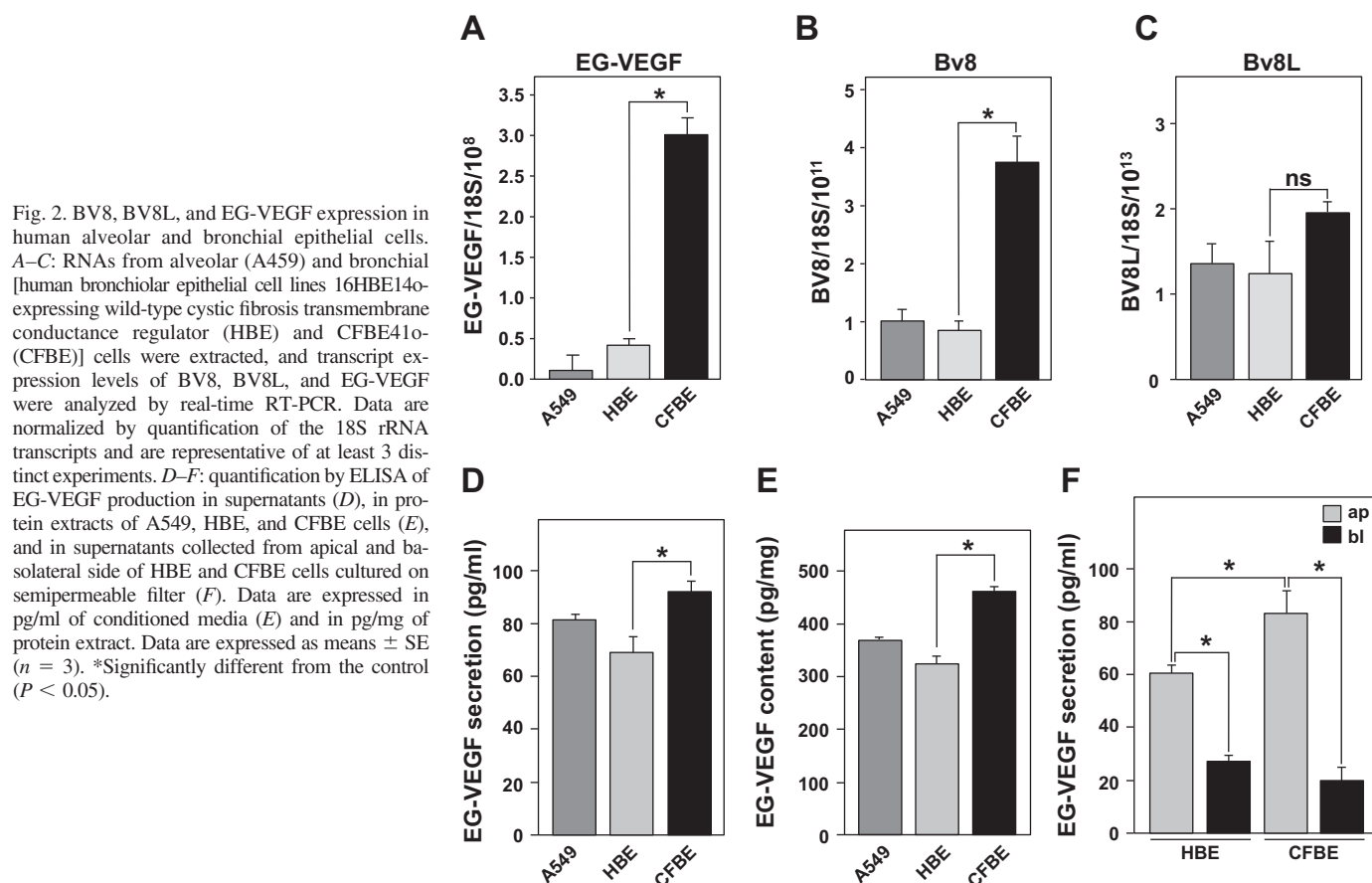


Fig. 2. BV8, BV8L, and EG-VEGF expression in human alveolar and bronchial epithelial cells. **A–C**: RNAs from alveolar (A549) and bronchial [human bronchiolar epithelial cell lines 16HBE14o-expressing wild-type cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (HBE) and CFBE41o-(CFBE)] cells were extracted, and transcript expression levels of BV8, BV8L, and EG-VEGF were analyzed by real-time RT-PCR. Data are normalized by quantification of the 18S rRNA transcripts and are representative of at least 3 distinct experiments. **D–F**: quantification by ELISA of EG-VEGF production in supernatants (**D**), in protein extracts of A549, HBE, and CFBE cells (**E**), and in supernatants collected from apical and basolateral side of HBE and CFBE cells cultured on semipermeable filter (**F**). Data are expressed in pg/ml of conditioned media (**E**) and in pg/mg of protein extract. Data are expressed as means $\pm$ SE ($n = 3$). *Significantly different from the control ($P < 0.05$).

and SYBR green PCR core reagents according to the manufacturer's instructions (Bio-Rad). The PCR condition and cycle were as follows: initial DNA denaturation 10 min at 95°C, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 s, follow by an annealing step, and then extension at 60°C during 1 min. Each point was performed in triplicate. To ensure that the primers produced a single and specific PCR amplification product, a dissociation curve was performed during the PCR cycle, and only primers with a unique dissociation peak were selected, followed by migration on a 2% agarose gel to ensure that the PCR product was unique. The PCR products were then sequenced to confirm that the correct cDNA was amplified. The expression level of each gene was adjusted by the level of 18S mRNA and expressed as the ratio to 18S mRNA. The CFX Manager software was used to quantify levels of expression (Bio-Rad).

Electrophoresis and immunoblotting. Protein extracts, prepared as previously described (10), were subjected to an SDS-PAGE (12%) and immunoblot analysis using rabbit polyclonal anti-PROKR1 and -PROKR2 (Covalab), and monoclonal anti- β -actin (Hybridoma Bank, University of Iowa). Images were captured using the Molecular Imaging acquisition system (Vilber Lourmat).

Intracellular Ca^{2+} mobilization assays. To evaluate intracellular Ca^{2+} mobilization flowing BV8 or EGVEGF stimulations, HBE and CFBE cells were seeded in poly-D-lysine-coated 96-well black wall tissue culture plates (BD Biosciences).

Ligand-stimulated Ca^{2+} mobilization was assayed using fluo 3 Ca^{2+} dye (Invitrogen) at a final concentration of 4 μM in dye loading buffer [DMEM F-12 medium without phenol red (Invitrogen) containing 2.5 mM probenecid] at room temperature for 1 h. Cells were then washed one time with dye loading buffer, and calcium mobilization in response to BV8 and EG-VEGF was assayed in a fluorometric imaging plate reader (Infinite M200; TECAN) as described previously (22).

Measurements of cAMP levels. For the measurement of cAMP mobilization, HBE and CFBE cells were plated into 12-well plates (1.5×10^6 cells/well). After 2 days of culture, cells were pretreated for 30 min with 0.5 mM 3-isobutyl,1-methylxanthine in serum-free medium before the addition of EG-VEGF or BV8 for 24 h. Intracellular cAMP concentrations were measured using the cAMP enzyme immunoassay system (GE Healthcare, Indianapolis, IN) as recommended by the manufacturer.

Measurement of the cAMP-stimulated CFTR activity. The plasma membrane cAMP-dependent halide conductance of HBE and CFBE cells was determined using iodide efflux as previously described (33). Iodide efflux was initiated by replacing the loading buffer with efflux medium (composed of 136 mM nitrate instead of iodide). The extracellular medium was replaced every minute with efflux buffer (1 ml). After the steady state was reached, the intracellular cAMP level was raised by agonists (10 μM forskolin, 0.2 mM CTP-cAMP, and 0.2 mM isobutyl methylxanthane) to achieve maximal phosphorylation of the CFTR protein. The collection of the efflux medium resumed for an additional 6–9 min. The amount of iodide in each sample was determined with an iodide-selective electrode (Orion).

EG-VEGF quantification by ELISA. EG-VEGF secretion was measured by ELISA (PeproTech) in the cell culture-conditioned media. Two separated standard curves were constructed to allow accurate readings of samples at upper and lower ranges of the assay. All samples were in the linear range of the standard curves. The detection limit of the assay was 16 pg/ml. Data were expressed as pictograms per milligram of protein extracted from HBE and CFBE.

Data analysis. Data are presented as mean values $\pm$ SE. Statistical comparisons were made using unpaired data Student's *t*-test. Differences were considered significant when $P < 0.05$.

RESULTS

CF tissues and CF cells differentially express and secrete BV8 and EG-VEGF. Previous gene expression profile analysis reported an upregulation of numerous proangiogenic genes in CF cells, namely basic fibroblast growth factor, fibroblast growth factor 5, placental growth factor, platelet-derived growth factor-C, platelet-derived growth factor- α polypeptide, angiopoietin 1, VEGF-A, and VEGF-C (37). However, the expression profiles of the new angiogenic factors, BV8 and EG-VEGF, has not yet been investigated. In CF lung tissue explants, both BV8 and EG-VEGF mRNA levels were upregulated compared with the control tissue (Fig. 1, A–C).

An alternatively spliced product of the BV8 gene encoding 21 additional amino acids compared with BV8, and designated as BV8L (for BV8 long form), has been shown to be broadly expressed. Compared with BV8, BV8L mRNA expression was shown to be lower in the brain, undetectable in the kidney, and higher in the lung and the spleen (5).

In CF, the mRNA level of BV8L did not show any significant changes compared with the control (Fig. 1, A and C), suggesting that BV8L has a limited role in CF.

