



Thèse

2004

Open Access

This version of the publication is provided by the author(s) and made available in accordance with the copyright holder(s).

Immunolocalisation des métalloprotéases et de certains oncogènes dans le trophoblaste du premier trimestre

Kohlik, Magdalena

How to cite

KOHLIK, Magdalena. Immunolocalisation des métalloprotéases et de certains oncogènes dans le trophoblaste du premier trimestre. Doctoral Thesis, 2004. doi: 10.13097/archive-ouverte/unige:263

This publication URL: <https://archive-ouverte.unige.ch/unige:263>

Publication DOI: [10.13097/archive-ouverte/unige:263](https://doi.org/10.13097/archive-ouverte/unige:263)

UNIVERSITE DE GENEVE

FACULTE DE MEDECINE

Section de médecine clinique

Département de gynécologie-obstétrique

Thèse préparée sous la direction du Professeur Paul Bischof

**IMMUNOLOCALISATION DES
METALLOPROTEASES ET DE CERTAINS
ONCOGENES DANS LE TROPHOBLASTE DU
PREMIER TRIMESTRE**

Thèse

présentée à la Faculté de Médecine
de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de Docteur en médecine

par

Magdalena Kohlik

de

Mellingen (AG)

Thèse n° 10389

Genève

2004



UNIVERSITÉ DE GENÈVE

FACULTÉ DE MÉDECINE

DOCTORAT EN MEDECINE

Thèse de :

Madame Magdalena KOHLIK
originaire de Mellingen (AG)

Intitulée :

IMMUNOLOCALISATION DES METALLOPROTEASES ET DE CERTAINS ONCOGENES DANS LE TROPHOBLASTE DU PREMIER TRIMESTRE

La Faculté de médecine, sur le préavis de Monsieur Paul BISCHOF, professeur titulaire au Département de gynécologie et obstétrique, autorise l'impression de la présente thèse, sans prétendre par là émettre d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 30 août 2004

Thèse n° 10389

Jean-Louis CARPENTIER
Doyen

N.B. - La thèse doit porter la déclaration précédente et remplir les conditions énumérées dans les "Informations relatives à la présentation des thèses de doctorat à l'Université de Genève".

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à mon directeur de thèse, le Professeur Paul Bischof pour son enthousiasme sans fin, sa disponibilité, son aide et soutien précieux tout au long de ce travail. Il m'a permis de découvrir un nouvel aspect passionnant de notre métier.

Je remercie également de tout cœur la Docteure Marie-Françoise Pelte pour son amabilité, efficacité et son grand savoir-faire dans la création des images qui illustrent cette thèse.

Encore un grand merci à Madame Louise Haenggeli pour son engagement apprécié dans la réalisation des coupes.

RESUME

L'implantation du produit de fécondation chez l'homme est unique. Elle peut être divisée au moins en deux phases: la phase d'attachement et la phase d'invasion.

La phase d'invasion ou de pénétration est un processus biochimique actif ressemblant à une métastatisation contrôlée, une métastatisation à la fois limitée dans le temps et dans l'espace.

Ce sont les cellules du cytotrophoblaste qui ont ce pouvoir invasif grâce à la production de certaines métalloprotéases. La cascade biochimique induisant cette production n'étant pas encore élucidée.

Notre hypothèse de travail était que l'activation transitoire des oncogènes c-jun et c-fos allait induire la production de certaines métalloprotéases et donc donner aux cytotrophoblastes leur caractère invasif. Nous en avons apporté une preuve indirecte en démontrant dans une étude immunohistochimique la colocalisation des oncogènes jun et fos avec les métalloprotéases MMP-1, -2 et -9.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES.....	4
1 INTRODUCTION	6
2 LA DIFFERENCIATION DU TROPHOBLASTE	7
3 LES METALLOPROTEINASES.....	8
3.1 LA SECRETION DES METALLOPROTEINASES	8
3.2 LA REGULATION DES METALLOPROTEINASES	11
3.2.1 Les hormones placentaires.....	11
3.2.2 Les composants de la matrice extracellulaire (MEC).....	12
3.2.3 Les cytokines et les protéines de liaison	13
3.2.4 Le gène de la MMP-9 et les facteurs de transcription probablement impliqués dans la régulation de l'invasion trophoblastique	18
4 HYPOTHESE	21
5 MATERIEL ET METHODES.....	21
5.1 PROVENANCE DU MATERIEL	21
5.2 IMMUNOHISTOCHIMIE.....	22
5.3 DESCRIPTION DE LA METHODE	22
6 RESULTATS	23
6.1 DEFINITION DES STRUCTURES.....	23
<i>Figure 2 : Colonne trophoblastique et cellules étudiées</i>	<i>25</i>
6.2 IMMUNOLOCALISATION	26
6.2.1 MMP-1 (<i>Figure 3.A</i>).....	26
6.2.2 MMP-2 (<i>Figure 3.B</i>).....	26
6.2.3 MMP-9, dilution 1/80 (<i>Figure 3.C</i>)	26
6.2.4 Cytokératine (<i>Figures 3.D</i>).....	27
6.2.5 TIMP-1 (<i>Figure 3.E</i>).....	27
6.2.6 TIMP-2 (<i>Figure 3.F</i>).....	27
6.2.7 C-jun (<i>Figure 4.A</i>)	27
6.2.8 C-fos (<i>Figure 4.B</i>).....	28
6.2.9 P-53 wild type (<i>Figure 4.C</i>).....	28
6.2.10 P-53 mut (<i>Figure 4.D</i>)	28
6.2.11 MMP-9 (dilution 1/200) (<i>Figure 5.A</i>).....	29
6.2.12 MMP-2 (<i>Figure 5.B</i>).....	29
6.3 TABLE III : RESUME DES RESULTATS	30
6.4 FIGURE 3	31
6.5 FIGURE 4	31
6.6 FIGURE 5	33
7 DISCUSSION.....	34

8	CONCLUSION	36
9	BIBLIOGRAPHIE	38

1 Introduction

L'implantation, qui est une acquisition relativement nouvelle dans l'évolution, permet le développement d'un petit nombre d'embryons dans l'organisme protecteur de la mère. Ce processus de reproduction nécessite la création de liaisons intimes entre la mère et le fœtus. Bien que cette manière de reproduction constitue un net avantage dans l'évolution, il est limité par la nécessité de synchronisation du développement de l'embryon et de l'utérus. Ceci est devenu possible avec l'acquisition d'un utérus fonctionnel.

L'implantation chez l'homme est unique (Lindner, 1972). La meilleure démonstration en est probablement la quasi-absence de grossesse extra-utérine chez les animaux, alors que chez l'humain elle n'est pas rare. Par contre ceci limite l'utilisation de modèles animaux pour son étude, l'utilisation d'embryons humains étant impossible pour des raisons éthiques évidentes. Par conséquent ces événements cruciaux doivent être déduits à partir d'informations obtenues chez d'autres primates (Enders et al., 1992) ou à l'aide de modèles de cellules trophoblastiques humaines *in vitro*.

Il est maintenant admis que l'implantation peut être divisée au moins en deux phases distinctes : la phase d'attachement et la phase d'invasion. D'un point de vue biologique ces deux phases sont complètement différentes :

- La phase d'attachement des cellules trophoblastiques du blastocyste à l'épithélium endométrial de la paroi utérine nécessite la présence de récepteurs membranaires et ne peut se faire que pendant une période du cycle utérin bien déterminée. La plupart du temps l'endomètre se protège de l'implantation sauf pendant une période très limitée qui s'appelle fenêtre d'implantation ou phase réceptive. Cette réceptivité particulière semble être la propriété de la couche épithéliale puisque l'ablation expérimentale de l'épithélium utérin ne permet pas une implantation complète du blastocyste (Cowell, 1969). Durant la phase d'attachement ce sont les connections fonctionnelles qui sont établies.

- La phase d'invasion, ou de pénétration, des cellules trophoblastiques dans l'endomètre n'est pas une croissance passive, mais un processus biochimique actif, ressemblant à une métastatisation – une métastatisation limitée à la fois dans le temps (premier trimestre de la grossesse) et dans l'espace (endomètre et tiers interne du myomètre).

2 La différenciation du trophoblaste

Les cellules cytotrophoblastiques (CTB) dérivent du trophoctoderme du blastocyte. Après l'attachement du blastocyte à l'endomètre utérin, certains CTB mononucléaires qui entourent le disque embryonnaire vont fusionner pour former un syncytium. Ces cellules géantes multinuclées vont pénétrer l'endomètre pseudo décidualisé. Une prolifération rapide du trophoblaste constitue le mécanisme cellulaire fondamental pour l'expansion du placenta fœtal. Les colonnes de trophoblastes (que l'on nomme villosités primaires) s'étendent depuis le chorion vers l'extérieur. Plus tard, avec l'apparition de mésenchyme dans les colonnes de trophoblastes, les villosités secondaires vont se former. Ces villosités sont constituées par du mésenchyme entouré d'une couche continue de cytotrophoblaste, elle-même couverte par du syncytium. Les villosités sont issues de la plaque chorale, d'où elles vont se diviser en plusieurs branches et sous-branches de façon à créer une unité structurale et fonctionnelle du placenta humain avec une importante surface d'échange. Quelques-unes de ces villosités vont entrer en continuité avec la plaque basale (partie maternelle du placenta) et devenir des villosités crampons.

Après la formation des villosités placentaires définitives, certaines villosités vont contacter la décidue. A la zone de contact, les CTB des villosités crampons vont acquérir un phénotype invasif transitoire et envahir l'endomètre décidualisé. Les CTB des villosités flottantes (dans l'espace extravilleux) restent attachées à la membrane basale des villosités. Les CTB suivent donc une des deux voies de différenciation suivantes: Les CTB villeuses (vCTB) forment une couche simple de cellules souches polarisées qui peuvent soit fusionner et former le syncytiotrophoblaste (STB) qui va couvrir toute la surface des villosités, soit quitter le tronc villeux aux zones de contact avec la décidue et former une colonne pluristratifiée de CTB non-polarisées. Ces CTB extravilleuses (evCTB) sont mobiles et ont un caractère extrêmement invasif. Ces cellules sont cytokératine positives et sont retrouvées dans la décidue, l'intima des vaisseaux utérins et le tiers proximal du myomètre. Ce sont ces cellules extravilleuses qui sont utilisées comme modèle in vitro pour étudier l'implantation blastocytaire.

3 Les Métalloprotéinases

3.1 La sécrétion des métalloprotéinases

L'invasion n'est pas due à une pression de croissance, mais à un processus biochimique actif.

Une cellule est invasive si elle est capable de sécréter des protéases et par ce biais de dégrader la matrice extracellulaire— et les CTB ne sont pas une exception (Fisher et al., 1985 ; Fisher et al., 1989 ; Bischof and Martelli, 1992 ; Bischof and Martelli, 1995).

Des protéases telles que les cathépsines et les métalloprotéinases (MMP) ont été impliquées dans ce processus invasif (Nagase et al., 1991). Les MMP forment une famille d'enzymes homologues qui ont toutes un atome de Zn^{2+} dans leur site actif (Nagase et al., 1991 ; Cawston, 1995). Elles sont sécrétées sous forme de pro-enzyme inactive qui sera activée après une hydrolyse partielle qui leur fait perdre le propeptide. Elles sont classées en quatre sous-groupes, selon leur spécificité de substrat (Tableau I): Les gélatinases (MMP-2 et MMP-9) sont capables de digérer le collagène de type IV qui est le constituant majeur des membranes basales, et de digérer la gélatine (collagène dénaturé). Les collagénases (MMP-1, MMP-8 et MMP-13) sont capables de digérer spécifiquement le collagène de type I, II, III, V et X. Ces collagènes constituent la matrice extra-cellulaire des tissus principalement conjonctifs. Les stromelysines (MMP-3, MMP-7, MMP-10, MMP-11, MMP-12, MMP-14) ont un spectre d'action plus large, puisqu'elles digèrent non seulement le collagène de type IV, V, VII, mais aussi la laminine, fibronectine, gélatine et les protéoglycans. Le substrat des MMPs membranaires (MMP-14, -15, -16, -17) est essentiellement la proMMP-2 et de ce fait ces enzymes vont permettre l'activation de MMP-2 à la surface cellulaire du front invasif. Le substrat de MMP-17 – également une MMP membranaire - n'a pas encore pu être clairement établi.

