

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
INRS-Institut Armand Frappier

**RÉGULATION DE L'INVASION DU TROPHOBLASTE PAR LA
SÉROTONINE : RÔLE ET MÉCANISMES D'ACTION DU
RÉCEPTEUR DE LA SÉROTONINE DE TYPE 2A (5-HT_{2A})
PLACENTAIRE HUMAIN**

Par

Talal OUFKIR

Master en biologie

Thèse présentée pour l'obtention du grade de
Philosophiae doctor (Ph.D.) ès sciences en biologie

Programme offert conjointement par l'INRS et l'UQAM

Jury d'évaluation

**Président du jury
et examinateur interne**

M. Denis GIRARD
INRS- Institut Armand Frappier

Examineur externe

M. Edouard Kouassi
Université de Montréal

Examineur externe

M. Carlos MORENO REYES
Université du Québec à Trois Rivières

Directeur de recherche

Mme Cathy VAILLANCOURT
INRS- Institut Armand Frappier

REMERCIEMENTS

C'est non sans émotion et surtout avec beaucoup de fierté que je commence à écrire ces quelques lignes de remerciement qui sonnent la fin d'une période de ma vie pour affirmer ma reconnaissance envers ces personnes qui ont contribué à l'élaboration de ce travail.

Bien sûr, mes premiers remerciements vont à ma directrice de thèse, la Professeure Cathy Vaillancourt, qui m'a accordé à la fois une confiance pour mener à bien ce projet et une liberté sans limite dans le choix de mes idées scientifiques tout en ayant un regard pertinent du parfait superviseur. Je la remercie également pour son côté humain d'avoir su bien me gérer dans des situations particulièrement difficiles ; je pense évidemment aux deux fois où je suis devenu papa de deux garçons. Cathy, je te remercie du fond du cœur.

Je remercie vivement le Professeur Denis Girard d'avoir accepté d'assumer cette lourde charge administrative en étant à la fois président du jury et évaluateur interne, je le remercie également pour ces moments de complicités et d'amitié et de bonne humeur qu'il répand dans tout l'IAF. Mes remerciements aux Professeurs Édouard Kouassi et Carlos Moreno-Reyes pour avoir accepté d'être les évaluateurs externes de ce travail et pour toute l'attention qu'ils y ont portée.

Je tiens également à remercier le Professeur Thomas Sanderson pour avoir accepté que je « squatte » assez souvent ces paillasses et que j'utilise son matériel avec un grand cœur. Je le remercie également pour sa gentillesse et pour sa grande contribution à l'avancée de ce projet sur le plan intellectuel et technique.

Mes remerciements vont également à tous mes collègues de laboratoire, qui ont su me ménager pendant les périodes difficiles tout en gardant leur sourire et pour leur bonne humeur. Merci également pour votre aide et votre joie de vivre.

Je ne peux oublier de remercier tous les laboratoires de l'INRS qui m'ont permis d'utiliser leurs appareils ; les doctorants, post-doctorants ou assistants de recherche qui m'ont prodigué des conseils, des réactifs pour que je puisse avancer ce projet. Je les remercie tous du fond du cœur. Sans vous, la tâche aurait été presque impossible.

Et en dernier, mais pas les moindres, mes pensées vont à ma famille : mes parents, mes frères et sœurs, ma femme, mais surtout mes deux garçons, Elias et Mishaal qui sont nés durant ce projet et qui ont transformé ma vie et m'ont fait découvrir une joie et des sentiments sans égal.