At the cellular level, similar results were observed. The levels of EG-VEGF and BV8 mRNA were, respectively, approximately

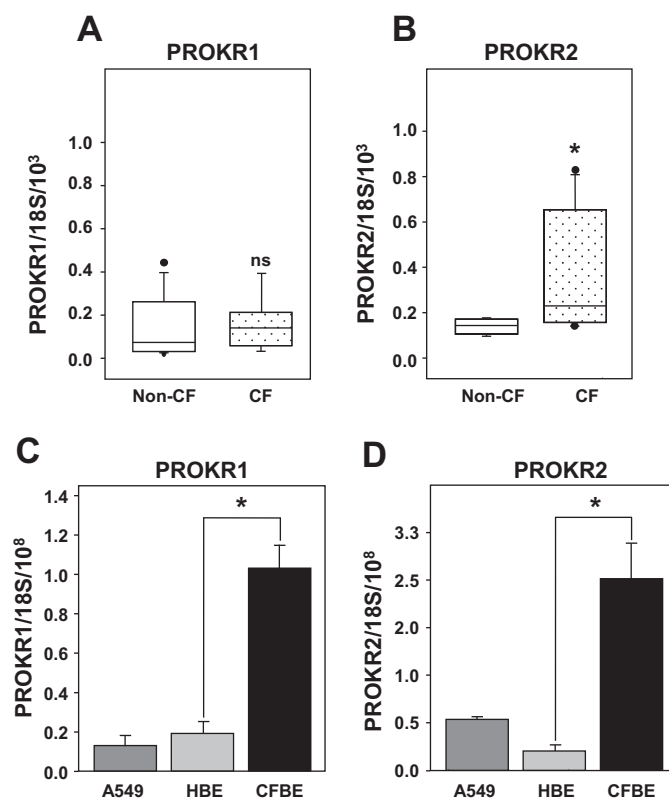
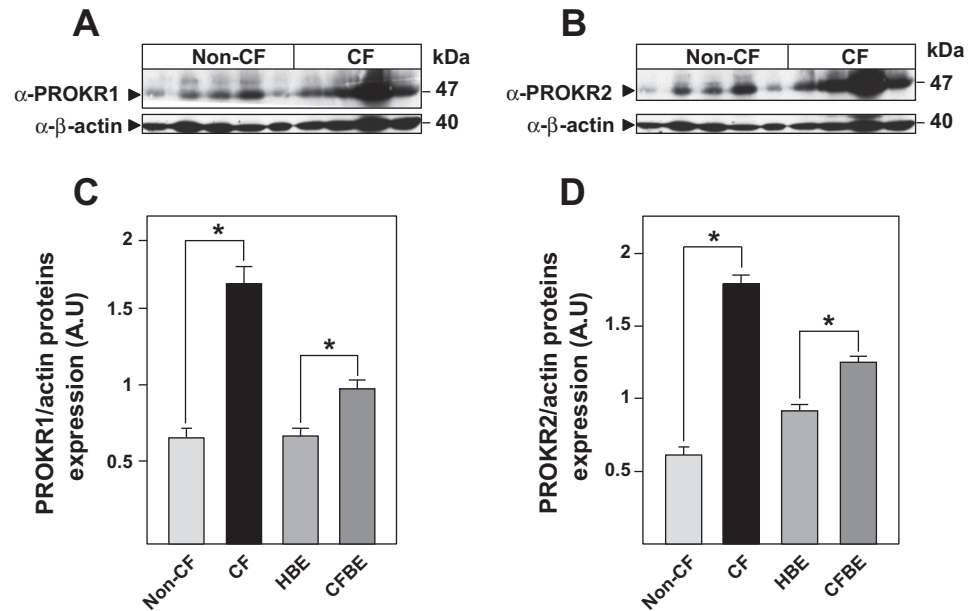


Fig. 3. Expression of prokineticin receptor (PROKR) 1 and 2 mRNA in normal and CF human lung. A and B: expression levels of PROKR1 (A) and PROKR2 (B) mRNAs were quantified by real-time RT-PCR and normalized to the 18S rRNA levels. Biopsies from non-CF and CF subjects were used. Data are expressed as means $\pm$ SE ($n = 3$). *Significantly different from the control ($P < 0.05$). C and D: RNAs from alveolar (A549) and bronchial (HBE and CFBE) cells were extracted, and transcript expression levels of PROKR1 (C) and PROKR2 (D) were analyzed by real-time RT-PCR. Data are normalized by quantification of the 18S rRNA transcripts and are representative of at least 3 distinct experiments.

Fig. 4. Protein expression of PROKR1 and PROKR2 in normal and CF human lung. *A* and *B*: expression of PROKR1 (*A*) and PROKR2 (*B*) proteins in non-CF and CF human lung tissues and in HBE and CFBE cell lines was monitored with immunoblotting using polyclonal anti-PROKR1 and anti-PROKR2 antibodies, and the enhanced chemiluminescence detection system (ECL). Black arrowheads indicate the corresponding proteins (47 kDa). The blot is representative of 3 independent experiments. Expression of β -actin was monitored with monoclonal anti- β -actin antibodies. *C* and *D*: Image J quantification of the expression levels of the PROKR1 (*C*) and PROKR2 (*D*) protein standardized to β -actin expression. Data are expressed as means $\pm$ SE ($n = 3$). *Significantly different from the corresponding control ($P < 0.05$).



six and four times higher in CF cells (CFBE) compared with HBE cells (Fig. 2, *A* and *B*). Similar to the data obtained with the tissue analysis, no significant difference in BV8L mRNA levels could be observed between HBE and CFBE cells (Fig. 2*C*). There was no difference in the BV8L expression in bronchial and alveolar cells (Fig. 2*C*). The increase in EG-VEGF levels in CFBE cells was further investigated by comparing its secretion and content in A549, HBE, and CFBE cells using ELISA test. Figure 2, *D* and *E*, shows that both EG-VEGF secretion and content are significantly

increased in CF cells. These data substantiate the findings at the mRNA levels and demonstrate that EG-VEGF secretion is also increased in CF cells. These results also suggest that CFTR protein might prompt EG-VEGF secretion. To get more insight into the site of EG-VEGF secretion by the polarized HBE and CFBE epithelial cells, apical and basolateral media were collected, and EG-VEGF were evaluated. The results indicated in Fig. 2*F* show that in both cells type EG-VEGF secretion was mainly apical.

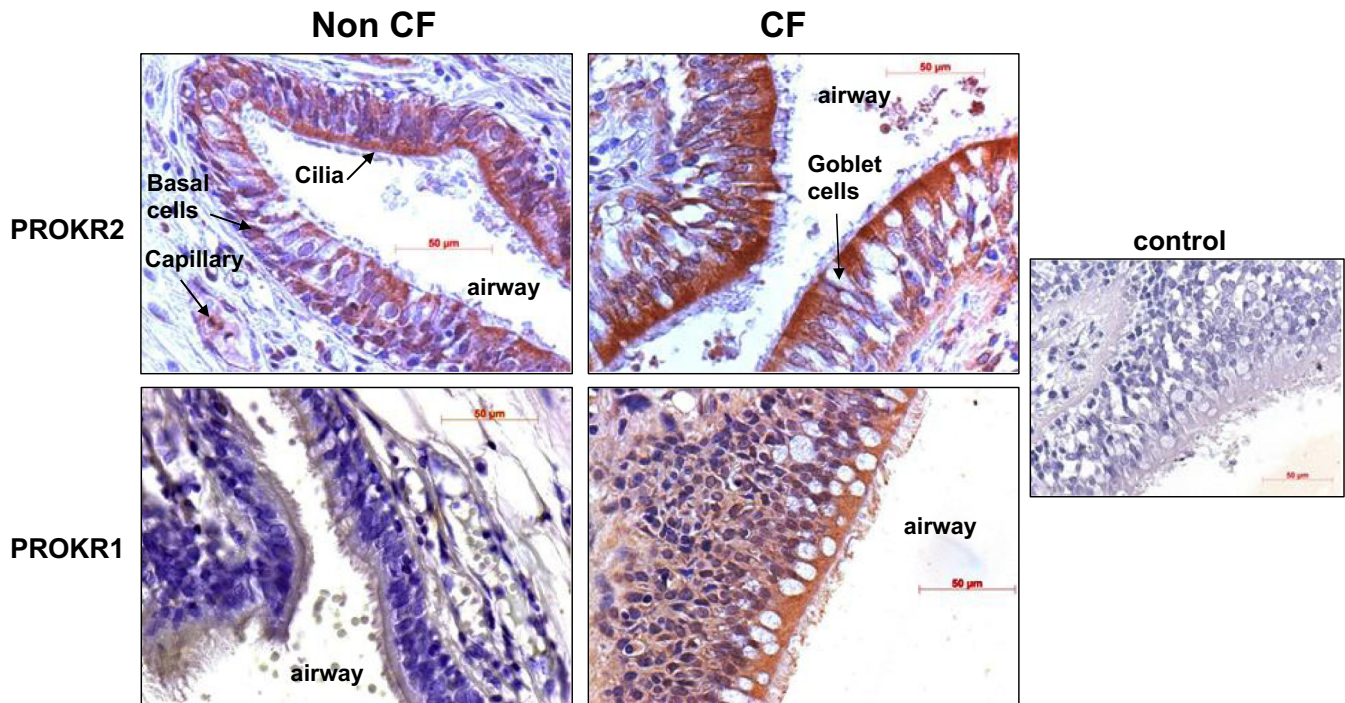


Fig. 5. Representative photomicrographs of PROKR1 and PROKR2 immunostaining in human airways. Airway sections were obtained in human control patients (non-CF) vs. CF patients. Sections were stained with an antibody to PROKR1 or PROKR2 (brown color) and counterstained with hematoxylin and eosin. Photomicrographs were representative of results obtained in 6 controls and in 6 CF patients. Omission of primary antibodies or incubation with rabbit or mouse serum eliminated staining in control sections (undersized photographs). Scale bars 50 μ m.

PROKR1 and PROKR2 are highly expressed in CF. BV8 and EG-VEGF share two cognate GPCRs receptors (PROKR1 and PROKR2) that share 80–90% identity (21, 34). We compared the levels of expression of the two receptors in CF and non-CF conditions. Using quantitative RT-PCR, only PROKR2 was highly expressed in CF tissues compared with normal specimens (Fig. 3, A and B).

However, both receptors were highly expressed in CF cells (CFBE) compared with normal ones (HBE) (Fig. 3, C and D). No differences in the level of expression of PROKR1 and PROKR2 were observed when comparing bronchial with alveolar cells (Fig. 3, C and D).

At the protein level, with the use of Western blotting analysis, both receptors were upregulated in CF lung tissues and were retrieved at a band around 47 kDa (Fig. 3, A and B), as already described (29). Quantification of independent experiments indicated that PROKR1 and PROKR2 are highly expressed, not only in CF tissues, but also in CFBE cells (Fig. 4, C and D).

PROKR1 and PROKR2 are expressed on the cell surface of respiratory epithelial cells. To get more insights into the cellular expression of PROKR1 and PROKR2 in the human lungs and compare their localizations in CF and non-CF lung tissues, we performed immunohistochemistry. Figure 5 shows that normal lung tissues express more PROKR2 than PROKR1. The intensities of expression for both receptors increased in the CF tissue sections. More importantly, in the CF condition, both receptors appear more concentrated at the apical membrane of the basal cells and within the goblet cells. Strong staining could also be observed for PROKR2 in the endothelial cells within the capillaries (Fig. 5). These findings

suggest that PROKR1 and PROKR2 might play important roles in the respiratory functions both under physiological and pathological conditions.

BV8 and EG-VEGF stimulate Ca^{2+} mobilization and cAMP production and activate chloride ion secretion. BV8 and EG-VEGF have been reported to stimulate Ca^{2+} mobilization in PROKR-expressing cells (21, 34). We compared BV8 and EG-VEGF stimulation of Ca^{2+} mobilization in HBE and CFBE cells. Our results showed that both ligands significantly stimulate Ca^{2+} mobilization in HBE and CFBE cells (Fig. 6A). There was no difference in the levels of mobilized Ca^{2+} upon EG-VEGF and BV8 treatment in HBE and CFBE cells.