En général les MMPs contiennent un peptide signal (qui indique qu'il s'agit de protéines sécrétées), un propeptide, un domaine pour la catalyse avec le site de liaison pour le zinc et un domaine « hemopexine-like » lié au domaine de catalyse par une région « HINGE » (Westermarck et al., 1999). En plus de ces composants, MMP-2 et MMP-9 contiennent un site pour la fibronectine de type II dans le domaine de catalyse. La plupart des MMPs sont sécrétées sous la forme inactive de proenzyme (zymogènes) qui deviennent actives dans le compartiment extracellulaire, à l'exception de MMP-11 et des MT-MMPs (constituant le sous-groupe "liaisons

membranaires"des MMPs ; voir page 9, table I). L'activation se fait par la dissociation d'une interaction de Zn^{2+} -Cys qui va provoquer la perte du propeptide. Plusieurs enzymes sont capables d'activer les proMMPs, une des plus importantes étant la plasmine (Nagase, 1997), mais aussi la MMP-3 (Ogata et al.,1992) et les MMPs membranaires (Sato et al., 1994 ; Takino et al., 1995 ; Will et Heizmann, 1995) sont des activateurs potentiels de plusieurs MMPs, ce qui veut dire que les MMP agissent en cascade, de manière similaire aux enzymes impliquées dans la coagulation. L'activité des MMPs dans l'espace extracellulaire est inhibée de manière spécifique par les TIMPs (« tissue inhibitor of metalloproteinases ») qui se lient spécifiquement au site du zinc fortement protégé des MMPs actives.

L'expression des MMPs, et particulièrement de MMP-9, a été clairement liée à un phénotype métastatique (Bernhard et al., 1994), alors que les TIMPs interviennent dans l'inhibition de la métastatisation (DeClerck et al.,1992). On connaît 4 TIMPs (TIMP-1, -2, -3 et -4) différant chacun par leur spécificité d'inhibition des MMPs dans l'espace extra-cellulaire. A part l'inhibition des MMPs, les TIMPs ont aussi d'autres fonctions biologiques importantes (Gomez et al.,1997).

In vitro, les CTB envahissent la membrane amniotique (Yagel et al., 1988) ou une membrane basale reconstituée (Kliman et al., 1990 ; Graham et al.,1994), elles se comportent donc comme des cellules métastatiques. Ce comportement invasif est dû à la capacité des CTB de sécréter des MMPs. Plusieurs études ont étudié la localisation des MMPs et de leur mRNA (Fernandez et al., 1992 ; Autio-Harmanen et al., 1992 ; Polette et al., 1994 ; Moll et al., 1990) dans le trophoblaste humain. Les CTB en culture sécrètent les MMPs (Fisher et al., 1989 ; Fisher et al., 1985 ; Bischof et al., 1995 ; Bischof et al., 1991), mais les CTB d'une grossesse jeune sont plus invasives et sécrètent plus de MMP que les CTB extraites d'un placenta à terme (Shimonovitz et al., 1994). De même, toutes les MMPs n'ont pas la même importance lors de l'invasion. Même si on ne connaît pas le mécanisme exact in vivo, il faut admettre que les CTB se comportent comme des métastases et qu'elles sécrètent des MMPs déjà très tôt dans la grossesse, depuis le stade de blastocyte (Puistola et al., 1989).

Table I : Classification des métalloprotéinases :

Sous-groupes	MMP	Autre appellation	PM	Substrats
Gélatinases	MMP-2	Gélatinase A 72 kDa Gélatinase	73882	Collagène IV,V,VII,X , gélatine
	MMP-9	Gélatinase B 92 kDa Gélatinase	78427	Fibronectine, élastine Collagène IV,V,gélatine
Collagénases	MMP-1	Collagénase interstitielle Collagénase fibroblastique	54007	Collagène I,II,III,VII,X, MMP-5, entactine
	MMP-8	Collagénase neutrophilique PMNL Collagénase	53412	Collagène I,II
	MMP-13	Collagénases-3	53819	Collagène I
Stromelysines	MMP-3	Stromelysine-1 Transine-1	53977	Coll III,IV,IX,X, Gélatine, Laminine, Fibronectine Elastine, Caséine
	MMP-7	PUMP-1, Matrilysine	29677	Caséine, Fibronectine, Gélatine
	MMP-10	Stromelysine-2 Transine-2	54151	Collagène II,IV,V, Fibronectine, Gélatine
	MMP-11	Stromelysine-3	54595	Collagène IV
	MMP-12	Métalloélastase	54000	Elastine, Fibronectine
Liaisons membranaires	MMP-14	MT1-MMP, MMP-X1	65883	MMP-2
	MMP-15	MT2-MMP	75807	MMP-2
	MMP-16	MT3-MMP	69158	MMP-2
	MMP-17	MT4-MMP		

Abréviations :

Coll : collagène ; PMNL : leucocytes polymorphonucléaire ; PUMP-1 : « putative metalloproteinase-1 »

3.2 La régulation des métalloprotéinases

Même si les CTB se comportent comme des cellules métastatiques, *in vivo* elles ne sont invasives que de manière transitoire (pendant le premier trimestre) et leur invasion est limitée à l'endomètre et au tiers proximal du myomètre. Cette régulation temporelle et spatiale de l'invasion trophoblastique est probablement médiée de manière autocrine par des facteurs trophoblastiques et de manière paracrine par des facteurs utérins. Plusieurs types de régulateurs ont été investigués : hormones, cytokines, facteurs de croissance et des composants de la matrice extra-cellulaire. Ces facteurs sont impliqués dans la régulation de la synthèse, l'activation ou la sécrétion des MMPs. Ils agissent en régulant la transcription des gènes à réponse précoce dont les produits vont activer ou réprimer les gènes des MMPs.

3.2.1 Les hormones placentaires

Le syncytiotrophoblaste (STB) sécrète la progestérone et la hCG (human chorionic gonadotrophin) en quantité importante. Ces deux hormones sont donc présentes à l'interface fœto-maternel et par ce fait ont une position privilégiée dans la régulation de l'invasion du trophoblaste.

Récemment il a été montré (Shimonovitz et al., 1998) que la progestérone diminue la production de la MMP-9 dans les CTB du premier trimestre. Ce processus est médié par le récepteur même de la progestérone, puisqu'un anti-gestagen inhibe cet effet. Ces résultats concordent avec l'observation que la production de la gélatinase trophoblastique est beaucoup plus importante dans le CTB du premier trimestre que dans le CTB à terme (Shimonovitz et al., 1994) quand la production de la progestérone est maximale. Cet effet de la progestérone doit être médié par d'autres facteurs à l'intérieur de la cellule, car il n'y a pas d'élément réponse à la progestérone dans la région régulatrice du gène MMP-9.

Même si c'est le STB qui exprime les récepteurs à hCG/LH en quantité importante, le cvCTB et en particulier le trophoblaste endovasculaire les expriment aussi, dans une moindre mesure (Tao et al., 1995). En plus, différentes études ont montré que des néoplasies trophoblastiques surexprimaient ces récepteurs à hCG/LH (Licht et al., 1994). Ces données

suggèrent que le hCG puisse jouer un rôle autocrine dans la régulation de la transformation, de la croissance et de l'invasion du trophoblaste. Il n'y a que trois études qui ont examiné in vitro le rôle de la hCG dans les différents paramètres de l'invasion trophoblastique. Yagel et al. (1993) ont montré que la hCG inhibait l'invasion du CTB du premier trimestre de manière dose-dépendante, sans exercer d'effets sur la capacité des CTB à s'attacher à la membrane basale. Dans leurs conditions expérimentales l'hCG diminuait l'activité de la collagénase, mais pas l'abondance de son mRNA. En plus, le TIMP mRNA n'était pas influencé par l'hCG. Dans une publication suivante, le même groupe (Milwidsky et al., 1993) montre que l'hCG inhibe également d'autres protéases connues en tant qu'activateurs des MMP, comme l'activateur du plasminogène de type urokinase. Ils concluent que la capacité de l'hCG à prévenir l'initiation de la cascade collagénolytique suggère que cette gonadotrophine puisse réguler l'activité invasive transitoire du trophoblaste. A l'opposé, Zygmunt et al. (1998) ont observé que la hCG augmentait de manière significative l'activité collagénolytique et l'invasion de cellules Jeg-3, une lignée cellulaire du choriocarcinome. Cette discordance peut certainement être expliquée par la différence des cellules utilisées (des CTB primaires versus cellules Jeg-3). Deux autres études (Oktay et al., 1994; Klein et al., 1995) évaluant la corrélation entre le niveau de l'hCG plasmatique et le degré de l'invasion trophoblastique dans les grossesses extra-utérines, concluent à une invasion significativement plus importante (allant jusqu'au myosalpinx) quand les taux plasmatiques de l'hCG sont plus élevés. Pour pouvoir donner une réponse à comment d'une part la hCG affecte l'invasion trophoblastique et d'autre part expliquer ces résultats a priori contradictoires, il faudra attendre d'autres études.

3.2.2 Les composants de la matrice extracellulaire (MEC)

Les CTB possèdent des intégrines qui permettent aux cellules de reconnaître leur environnement immédiat et de s'y adapter. Le collagène de type I, le composant majeur de la matrice extracellulaire (MEC), a un effet stimulateur important sur les CTB qui vont réagir en sécrétant la gélatinase (Emonard et al., 1993; Emonard et al., 1990). La laminine qui est médiateur du comportement invasif des cellules du mélanome, et qui stimule la sécrétion de MMP-2, exerce un effet similaire sur les cellules BeWo du choriocarcinome, mais pas sur leur pendant, les cellules

CTB normales (Emonard et al., 1990). Ceci indique un certain degré de spécificité cellulaire. Une étude impliquant directement les intégrines dans la régulation des MMPs (Werb et al., 1989) montre que les anticorps contre le récepteur de la fibronectine (intégrine $\alpha 5 \beta 1$) induisent la synthèse de la collagénase interstitielle et de la stromelysine-1 (MMP-1 et MMP-3 respectivement) dans les fibroblastes de peau de lapin. Comme la fibronectine elle-même n'exerce pas cet effet, mais que des fragments de la fibronectine le font, les auteurs postulent que la fibronectine (comme aussi d'autres protéines de la matrice) possède d'autres domaines en dehors du site de la reconnaissance cellulaire, qui vont avoir de l'effet sur la décision cellulaire à produire les MMPs (Tremble et al., 1995; Werb et al., 1990). Kliman et Feinberg (1990) ont montré de manière convaincante que la MEC avait de l'effet sur le comportement cellulaire. Les CTB mises en contact avec du matrigel répondent d'une manière différente selon l'épaisseur du matrigel sur lequel elles reposent: si l'épaisseur du matrigel est entre 1 et 4 microns, les CTBs vont adhérer, s'agréger et former du syncytium, si l'épaisseur est entre 4 et 14 microns, les CTBs vont rester rondes, s'agréger et envahir le matrigel. Si on augmente encore l'épaisseur de la matrice du matrigel, les CTBs vont rester des cellules mononucléaires et ne vont pas envahir la matrice. Le mécanisme responsable de ces réponses différentes reste à être exploré. A part la sécrétion de MMP induite par le contact entre la cellule et la matrice, il pourrait également exister des régulations médiées par le contact entre deux cellules. En fait, il y a plusieurs exemples de tumeurs qui ne produisent pas de MMPs, mais qui induisent les cellules voisines à les sécréter.

3.2.3 Les cytokines et les protéines de liaison

La littérature concernant les effets des cytokines et des facteurs de croissance sur le comportement invasif est plutôt expansive, nous allons donc limiter la discussion aux cytokines produites par l'endomètre et/ou par le trophoblaste.

3.2.3.1 Interleukine-1

L'interleukine-1 (IL-1) est constitué par deux peptides distincts (IL-1 α et IL-1 β). L'IL-1 n'est pas seulement produit par les monocytes et les macrophages, mais aussi par les tissus de

l'interface foëto-maternelle. Chez la souris, IL-1 est sécrété par l'embryon avant l'implantation et les récepteurs à IL-1 des type 1 (IL-1R-1) sont exprimés en quantité maximale par les cellules endométriales pendant la phase de sécrétion, donc au moment de l'implantation. Quand on administre des antagonistes du récepteur à IL-1 aux souris avant l'implantation, le nombre d'embryons implantés est significativement réduit (Simon et al., 1994), ce qui implique que chez la souris IL-1 est un médiateur important de l'implantation. Chez l'humain IL-1 est distribué de manière semblable au niveau des protéines ainsi qu'au niveau du mRNA (Simon et al., 1994; Kauma et al., 1990). Les cellules endométriales et le cvCTB (mais pas le vCTB) expriment le IL-1R-1, et les deux CTB (villeux et extra-villeux) mais pas les cellules épithéliales produisent IL-1. Dans l'endomètre humain l'IL-1 est produite par les cellules stromales décidualisées et pseudo-décidualisées puisque son mRNA apparaît dans ces cellules au 23^{ème} jour du cycle. Il a été montré que IL-1 stimule l'activité de MMP-1, MMP-3 et TIMP dans les fibroblastes humains (Unemori et al., 1991) et de MMP-9 dans le CTB (Meisser et al., 1999; Librach et al., 1994). Le mécanisme initiant cette stimulation inclut la protéine kinase C et/ou des "immediate early response genes" (Takashi et al., 1993; Fini et al., 1994).