RÉSUMÉ

L'implantation de l'embryon et la formation du placenta (placentation) sont des étapes essentielles en début de grossesse. Dès les premiers stades de la placentation, le trophoblaste humain, à l'origine du placenta, s'engage dans deux voies de différenciation : 1) la voie du trophoblaste villositaire (vCTB) qui constitue la cellule endocrine du placenta et 2) la voie du trophoblaste extravillositaire (evCTB) qui, par ses capacités invasives et migratoires, assure l'ancrage du placenta dans le myomètre et la formation de l'unité fœto-maternelle. En outre, le trophoblaste extravillositaire sécrète les métalloprotéases -9 et -2 capables de dégrader la matrice extracellulaire des tissus utérins. Dès l'implantation, le développement et la fonction du trophoblaste se trouve régulée par des hormones, des cytokines et des facteurs de croissance produits par le placenta et les différents tissus maternels. La sérotonine ou 5-hydroxytryptamine (5-HT) est une monoamine servant de neurotransmetteur dans le système nerveux central (SNC). Cette hormone est également synthétisée dans plusieurs tissus périphériques ou elle exerce des effets prolifératif, pro-invasif et pro-différenciation. La sérotonine exerce ses effets via l'activation de plusieurs types de récepteurs, incluant les récepteurs de type $2A$ (5-HT $_{2A}$). Ce dernier fait partie des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à une protéine de type G $_{q/11}$ (RCPG $_{q/11}$) et est connu pour activer les voies PLC-PKC, MEK/ERK1/2 et JAK2/STAT3. Ces voies de signalisation sont impliquées dans la régulation de la prolifération, la migration et l'invasion de trophoblaste. Au niveau placentaire, le récepteur 5-HT $_{2A}$ est exprimé dans les primocultures de trophoblaste humain de grossesse normale à terme et dans les lignées cellulaires de choriocarcinomes JEG-3 et BeWo (modèles *in vitro* du trophoblaste placentaire). Bien que la sérotonine et de son récepteur 5-HT $_{2A}$ soient présents au niveau de l'interface fœto-maternelle, son rôle potentiel dans le développement et les fonctions du trophoblaste n'ont jamais été étudié. L'hypothèse de recherche de cette thèse de doctorat est que le récepteur 5-HT $_{2A}$, via l'activation des voies de signalisation JAK2/STAT3 et MEK/ERK1/2, stimule les capacités prolifératives, migratoires et invasives du trophoblaste. Pour vérifier cette hypothèse, les objectifs spécifiques sont: (1) Déterminer le rôle du récepteur 5-HT $_{2A}$ placentaire dans la régulation de la prolifération et la croissance des cellules trophoblastiques; (2) Déterminer le mécanisme moléculaire impliqué dans l'effet mitogénique du récepteur 5-HT $_{2A}$ dans les cellules trophoblastiques; (3) Déterminer le rôle du récepteur 5-HT $_{2A}$ dans l'invasion des cellules trophoblastiques et le mécanisme moléculaire impliqué. Les résultats de cette thèse démontrent que l'activation spécifique du récepteur 5-HT $_{2A}$ exerce des effets prolifératifs, pro-migratoires et pro-invasifs sur les cellules trophoblastiques. Plus spécifiquement: le DOI ((±)-2,5-Diméthoxy-4-iodoamphetamine hydrochloride), agoniste sélectif du récepteur 5-HT $_{2A}$: (i) stimule la croissance et la prolifération des lignées trophoblastiques JEG-3 et BeWo; (ii) augmente le nombre de cellules en phase S et en phase G2/M du cycle cellulaire dans les cellules BeWo et JEG-3, respectivement; (iii) active les voies de signalisation JAK2/STAT3 et MEK/ERK1/2, (iv) augmente la prolifération des cellules JEG-3 via la stimulation des voies de signalisation JAK2/STAT3 et PLC/PKC/ERK1/2; (v) L'activité de ERK1/2 induit par le DOI nécessite l'activation de la voie JAK2/STAT3 et la voie PLC/PKC/Ras; (vi) stimule la croissance, la migration et l'invasion du trophoblaste extravillositaire (primocultures et les lignées cellulaires JEG-3 et HTR-8/SVneo et (vii) augmente

l'expression et l'activité des métalloprotéinases MMP-2 et MMP-9 dans les lignées trophoblastiques JEG-3 et HTR-8/SVneo via l'activation de la voie de signalisation JAK2/STAT3. L'ensemble de ces résultats montre que le récepteur 5-HT_{2A}, via l'activation de la voie de signalisation JAK2/STAT3 induit la prolifération, la migration et l'invasion des cellules trophoblastiques. Ces travaux suggèrent que la sérotonine (d'origine maternelle et/ou trophoblastique), via ses récepteurs 5-HT_{2A} placentaires, pourrait réguler le développement précoce du trophoblaste et, par conséquent, le bon déroulement de la grossesse.