Because PROKR1 and PROKR2 activations were reported to stimulate cAMP accumulation, we examined their effects on cAMP accumulation in HBE and CFBE cells. In the absence of these ligands, only a basal cAMP production was detected. BV8 or EG-VEGF at 50 ng/ml significantly increased cAMP production in HBE. This increase was more important in the CFBE cells (Fig. 6B).

Consistent with the notion that cAMP accumulation accounts, at least in part, for the CFTR chloride channel activity, we evaluated the cAMP-activated anion conductance of the plasma membrane (Fig. 6C). As expected, CFBE cells did not show any iodide compared with HBE cells that endogenously express the wild-type CFTR (Fig. 6C). The treatment of HBE cells with BV8 or EG-VEGF showed a significant increase in the CFTR activity (Fig. 6D). These data suggest that EG-VEGF/BV8 through the activation of their receptors might play an important role in the physiological processes of normal and CF human lung function.

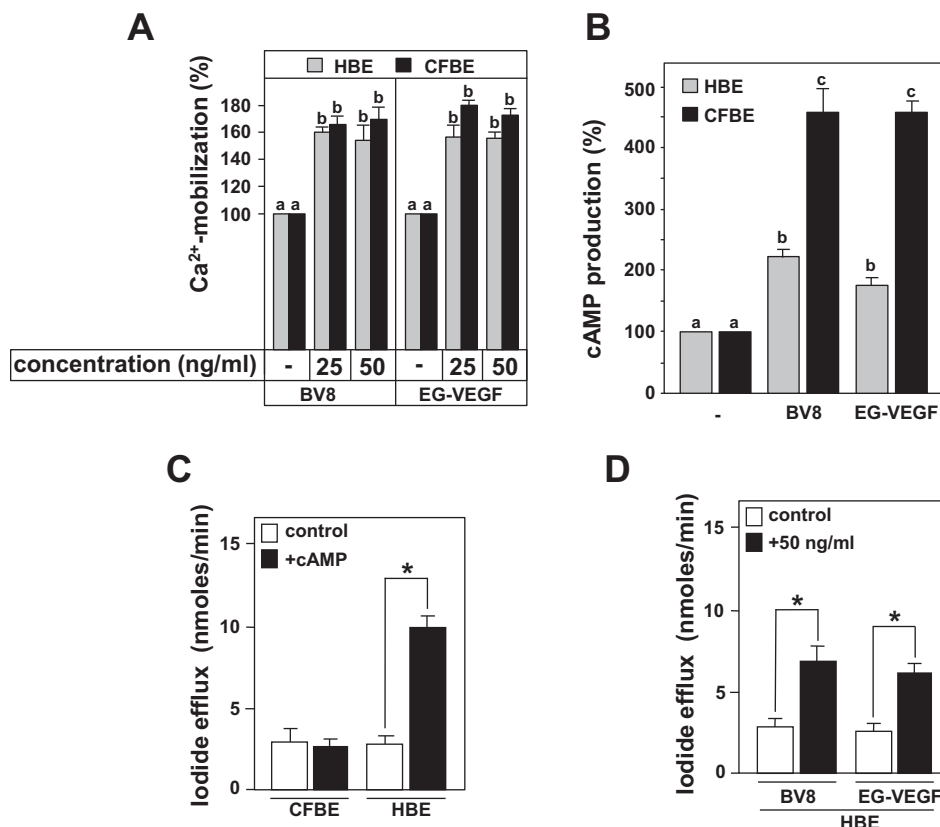


Fig. 6. A: evaluation of intracellular Ca^{2+} mobilization following BV8 and EG-VEGF stimulation in HBE and CFBE cells. Intracellular Ca^{2+} was measured as indicated in MATERIALS AND METHODS. B: stimulation of cAMP accumulation in HBE and CFBE cells following stimulation either with 50 ng BV8 or EG-VEGF. The accumulated cAMP was measured as indicated in MATERIALS AND METHODS. Data are expressed as means $\pm$ SE ($n = 3$). Values overwriten with different letters (a, b, c) are significantly different from each other ($P < 0.05$). C and D: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) activity was monitored using cAMP-stimulated iodide release from CFBE and HBE cells. The iodide efflux was measured after 1 and 2 min of cAMP-dependent protein kinase stimulation (C) or after 5 min stimulation by 50 ng of BV8 or EG-VEGF (D). Iodide release from CFBE and HBE cells is expressed as nmol/min (mean $\pm$ SE, $n = 4$, * $P < 0.05$).

Role of CFTR-mediated chloride secretion on BV8/EG-VEGF transcription and secretion. We showed in Fig. 2 that BV8 and EG-VEGF expression and EG-VEGF secretion were higher in CF cells (CFBE) compared with normal cells (HBE). Data in Fig. 6 reporting the iodide-efflux results (Fig. 6D) confirmed the presence of a cAMP-activated chloride channel. Nevertheless, the relationship between CFTR activity and BV8/EG-VEGF transcription and secretion had still to be established. Using CFTR-inh172 (10 μ M), a selective inhibitor of CFTR chloride channel activity (23), we observed an $\sim$ 1.5-fold increase in EG-VEGF secretion in HBE cells (Fig. 7A).

To examine whether the effect of CFTR inhibition on EG-VEGF secretion was related to a transcriptional effect, we evaluated EG-VEGF, BV8, PROKR1, and PROKR2 mRNA expression using QPCR. Treatment of HBE cells with CFTR-inh172 (10 μ M) induced a significant increase in EG-VEGF mRNA levels after 6 h of treatment (Fig. 7B).

The CFTR inhibition also increased BV8 and PROKR2 mRNA expression. We did not observe any significant effect on the mRNA expression levels of BV8L and PROKR1 (Fig. 7, C–F).

DISCUSSION

CF is the most common life-threatening inherited disease in the Caucasian population. Abnormal airway surface liquid results in recurrent lower respiratory tract infections, inflammation, and airway remodeling (4, 31). To our knowledge, this

is the first report concerning the expression, localization, and potential role of two new angiogenic factors, BV8 and EG-VEGF, and their receptors, PROKR1 and PROKR2, in normal and CF human lungs.

Our results show that the airway epithelium is an important site for BV8, EG-VEGF, PROKR1, and PROKR2 expression. This expression was increased in CF patients compared with control subjects. In the airway epithelial cell line carrying a homozygote CF mutation (delf508), both ligands and their receptors were highly expressed compared with the wild-type cells. In these cells, the absence or the inhibition of CFTR chloride secretion resulted in increased BV8 and EG-VEGF biosynthesis and secretion. The present study also suggests that PROKR1 and PROKR2 are functionally coupled to the CFTR protein through the mobilization of intracellular cAMP.

BV8, EG-VEGF, PROKR1, and PROKR2 were localized to ciliated cells and in their precursors, i.e., the basal cells. The immunolabeling of both receptors showed that PROKR1 and PROKR2 were localized to the apical plasma membrane, where CFTR normally resides. Similar localization was also reported for the β_2 -adrenergic receptor (36). EG-VEGF was secreted at the apical site of CFBE and HBE cells, suggesting a potential role of prokineticins at the airway site.

The immunostaining study also revealed a cytoplasm localization for these receptors that probably corresponds to their constitutively internalization process.

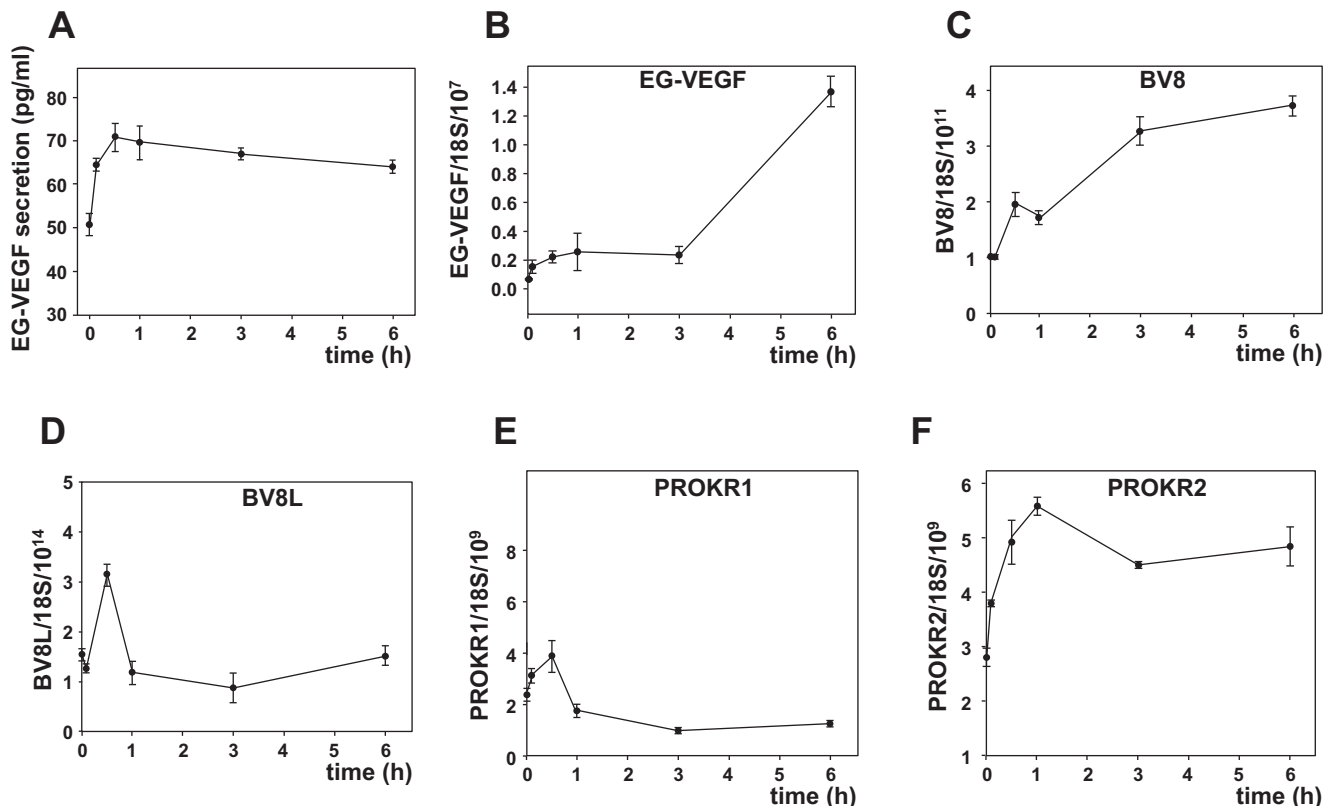


Fig. 7. Time-dependent effect of CFTR inhibition on the expression of prokineticin factors and their receptors and on EG-VEGF secretion. A: effect of selective CFTR inhibitors on EG-VEGF secretion in HBE cells. Secretion of EG-VEGF was evaluated in conditioned media using ELISA following HBE cell treatment with 10 μ M of CFTR-inh172 for the indicated times. B–F: effect of selective CFTR inhibitors on EG-VEGF (B), BV8 (C), BV8L (D), PROKR1 (E), and PROKR2 (F) expression in HBE cells. Cells were cultured in the absence or presence of 10 μ M of CFTR-inh172. mRNA expression was measured using quantitative PCR, and the results are standardized to the housekeeping gene 18S. All results were expressed as means $\pm$ SE of 3 independent experiments.