3.2.3.2 *Interleukine-6*

L'interleukine-6 (IL-6) exerce son activité en se liant à un récepteur complexe de haute affinité comprenant deux protéines membranaires: une protéine réceptrice de 80 kDa et liant IL-6 (IL-6R) et une protéine transmettrice du signal de 130 kDa (gp 130), (Hibi et al., 1990). L'IL-6 mRNA et la protéine sont localisés dans l'endomètre humain où l'expression est maximale pendant la phase sécrétoire moyenne (Tabizadeh et al., 1995). Dans le trophoblaste du premier trimestre la protéine IL-6 (Jauniaux et al., 1996) et son RNA (Stephanou et al., 1995) sont présents dans le CTB et dans le STB. L'IL-6R et gp 130 se trouvent dans les cellules épithéliales endométriales (Tabizadeh et al., 1995) et gp 130 mRNA est retrouvé dans la décidue et le trophoblaste du premier et troisième trimestre (Kojima et al., 1995) ainsi que dans les blastocytes humains (Sharkey et al., 1995). Donc IL-6 et son récepteur sont présents de manière simultanée dans les tissus maternels et fœtaux pendant l'implantation et la placentation.

IL-6 induit l'activation de MMP-2 et MMP-9 trophoblastique, mais pas leur synthèse puisque cette cytokine ne change pas la concentration immunoréactives des MMP-2 et MMP-9 dans les

surnageants de cultures des CTB (Meisser et al., 1999). Il a été démontré que IL-6 stimule in vitro l'invasivité de lignées cellulaires provenant de cancers de la tête et du cou (Nishino et al., 1998) et de cancers de l'ovaire chez l'humain (Obata et al., 1997). Il est donc postulé que cette cytokine pourrait être un régulateur d'invasion trophoblastique in vitro.

3.2.3.3 *Interleukine-10 et Interleukine-15*

L'interleukine-10 (IL-10) et l'interleukine-15 (IL-15) ont été récemment impliquées dans la régulation de l'invasion trophoblastique. L'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire qui est produite in vitro par le trophoblaste du premier trimestre, dont les cellules expriment également le récepteur de l'IL-10. Comme l'IL-10 diminue la MMP-9 et l'invasion des CTB, elle est considérée comme un régulateur autocrine de l'invasivité trophoblastique (Roth et al., 1999). Par contre, l'IL-15 qui est également produite par le trophoblaste, augmente l'invasion, la migration et la production de MMP-1 par les cellules Jeg-3 du choriocarcinome, mais n'a aucun effet sur MMP-2 et MMP-9 (Zygmunt et al., 1998).

3.2.3.4 *"Tumour necrosis factor"*

Le "tumour necrosis factor" (TNF) est un polypeptide de 14 kDa qui est produit par différents types de cellules et en particulier par les macrophages (Vince et al., 1990). Les récepteurs pour le TNF ont été visualisés sur les cellules trophoblastiques humaines (Eades et al., 1988; Yang et al., 1993). TNF induit la sécrétion de MMP-9 dans des cellules endothéliales bovines (Partidge et al., 1993) et de MMP-1 et MMP-3 dans les cellules du chorion humain (So et al., 1992). A l'opposé de IL-10, TNF diminue TIMP (Takahashi et al., 1993). Dans notre laboratoire, TNF stimule la MMP-9 des CTB, mais pas la MMP-2 (Meisser et al., 1999).

3.2.3.5 *"Epidermal growth factor" et "Transforming growth factor alpha"*

L'"epidermal growth factor" (EGF) et le "transforming growth factor alpha" (TGFalpha) ont des séquences d'acide aminés en commun et se lient au même récepteur. EGF peut être localisé dans l'endomètre pendant les phases prolifératives et sécrétoires, mais son expression est

particulièrement élevée dans les cellules de la décidue (Horowitz et al., 1993; Lysiak et al., 1993). EGF engendre le comportement invasif de cellules de sarcomes (Yudoh et al., 1994) et des CTB (Bass et al., 1994). La promotion du phénotype invasif pourrait être le résultat d'une stimulation directe de MMP-1 et MMP-3 (Delamy et al., 1992) ou d'une activation synergique des ces enzymes par IL-1 et EGF (Unemori et al., 1994).

3.2.3.6 *"Leukaemia inhibitory factor"*

Le "leukaemia inhibitory factor" (LIF) est exprimé dans l'endomètre de la souris le 4^{ème} jour de la grossesse, juste avant l'implantation du blastocyte (Bhatt et al., 1991). Cette expression transitoire de LIF est essentielle pour la grossesse puisque chez les souris transgéniques sans gène fonctionnel de LIF, l'implantation ne se fait pas. L'endomètre humain produit également le LIF (Kojima et al., 1995) et le LIF mRNA est plus abondant dans l'endomètre sécrétoire que dans l'endomètre en phase proliférative (Kojima et al., 1994). Les récepteurs pour le LIF ont été trouvés dans les CTB villeux ainsi que dans les CTB extra-villeux (King et al., 1995). LIF augmente le TIMP dans les fibroblastes humains (Richards et al., 1993) et inhibe massivement l'activité gélatinolytique des CTB porteuses des récepteurs à la laminine, mais pas des CTB exprimant les récepteurs à la fibronectine (Bischof et al., 1995).

3.2.3.7 *"Transforming growth factor beta"*

La protéine et le mRNA du "transforming growth factor beta" (TGFbeta) ont été localisés dans le stroma endométrial, les cellules épithéliales et déciduales ainsi que dans les CTB et STB villeux et extra-villeux (Kauma et al., 1990; Graham et al., 1992; Selick et al., 1994). Les CTB ont trois types de récepteurs TGFbeta qui diffèrent dans leur affinité pour TGFbeta1 et TGFbeta2 (Mitchell et al., 1992). Dans les CTB ou dans les fibroblastes de la cornée humaine, le TGFbeta stimule la synthèse de glycoprotéines de la matrice comme la laminine, fibronectine et le collagène (Ohji et al., 1993; Feinberg et al., 1994). TGFbeta exerce un effet anti-invasif en stimulant la sécrétion de TIMP par les CTB et en inhibant leur comportement migratoire (Irving et Lala, 1995). TGFbeta pourrait donc très bien être un signal endométrial qui contrôlerait l'invasion trophoblastique pendant l'implantation et la placentation.

En conclusion on peut dire que les cytokines influencent la sécrétion et/ou l'activité des MMPs. Même s'il y a un certain degré de spécificité cellulaire, les cytokines pro-inflammatoires exercent un effet de stimulation alors que les cytokines anti-inflammatoires généralement inhibent les MMPs. Les cytokines exercent leur effet surtout en induisant la transcription des "immediate early genes" dont les produits vont agir en tant que facteurs activant d'autres gènes, y compris ceux des MMPs.

3.2.3.8 *"Insulin-like growth factor binding protein-1"*

L'"insulin-like growth factor binding protein-1" (IGFBP-1) est une de six protéines homologues qui médient de manière spécifique les effets mitogéniques et métaboliques des "insuline-like growth factors" IGF-I et IGF-II. IGFBP-1 est surtout produit par le foie et par l'endomètre décidualisé. En effet, l'IGFBP-1 est le produit majeur de sécrétion de l'endomètre décidualisé (Bell et al., 1985) et cette protéine (Rutanen et al., 1992) ainsi que son mRNA (Han et al., 1996) ont été localisés dans les cellules stromales avant la décidualisation dans la phase sécrétoire tardive de l'endomètre et dans les cellules déciduales de l'endomètre durant la grossesse. IGFBP-1 augmente la sécrétion de TIMP-1 par le trophoblaste et augmente également l'activité gélatinolytique des CTB (Bischof et al., 1998). Cette augmentation ne peut pas être due aux MMP-2 et MMP-9, car l'activité de ces deux enzymes est inchangée par IGFBP-1. Cette protéine doit donc stimuler une autre enzyme avec des propriétés gélatinolytiques, possiblement MMP-3 (Bischof et al., 1998). IGFBP-1 stimule la migration et l'invasion des cellules trophoblastiques probablement par un mécanisme incluant l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$, un récepteur de la fibronectine (Irving et Lala, 1995).

Tous ces régulateurs autocrines et paracrines décrits ci-dessus ont été testés in vitro et il faut admettre que l'extrapolation de ces résultats à la situation in vivo ne peut être faite facilement, en particulier parce que les cytokines agissent souvent en cascade. Il est possible que l'effet stimulateur observé sur les MMPs par une des cytokines puisse être dû à une deuxième cytokine

synthétisée en réponse à la première.

3.2.4 Le gène de la MMP-9 et les facteurs de transcription probablement impliqués dans la régulation de l'invasion trophoblastique

Comme dans tous les gènes connus, la région promotrice du gène humain de la MMP-9 contient plusieurs éléments de régulation, qui lient des protéines nucléaires, connues comme facteurs de transcription. Ceci explique l'intérêt porté au gène de la MMP-9, et notamment à sa région promotrice.

Le gène MMP-9 contient 13 exons et 12 introns pour une taille totale de 7.7 kb. La région régulatrice de ce gène (5') contient de multiples éléments cis-régulateurs. Ces éléments cis-régulateurs sont des séquences d'ADN spécifiques qui lient des facteurs de transcription (trans-activateurs ou trans-répresseurs) codés par d'autres gènes. Les facteurs de transcription sont des protéines nucléaires qui se lient à des sites spécifiques de l'ADN, localisés dans la région régulatrice des gènes. Par cette liaison ces protéines vont activer ou réprimer la transcription du gène.