Mots clés : sérotonine, récepteur de la sérotonine de type _{2A} (5-HT_{2A}), trophoblaste extravilleux, prolifération, invasion, JAK2/STAT3, MEK1/2, ERK1/2, métalloprotéinases-2 et -9 (MMP-2, MMP-9).

ABSTRACT

The implantation of the embryo and the formation of placenta (placentation) are necessary steps in early pregnancy. During early stages of placentation, human placental trophoblast, which forms placenta, engages in two differentiation pathways: 1) the path of villous trophoblast (vCTB) which constitutes the endocrine cells of the placenta and 2) way of extra-villous trophoblast (evCTB), which by its invasive and migratory abilities, ensures the attachment of the placenta into the myometrium and the formation of the fetomaternal unit. The extravillous trophoblast secretes metalloproteinases -2 and -9 capable of degrading the extracellular matrix of the uterine tissues. In the early *phase of implantation*, the development and function of the trophoblast is regulated by hormones, cytokines and growth factors produced both by the placenta and the maternal tissues. Serotonin or 5-hydroxytryptamine (5-HT) is a monoamine serving as neurotransmitter in the central nervous system (CNS). This hormone is also synthesized in several peripheral tissues where it exerts its proliferative, pro-invasive and pro-differentiating effects. Serotonin exerts its effects via the activation of several types of receptors, including receptor type 2A (5-HT_{2A}). The latter belong to the seven transmembrane domains G_{q/11}-coupled receptors (RCPG_{q/11}) known to stimulate MEK/ERK1/2 and JAK2/STAT3. These signalling pathways are involved in the regulation of proliferation, migration and invasion of trophoblasts. In placental, the 5-HT_{2A} receptor is expressed in normal human term placental tissue, and choriocarcinoma cell lines JEG-3 and BeWo (*in vitro* models of placental trophoblast). Although serotonin and its 5-HT_{2A} receptor are present at the fetomaternal- interface, their direct effects on the invasive trophoblast function remains unknown. The hypothesis is that 5-HT_{2A} receptor, and via activation of signalling pathways JAK2/ STAT3 and MEK/ERK1/2 stimulates proliferative, migratory and invasive capacities of trophoblasts. To test this hypothesis, the specific objectives are: (1) To determine the role of the 5-HT_{2A} receptor placenta in regulating proliferation and growth of trophoblastic cells; (2) To determine the molecular mechanism involved in the mitogenic effect of 5-HT_{2A} receptor in trophoblast cells; (3) To determine the role of the 5-HT_{2A} receptor in the invasion of trophoblastic cells and the molecular mechanisms involved. In this thesis, we have shown that specific activation of 5-HT_{2A} receptor exerts proliferative effects, pro-migratory and pro-invasive on the trophoblast cells. Specifically, we demonstrated that: (i) activation of 5-HT_{2A} receptor by its selective agonist DOI ((±) - 2,5-Dimethoxy-4-iodoamphetamine hydrochloride) stimulates growth and proliferation of trophoblastic cell lines JEG-3 and BeWo, (ii) DOI increases the number of cells in S phase and G2/M phase of the cell cycle for BeWo and JEG-3, iii) DOI activates JAK2/STAT3 and MEK/ERK1/2 signalling pathways; cells, respectively; (iv) DOI increases the proliferation of JEG-3 cells via stimulation of JAK2/STAT3 and PLC/PKC/ERK1/2 signalling pathways; (v) DOI-activated ERK1/2 requires both activation of JAK2/STAT3 and PLC/PKC/Ras signalling pathway, (vi) DOI stimulates growth, migration and invasion of extravillous trophoblast (primocultures and cell JEG-3 and HTR-8/SVneo) and (vii) the DOI increases the expression and activity of metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 in the trophoblastic cell lines JEG-3 cell lines and HTR-8/SVneo, via activation of the JAK2/STAT3 signalling pathway. All together, these results show that the 5-HT_{2A} receptor, via the activation of JAK2/STAT3 signalling pathway, induces proliferation, migration and invasion of trophoblast. These findings

suggest that serotonin (of maternal and/or trophoblast origin), via its 5-HT_{2A} receptors placenta, may regulate early development of the trophoblast and, consequently, the progress of pregnancy.