In the epithelial cell model, both receptors were functional, and their stimulation by the corresponding ligands mobilized intracellular calcium and cAMP, as previously reported (21, 26).

Our results show that human bronchial epithelial cells carrying the homozygous CFTR mutation $\Delta F508$ display a higher proangiogenic status compared with control epithelial cells. This proangiogenic status is characterized by an increased production of BV8, EG-VEGF, and PROKR2. For PROKR1 receptor, however, only its protein expression was upregulated in CF tissues and cells. These results suggest that both receptors are not regulated in the same way in normal and CF conditions. Our results suggest that BV8 and EG-VEGF should be considered as new angiogenic lung factors that might contribute to the increased angiogenesis observed in the CF disease.

Furthermore, these findings reveal that CF epithelial cells have the potential to efficiently induce angiogenesis through the release of multiple angiogenic factors, and raise the possibility that they could also initiate or increase the inflammation-related vascular remodeling in CF patients.

Our conclusion that CFTR dysfunction might trigger BV8 and EGVEGF synthesis is based on data obtained in cultured airway epithelial cells. Indeed, use of CF epithelial cells lacking apical chloride ion secretion or the inhibition of the CFTR activity in non-CF epithelial cells showed an increase in BV8/EG-VEGF biosynthesis and secretion.

Similar results were reported for the most potent angiogenic factor, VEGF-A. Verhaeghe et al. (37), using a human fetal cell line carrying the homozygous mutation $\Delta F508$, and Martin et al. (24), by inhibiting the function of CFTR protein in a normal airway epithelial cell line, reported increased VEGF-A synthesis compared with control human cells. Our data provided circumstantial evidence of a role for CFTR dysfunction in BV8/EG-VEGF production. Finally, the absence of CFTR activity induced both increased BV8/EG-VEGF mRNA and protein synthesis, suggesting a transcriptional effect. Further studies are required to determine whether the effect is related to mRNA synthesis and/or mRNA stabilization.

The increase of BV8/EG-VEGF synthesis in CFBE cells was independent of infection and inflammation. However, increased BV8/EG-VEGF expression observed in CF airway epithelium at transplantation could be related to multiple factors, such as proinflammatory cytokines, microbial products from bacteria (116, 25), and to a hypoxic environment (15).

It is well established that hypoxic environment might accompany CF disease in the lung as a result of the CF-associated oxidative stress (1, 3). Hypoxia is also known to upregulate BV8 and EG-VEGF (19, 20), suggesting that the increased levels of both ligands observed in CF might be a consequence of this phenomenon.

Because BV8 and EG-VEGF can regulate a wide variety of biological processes, including angiogenesis, and inflammatory responses (20, 30), their elevated expression in CF may reflect the severity and neutrophil predominance of inflammation in this disorder (14).

Higher BV8 and EG-VEGF levels in CF may also be related to airway infection and that both ligands may be used as sensitive surrogate markers of airway inflammation associated with airway infection. Further studies including subjects with CF, chronic bronchitis, and bronchiectasis would further clar-

ify the relationship between infection, inflammation, and BV8/EG-VEGF.

Our study highlights the ability of CF epithelial cells to intrinsically promote angiogenesis via the expression of angiogenic factors, including the EG-VEGF/Bv8 family. This suggests that therapies directly targeting a reduction in BV8/EG-VEGF synthesis and/or action to antagonized PROKR2 receptors could represent a promising method of reducing vascular remodeling in CF airways. Because angiogenesis is correlated with more severe pulmonary diseases, therapies based on the use of antiangiogenic factors could also be considered to reduce this phenomenon and to decrease the severity of the CF pathology.

GRANTS

This work was supported by the French Cystic Fibrosis Foundation [Vaincre la Mucoviscidose (VLM)] and ABCF Association for Cystic Fibrosis. S. Chauvet was supported by a Ph.D. Fellowship from VLM. We acknowledge the following sources of funding: Centre National de la Recherche Scientifique (LCBM-UMR 5249); Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (U1036), Commissariat à l'Energie Atomique/DSV/IRTSV, and Grenoble Alpes University.

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise are declared by the authors.

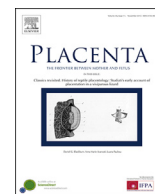
AUTHOR CONTRIBUTIONS

Author contributions: S.C., W.T., L.T., A.K., and M.B. performed experiments; S.C., W.T., L.T., and M.B. analyzed data; S.C. and M.B. prepared figures; S.C., W.T., L.T., J.-J.F., B.C., N.A., and M.B. approved final version of manuscript; J.-J.F., B.C., N.A., and M.B. edited and revised manuscript; N.A. and M.B. interpreted results of experiments; N.A. and M.B. drafted manuscript; M.B. conception and design of research.

REFERENCES

- Bradley S, Solin P, Wilson J, Johns D, Walters EH, Naughton MT. Hypoxemia and hypercapnia during exercise and sleep in patients with cystic fibrosis. *Chest* 116: 647–654, 1999.
- Brouillet S, Hoffmann P, Feige JJ, Alfaidy N. EG-VEGF: a key endocrine factor in placental development. *Trends Endocrinol Metab* 23: 501–508, 2012.
- Buchdahl RM, Babiker A, Bush A, Cramer D. Predicting hypoxaemia during flights in children with cystic fibrosis. *Thorax* 56: 877–879, 2001.
- Burgel PR, Montani D, Danel C, Dusser DJ, Nadel JA. A morphometric study of mucins and small airway plugging in cystic fibrosis. *Thorax* 62: 153–161, 2007.
- Chen J, Kuei C, Sutton S, Wilson S, Yu J, Kamme F, Mazur C, Lovenberg T, Liu C. Identification and pharmacological characterization of prokineticin 2 beta as a selective ligand for prokineticin receptor 1. *Mol Pharmacol* 67: 2070–2076, 2005.
- Cheng MY, Bullock CM, Li C, Lee AG, Bermak JC, Belluzzi J, Weaver DR, Leslie FM, Zhou QY. Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus. *Nature* 417: 405–410, 2002.
- Cohen TS, Prince A. Cystic fibrosis: a mucosal immunodeficiency syndrome. *Nat Med* 18: 509–519, 2012.
- Crawford S, Stellmach V, McColey S, Jacobitz J, Backer C. Elevated inducer of angiogenesis and increased microvascular density suggest a role for neovascularization in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol Suppl* 1997, p. 296.
- Cutting GR, Kasch LM, Rosenstein BJ, Zielenski J, Tsui LC, Antonarakis SE, Kazazian HH Jr. A cluster of cystic fibrosis mutations in the first nucleotide-binding fold of the cystic fibrosis conductance regulator protein. *Nature* 346: 366–369, 1990.
- Donadio S, Alfaidy N, De Keukeleire B, Micoud J, Feige JJ, Challis JR, Benharouga M. Expression and localization of cellular prion and COMMD1 proteins in human placenta throughout pregnancy. *Placenta* 28: 907–911, 2007.

11. Flume PA, Yankaskas JR, Ebeling M, Hulsey T, Clark LL. Massive hemoptysis in cystic fibrosis. *Chest* 128: 729–738, 2005.
12. Hoffmann P, Saoudi Y, Benharouga M, Graham CH, Schaal JP, Mazouni C, Feige JJ, Alfaidy N. Role of EG-VEGF in human placenta: physiological and pathological implications. *J Cell Mol Med* 13: 2224–2235, 2009.
13. Kerem E, Corey M, Kerem B, Durie P, Tsui LC, Levison H. Clinical and genetic comparisons of patients with cystic fibrosis, with or without meconium ileus. *J Pediatr* 114: 767–773, 1989.
14. Khan TZ, Wagener JS, Bost T, Martinez J, Accurso FJ, Riches DW. Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 151: 1075–1082, 1995.
15. Kim SR, Lee KS, Park HS, Park SJ, Min KH, Moon H, Puri KD, Lee YC. HIF-1 α inhibition ameliorates an allergic airway disease via VEGF suppression in bronchial epithelium. *Eur J Immunol* 40: 2858–2869, 2010.
16. Koff JL, Shao MX, Ueki IF, Nadel JA. Multiple TLRs activate EGFR via a signaling cascade to produce innate immune responses in airway epithelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294: L1068–L1075, 2008.
17. Kopito RR. Biosynthesis and degradation of CFTR. *Physiol Rev* 79: S167–S173, 1999.
18. LeCouter J, Ferrara N. EG-VEGF and Bv8, a novel family of tissue-selective mediators of angiogenesis, endothelial phenotype, and function. *Trends Cardiovasc Med* 13: 276–282, 2003.
19. LeCouter J, Kowalski J, Foster J, Hass P, Zhang Z, Dillard-Telm L, Frantz G, Rangell L, DeGuzman L, Keller GA, Peale F, Gurney A, Hillan KJ, Ferrara N. Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium. *Nature* 412: 877–884, 2001.
20. LeCouter J, Lin R, Tejada M, Frantz G, Peale F, Hillan KJ, Ferrara N. The endocrine-gland-derived VEGF homologue Bv8 promotes angiogenesis in the testis: Localization of Bv8 receptors to endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 2685–2690, 2003.
21. Lin DC, Bullock CM, Ehlert FJ, Chen JL, Tian H, Zhou QY. Identification and molecular characterization of two closely related G protein-coupled receptors activated by prokineticins/endocrine gland vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 277: 19276–19280, 2002.
22. Liu C, Wilson SJ, Kuei C, Lovenberg TW. Comparison of human, mouse, rat, and guinea pig histamine H₄ receptors reveals substantial pharmacological species variation. *J Pharmacol Exp Ther* 299: 121–130, 2001.
23. Ma T, Thiagarajah JR, Yang H, Sonawane ND, Folli C, Galletta LJ, Verkman AS. Thiazolidinone CFTR inhibitor identified by high-throughput screening blocks cholera toxin-induced intestinal fluid secretion. *J Clin Invest* 110: 1651–1658, 2002.
24. Martin C, Coolen N, Wu Y, Thevenot G, Touqui L, Pruliere-Escabasse V, Papon JF, Coste A, Escudier E, Dusser DJ, Fajac I, Burgel PR. CFTR dysfunction induces vascular endothelial growth factor synthesis in airway epithelium. *Eur Respir J* 42: 1553–1562, 2013.
25. Martin C, Thevenot G, Danel S, Chapron J, Tazi A, Macey J, Dusser DJ, Fajac I, Burgel PR. *Pseudomonas aeruginosa* induces vascular endothelial growth factor synthesis in airway epithelium in vitro and in vivo. *Eur Respir J* 38: 939–946, 2011.
26. Masuda Y, Takatsu Y, Terao Y, Kumano S, Ishibashi Y, Suenaga M, Abe M, Fukusumi S, Watanabe T, Shintani Y, Yamada T, Hinuma S, Inatomi N, Ohtaki T, Onda H, Fujino M. Isolation and identification of EG-VEGF/prokineticins as cognate ligands for two orphan G-protein-coupled receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 293: 396–402, 2002.
27. McColley SA, Stellmach V, Boas SR, Jain M, Crawford SE. Serum vascular endothelial growth factor is elevated in cystic fibrosis and decreases with treatment of acute pulmonary exacerbation. *Am J Respir Crit Care Med* 161: 1877–1880, 2000.
28. Monnier J, Samson M. Prokineticins in angiogenesis and cancer. *Cancer Lett* 296: 144–149, 2010.
29. Negri L, Lattanzi R, Giannini E, Canestrelli M, Nicotra A, Melchiorri P. Bv8/prokineticins and their receptors a new pronociceptive system. *Int Rev Neurobiol* 85: 145–157, 2009.
30. Ngan ES, Tam PK. Prokineticin-signaling pathway. *Int J Biochem Cell Biol* 40: 1679–1684, 2008.
31. Regamey N, Jeffery PK, Alton EW, Bush A, Davies JC. Airway remodelling and its relationship to inflammation in cystic fibrosis. *Thorax* 66: 624–629, 2011.
32. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245: 1066–1073, 1989.
33. Sharma M, Benharouga M, Hu W, Lukacs GL. Conformational and temperature-sensitive stability defects of the delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in post-endoplasmic reticulum compartments. *J Biol Chem* 276: 8942–8950, 2001.
34. Soga T, Matsumoto S, Oda T, Saito T, Hiyama H, Takasaki J, Kamohara M, Ohishi T, Matsushime H, Furuichi K. Molecular cloning and characterization of prokineticin receptors. *Biochim Biophys Acta* 1579: 173–179, 2002.
35. Sund M, Hamano Y, Sugimoto H, Sudhakar A, Soubasakos M, Yerramalla U, Benjamin LE, Lawler J, Kieran M, Shah A, Kalluri R. Function of endogenous inhibitors of angiogenesis as endothelium-specific tumor suppressors. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 2934–2939, 2005.
36. Taouil K, Hinnrasky J, Hologne C, Corlieu P, Klossek JM, Puchelle E. Stimulation of beta 2-adrenergic receptor increases cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression in human airway epithelial cells through a cAMP/protein kinase A-independent pathway. *J Biol Chem* 278: 17320–17327, 2003.
37. Verhaeghe C, Tabruyn SP, Oury C, Bours V, Griffioen AW. Intrinsic pro-angiogenic status of cystic fibrosis airway epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 356: 745–749, 2007.
38. Welsh MJ, Anderson MP, Rich DP, Berger HA, Denning GM, Ostedgaard LS, Sheppard DN, Cheng SH, Gregory RJ, Smith AE. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: a chloride channel with novel regulation. *Neuron* 8: 821–829, 1992.
39. Wilson JW, Bamford TL. Assessing the evidence for remodelling of the airway in asthma. *Pulm Pharmacol Ther* 14: 229–247, 2001.
40. Wilson JW, Robertson CF. Angiogenesis in paediatric airway disease. *Paediatr Respir Rev* 3: 219–229, 2002.