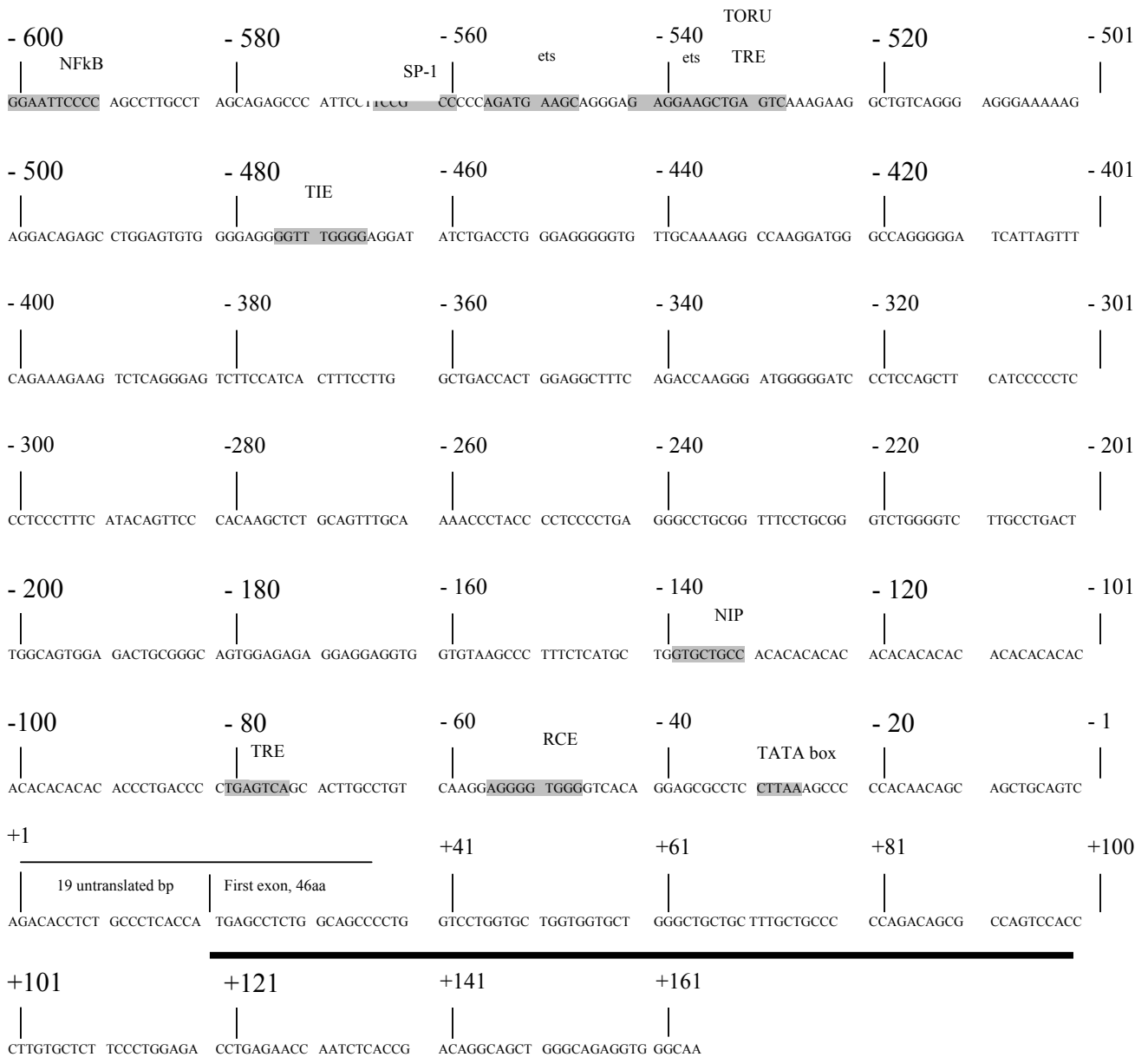
En lisant de 3' à 5' la région promotrice de MMP-9 (**Figure 1**), on rencontre un TATA -box et puis la région RCE (« retinoblastoma control element ») qui lie une protéine nommée p105 (le produit de l'oncogène RB1). Les prochains éléments cis-régulateurs sont un « TPA responsive element » (TRE), NIP (lie des protéines nucléaires inhibiteurs), TIE (inhibant TGFbeta), un autre TRE couplé à PEA3 (« polyoma enhancer protein ») qui lie les produits de l'oncogène c-ets. TRE-PEA3 agissent de manière synergique pour trans-activer des gènes et forment le TORU (« TPA and oncogene responsive unit »). Plus loin on trouve un site SP-1 qui lie le facteur de transcription nucléaire Sp-1, et un site NFkB qui lie p50-p65, codés par la famille d'oncogène c-REL.

Tous les gènes dont la transcription peut être induite par le promoteur tumoral TPA (ester phorbolique) ont une même séquence (TGAG/CTCA) dans la région promotrice, appelé site TRE (« TPA responsive element »). Ce site lie le complexe AP-1 (activator protein-1) qui est un des facteurs de transcription le mieux connu. Il s'agit d'un hétérodimère de Jun et Fos, le produit des

proto-oncogènes c-jun et c-fos qui appartiennent à la famille des gènes à réponse immédiate. Jun et Fos peuvent former leur complexe en l'absence d'ADN. Jun possède un domaine c-terminal qui va reconnaître TRE. Cette liaison à l'ADN est régulée par plusieurs étapes de phosphorylations et déphosphorylations. Ainsi lorsqu'on ajoute le TPA à une cellule en culture, il va activer la protéine kinase C qui va phosphoryler AP-1, ceci va augmenter les liaisons entre AP-1 et TRE induisant par la même la transcription du gène de la MMP-9.

Même si les régions promotrices des gènes MMP sont différentes, MMP-1, MMP-3 et MMP-9 (mais pas MMP-2), elles ont toutes un site TRE capable de lier l'hétérodimère Fos-Jun. Le complexe AP-1 occupe donc une position clé dans les signaux médiés par les cytokines qui va mener à l'augmentation de l'expression des MMPs et à l'acquisition d'un phénotype invasif.

Figure 1 La région régulatrice du gène de la métalloprotéinase-9 (MMP-9).



4 Hypothèse

Nous pensons que l'activation transitoire des oncogènes c-jun et c-fos par TNF, IL-1 ou TPA va donner aux CTBs leur caractère invasif et induire la production de MMP-9.

Nous essayons d'en apporter une preuve indirecte en étudiant la localisation, et l'éventuelle colocalisation, de Jun, Fos et MMP-1,2,9 dans le trophoblaste de grossesses jeunes.

5 Matériel et méthodes

5.1 Provenance du matériel

Les coupes examinées proviennent de situations différentes :

a) Coupes d'un site d'implantation : 11^{ème} semaine d'aménorrhée (SA)

Patiente 4G 3P de 40 ans, connue pour un utérus myomateux symptomatique et désirant une interruption de grossesse, chez qui, sur le désir de la patiente, on effectue une hystérectomie totale abdominale à 11 semaines d'aménorrhée.

b) Coupes de 5^{ème} à 12^{ème} semaine d'aménorrhée

Les coupes proviennent du matériel de curetage et d'aspiration de grossesses jeunes (n=16) de 5 à 12 semaine d'aménorrhée suite à un curetage interrupteur pour interruption de grossesse pour des raisons psychosociales.

Les tissus frais sont fixés dans le formol puis enrobés en paraffine. Des coupes de 10 micromètres sont réalisées au microtome et montées sur des lames de verre prétraitées au silane.

5.2 Immunohistochimie

Table II : Résumé des anticorps primaires

Anticorps	Type	Classe	Provenance	Dilution
MMP-1	Monoclonal souris	41-IE5-IM35L	Oncogène	1/100
MMP-2	Monoclonal souris	42-5DII/IM33L	Oncogène	1/80
MMP-9	Monoclonal souris	56-24A/IM33L	Oncogène	1/80 et 1/200
TIMP-1	Polyclonal	9013.1609	Anawa	1/10
TIMP-2	Monoclonal souris	T2-101/IMIIL	Oncogène	1/100
P53 wt	Monoclonal souris	Pab1620/OP33	Oncogène	1/50
P53 mut + wt	Monoclonal souris	Pab1 620/OP29	Oncogène	1/50
CJun	Polyclonal lapin	PCO6/	Oncogène	1/20 et 1/50
Cfos	Polyclonal lapin	PCO5/Ab-2	Oncogène	1/20 et 1/50
cytokératine	Oligoclonal souris	1124 161	Boehringer	1/100

5.3 Description de la méthode

Les coupes montées sur lame sont déparaffinées dans le xylol (3 fois 5 minutes), réhydratées dans l'éthanol puis dans l'eau (par étapes de 5 minutes) et enfin rincées à l'eau.

Les lames sont alors placées dans un bac contenant du tampon citrate-HCl (10mM, pH 6.0). Le

Le bac est glissé dans un four à micro-onde (500W) et chauffé 4 fois 5 minutes avec 5 minutes de refroidissement entre deux périodes de chauffage. Après avoir rincé les coupes à l'eau, elles sont incubées pendant 15 à 20 minutes avec du tampon phosphate (PBS 0.05% + 5% albumine bovine, BSA). Après l'incubation, le premier anticorps (dilué dans le tampon PBS-BSA) est ajouté et l'incubation est continuée pendant une nuit à 4°C dans une atmosphère humide. Le lendemain matin, les lames sont rincées avec le tampon PBS-BSA et le deuxième anticorps (rabbit anti-mouse ou sheep anti-rabbit conjugués à la biotine) est ajouté à une dilution de 1/250 dans le PBS-BSA et incubé pendant 30 minutes à température ambiante. Après un rinçage, le conjugué streptavidine-phosphatase alcaline (Biogenex, San Ramon, USA) est ajouté et les lames incubées pendant 30 minutes. Après l'incubation et un rinçage au PBS, le substrat (qui révélera la présence de la phosphatase alcaline liée à l'antigène grâce aux deux anticorps) est ajouté aux lames (pendant 10 à 30 minutes). Ce substrat (5bromo-4 chloro-3 indoyl phosphate (« Fast Red » de Dako, Copenhague, Danemark) se transforme en un produit insoluble bleu en présence de phosphatase et permet ainsi la mise en évidence de l'antigène. La lame est alors couverte d'une lamelle et fixée avec l'agutax (Dako, Copenhague, Danemark).

6 Résultats

6.1 Définition des structures

Les villosités sont des formations de mésenchyme d'origine fœtale contenant essentiellement des fibroblastes et des cellules endothéliales fœtales, et qui sont entourées d'abord par une couche de CTB, puis par une deuxième couche, le STB (**Figure 2**).

Les villosités crampons sont les villosités placentaires en contact avec la décidue basale grâce à des colonnes de cellules trophoblastiques : les CTB extravilleux (evCTB). Nous avons divisé ces evCTB selon leur phénotype en trois différentes catégories :

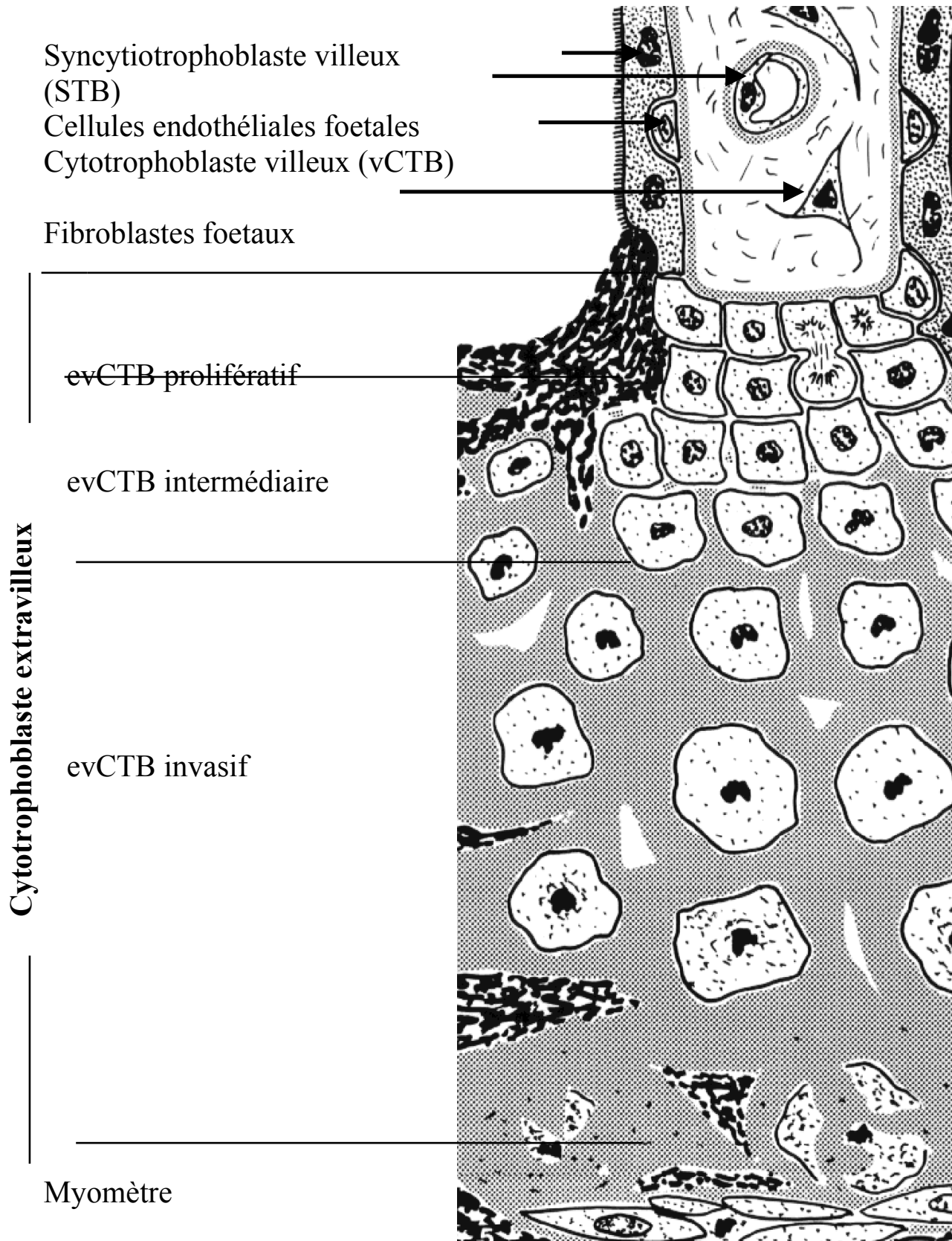
- Le phénotype prolifératif : il est constitué par des cellules en division se trouvant dans la partie proximale de la colonne. Elles permettent l'encrage de l'unité foeto-placentaire à l'utérus

maternel. Il s'agit de plusieurs couches de cellules polarisées, connectées entre elles par des jonctions intercellulaires. Il n'y a pas de matrice extracellulaire entre elles.