Keywords: serotonin, serotonin receptor type 2A (5-HT_{2A}), extravillous trophoblast, proliferation, invasion, JAK2/STAT3, MEK1/2, ERK1/2, metalloproteinases -2 and -9 (MMP-2, MMP-9)

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	iii
Abstract	v
Table des matières	vii
Liste des tableaux	x
Liste des figures	xi
Liste des abréviations	xii
INTRODUCTION	1
I- SÉROTONINE	2
I.1) Métabolisme de la sérotonine	2
<i>Biosynthèse et entreposage de la sérotonine</i>	2
<i>Dégradation de la sérotonine</i>	4
<i>Recapture de la sérotonine : Transporteur de la sérotonine</i>	4
<i>Dégradation enzymatique de la sérotonine : les monoamines oxydases</i>	6
I.2) Rôles physiologiques et physiopathologiques de la sérotonine	6
I.3) Récepteurs de la sérotonine	7
I.3.1) Structure et mode de transduction du signal des récepteurs couplés à des protéines G (RCPGs)	8
<i>Structure des RCPGs</i>	8
<i>Initiation de la signalisation par les RCPGs</i>	10
<i>Désensibilisation des RCPGs</i>	12
I.3.2) Récepteurs de la sérotonine de la classe 2 (5-HT ₂)	14
I.3.2.1) Récepteur de la sérotonine de types 2A (5-HT _{2A})	14
I.3.2.1.1) Localisation et pharmacologie du récepteur 5-HT _{2A}	14
I.3.2.1.2) Physiologiques de la sérotonine : focus sur l'action médiée par 5-HT _{2A}	17
<i>Au niveau du SNC</i>	17
<i>En Périphérie</i>	17
<i>Plaquettes sanguine</i>	17
<i>Système cardiovasculaire</i>	18
<i>Métabolisme du glucose</i>	18

<i>Métabolisme osseux</i>	18
<i>Tractus gastro-intestinal</i>	19
I.3.2.1.3) Voies de signalisation activées par les récepteurs 5-HT _{2A}	19
<i>Voie des MAPKs</i>	20
<i>Voie JAK/STAT</i>	24
I.3.2.1.4) Rôle mitogénique de la sérotonine et du récepteur 5-HT _{2A}	27
<i>Au niveau hépatique</i>	27
<i>Au niveau rénal</i>	28
<i>Au niveau du sein</i>	28
II) PLACENTA HUMAIN	29
II.1) Développement du placenta humain	30
II.1.1) Différenciation du trophoblaste vilieux	30
II.1.2) Différenciation du trophoblaste extravilleux	32
II.3) Systèmes modèles pour les études <i>in vitro</i> du trophoblaste extravilleux	34
<i>Lignées cellulaires du choriocarcinome placentaire humain</i>	34
<i>Lignées cellulaires de primocultures trophoblastiques immortalisées</i>	35
<i>Primocultures de trophoblaste extravilleux</i>	37
<i>Explants de villosités de placenta de premier trimestre de grossesse</i>	38
II.3) Régulation de l'invasion du trophoblaste extravilleux	39
II.3.1) Métalloprotéases matricielles (MMPs)	39
<i>Classification et structure</i>	39
<i>Régulation des MMPs</i>	42
<i>Régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle</i>	42
<i>Régulation de la sécrétion des MMPs</i>	44
<i>Maturation des MMPs</i>	44
<i>Protéines inhibitrices des MMPs (TIMPs)</i>	45
II.3.2) Rôle des MMPs et des TIMPs dans l'invasion du trophoblaste extravilleux	45
II.3.3) Régulation de l'expression des MMPs et TIMPs durant l'invasion du trophoblaste extravilleux	48
<i>Système activateur tissulaire du plasminogène (uPA)</i>	48
<i>Composantes de la matrice extracellulaire (MEC)</i>	49