Inhibition of human placental endothelial cell proliferation and angiogenesis by netrin-4

M. Dakouane-Giudicelli ^{a,b,*}, S. Brouillet ^{d,e,f,g}, W. Traboulsi ^d, A. Torre ^b, G. Vallat ^b,
S. Si Nacer ^b, M. Vallée ^b, J.J. Feige ^{d,e,f}, N. Alfidy ^{d,e,f,1}, P. de Mazancourt ^{a,b,c,1}

^a Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 1179, Montigny Le Bretonneux, France

^b Université de Versailles Saint Quentin, En Yvelines, France

^c AP-HP Hôpital Ambroise Paré, Boulogne-Billancourt, France

^d Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 1036, Grenoble, France

^e Université Grenoble-Alpes, 38000 Grenoble, France

^f Commissariat à l'Energie Atomique (CEA), iRTSV-Biology of Cancer and Infection, Grenoble, France

^g Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble, Hôpital Couple-Enfant, Centre Clinique et Biologique d'Assistance Médicale à la Procréation, 38700 La Tronche, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 May 2015

Received in revised form

9 September 2015

Accepted 11 September 2015

Keywords:

Netrin-4

Placenta

HPEC

Angiogenesis

Human placenta

ABSTRACT

Introduction: Netrin-4 is a secreted member of the laminin-related protein family, known to be involved in axonal guidance and endothelial cell survival, proliferation, and migration. We have recently reported the cellular localization of netrin-4 and its receptor neogenin in human first trimester and term placenta. A strong expression of netrin-4 was observed in trophoblast and in endothelial cells, suggesting a potential role of this protein in placental angiogenesis. In relation to human pregnancy, it has been reported that circulating netrin-4 were increased in fetal umbilical cord blood of intrauterine growth restriction IUGR compared to normal pregnancy suggesting an adverse effect of this protein on placental and fetal development.

The aim of this study was to determine the role of netrin-4 in placental angiogenesis.

Methods: The effects of netrin-4 on proliferation, migration, tube-like organization, and spheroid sprouting of human placental microvascular endothelial cells (HPEC) were studied.

Results: We demonstrated that netrin-4 inhibits HPEC proliferation, tube-like formation, migration and spheroid sprouting, suggesting a direct role of netrin-4 in the regulation of intra-villus angiogenesis.

Discussion: This is the first report of an anti-angiogenic activity of netrin-4 in human placenta. This study brings new insights into netrin-4 roles in placental angiogenesis and suggests possible involvements of netrin-4 in angiogenesis-related pathologies such as IUGR.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Netrin-4 (formerly known as β netrin) is related to the laminin β chain [1]. Netrin-4 is one of the most extensively studied member of the netrin family (for a review, see Dakouane-Giudicelli et al., 2014 [2]). It is a secreted protein involved in neurite growth and migration orientation during the development of the central

* Corresponding author. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 1179, UFR des Sciences de la santé Simone Veil, 2 Avenue de la Source de la Bièvre, 78180, Montigny Le Bretonneux, France.

E-mail address: mbarka.dakouane-giudicelli@uvsq.fr (M. Dakouane-Giudicelli).

¹ Equal contribution.

nervous system [1]. Besides the central nervous system, netrin-4 has been shown to regulate multiple biological processes, including epithelial branching and morphogenesis in the lung [3], modulation of beta cell apoptosis signaling via dependence receptors in the pancreas [4], and binding to the laminin short arms to regulate basement membrane assembly in the salivary gland [5]. Netrin has also been reported to be involved in lymphangiogenesis, angiogenesis, and tumor growth [6]. In relation to tumor growth, netrin-4 has been shown to inhibit the proliferation of tumor renal, pancreatic and hepatic cells [25].

The biological effects of netrin-4 are mediated through two different classes of transmembrane receptors, neogenin and UNC5B, members of the neogenin/DCC (deleted in colorectal

cancer) and UNC5 families, respectively [7,8]. We have recently reported the presence of netrin-4 and its receptors neogenin and UNC5B in the human placenta [2,9]. We showed a strong netrin-4 and neogenin expression in placental endothelial cells within the villi, suggesting that netrin-4 might have an autocrine effect [2]. Moreover, netrin-4 might have both paracrine and autocrine effects since it was also found in the syncytiotrophoblast together with its receptor neogenin. In the villous cytotrophoblast cells, we reported that netrin-4 colocalized with its receptor UNC5B [2,9], whereas neogenin was absent. Other localizations of netrin-4 were observed in proximal extravillous and distal invasive cytotrophoblasts. Neogenin was also expressed by villous mesenchymal cells.

Here, we investigated the potential role of netrin-4 on placental angiogenesis and particularly on intra-villus angiogenesis. This process ensures placental development during the first trimester of pregnancy and was reported to be deregulated in placental pathologies associated with abnormal vascularization such as intra-uterine growth restriction IUGR [10–12], a disease that is associated with reduced angiogenesis in the placenta [10]. Importantly, a recent finding from Boutsikou and al 2014 [13] reported an increased cord blood netrin-4 level in a case of IUGR.

During placental development, some aspects of angiogenesis precede generation of vasculature and lead to the remodeling of the vascular plexus into a branched vascular tree to ensure increased nutritional and gas exchanges and efficient elimination of fetal wastes. Placental angiogenesis is dependent on various growth factors including the vascular endothelial growth factor VEGF and its receptor VEGFR2 [14], the PDGF/PDGF receptor [15], the angiotensin/TIE receptor [16], the TGF β /TGF β receptor [17], placental growth factor [18], the endocrine gland derived endothelial growth factor (EG-VEGF) [19] and basic fibroblastic growth factor (bFGF [20]).

Up to now, no data concerning the effect of netrin-4 on microvascular placental cells, a cell entity that is more closely related to vascular physiological and pathological placental development, was available. Hence, we investigated the role of netrin-4 on placental angiogenesis using primary isolated microvascular human placental endothelial cells. Key processes in angiogenesis were investigated *in vitro*, including proliferation, migration, spheroid formation and capillary like organization.

2. Materials and methods

2.1. Tissues collection

Placental collection was approved by the district and local hospital ethical committees, and performed according to the Poissy Hospital code of practice. All subjects gave written informed consent. For HPEC isolation, nine placental disk were obtained from nine healthy women with viable and healthy singleton fetuses undergoing Caesarian section between 38 and 40 weeks of gestation (wg).

2.2. Endothelial cell isolation

HPEC Cell Isolation. Primary HPECs were isolated from fetal vessels of human term placenta, as described elsewhere [19,21]. Term trimester placentas were used for technical reasons. The large size of the placenta at this gestational age allows the isolation of a sufficient number of endothelial cells. Also, at this gestational age, UNC5B and Neogenin receptors are both present [2,9]. HPECs were isolated from term placental villi by enzymatic perfusion of the fetal vasculature, followed by separation of the resulting cells on a Percoll density gradient. The cells were further purified by two-steps selection procedure, based on differential trypsinization

[21]. HPECs were used in our experiments between passage 3 and 5. Cells were cultured at 37 °C in 5% CO₂ in air (vol/vol) and relative humidity above 95%. HPECs were maintained in endothelial cell basal medium (MCDB131, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplemented with fetal bovine serum (FBS, 15%, Invitrogen), EGM 2 MV endothelial med single quote kit (Lonza, Basel, Switzerland), and antibiotics (1%). HPEC cells were passaged upon reaching confluence, typically every 3–4 days.

2.3. Assessment of HPEC proliferation

The effect of Netrin-4 on HPEC proliferation was determined using three different preparations of HPEC cells that were isolated from three different placentas. We used the direct visual cell counting with a hemocytometer. The cells were placed in 48-well plates (7×10^4 cell/well) and cultured overnight (37 °C, 5% CO₂). The cells were serum-starved for 24 h and then incubated in triplicate for 24 h in serum-free media containing 100, 200 or 500 ng/mL of netrin-4 diluted in PBS or in serum-free media containing PBS (control). The cells were subsequently washed in HBSS, trypsinized, and stained with crystal violet to be counted using a hemacytometer (Kova Classic slide 10; Hycor, Indianapolis, IN, USA).