- Le phénotype intermédiaire : ces cellules commencent à se différencier: elles perdent graduellement leur polarité et leur capacité à se diviser. Ces cellules acquièrent un phénotype invasif.. On peut observer à certains endroits une augmentation de l'espace intercellulaire occupé par la matrice extracellulaire.

- Le phénotype invasif : ce sont les cellules localisées dans la partie distale de la colonne ne formant plus de jonctions intercellulaires. Ces cellules ne se divisent plus, elles sont apolaires leur noyau est plus petit, ovoïde et le corps cellulaire est plus allongé que celui des cellules proximales. Elles sont séparées par l'accumulation de matrice extra-cellulaire (fibronectine, laminine, collagène de type I) et elles s'étendent de la partie distale de la colonne jusque dans la décidue basale et dans l'endomètre.

Figure 2 : Colonne trophoblastique et cellules étudiées



6.2 Immunolocalisation

6.2.1 MMP-1 (Figure 3.A)

La figure 3.A montre des villosités flottantes et une villosité crampon d'un placenta du 1^{er} trimestre (12^{ème} semaine). Les CTB villeuses ainsi que le STB sont intensément positif pour la MMP1. Il n'y a aucune différence entre les villosités flottantes ou crampons (flèches bleues). Toutes les cellules extra villeuses (prolifératives (1), intermédiaires (2) et distales (3)) sont également marquées mais l'intensité de la coloration est moins forte dans ces dernières par comparaison aux cellules villeuses. Il faut noter qu'aucune des cellules du stroma fœtal n'exprime la MMP-1.

6.2.2 MMP-2 (Figure 3.B)

Toutes les cellules étudiées expriment la MMP-2 (vCTB, vSTB, evCTB). A la différence de MMP-1, on ne remarque pas de coloration plus marquée dans les vCTB que dans les vSTB (flèches noires). Il est intéressant de noter la présence d'un gradient de coloration : les evCTB prolifératifs montrent une coloration plus faible que les evCTB invasives (comparer 1 et 2). L'intensité de la coloration ou sa répartition ne change pas de la 5^{ème} à la 12^{ème} SA (résultats non présentés). Les cellules endothéliales fœtales et les fibroblastes fœtaux expriment également MMP-2, bien que la coloration soit plus faible que dans les autres cellules (flèches bleues).

6.2.3 MMP-9, dilution 1/80 (Figure 3.C)

Cette gélatinase est exprimée par toutes les cellules étudiées, y compris par les cellules endothéliales et fibroblastes fœtaux (flèche bleue). La coloration la plus forte est retrouvée dans les evCTB, autant prolifératives (1) que distales (2), sans véritable gradient de coloration dans les différents phénotypes (flèche noire). On note toutefois une intensité de coloration nettement plus forte dans les vCTB que dans les vSTB (comparer 3 et 4). Il n'y a par contre pas de changement

de coloration notable entre la 5^{ème} et la 12^{ème} semaine d'aménorrhée.

6.2.4 Cytokératine (Figures 3.D)

La cytokératine est un marqueur des cellules épithéliales. Une forte intensité de coloration est observée de manière égale dans les vSTB (1), les vCTB (2) et les evCTB (3), confirmant ainsi leur origine. Les fibroblastes fœtaux par contre sont, comme prévu, cytokératine négative.

6.2.5 TIMP-1 (Figure 3.E)

Toutes les cellules étudiées expriment cet inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases : les vCTB, vSTB, evCTB et également les cellules du stroma fœtal. L'intensité de coloration est similaire dans les vCTB, vSTB et dans les evCTB. On note cependant une diminution progressive de l'intensité de coloration dans les evCTB de la 5^{ème} à la 12^{ème} semaine d'aménorrhée (insert, 5^{ème} semaine), alors qu'elle reste stable dans les vCTB et vSTB.

6.2.6 TIMP-2 (Figure 3.F)

Aucune des cellules étudiées n'exprime cet inhibiteur des métalloprotéases, ni les cellules d'origine fœtale, ni celles d'origine maternelle. Cet anticorps peut être considéré comme témoin négatif.

6.2.7 C-jun (Figure 4.A)

Toutes les cellules étudiées expriment cette protéine, toutefois à des intensités différentes : la plus forte coloration est trouvée dans les vCTB (1) et dans les cellules du stroma fœtal (2), l'intensité de coloration des autres cellules étant plus faible. Dans les evCTB la concentration augmente clairement avec le pouvoir invasif des cellules (evCTB prolifératives (3) < evCTB

intermédiaires (4) < evCTB invasives (5)).

De la 5ème à la 12ème semaine d'aménorrhée l'intensité de coloration dans les vSTB tendent à diminuer, alors que dans les vCTB elles tendent à s'accroître. Les cellules endothéliales fœtales et les fibroblastes fœtaux présentent également une forte intensité de coloration, avec une discrète diminution de l'intensité de la 5ème à la 12ème semaine d'aménorrhée.

6.2.8 C-fos (Figure 4.B)

Cette protéine est exprimée par toutes les cellules étudiées, y compris les cellules fœtales (quoique faiblement). On retrouve une différence d'intensité de coloration entre les vSTB et les vCTB en faveur des vCTB (comparer (1) et (2)), comme déjà décrit précédemment pour c-jun. Par contre, à l'inverse de c-jun, il n'y a pas de gradient d'expression entre les 3 types de evCTB (prolifératif, intermédiaire et invasif). En revanche, les evCTB prolifératives (3) et intermédiaires (4) sont plus marquées que les invasives (5).

6.2.9 P-53 wild type (Figure 4.C)

Sur les coupes de la 7ème à la 10ème SA, aucune cellule étudiée n'exprime cette protéine alors que la p53 est fortement exprimée dans un cancer du sein (insert).

6.2.10 P-53 mut (Figure 4.D)

L'anticorps p53 qui reconnaît la forme mutée donne un signal positif dans toutes les cellules trophoblastiques, à l'exception des cellules du stroma fœtal. L'intensité varie selon le type cellulaire : vCTB et STB sont faiblement positives ((1), (2) respectivement) alors que les evCTB prolifératives (3) et intermédiaires (4) sont très intensément marquées . Les cellules evCTB invasives (5) sont d'intensité intermédiaire.

6.2.11 MMP-9 (dilution 1/200) (Figure 5.A)

Les vSTB n'expriment que très faiblement la MMP-9, alors que l'intensité de la coloration dans les vCTB est très marquée (comparer (1) et (2)). On observe une forte coloration dans les CTB extravilleuses avec la présence d'un gradient d'intensité de coloration évident et croissant entre les evCTB prolifératives (intensité de coloration plus faible (3)), les evCTB intermédiaires (intensité de coloration moyenne (4)) et les evCTB invasives (intensité de coloration la plus forte (5)). Les cellules endothéliales et le stroma fœtal expriment également cette gélatinase quoique plus faiblement qu'avec la dilution de 1/80 de l'anticorps MMP-9 (flèche bleue). Nous ne notons par contre aucun changement de la 5ème à la 12ème semaine d'aménorrhée.

6.2.12 MMP-2 (Figure 5.B)

Cette métalloprotéase est exprimée par toutes les cellules étudiées. Toutefois l'intensité de coloration diffère selon le type de cellule concerné: la coloration est marquée dans les vCTB et vSTB. Dans les evCTB on trouve un gradient de coloration qui se renforce en allant de l'evCTB prolifératif à l'invasif (flèche noire). Le stroma fœtal exprime également la MMP-2 bien qu'à une intensité moindre.

6.3 Table III : Résumé des résultats

Trophoblaste						Stroma foetal	
Type	vCTB	vSTB	evCTB prolif	evCTB interméd	evCTB invasif	Endothelium	Fibroblastes
MMP-1	+++	+++	++	+	++	O	O
MMP-2	++	++	++	++	+++	+	+
MMP-9 1/80	+++	++	+++	+++	+++	++	++
MMP-9 1/200	+++	+	++	++	+++	+	+
TIMP-1	++	++	++	++	++	++	++
TIMP-2	O	O	O	O	O	O	O
p53 wt	O	O	O	O	O	O	O
p53 mut	+	+	+++	+++	++	+	+
cJun	+++	++	+	++	++	+++	+++
cFos	++/+++	++	++	++	++	+	+
Cytokér	++	++	++	++	++	O	O

6.4 Figure 3

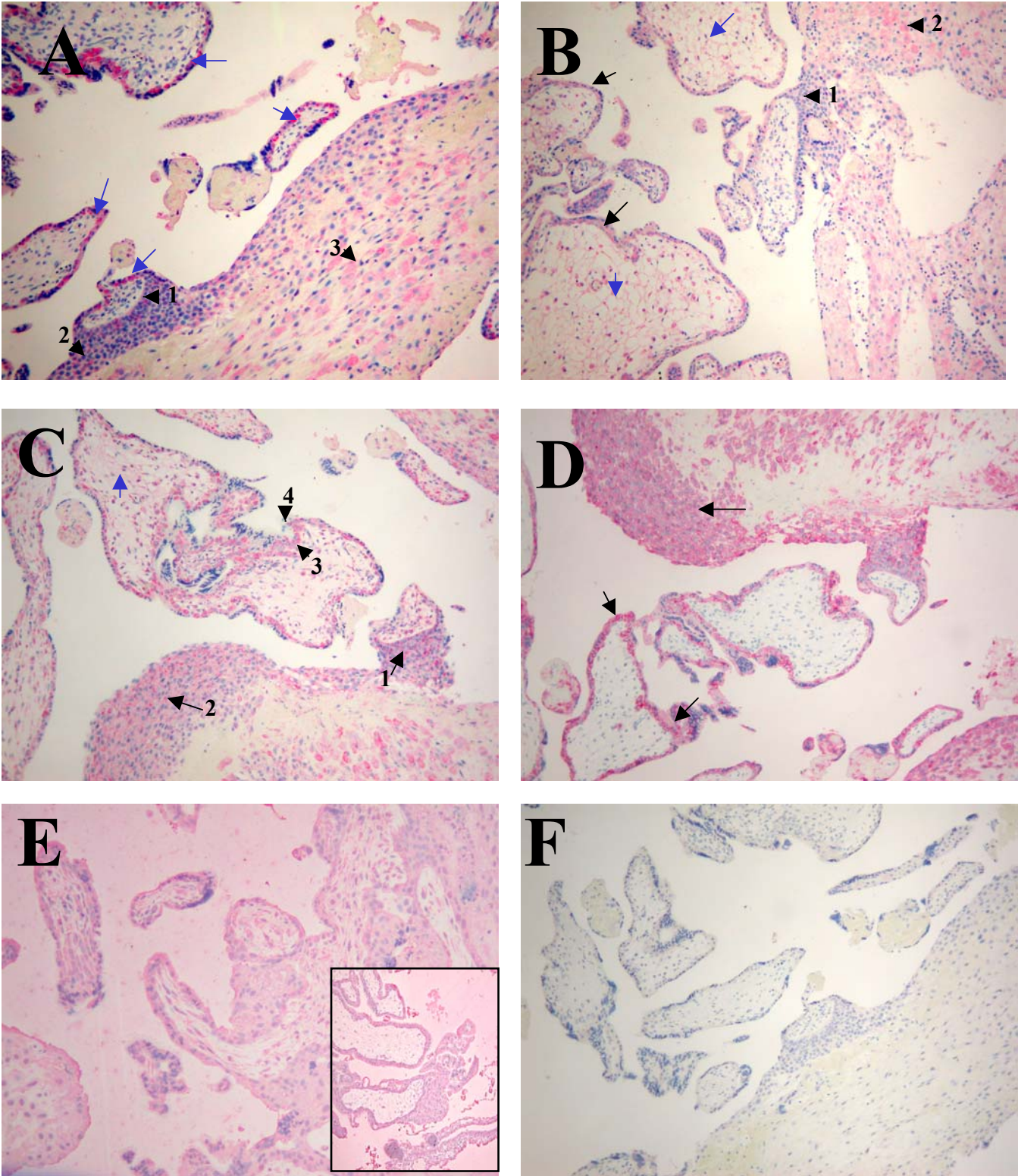


Figure 3. Sites d'implantations (x10) coloré avec: **A**, anti-MMP-1; **B**, anti-MMP-2; **C**, anti-MMP-9;