<i>Hormones placentaires</i>	50
<i>Facteurs de croissance/Cytokines</i>	51
<i>Rôle de l'oxygène</i>	54
II.4) Voies de signalisation impliquées dans l'invasion du trophoblaste extravilleux	57
<i>Voie FAK (Focal adhesion kinases)</i>	57
<i>Petites protéines G (GTPases)</i>	60
<i>Voie Phosphoinositide-3kinase (PI-3K)</i>	62
<i>Voie des facteurs de transcription Smad</i>	64
<i>Voie Wingless (Wnt)</i>	65
<i>Voie des MAPKs</i>	69
<i>Voie JAK/STAT</i>	69
III) SÉROTONINE ET GROSSESSE	72
IV) HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS	75
V) RÉSULTATS	76
I - CHAPITRE 1: The 5-HT _{2A} serotonin receptor enhances cell viability, affects cell cycle progression and activates MEK/ERK1/2 and JAK2/STAT3 signalling pathways in human choriocarcinoma cell lines	77
II - CHAPITRE 2: Phosphorylation of JAK2 by serotonin 5-HT _{2A} receptor activates both STAT3 and ERK1/2 pathways and increases growth of JEG-3 human placental choriocarcinoma cell	89
III - CHAPITRE 3: The activation of 5-HT _{2A} receptor by (±)-2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine hydrochloride (DOI) induces trophoblast cell invasion	100
DISCUSSION GÉNÉRALE	145
CONCLUSION GÉNÉRALE	155
BIBLIOGRAPHIE	157

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Affinités des ligands sélectifs aux récepteurs 5-HT ₂	16
Tableau 2 : Sommaire des différents membres de la famille JAK et STAT activés par les récepteurs couplés à une protéine G de type Gq	27
Tableau 3 : Les différentes hormones et cytokines présentes au niveau de l'interface fœto-maternelle et leurs effets sur les capacités prolifératifs migratoires et invasives des cellules trophoblastiques humaines et sur les voies de transduction du signal	56

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Voies de synthèse et de dégradation de la sérotonine	3
Figure 2 : Mécanisme du transport de la sérotonine par le transporteur de la sérotonine	5
Figure 3 : Classification des récepteurs de la sérotonine	9
Figure 4 : Structure générale d'un récepteur couplé à une protéine G	10
Figure 5 : (A) Le cycle des GTPase commun aux protéines G. (B) Signalisation en aval des récepteurs couplés à des protéines G	11
Figure 6 : Modèle classique de la régulation de l'activité des RCPGs par les kinases GRKs et les arrestines	13
Figure 7 : Voie de signalisation des kinases activées par les mitogènes (MAPKs)	22
Figure 8 : Activation de la voie de signalisation des MAPKs par les RCPGs	24
Figure 9 : Voie de signalisation JAK/STAT	26
Figure 10: Villosité placentaire	29
Figure 11: Voies de différenciation des cytotrophoblastes humains	30
Figure 12 : Modèle cellulaire pour l'étude <i>in vitro</i> de la différenciation du trophoblaste placentaire humain	36
Figure 13 : Métalloprotéases matricielles (A) Structure ; (B) Activation par clivage du pro-domaine	41
Figure 14 : Séquences régulatrices dans les promoteurs des métalloprotéinases	43
Figure 15 : Effecteurs et mode d'action du système uPA	49
Figure 16 : Protéine focal adhesion kinases (FAK)	59
Figure 17 : Régulation des protéines GTPase Rho	61
Figure 18 : Description schématique de la voie PI3-Kinase	63
Figure 19 : Voie Smads activée par le TGF- β 1	66
Figure 20 : Voie Wnt canonique ou Wnt/ β -caténine	68
Figure 21 : Représentation schématique des voies de signalisation impliquées dans l'invasion du trophoblaste	71