We also studied the effect of Netrin-4 on the expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in three different placentas. The HPEC were cultured in medium supplemented with (PBS; control), netrin-4 ($n = 3$ each). After 24 h the cells were homogenized in RIPA buffer containing 1 mmol/L phenylmethanesulphonyl fluoride and 1% protease inhibitor cocktail (Sigma–Aldrich, MO, United States). Homogenates was centrifuged at 10000 g for 10 min and the supernatant was stored in –80 °C. 20 μ g of proteins were loaded and separated by 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. After electrophoresis, separated proteins were transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes. The membranes were blocked with 5% BSA for 1 h at room temperature and then incubated at 4 °C overnight against primary proliferating cell nuclear antigen antibody (PCNA; BD Biosciences, CA, United States) and with mouse anti-beta-actin (Santa Cruz biotechnology) for standardization. Primary antibody was detected by mouse horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies using super signal west pico chemiluminescent substrate (Thermo scientific, IL, United States). The bands were quantified by densitometry using the Quantity One software (Bio-Rad, CA, United States).

2.4. Assessment of HPEC migration

The effect of Netrin-4 on HPEC migration was determined using the wound healing assay. We used five cell preparations of HPEC cells that were isolated from five different placentas. We examined the effect of Netrin-4 on HPEC cell motility using specific culture insert with two rectangular wells from Ibidi (Martinsried, Germany). The Culture-Inserts were placed in 24 well plates and slightly pressed on the top to ensure tight adhesion. Then, 70 μ L of cell suspension (5×10^5 cells/mL) were seeded into each well and incubated at 37 °C under 5% CO₂. After cell attachment (24 h), the inserts were gently removed, creating a defined 500 μ m cell free gap which allowed reproducible experiments. Incubation in the absence or presence of netrin-4 was performed and photographs were taken under an inverted photomicroscope after 12 h. Using the Image J software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>), the wound healing was assessed by measuring the remaining cell free area which is inversely correlated to HPEC migration.

2.5. Pseudovascular morphogenesis assay

The effect of Netrin-4 on HPEC tube like structure was studied on six cell preparations of HPEC cells that were isolated from six different placentas. Matrigel (BD Biosciences, France) was thawed on ice, and 10 μ L were distributed into 15 microwell angiogenesis slides (Ibidi). The Matrigel was allowed to solidify at 37 °C for 30 min. Then, 50 μ L of HPEC suspension at 3×10^5 /mL were incubated at 37 °C in an atmosphere of humidified 95% air and 5% CO₂ in the absence or presence of netrin-4. After 4 h of culture, photographs were taken and quantification of the branching was performed by calculating the number of branching point formed in each well using the Image J software.

2.6. Generation of endothelial spheroids

The effect of Netrin-4 on HPEC spheroid sprouting was studied using four cell preparations of HPEC cells that were isolated from four different placentas. Confluent monolayers of HPECs were trypsinized. Cells were suspended in a mixture of 1 volume of 1.2% (wt/wt) methylcellulose and 4 volumes of culture medium containing 15% FBS and antibiotics. In these experiments, 1000 cells were suspended in culture medium/methylcellulose and seeded in non-adherent round-bottom 96-well plates (Greiner, Frickenhansen, Germany). Under these conditions all suspended cells contribute to the formation of a single endothelial cell spheroid. The spheroids were harvested within 24 h and transferred into a collagen gel (4.1 mg/mL, BD Biosciences) with different concentrations of netrin-4. Sprout formation was measured and compared to control (without netrin-4). Quantification of the sprouting was performed using the Image J software after 12 h of culture by image analysis of microphotographs.

2.7. Statistical analysis

All analyses were conducted using the statistical software program graph pad prism for windows. Test result are expressed as means $\pm$ SEM. Data from netrin-4-treated replicates were compared to untreated replicates within each experimental trial using the Student's t test. Comparisons between treated and untreated endothelial cells were performed using one way ANOVA, followed by Bonferroni's, when appropriate. P value < 0.05 was considered statistically significant.

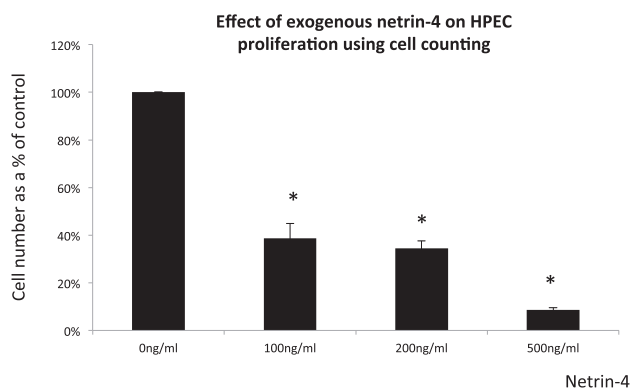


Fig. 1. Netrin-4 effects on HPEC proliferation tested by cell counting. HPEC were treated with netrin-4 at different doses for 24 h and proliferation was evaluated. Results are expressed as percentage of cell number in the control condition (absence of netrin-4). Each value represents the mean $\pm$ SEM from three independent experiments. *p < 0.05 in comparison to control conditions (absence of netrin-4).

Effect of exogenous netrin-4 on HPEC proliferation using PCNA as marker

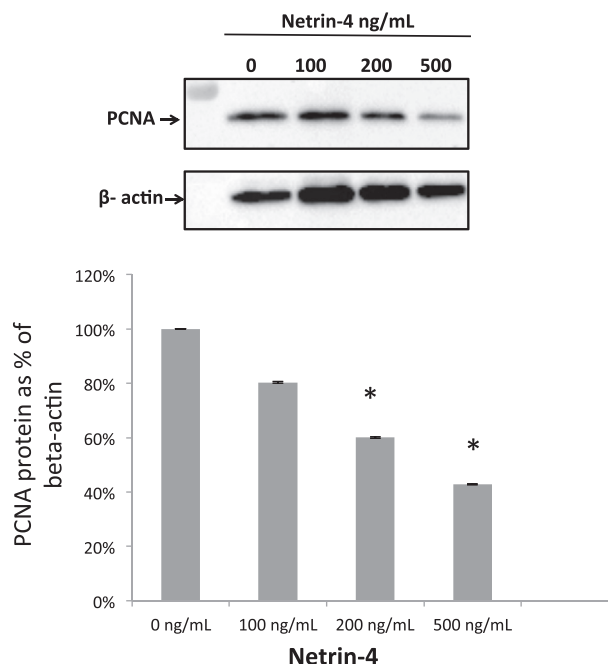


Fig. 2. Netrin-4 effects on HPEC proliferation analyzed by PCNA antibody. HPEC were treated with netrin-4 at different doses for 24 h and total protein extracted and analyzed by Western blotting as described under materials and methods sections. The western blot shows a representative experiment chosen among three. *p < 0.05 (n = 3) in comparison to control conditions (absence of netrin-4).

3. Results

3.1. Netrin-4 effect on HPEC proliferation

Proliferation was assessed using cell counting as described in the material and methods section. After cell attachment and subsequent serum starving, cells were treated for 24 h with increasing doses of netrin-4. Next, cells were trypsinized and counted, and the number of cells were expressed as percent of cells counted in the absence of netrin-4 within the same experiment. Fig. 1 shows the mean values ($\pm$ SEM) of cell proliferation in response to increasing doses of netrin-4 (100–500 ng/mL). Our results show that netrin-4 significantly decreased HPEC cell proliferation. A dose dependent inhibition of cell proliferation was observed, with maximal effects above 90% of inhibition at 500 ng/mL.

To further quantify the effect of netrin4 on the proliferation process, we compared the levels of PCNA expression between control and HPEC-treated cells by netrin-4 at 100 ng/mL, 200 ng/mL and 500 ng/mL. There was a significant decrease in PCNA expression in the netrin-4 treated conditions compared to the control one (Fig. 2), thus confirming the result of cell counting (Fig. 1).

3.2. Effect of netrin-4 on HPEC migration

Migration was assessed using the wound healing assay. When the cells occupy all the available surface and have no room left for expansion, cell proliferation is greatly reduced or ceases entirely. In our conditions, the wound healing test assessed at 12 h and was not influenced by cell proliferation. Quantification of four independent experiments showed that netrin-4 significantly decreased the migration of HPECs. While the wound closed completely after 12 h in the control condition (100% healing), it was only closed by 25% at

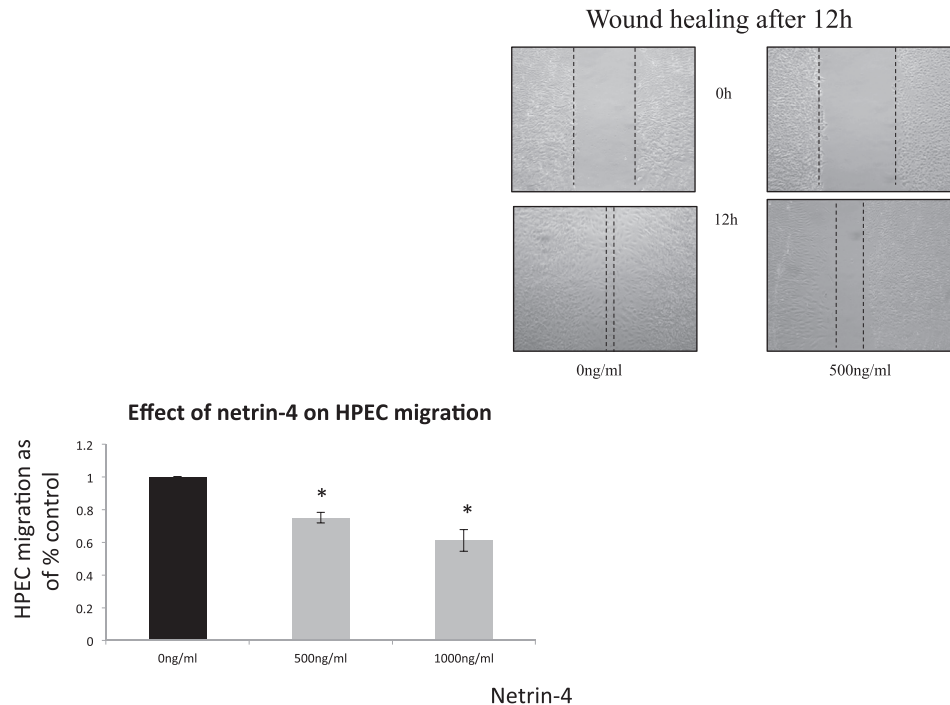


Fig. 3. Netrin-4 effects on HPEC migration. HPEC were treated with netrin-4 at different dose for 12 h. Wound healing was next measured and expressed as the percentage of the gap filled at 12 h. Each value represents the mean $\pm$ SEM from five independent experiments. * $p < 0.05$ in comparison to control conditions (absence of netrin-4).