6.5 Figure 4

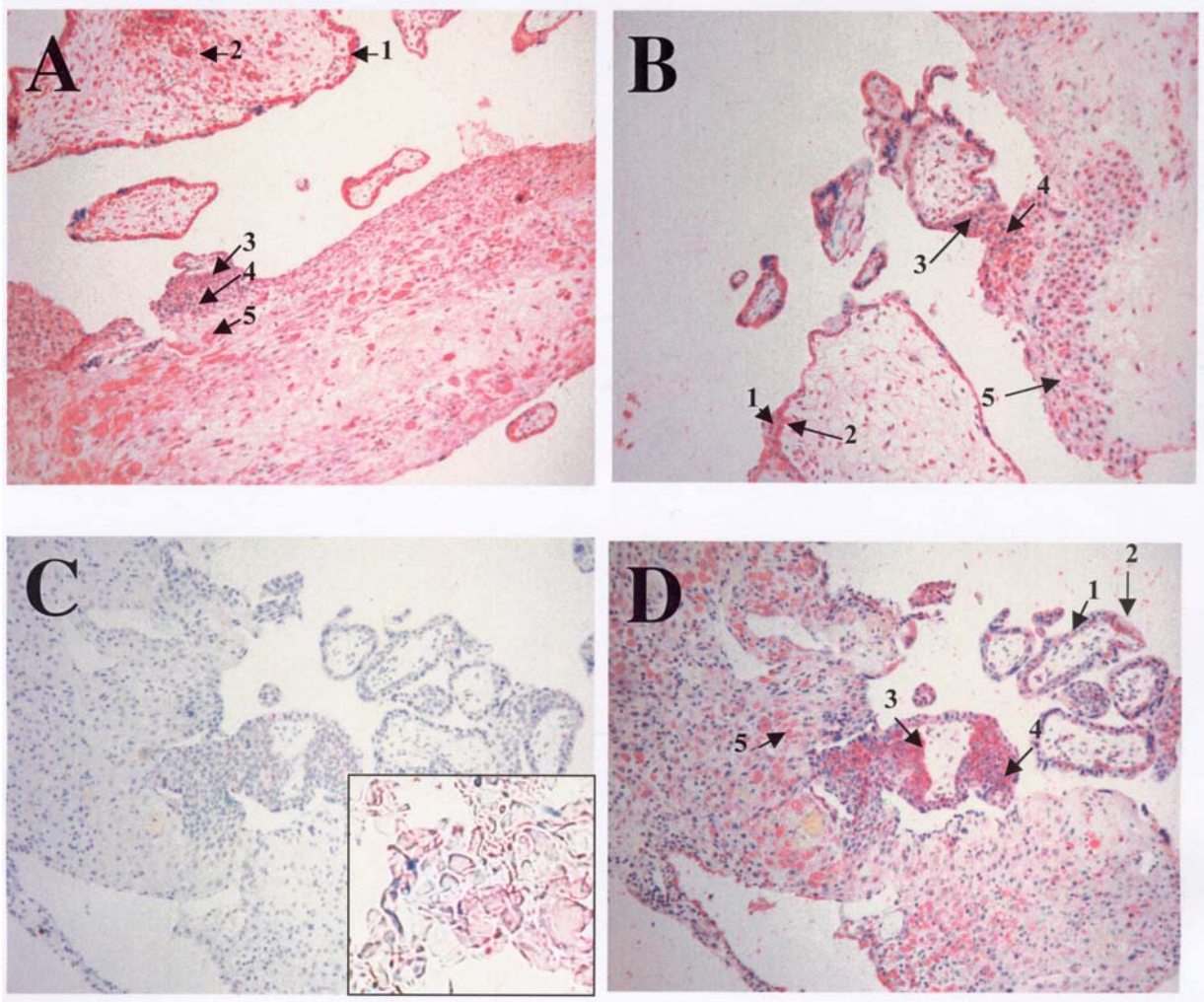


Figure 4. Sites d'implantations (x10) coloré avec; **A**, anti-cJun; **B** anti-cFos; **C**, anti-p53wt; **D**, anti-p53mut;

6.6 Figure 5

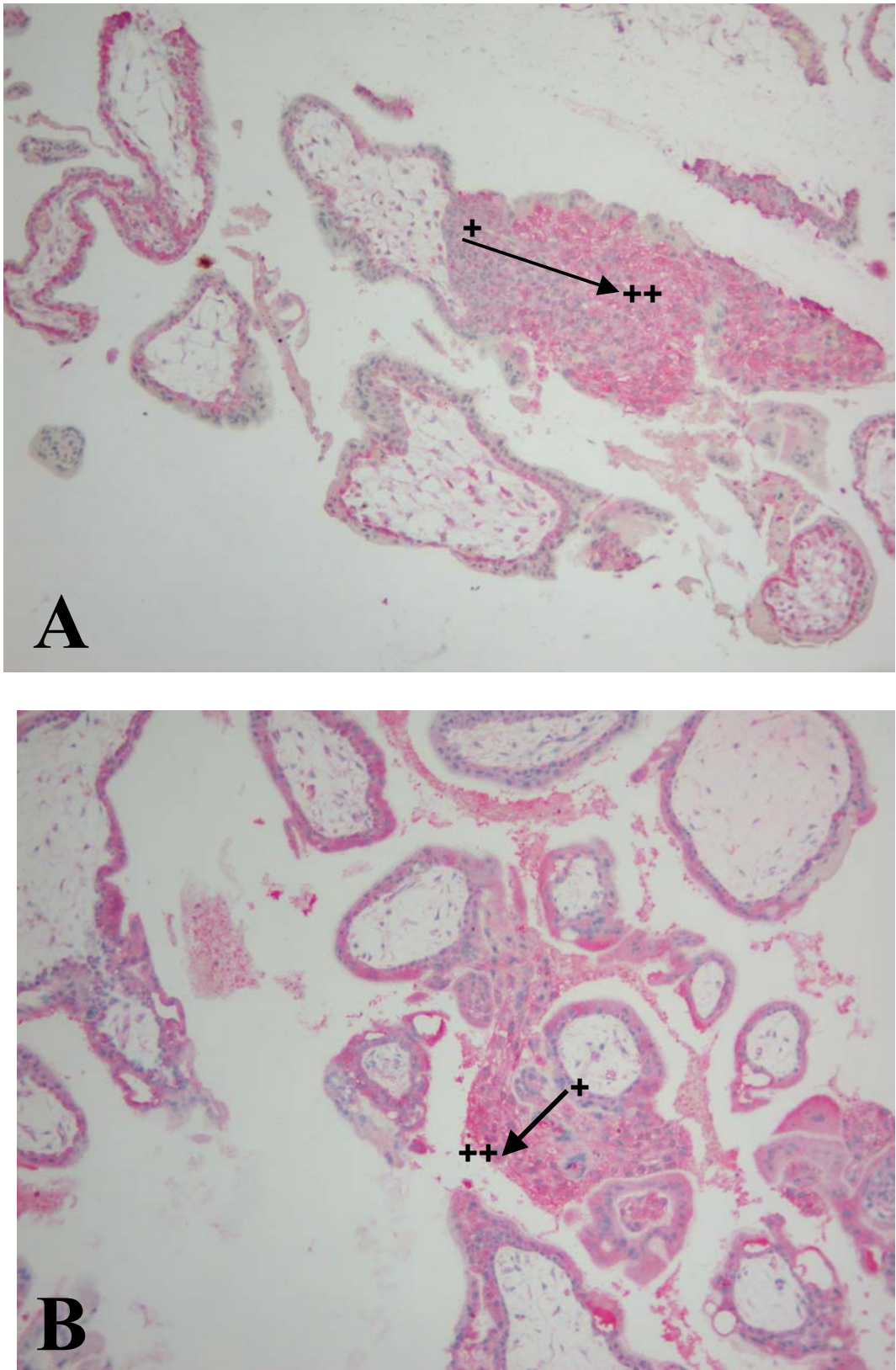


Figure 5. Grossesse de 5 semaines colorés avec: **A**, anti-MMP-9; **B**, anti-MMP-2.

7 Discussion

Comme toute méthode, l'immunohistochimie comporte des limites dont il convient de tenir compte dans l'interprétation des résultats. Il s'agit d'une méthode qui n'est que semi-quantitative et une coloration plus intense ne veut pas forcément dire que ces MMPs sont effectivement synthétisées en plus grande quantité. Cela pourrait aussi vouloir indiquer que les MMPs sont stockées ou liées à un récepteur.

Par ailleurs nous avons utilisé des coupes paraffines, qui, par rapport aux coupes cryostatiques, ont l'avantage de diminuer la perte d'enzymes due à la diffusion, mais qui comportent un risque de diminution d'antigénicité. Ceci pourrait expliquer la non-expression de TIMP-2 dans toutes les cellules analysées. Ce même résultat est obtenu dans d'autres travaux, notamment ceux de Huppertz et al. , 1997, où en coupes paraffines aucune cellule n'exprime cet inhibiteur, alors que son expression a été retrouvée dans les evCTB intermédiaires et invasives sur coupes cryostatiques.

En comparant nos résultats avec ceux obtenus par Huppertz et al. ,1997, on note toutefois plusieurs différences :

Dans notre série, MMP-1 est exprimée par toutes les cellules des evCTB, y compris par les evCTB prolifératives, donc ceux à faible pouvoir invasif. Huppertz ne trouve aucune expression de cette collagénase interstitielle dans les evCTB prolifératives. Par contre dans les deux travaux on note un gradient croissant dans l'expression de MMP-1 des evCTB intermédiaires vers les evCTB invasives. Le même commentaire s'applique également à l'expression de MMP-2 et MMP-9 : il y a un gradient d'expression croissant avec le pouvoir invasif des evCTB dans les deux travaux, avec la différence que nous trouvons également une expression dans les evCTB prolifératives, ce qui n'est pas le cas dans les coupes étudiées par Huppertz.

Probablement que ces différences de résultats sont en partie explicables par l'utilisation d'anticorps différents.

Les cellules endothéliales, un des outils de l'angiogenèse, expriment les MMP-2, MMP-9, TIMP-1, c-jun et c-fos, même si l'expression est plus faible que dans les evCTBs. Ceci indique que dans le processus d'angiogenèse, qui ne peut se faire sans digestion de la matrice extra-cellulaire,

interviennent (en tous les cas en partie) les mêmes activateurs et inhibiteurs que dans l'invasion trophoblastique.

Le fait que MMP-2 et MMP-9 ont une plus grande expression dans les evCTB invasives que dans les evCTB prolifératives est à souligner, car elle indique l'importance de ces MMPs au front d'invasion. Ceci correspond à des observations faites *in vitro* (Librach et al. ,1991) qui montrent le rôle prédominant de MMP-9 dans l'invasion du matrigel par les CTBs. Ainsi, l'acquisition d'un phénotype invasif va-t'il de paire avec une expression croissante des gélatinases.

Or MMP-2 est une MMP constitutive, elle est donc peu régulée et produite de manière basale. Pourquoi l'expression de cette MMP est-elle plus élevée dans les evCTB par comparaison aux vCTB? Son expression plus abondante dans les evCTB ne peut s'expliquer simplement et nécessite des investigations supplémentaires. En revanche, la MMP-1 qui est régulée, est plus fortement exprimée dans les vCTB que dans le evCTB. Cela pourrait vouloir dire que cette MMP est peut-être impliquée dans le mécanisme de syncytialisation. En effet, les vCTB sont essentiellement des cellules souches dont la fusion va permettre la mise en place du STB.

L'expression de TIMP-1 est plus forte dans les vCTB que dans les evCTB. L'observation a une implication importante car elle peut vouloir dire que TIMP-1 est partiellement inhibé dans les cellules evCTB et que cette inhibition pourrait faire partie du mécanisme qui confère à ces cellules leur caractère invasif. Ainsi, lorsque les vCTB quittent le tronc villositaire pour devenir invasives, elles diminuent l'expression de l'inhibiteur TIMP-1 et augmentent l'expression de la MMP-9.

La diminution de l'expression du TIMP-1 dans les evCTB entre la 5^e et la 12^e semaine d'aménorrhée permet de poser l'hypothèse que la diminution puis l'arrêt de l'invasion trophoblastique lors du premier trimestre de la grossesse peut éventuellement être imputable au TIMP-1 sécrété par les cellules déciduales. Graham et Lala (1991) ont montré que TIMP-1 inhibait l'invasion *in vitro* des CTBs dans le matrigel.