LISTE DES ABRÉVIATIONS

5-HT	5-Hydroxytryptamine (sérotonine)
TPH	5-Hydroxytryptophane hydroxylase
AA	Acide aminé
AADC	Hydroxylase des acides aminés aromatiques
ADAM 12	A Disintegrin and Metalloproteinase domain 12
ADN	Acide désoxyribonucléique
Akt	Tyrosine kinase A
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
ARN	Acide ribonucléique
C/EBP	Protéines de liaison à CCAAT/Enhancer
CBP CREB	Protéines de liaison aux CREB
CK7	Cytokératine 7
Cx	Connexine
DAG	Di-Acyl Glycerol
DBD	Domaine de liaison à l'ADN
DOI	+/- 2,5 Diméthoxyamphétamine hydrochloride
EC	Cellule endothéliale
EGF	Facteur de croissance épidermique
EG-VEGF	Facteur de croissance endothéliale vasculaire dérivé des glandes endocrines
ELISA	Dosage immunoenzymatique
eNOS	Nitrite Oxyde synthase de type endothéliale
evCTB	Cytotrophoblaste extravilleux
ER	Récepteurs aux œstrogènes
ERK	Kinases régulées par les signaux extracellulaires
ET	Endothéline
ETR	Récepteur à l'endothéline
FGF	Facteur de croissance fibroblastique
FC	Capillaire foetal

FF	Fibroblaste foetal
GC	Cellule géante trophoblastique
GATA	Facteur de transcription Globin
GDP	Guanosine diphosphate
GTP	Guanosine triphosphate
GM-CSF	Facteur stimulant les colonies de granuloocytes et de macrophages
GR	Récepteurs aux Glucocorticoides
hCG	Gonadotrophine chorionique humaine
HIF	Facteur induit par l'hypoxie
HLA	Antigène leucocytaire humain
HGF	Facteur de croissance hépatocytaire
hPL	Lactogène placentaire humaine
i-evCTB	Cytotrophoblaste extravilleux invasif
ICAM	Molécule d'adhésion intercellulaire
IGF	Facteur de croissance insuline-like
IGF-2R	Récepteur de type 2 de l'IGFs
IGFBP	Protéines de liaison de l'IGF
IL	Interleukine
IP3	Inositol triphosphate
JAK	Janus Kinase
MMP	Matrix Métalloprotéinases matricielles
MR	Récepteurs aux minéralo-corticoïdes
MT-MMP	MMP de type membranaire
NF- κ B	Facteur nucléaire kappa B
L-trp	L-tryptophane
LIF	Facteur inhibiteur de la leucémie
MAPK	Protéine MAP kinase
MAO	Monoamines oxydase
p-evCTB	Cytotrophoblaste extravilleux prolifératif
PAI	Activateur/inhibiteur plasminogène

PAPP-A	Protéine plasmatique associée à la grossesse
PBP	Protéines de liaison aux PPAR
PBS	Tampon phosphate saline
PCNA	Antigène nucléaire des cellules prolifératives
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
pGH	Hormone de croissance placentaire
PGR	Récepteurs aux progestérones
PIP2	Phosphatidyl Inositol 4,5-biphosphate
PKA	Protéine Kinase A
PKC	Protéine Kinase C
PLC	Phospholipase C
PIGF	Facteur de croissance placentaire
RB	Protéines du rétinoblastome
RCIU	Retard de Croissance IntraUtérine
RE	Réticulum Endoplasmique
RIPA	Essai par radioImmuno-précipitation
RNAPol	RNA polymérase
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
rpm	Rotation par minute
RTK	Récepteurs tyrosine kinase
SA	Semaine d'aménorrhée
uSA	Artère spiralée utérine
SERT	Transporteur de la sérotonine
siRNA	Petit ARN interférant
SNC	Système nerveux central
Sp	Facteur sélectif des promoteurs
SRC	Sarcome
STB	Syncytiotrophoblaste
Stat	Transducteur du signal et activateur de la transcription
TEF5	Facteur de Transcription enhancer 5