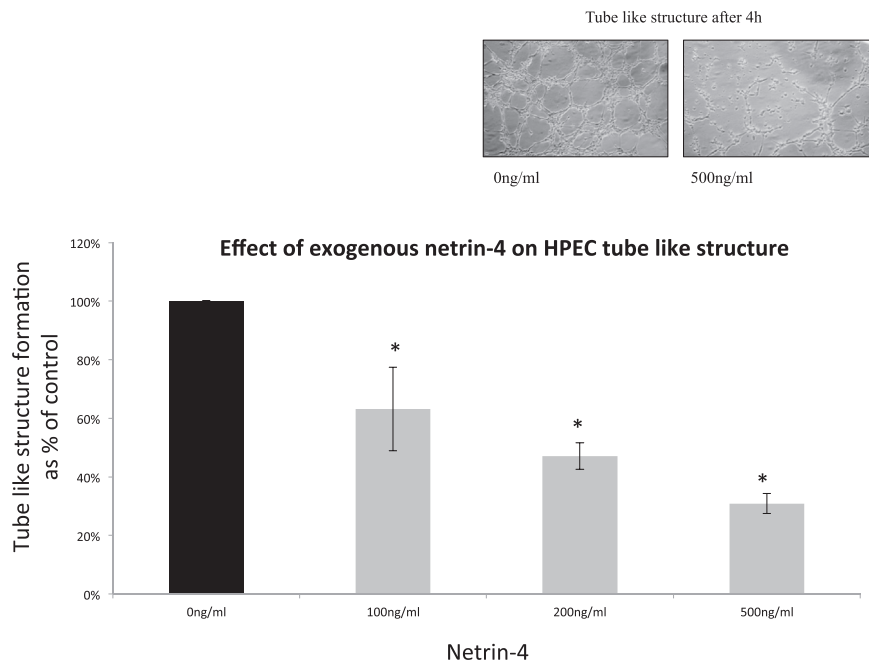


Fig. 4. Netrin-4 effects on HPEC tube like structure formation. HPEC were cultured on matrigel and treated with netrin-4 at different doses for 4 h. Tube-like formation was measured by counting the branching points. Results are expressed as percentages of the number of branching points in the control condition (absence of netrin-4). Each value represents the mean $\pm$ SEM from six independent experiments. * $p < 0.05$ in comparison to control conditions (absence of netrin-4).

the netrin-4-treated condition (500 ng/mL), and increasing to 40% at the netrin-4-treated condition (1000 ng/mL) (Fig. 3).

3.3. Effect of netrin-4 on pseudovascular organization of HPEC cells

Endothelial cells are well known to self-organize as networks of vascular-like structures when grown on Matrigel. The assay

measures the ability of endothelial cells plated at subconfluent densities with the appropriate extracellular matrix support, to form capillary-like structures. Here, we investigated the effect of netrin-4 on pseudovascular organization of HPECs on Matrigel. Fig. 4 shows representative photographs of HPEC cells at 0 and 4 h of culture in the absence or presence of netrin-4 (500 ng/mL). In the control condition, HPEC cells started to organize into tube-like

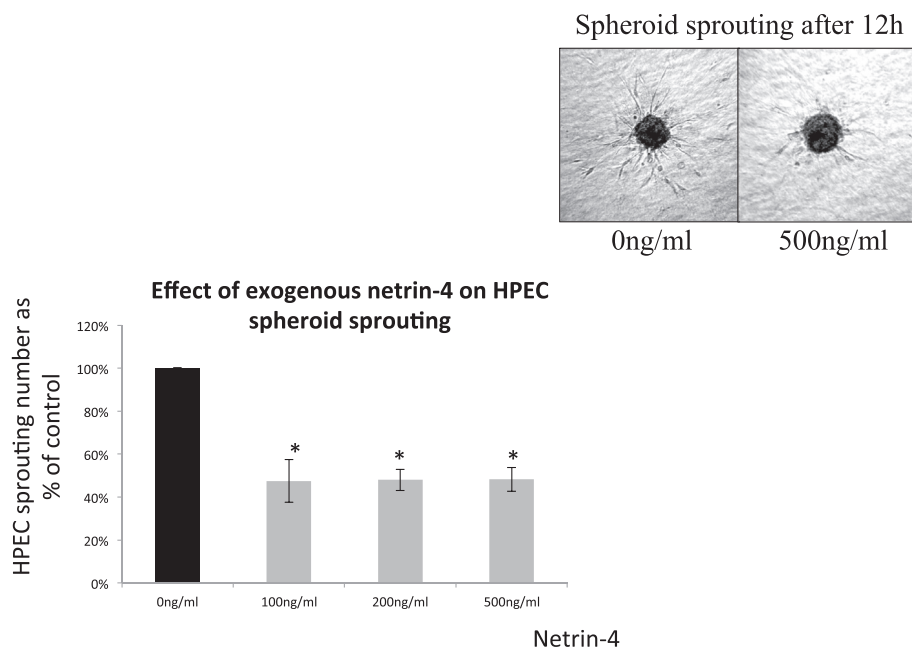


Fig. 5. Netrin-4 effects on sprouting of HPEC spheroid. Spheroid were cultured in collagen gel and treated with netrin-4 at different doses for 12 h. Each value represents the mean $\pm$ SEM from four independent experiments. * $p < 0.05$ in comparison to control conditions (absence of netrin-4).

structures by 3 h, whereas this process was only starting after 4 h of culture in the netrin-4 treatment condition. Quantification the number of branching points after 6 h in six independent experiments showed that netrin-4 significantly decreased HPEC organization in a dose-dependent manner as compared to the control condition. The effect ranged from $53 \pm 4\%$ at 100 ng/mL to $69 \pm 3\%$ at 500 ng/mL (Fig. 4).

3.4. Effect of netrin-4 on endothelial cell sprouting

A three-dimensional *in vitro* angiogenesis system was used to study the role of Netrin-4 on HPEC sprouting. The sprouting assay evaluates in three dimensions the *in vitro* proteolytic activity, migration, proliferation, and lumen formation. The assay utilizes endothelial cell spheroids (each containing 400–500 cells) embedded in a collagen matrix, which resembles the *in vivo* basement membrane environment. Under these condition, new vessels sprout into the collagen matrix and can be quantified without cell staining. The number and length of the sprouts correlates to the angiogenicity of the tested substance. Fig. 5 shows that a 12 h incubation of HPEC spheroids netrin-4 (500 ng/mL) significantly decreased the sprouting ($52\% \pm 1\%$). Moreover, the maximal effect was reached with netrin-4 concentrations as low as 100 ng/mL. Fig. 5 also shows representative photographs of HPEC spheroids 12 h after their incubation with and without 500 ng/mL netrin-4.

4. Discussion

Here we studied the effects of netrin-4 on the angiogenic processes using placental microvascular endothelial cells from a highly vascularized organ, the human placenta. Using a multifaceted strategy, the present data support the idea that netrin-4 inhibits placental angiogenesis within the placental villi. This strategy included evaluation of key processes of placental development such as proliferation, migration, tube organization and sprouting.

Recent data from our group have shown that netrin-4 is expressed by the cytotrophoblast, the syncytiotrophoblast layers

and endothelial cells. These data suggest that netrin-4 might act in an autocrine and/or paracrine manners to regulate key processes of placental development [2,9]. In the present study we focused on the fetal microvascular endothelial cells. Much of our knowledge on the netrin-4 effects on angiogenesis comes from cell models, and particularly from HUVEC (human umbilical vascular endothelial cells). These cells have been used as a model for endothelial cells in many studies describing the regulation of endothelial cells by specific growth factors [22]. Although they have proven to be a useful model, HUVECs are macrovascular endothelial cells that are exposed to oxygenated blood and thereby atypical endothelial cells in their physiological context. Nowadays, growing literature in this field shows that the placental microvascular endothelial cells differ from macrovascular endothelial cells in phenotype, gene expression, and physiology [19,23,24]. In particular, the microvascular cells are known to cover the fetal capillaries of the chorionic villi and are believed to play key roles in placental angiogenesis and growth.

Importantly, the present findings substantiate the similar anti-angiogenic potential of netrin-4 observed when using the HUVEC, as described by Lejmi et al. [7]. The similarity in the responses between the HUVEC and the HPEC to netrin-4 [7] might be explained by the fact that these cells express similar type of receptors, *ie* UNC5B and neogenin [2,9].

Our findings are also in line with data recently published by the group of Nacht who demonstrated that in tumor cell lines, such as the renal carcinoma cell line (RCC786-0) and the hepatoma cell line (Hep3B), the same inhibitory effects on cell proliferation were observed for netrin-4 [25].

In relation to pregnancy pathologies, increased levels of netrin-4 were observed in IUGR Boutsikou and al [13]. Additionally, previous work of the group of Aplin showed that IUGR placentas are closely associated with significant reduction of placental blood vessel density [26].

In conclusion, our findings strongly suggest that netrin-4 is a new factor that control endothelial growth within the placental villi, hence regulating the development of the vascular tree, a process that drives the whole growth of the placenta.

5. Conclusions

This study provides, for the first time, *in vitro* evidences that netrin-4 inhibits HPEC angiogenesis. Therefore, netrin-4 appears as a potential regulator of local placental angiogenesis.

Here, we highlighted the roles of netrin-4 as an anti-angiogenic factor in the placenta, however, the molecular mechanisms underlying the netrin effects remain largely unknown in the human placenta. Additional research such as those using animal models overexpressing netrin-4 may provide new insights into the role of netrin-4 in normal and pathological placental development.

Acknowledgments

We acknowledge Professor Yves Giudicelli, for his help in reviewing the manuscript. This work was supported by the Ministère de la Recherche, Université de Versailles Saint Quentin and Adenosine. We also acknowledge the following sources of funding: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (U1036), University Joseph Fourier, Commissariat à l'Energie Atomique (DSV/IRTSV/BCI), the region Rhône-Alpes, and Ligue Internationale contre le cancer, grant to Nadia Alfaidy.