La colocalisation de TIMP-1 avec les trois MMPs étudiées (MMP-1, MMP-2 et MMP-9), montre l'équilibre délicat entre les facteurs favorisant et les facteurs inhibant l'invasion, ce qui est primordial dans la maîtrise de ce processus.

Le p53wt (wild type) n'est pas exprimé par les cellules étudiées. Pour rappel, le p53 est un peptide anti-oncogénique. Or, lorsqu'il est muté, il perd ces fonctions anti-oncogéniques. La mutation de p53 lui fait perdre une forme tridimensionnelle différente ce qui explique qu'il n'est plus reconnu par notre anticorps utilisé. Il est à noter que l'anticorps qui reconnaît la forme mutée de p53 et la forme wild type montre une localisation trophoblastique de cet onco-suppresseur. Cette observation indique que la structure tertiaire de p53 placentaire est différente de celle d'autre tissus (cancer du sein par exemple). Par transfection dans des CTB (Bischof, observations non publiées) le p53 inhibe l'expression de la MMP-9. Toutefois, la stimulation du p53 endogène par l'étoposide reste sans effet. Ces résultats sont en ligne avec nos observations immunohistochimiques et indiquent que la fonctionnalité oncopressive de p53 placentaire est perdue. Cela pourrait bien être une cause de l'acquisition d'un phénotype invasif par les evCTB.

L'expression de c-jun comme celle de MMP-2 et MMP-9 montre un gradient croissant du evCTB prolifératif vers le evCTB invasif. Ainsi les cellules les plus invasives expriment bien c-jun. Comme déjà discuté sous 3.2.4., l'hétérodimère de Jun et Fos, appelé complexe AP-1, joue un rôle capital dans l'expression de MMP-9. Lorsque dans le processus d'activation la protéine kinase C va phosphoryler AP-1, le domaine c-terminal de Jun va reconnaître le site TRE (« TPA responsive element ») de MMP-9, ce qui va augmenter les liaisons entre AP-1 et TRE, et, par la même, induire la transcription du gène de la MMP-9. La colocalisation de jun et de MMP-9 dans les evCTB nous permet de postuler qu'AP1 joue certainement aussi un rôle régulateur in-vivo.

Le fait que c-fos n'ait pas de gradient peut-être vouloir dire que dans le complexe AP-1 qui régule l'expression du gène de la MMP-9, ce n'est pas c-fos qui est important. Peut-être un autre membre de la famille est impliqué, comme FosB ou FRA-1 qui sont des facteurs de transcription connus pour former des complexes AP-1 également.

8 Conclusion

Notre étude immunohistochimique confirme l'hypothèse de travail selon laquelle les oncogènes *jun* et *fos* sont colocalisés avec les métalloprotéases MMP-1, -2, et -9. Ces résultats *in vivo* correspondent bien aux résultats *in vitro* selon lesquels le complexe AP-1 joue un rôle essentiel à la transcription de la MMP-9 dans les cellules cytotrophoblastiques humaines (Bischof et al, 2003).

En outre, ce travail confirme *in vivo* les effets de TIMP-1 sur l'invasion trophoblastique observés *in vitro*.

L'observation originale montrant une expression plus importante de MMP-1 dans les vCTB par rapport aux evCTB ouvre une nouvelle voie de recherche. En effet, ce résultat immunohistochimiques pourrait vouloir indiquer que cette MMP (et peut-être d'autres protéases) sont impliquées dans le mécanisme de fusion cellulaire menant à la formation du syncytium. Cette possibilité sera investiguée *in vitro* avec des CTB purifiées à partir de produits d'avortement.

9 Bibliographie

- Autio-Harmainen H, Hurskainen T, Niskasaari K, Hoyhtya M, Tryggvason K (1992). Simultaneous expression of 70 kilodalton type IV collagenase and type IV collagen alpha 1 (IV) chain genes by early human placenta and gestational endometrium. *Lab. Invest.* 6: 191-200
- Bass KE, Morrisch D, Roth I, Bhardwaj D, Taylor R, Zhou Y, Fisher SJ (1994). Human cytotrophoblast invasion is up-regulated by epidermal growth factor: Evidence that paracrine factors modify this process. *Develop. Biol.* 164: 550-561
- Bell SC, Hales MW, Patel S, Kirwan PH, Drife JO (1985). Protein synthesis and secretion by the human endometrium and decidua during early pregnancy. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 92: 793-803
- Bhatt H, Brunet LJ, Stewart CL (1991). Uterine expression of leukaemia inhibitory factor coincides with the onset of blastocyst implantation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 11402-11412
- Bischof P, Friedli E, Martelli M, Campana A (1991). Expression of extracellular matrix-degrading metalloproteases by cultured human cytotrophoblast cells: Effect of cell adhesion and immunopurification. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 65: 1791-1801
- Bischof P, Haenggeli L, Campana A (1995). Effect of leukaemia inhibitory factor on human cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway. *Am. J. Reprod. Immunol.* 34: 225-230
- Bischof P, Martelli M, Campana A, Itoh Y, Ogata Y, Nagase H (1995). Importance of metalloproteinases (MMP) in human trophoblast invasion. *Early Pregn. Biol. Med.* 1: 263-269
- Bischof P, Meisser A, Campana A, Tseng L (1998). Effects of decidua conditioned medium and insuline-like growth factor binding protein-1 on trophoblast matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Placenta* 19: 457-464
- Bischof P, Truong K, Campana A (2003). Regulation of trophoblastic gelatinases by proto-oncogenes. *Placenta* 24: 155-163
- Cowell TP (1969). Implantation and development of mouse eggs transferred to the uteri of non progestational mice. *J. Reprod Fertil.* 19: 239-245
- Delamy AM, Brinckerhoff CE (1992). Post transcriptional regulation of collagenase and stromelysin gene expression by epidermal growth factor dexamethasone in cultured human fibroblasts. *J. Cell. Biochem.* 50: 400-410
- Eades DK, Cornelins P, Pekala PH (1988). Characterisation of the tumour necrosis factor receptor in human placenta. *Placenta* 9: 247-251
- Emonard H, Aghayan M, Smet M, Shaaps JP, Grimaud JA, Christiane Y, Foidart JM (1993). Role of extracellular matrix in regulation of type IV collagenase synthesis by human trophoblast cells and their malignant counterparts. *Troph. Res.* 7: 201-210
- Emonard H, Christiane Y, Smet M, Grimaud JA, Foidart JM (1990). Type IV and interstitial collagenolytic activities in normal and malignant trophoblast cells are specifically regulated by the extra cellular matrix. *Invas. Metastasis* 10:170-1777
- Expression of leukaemia inhibitory factor in human endometrium and placenta. *Biol. Reprod.* 50: 882-887
- Feinberg RF, Kliman HJ, Wang CL (1994). Transforming growth factor beta stimulates trophoblast oncofetal fibronectin synthesis in vitro: implications for trophoblast implantation in vivo. *J.Clin. Endocr. Metab.* 78: 1241-1248

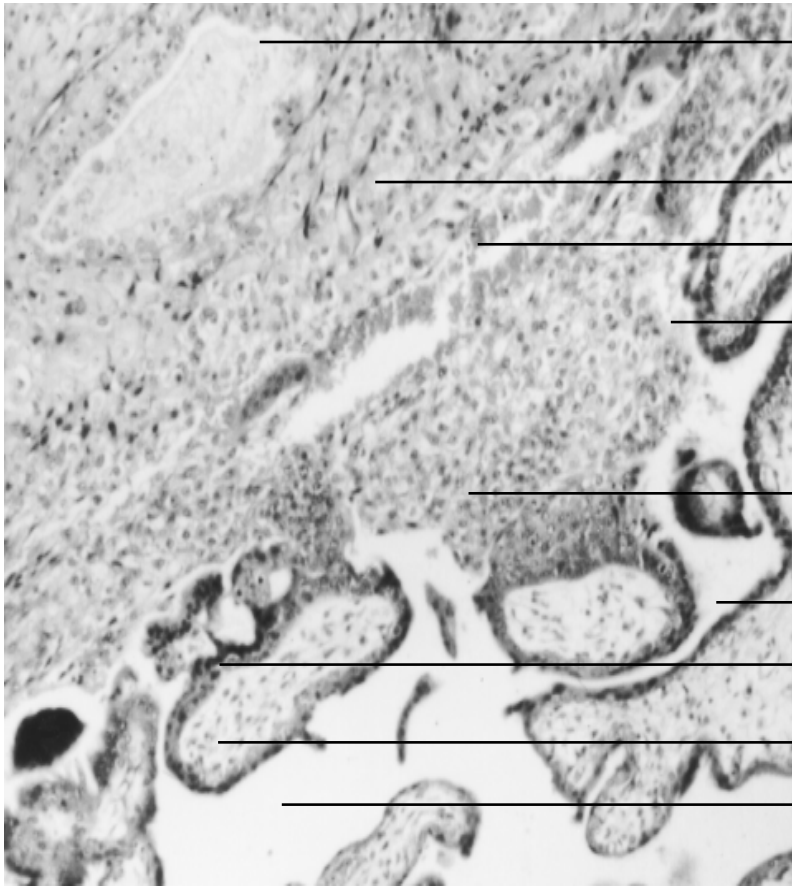
- Fernandez PL, Merino MJ, Nogales FF, Charonis AS, Stetler-Stevenson W, Liotta L (1992). Immunohistochemical profile of basement membrane proteins and 72 kilodalton type IV collagenase in the implantation placental site. *Lab. Invest.* 66: 572-579
- Fini ME, Strissel KJ, Girard MT, West Mays J, Rinehart WB (1994). Interleukin-1 alpha mediates collagenase synthesis stimulated by phorbol 12-myristate 13-acetate. *J. Biol. Chem.* 269 : 11291-11298
- Fisher SJ, Cui T, Zhang L, Hartmann L, Grahl K, Guo-Yang Z, Tarpey J, Damsky CH (1989). Adhesive and degradative properties of human placental cytotrophoblast cells in vitro. *J. Cell. Biol.* 109: 891-902
- Fisher SJ, Leitch MS, Kantor MS, Basbaum CB, Kramer RH (1985). Degradation of extracellular matrix by the trophoblastic cells of first trimester placentas. *J. Cell. Biochem.* 27: 31-41
- Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP (1997). Tissue inhibitor of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur. J. Cell. Biol.* 74: 111-122
- Graham CH, Connelly I, MacDougall JR, Kerbel RS, Stetler-Stevenson WG, Lala PK (1994). Resistance of malignant trophoblast cells to both the anti-proliferative and anti-invasive effects of transforming growth factor beta. *Experimental Cell Res.* 214: 93-99
- Graham CH and Lala PK (1991). Mechanism of control of trophoblast invasion in situ. *J. Cell. Physiol.* 148: 228-234
- Graham CH, Lysiak JJ, Mc Crae KR, Lala PK (1992). Localisation of transforming growth factor of the human foetal-maternal interface: Role in trophoblast growth and differentiation. *Biol. Reprod.* 4: 561-572
- Han VK, Basset N, Walton J, Challis JR (1996). The expression of insulin-like growth factor (IGF) and IGF-binding protein (IGFBP) genes in the human placenta and membranes: evidence for IGF-IGFBP interactions at the foeto-maternal interface. *J. Clin. Endocr. Metab.* 81:2680-2693
- Hibi M, Murakami ; Saito M, Hirano T, Taga T, Kishimoto T (1990). Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, GP 130. *Cell* 63: 1149-1157
- Horowitz GM, Scott RT, Drews MR, Navot D, Hoffmann GE (1993). Immunohistochemical localisation of transforming factor in human endometrium, decidua and trophoblast. *J.Clin. Endocr. Metab.* 76 : 786-792
- Huppertz B, Kertschanska S, Demir A, Frank H-G, Kaufmann P (1998). Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases (MMP), their substrates, and their inhibitors (TIMP) during trophoblast invasion in the human placenta. *Cell Tissue Res.*, 291: 133-148
- Irving JA, Lala PK (1995). Functional role of cell surface integrins on human cytotrophoblast migration: regulation by TGF-beta, IGF II and IGFBP-1. *Exp. Cell. Res.* 217: 419-427
- Irving,JA, Lala PK (1995). Functional role of cell surface integrins on human trophoblast cell migration: regulation by TGFbeta, IGFII and IGFBP-1. *Exp. Cell Res.*, 217: 419-27
- Jauniaux E, Gulbis B, Schandene L, Colette J, Hustin J (1996). Distribution of interleukin-6 in maternal and embryonic tissues during the first trimester. *Molecular Human Reproduction* 2: 239-243
- Kauma SW, Matt D, Strom S, Eierman D, Turner T (1990). Interleukin-1 beta, human leukocyte antigen HLA-DR and transforming growth factor beta expression in endometrium, placenta and placental membranes. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 163: 1430-1437
- King A, Jokhi PP, Smith SK, Sharkey AM, Loke YW (1995). Screening for cytokine mRNA in human villous and extravillous trophoblasts using the reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) *Cytokine* 7: 364-371