TGF	Facteur de croissance transformant
THR	Récepteurs thyroïdiens
TIMP	Inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases matricielles
TNF	Facteur de nécrose tumorale
Tris	Trishydroxyméthylaminométhane
TSH	Hormone stimulant la thyroïde
uNK	<i>uterine natural killer</i>
uPA	Activateur plasminogène de type urokinase
VCAM	Molécule d'adhésion endothéliale vasculaire
VDR	Récepteur de la vitamine D
VEGF	Facteur de croissance vasculaire endothéliale
VEGFR	Récepteur aux VEGF
VMAT	Transporteur vésiculaire des monoamines

INTRODUCTION

I) SÉROTONINE

La sérotonine est une molécule qui fut décrite pour la première fois dans les années 1930 (pour revue, (Green *et al.*, 2006, Whitaker-Azmitia *et al.*, 1999) par Vittorio Erspamer pour ses propriétés vasoconstrictrices sur les muscles lisses et en particulier les muscles utérins. Cette substance a été appelée 'entéramine' (Erspamer *et al.*, 1953). Le nom de sérotonine dérivé de séro (serum) et tonin (tonus) est proposé par le chimiste Maurice Rapport et ses collègues en 1947 suite à la purification de cette substance présente dans le sang coagulé et qu'ils ont baptisée 5-hydroxytryptamine (5-HT) (Rapport *et al.*, 1947). La découverte de la présence de la sérotonine dans le cerveau des mammifères par Twarog en 1953 (Twarog *et al.*, 1953) et de la similarité entre les structures de la sérotonine et du LSD (*d*-lysergic acid diethylamide) doté de propriétés hallucinogènes confirma le rôle de la sérotonine comme neurotransmetteur (Woolley *et al.*, 1954; Woolley *et al.*, 1963).

I.I) Métabolisme de la sérotonine

Biosynthèse et entreposage de la sérotonine

La sérotonine est synthétisée à partir de l'acide aminé essentiel le L-tryptophane (L-trp). Le L-trp subit successivement une hydroxylation par l'enzyme tryptophane hydroxylase (TPH) en 5-hydroxytryptophane (5-HTP), qui est par la suite décarboxylé en 5-hydroxytryptamine (5-HT) ou sérotonine par une enzyme ubiquitaire, la décarboxylase des acides aminés aromatiques (AADC : *Aromatic Amino acid Decarboxylase*) (**Fig. 1**). L'hydroxylation du L-trp par la TPH est l'étape limitante de cette biosynthèse. Deux isoformes, ayant une activité d'hydroxylation du tryptophane, ont été identifiés : la TPH1 et la TPH2 (Walther *et al.*, 2003). Il a été rapporté que les transcrits de la TPH2 sont préférentiellement exprimés dans le cerveau; en revanche, ceux de la TPH1, à peine détectables dans le cerveau, sont exprimés principalement dans la glande pinéale et en périphérie (Walther *et al.*, 2003). Ainsi, la vitesse de synthèse de la sérotonine est dépendante de la biodisponibilité du L-trp et de l'activité de la TPH (Tyce, 1990). Quarante-vingt-dix pour cent de la totalité de la sérotonine synthétisée dans tout l'organisme provient de la périphérie dont 5% est synthétisée dans les neurones sérotoninergiques myéliniques et 95% synthétisée dans les cellules entérochromaffines du tractus gastro-intestinal.