References

- [1] M. Koch, J.R. Murrell, D.D. Hunter, P.F. Olson, W. Jin, D.R. Keene, et al., A novel member of the netrin family, beta-netrin, shares homology with the beta chain of laminin: identification, expression, and functional characterization, *J. Cell Biol.* 151 (2) (2000) 221–234.
- [2] M. Dakouane-Giudicelli, C. Duboucher, J. Fortemps, S. Salama, A. Brule, P. Rozenberg, et al., Identification and localization of netrin-4 and neogenin in human first trimester and term placenta, *Placenta* 33 (9) (2012) 677–681.
- [3] G. Liu, H. Beggs, C. Jurgensen, H.T. Park, H. Tang, J. Gorski, et al., Netrin requires focal adhesion kinase and Src family kinases for axon outgrowth and attraction, *Nat. Neurosci.* 7 (11) (2004) 1222–1232.
- [4] Y.H. Yang, M. Szabat, C. Bragagnini, K. Kott, C.D. Helgason, B.G. Hoffman, et al., Paracrine signalling loops in adult human and mouse pancreatic islets: netrins modulate beta cell apoptosis signalling via dependence receptors, *Diabetologia* 54 (4) (2011) 828–842.
- [5] F.I. Schneiders, B. Maertens, K. Bose, Y. Li, W.J. Brunken, M. Paulsson, et al., Binding of netrin-4 to laminin short arms regulates basement membrane assembly, *J. Biol. Chem.* 282 (33) (2007) 23750–23758.
- [6] F. Larrieu-Lahargue, A.L. Welm, K.R. Thomas, D.Y. Li, Netrin-4 induces lymphangiogenesis in vivo, *Blood* 115 (26) (2010) 5418–5426.
- [7] E. Lejmi, L. Leconte, S. Pedron-Mazoyer, S. Ropert, W. Raoul, S. Lavalette, et al., Netrin-4 inhibits angiogenesis via binding to neogenin and recruitment of UNC5B, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (34) (2008) 12491–12496.
- [8] S. Hoang, J. Liauw, M. Choi, M. Choi, R.G. Guzman, G.K. Steinberg, Netrin-4 enhances angiogenesis and neurologic outcome after cerebral ischemia, *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 29 (2) (2009) 385–397.
- [9] M. Dakouane-Giudicelli, C. Duboucher, J. Fortemps, H. Missey-Kolb, D. Brule, Y. Giudicelli, et al., Characterization and expression of netrin-1 and its receptors UNC5B and DCC in human placenta, *J. Histochem Cytochem* 58 (1) (2010) 73–82.
- [10] A. Ahmed, J. Perkins, Angiogenesis and intrauterine growth restriction, *Baillieres Best. P. R. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 14 (6) (2000) 981–998.
- [11] J.C. Kingdom, P. Kaufmann, Oxygen and placental villous development: origins of fetal hypoxia, *Placenta* 18 (8) (1997) 613–621 discussion 623–6.
- [12] D. Maulik, J. Frances Evans, L. Ragolia, Fetal growth restriction: pathogenic mechanisms, *Clin. Obstet. Gynecol.* 49 (2) (2006) 219–227.
- [13] T. Boutsikou, M. Giotaki, D. Gourgiotis, M. Boutsikou, D.D. Briana, A. Marmarinos, et al., Cord blood netrin-1 and -4 concentrations in term pregnancies with normal, restricted and increased fetal growth, *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* 27 (18) (2014) 1849–1853.
- [14] N. Ferrara, Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications, *Semin. Oncol.* 29 (6 Suppl 16) (2002) 10–14.
- [15] M. Hellstrom, M. Kalen, P. Lindahl, A. Abramsson, C. Betsholtz, Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse, *Development* 126 (14) (1999) 3047–3055.
- [16] N.W. Gale, G.D. Yancopoulos, Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development, *Genes Dev.* 13 (9) (1999) 1055–1066.
- [17] K.K. Hirschi, S.A. Rohovsky, P.A. D'Amore, PDGF, TGF-beta, and heterotypic cell-cell interactions mediate endothelial cell-induced recruitment of 10T1/2 cells and their differentiation to a smooth muscle fate, *J. Cell Biol.* 141 (3) (1998) 805–814.
- [18] D. Maglione, V. Guerriero, G. Viglietto, P. Delli-Bovi, M.G. Persico, Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88 (20) (1991) 9267–9271.
- [19] S. Brouillet, P. Hoffmann, M. Benharouga, A. Salomon, J.P. Schaal, J.J. Feige, et al., Molecular characterization of EG-VEGF-mediated angiogenesis: differential effects on microvascular and macrovascular endothelial cells, *Mol. Biol. Cell.* 21 (16) (2010) 2832–2843.
- [20] T. Asahara, C. Bauters, L.P. Zheng, S. Takeshita, S. Bunting, N. Ferrara, et al., Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis in vivo, *Circulation* 92 (9 Suppl) (1995). II365–71.
- [21] V.V. Jinga, A. Gafencu, F. Antohe, E. Constantinescu, C. Heltianu, M. Raicu, et al., Establishment of a pure vascular endothelial cell line from human placenta, *Placenta* 21 (4) (2000) 325–336.
- [22] A. Poleć, P. Fedorcsák, A. Eskild, T.G. Tanbo, The interplay of human chorionic gonadotropin (hCG) with basic fibroblast growth factor and adipokines on angiogenesis in vitro, *Placenta* 35 (4) (2014) 249–253.
- [23] P. Murthi, U. Hiden, G. Rajaraman, H. Liu, A.J. Borg, F. Coombes, et al., Novel homeobox genes are differentially expressed in placental microvascular endothelial cells compared with macrovascular cells, *Placenta* 29 (7) (2008) 624–630.
- [24] I. Lang, M.A. Pabst, U. Hiden, A. Blaschitz, G. Dohr, T. Hahn, et al., Heterogeneity of microvascular endothelial cells isolated from human term placenta and macrovascular umbilical vein endothelial cells, *Eur. J. Cell Biol.* 82 (4) (2003) 163–173.
- [25] M. Nacht, T.B. St Martin, A. Byrne, K.W. Klinger, B.A. Teicher, S.L. Madden, et al., Netrin-4 regulates angiogenic responses and tumor cell growth, *Exp. Cell Res.* 315 (5) (2009) 784–794.
- [26] C.-P. Chen, R. Bajoria, J.D. Aplin, Decreased vascularization and cell proliferation in placentas of intrauterine growth-restricted fetuses with abnormal umbilical artery flow velocity waveforms, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 187 (3) (2002) 764–769.

Le choriocarcinome est une tumeur trophoblastique hautement maligne qui se développe souvent suite à des grossesses molaires dénommées moles hydatiformes (MH). La progression d'une MH vers un choriocarcinome reste à ce jour non caractérisée. L'implication de facteurs angiogéniques dans ce processus a été proposée. Nous avons étudié le rôle d'un nouveau facteur angiogénique spécifique du placenta, l'EG-VEGF (Endocrine Gland-Derived Endothelial Growth Factor) dans la pathogenèse du choriocarcinome. EG-VEGF agit via deux récepteurs (RCPG), PROKR-1 et PROKR-2. Trois approches ont été utilisées pour vérifier cette hypothèse. Une approche clinique, utilisant des échantillons placentaires et des sera collectés chez des patientes MH (n = 38) et avec choriocarcinome (n = 3) et chez des femmes normales (n = 18), tous prélevés au cours du premier trimestre de la grossesse. Une approche *in vitro*, utilisant les cellules JEG3, lignée humaine de cellules de choriocarcinome et des cellules trophoblastiques normales du premier trimestre (CTN). Une approche *in vivo* qui a visé à développer un modèle animal du choriocarcinome qui a servi à l'étude de la progression du choriocarcinome. Les niveaux circulants d'EG-VEGF étaient significativement plus élevés dans les MH et le choriocarcinome comparés aux niveaux chez les patientes normales. Au niveau placentaire, à la fois les niveaux d'expression de l'EG-VEGF et ses récepteurs ont été augmentés. Dans les cellules JEG3, EG-VEGF augmente i) l'expression de PROKR-1 et PROKR-2, ii). La migration, l'invasion, la prolifération et la formation de sphéroïdes dans des systèmes de culture 2 et 3D. Ces effets étaient significativement diminués en présence des antagonistes des deux récepteurs, iii) la phosphorylation de diverses protéines impliquées dans la progression tumorale, ainsi que la sécrétion de MMP-2 et MMP-9. Le modèle de choriocarcinome a été développé par injection de cellules JEG3 en orthotopie dans le placenta de la souris SCID (brevet en cours). En 12 jours, les souris gestantes injectées ont développés un choriocarcinome qui a métastasé dans différents organes. L'injection des antagonistes des récepteurs de l'EG-VEGF réduit significativement le développement et la progression de la tumeur. Par ailleurs, nous avons caractérisé le mécanisme par lequel EG-VEGF contribuerait à la progression tumorale. Ce mécanisme implique le clivage de la protéine de la jonction endothéliale, la VE-Cadhérine, suite à sa phosphorylation sur tyrosine 685 par l'EG-VEGF. Au total, mon projet de thèse i) démontre l'implication directe de l'EG-VEGF dans le développement et la progression du choriocarcinome ii) élucide le mécanisme de cette progression et iii) propose une piste thérapeutique via l'antagonisation de ses récepteurs.

Mots clés : Placenta, Moles hydatiformes, Choriocarcinome, EG-VEGF, Récepteurs des prokinéticines, Modèle animal, VE-Cadhérine, thérapie ciblée.

Choriocarcinoma is a highly malignant trophoblastic tumor that often develop from molar pregnancies also called hydatidiform mole (HM). Nevertheless, HM progression towards choriocarcinoma remains uncharacterized. Involvement of angiogenic factors in this process is proposed. Here, we investigated the role of a new placental angiogenic factor, EG-VEGF (Endocrine Gland-Derived Endothelial Growth Factor) in choriocarcinoma pathogenesis. EG-VEGF acts via two GPCR receptors PROKR-1 and PROKR-2. Three approaches were used to verify this hypothesis. A clinical approach using sera and placental samples collected from HM (n=38) and Choriocarcinoma patients (n=3) and from normal pregnant women (n=18); all collected during the first trimester of pregnancy. An *In vitro* approach using JEG3 cells, a human choriocarcinoma cell line and normal first trimester trophoblast cells (NTC). An *in vivo* approach that aimed at developing an animal model of choriocarcinoma in which therapeutic agents have been tested. Circulating EG-VEGF levels were significantly higher in HM and choriocarcinoma compared to normal patients. Placental EG-VEGF, PROKR1 and PROKR2 expression exhibited the same pattern. In JEG3 cells, EG-VEGF increased i) the expression of PROKR-1 and PROKR-2, ii). Their migration, proliferation invasion and spheroid formation using both 2 and 3D culture systems. These effects were abolished using PROKR1 and PROKR2 antagonists, iii) phosphorylation of different proteins involved in tumor progression as well as secretion of MMP-2 and MMP-9. Choriocarcinoma model has been developed by injection of JEG3 cells orthotopically within the placenta of SCID mice (Patent in progress). Within 12 days, injected gravid mice developed a choriocarcinoma that metastasis in multiple organs. Importantly, injection of EG-VEGF receptors antagonists significantly reduced tumor development and its progression. Also, we have characterized the mechanism by which EG-VEGF contributes to tumor progression. This mechanism involves the cleavage of the key junctional protein, the VE-cadherin, following its phosphorylation at the tyrosine 685, by EG-VEGF. In total my thesis project i) demonstrated the direct involvement of the EG-VEGF in the development and progression of choriocarcinoma ii) elucidated the mechanism of this progression and iii) proposes a potential therapeutic for choriocarcinoma through the antagonisation of its receptors.

Key words: Placenta, Hydatidiform mole, Choriocarcinoma, EG-VEGF, Prokineticin receptors, Animal model, VE-Cadherin; Target therapy.