- Klein M, Graf A, Kiss H, Czerwenka K, Beck A, Egarter C, Husslein P (1995). The relation between depth of trophoblastic invasion and beta-hCG levels in tubal pregnancies. *Arch. Gynecol. Obstet.* 256: 85-88
- Kliman HJ, Feinberg RF (1990). Human trophoblast extracellular matrix (ECM) interactions in vitro ECM thickness modulates morphology and proteolytic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 3057-3061
- Kojima K, Kanzaki H, Iwai M, Hatayama H, Fujimoto M, Inoue T, Horie K, Nakayama H, Fujita J, Mori T (1994). Kojima K, Kanzaki H, Iwai M, Hatayama H, Fujimoto M, Narukawa S, Higuchi T, Kaneko Y, Mori T, Fujita J (1995). Expression of leukaemia inhibitory factor (LIF) receptor in human placenta: a possible role for LIF in the growth and differentiation of trophoblasts. *Human Reproduction* 10: 1907-1911
- Kojima K, Kanzaki H, Iwai M, Hatayama H, Fujimoto M, Narukawa S, Higuchi T, Kaneko Y, Mori T, Fujita J (1995). Expression of leukaemia inhibitory factor (LIF) receptor in human placenta: a possible role for LIF in the growth and differentiation of trophoblasts. *Mol. Hum. Reprod.* 10: 1907-1911
- Librach CL, Feigenbaum SL, Bass KE, Cui TY, Verastás N, Sadovsky Y, Quigley JP, French DL, Fisher SJ (1994). Interleukin-1 beta regulates human cytotrophoblast metalloproteinase activity and invasion in vitro. *J. Biol. Chem.* 269 : 17125-17131
- Librach CL, Werb Z, Fitzgerald ML, Chiu K, Corwin NM, Esteves RA, Grobely D, Galaray R, Damsky CH (1991). 92 kDa type IV collagenase mediates invasion of human cytotrophoblast. *J. Cell Biol* 113: 437-449
- Licht P, Cao H, Zuo J, Lei ZM, Rao V, Merz WE, Day TG Jr. (1994). Lack of self-regulation of human chorionic gonadotropin biosynthesis in human choriocarcinoma cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 78: 1188-1194
- Lindner HR (1972). Choice of animal model for the study of ovum implantation derived from implantation in vitro. *Reprod. Fertil. Dev.*, 4: 653-70
- Lysiak JJ, Han VKM, Lala PK (1993). Localisation of transforming growth factor alpha in the human placenta and decidua : role in trophoblast growth. *Biol. Reprod.* 49: 885-894
- Meisser A, Cameo P, Islami D, Campana a, Bischof P (1999). Effects of interleukin-6 (IL-6) on cytotrophoblastic cells. *Molec. Hum. Reprod.* 5: 1055-1058
- Meisser A, Chardonnens D, Campana A, Bischof P (1999). Effects of tumour necrosis factor alpha, interleukin-1 alpha, macrophage colony stimulating factor and transforming growth factor beta on trophoblastic matrix metalloproteinases. *Molec. Hum. Reprod.* 5 : 252-260
- Milwidsky A, Finci-Yeheskel Z, Yagel S, Mayer M (1993). Gonadotropin-mediated inhibition of proteolytic enzymes produced by human trophoblast in culture. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 76: 1101-1005
- Mitchell EJ, Fitz-Gibbon L, O'Connor MC, Court MD (1992). Subtype of betaglycan and of type I and type II transforming growth factor (TGF) receptors with different affinities for TGF-1 and TGF-2 are exhibited by human placental trophoblast cells. *J. Cell. Physiol.* 150: 334-343
- Moll UM, Lane BL (1990). Proteolytic activity of first trimester human placenta: localisation of interstitial collagenase in villous and extravillous trophoblast. *Histochem.* 94: 555-560
- Nagase H (1997). Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol. Chem.* 378: 151-160
- Nishino H, Miyata M and Kitamura K (1998). The effect of interleukin-6 on enhancing the invasiveness of head and neck cancer cells in vitro. *European Archives of Otorhinolaryngology* 255: 468-472

- Obata NH, Tamakoshi K, Shibata k, Kikkawa F and Tomoda Y (1997). Effects of interleukin-6 on in vitro cell attachment, migration and invasion of human ovarian carcinoma. *Anticancer Res.* 17: 337-342
- Ohji M, Sundar Raj N, Thoft RA (1993). Transforming growth factor beta stimulates collagen and fibronectine synthesis by human corneal stromal fibroblasts in vitro: *Current Eye Res.* 12: 703-709
- Oktay K, Brzyski RG, Miller EB, Krugman K (1994). Association of serum beta-hCG levels with myosalpingeal invasion and viable trophoblast mass in tubal pregnancy. *Obstet. Gyneco.* 84: 803-861
- Partidge CA, Jeffrey JJ, Malik AB (1993). A 96 kDa gelatinase induced by TNF alpha contributes to increased microvascular endothelial permeability. *Am. J. Physiol.* 265: L438-L447
- Polette M, Nawrocki B, Pintiaux A, Massenat C, Maquoi E, Volders L, Schaaps JP, Birembaut P, Foidart JM (1994). Expression of gelatinases A and B and their tissue inhibitors by cells of early and term human placenta and gestational endometrium. *Lab. Invest.* 71: 838-846
- Puistola U, Ronnberg L, Martikainen H, Turpeenniemi-Hujanen T (1989). The human embryo produces basement membrane collagen (type IV collagen) -degrading protease activity. *Hum. Reprod.* 4: 309-311
- Richards CD, Shoyab M, Brown TJ, Gaudie J (1993). Selective regulation of metalloproteinase inhibitor (TIMP-1) by oncostatin M in fibroblast culture. *J.Immunol.* 150: 5596-5603
- Roth I, Fisher SJ (1999). IL-10 is an autocrine inhibitor of human placental cytotrophoblast MMP-9 production and invasion. *Dev. Biol.* 205: 194-204
- Rutanen EM (1992). Insuline-like growth factor binding protein-1. *Seminars in Reprod. Endocrin* 10:154-163
- Selick CE, Horowitz GM, Gratch M, Scott RT, Navot D, Hofmann GE (1994). Immunohistochemical localisation transforming growth factor beta in human implantation sites. *J.Clin. Endocr. Metab.* 78:592-596
- Sharkey A.M, Dellow K, Blayney M, Macnamee M, Charnock-Jones S and Smith S.K(1995). Stage-specific expression of cytokine and receptor messenger ribonucleic acids in human pre-implantation embryos. *Biol. Reprod.* 53:974-981
- Shimonovitz S, Hurwitz A, Dushnik M, Anteby E, Geva-Eldar T, Yagel S (1994). Developmental regulation of the expression of 72 and 92 kd type IV collagenases in human trophoblasts: A possible mecanism for control of trophoblast invasion. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 171: 832-838
- Shimonovitz S, Hurwitz A, Hochner-Celnikier D, Dushnik M, Anteby E, Yagel S (1998). Expression of gelatinase B by trophoblast cells: Down-regulation by progesterone. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 178: 457-461
- Simon C, Frances A, Piquette GN, Danasouri TE, Zurawski G, Dang W, Polan ML (1994). Embryonic implantation in mice is blocked by interleukin-1 receptor antagonist. *Endocrinol.* 134: 521-528
- Simon C, Frances A, Piquette GN, Hendrickson M, Milki A, Polan ML (1994). Interleukin-1 system in the materno-trophoblast unit in human implantation : Immunohistochemical evidence for autocrine/paracrine function : *J. Clin: Endocr. Metab.* 78: 847-854
- So T, Ito A, Sato T, Mori Y, Hirakawa S (1992). Tumour necrosis factor stimulates the biosynthesis of matrix metalloproteinases and plasminogen activator in cultured human chorionic cells. *Biol. Reprod.* 46: 772-778

- Stephanou A, Myatt L, Eis AL, Sarlis N, Jikihara H, Handwerger S (1995). Ontogeny of the expression and regulation of interleukin-6 (IL-6) and IL-1 mRNAs by human trophoblast cells during differentiation in vitro. *Journal of Endocrinology* 147: 487-496
- Tabibzadeh S, Kong QF, Babaknia A, May LT (1995). Progressive rise in the expression of interleukin-6 in human endometrium during menstrual cycle is initiated during the implantation window. *Hum. Reprod.* 10: 2793-2799
- Takahashi S, Sato T, Ito A, Ojima Y, Hosomo T, Nagase H, Mori Y (1993). Involvement of protein kinase C in the interleukin-1 alpha induced gene expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor 1 of metalloproteinases (TIMP-1) in human uterine cervical fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta* 57-65
- Tao YX, Lei ZM, Hofmann GE, Rao CV (1995). Human intermediate trophoblasts express chorionic gonadotropin/luteinising hormone receptor gene. *Biol. Reprod.* 53: 899-904
- Tremble P, Damsky CH, Werb Z (1990). Components of the nuclear signalling cascade that regulate collagenase gene expression in response to integrin-derived signals. *J. of Cell Biol.* 129: 1707-1720
- Unemori EN, Bair MJ, Bauer EA, Amento EP (1991). Stromelysin expression regulates collagenase activation in human fibroblast. *Biol. Chem.* 266 : 23477-23482
- Unemori EU, Ehsani N, Wang M, Lee S, Mc Guire J, Amento E (1994). Interleukin-1 and transforming growth factor alpha synergistic stimulation of metalloproteinases, PGE2 and proliferation in human fibroblasts. *Exp. Cell Res.* 210:166-171
- Vince GM, Starkey PM, Jackson MC, Sargent IL, Redman CWG (1990). Flow cytometric characterisation of cell populations in human pregnancy decidua and isolation of decidual macrophages. *J. Immunol. Meth.* 132: 181-189
- Werb Z, Tremble P, Damsky CH (1990). Regulation of extracellular matrix degradation by cell-extra cellular matrix interactions. *Cell Diff. & Develop.* 32 : 299-306
- Werb Z, Tremble PM, Behrendtsen O, Crowley E, Damsky CH (1989). Signal transduction through the fibronectine receptor induces collagenases and stromelysin gene expression. *J. Cell. Biol.* 109: 877-889
- Westermarck J, Kähäri VM (1999). Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumour invasion. *FASEB J.* 13: 781-792
- Yagel S, Geva TE, Solomon H, Shimonovitz S, Reich R, Finci-Yeheskel Z, Mayer M, Milwidsky A (1993). High levels of hCG retard first trimester trophoblast invasion in vitro by decreasing urokinase plasminogen activator and collagenase activities. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 77: 1506-1511
- Yagel S, Parhar RS, Jeffrey JJ, Lala PK (1988). Normal non-metastatic human trophoblast cells share in vitro invasive properties of malignant cells. *J.Cell. Physiol.* 136: 455-462
- Yang Y, Yelavarthi KK, Chen HL, Pace JL, Terranova PF, Hunt JS (1993). Molecular biochemical and functional characteristics of tumour necrosis factor alpha produced by human placental cytotrophoblastic cells. *J.Immunol.* 150: 5614-5624
- Yudoh K, Matsui H, Kanamori M, Maeda A, Ohmori K, Tsuji H (1994). Effects of epidermal growth factor on invasiveness through the extracellular matrix in high and low metastatic clones of RCT sarcoma in vitro. *J. Cancer Res.* 85: 63-71
- Zygmunt M, Hahn D, Kiesenbauer N, Munstedt K, Lang U (1998). Invasion of cytotrophoblastic (Jeg-3) cells is up-regulated by interleukin-15 in vitro. *Am. J. Reprod. Immunol.* 40: 326-331

Zygmunt M, Hahn D, Munstedt K, Bischof P, Lang U (1998). Invasion of cytotrophoblastic JEG-3 cells is stimulated by hCG in vitro. *Placenta* 19: 587-593



Glande

Décidu

Artère spiralée endométriale

Syncytiotrophoblaste vilieux

Cytotrophoblaste extravilleux

Villosité flottante

Cytotrophoblaste vilieux

Villosité

Espace intervilloux