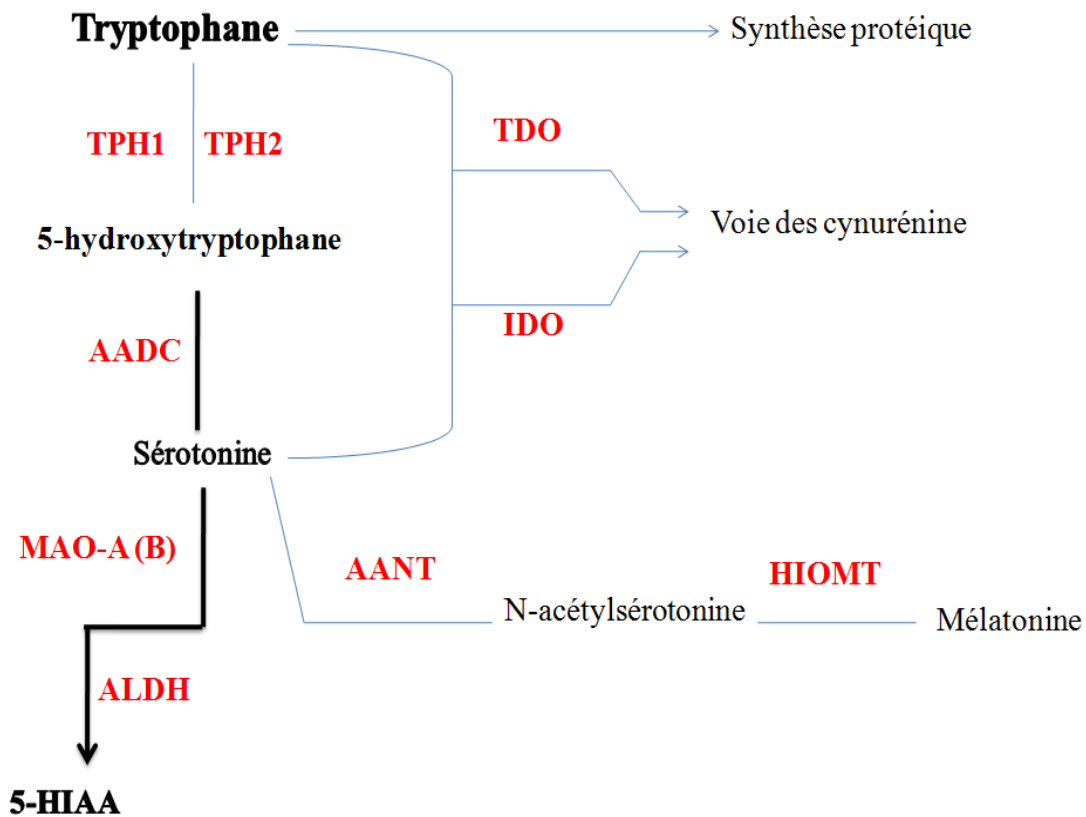


Figure 1 : Schéma général des voies de synthèse et de dégradation de la sérotonine. Le tryptophane fournit par l'alimentation est hydroxylé en 5 Hydroxytryptophane par la tryptophane hydroxylase (TPH1 et TPH2) qui, à son tour, subit une décarboxylation par une décarboxylase des acides aminés aromatiques (AADC) pour donner la sérotonine. La sérotonine peut être, elle-même, métabolisée en sérotonine en mélatonine par l'action successive de la N-acétyltransférase des acides aminés aromatiques (AANAT) et de la hydroxyindol-O-méthyltransférase (HIOMT). La sérotonine peut être dégradée en l'acide 5-hydroxy-indol-acétique (5-HIAA) par l'action de la monoamine oxydase (MAO) suivie de l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH). Enfin, il faut noter que la majeure partie du tryptophane est utilisée dans la synthèse protéique et des cynurénine. Pour obtenir les cynurénine, le tryptophane est transformé par la voie des indoleamine-2,3-dioxygénases (voie TDO) ou la voie des Tryptophane 2,3-dioxygénases (IDO).

La voie de synthèse de la sérotonine ne constitue pas la voie majoritaire du métabolisme du L-trp puisque 95% du L-trp fournit par l'alimentation est utilisé pour la synthèse du squelette polypeptidique des protéines et des Cynurénines (**Fig. 1**). Ces dernières sont transformées en acide xanthurénique et en acide nicotinique par le biais des enzymes tryptophane-2-3 dioxygénase (voie TDO) et indoleamine-2-3 dioxygénase (voie IDO) (**Fig. 1**). Le devenir de la sérotonine va dépendre de sa localisation. Dans le système nerveux central (SNC), la sérotonine est accumulée dans des vésicules synaptiques d'entreposage grâce à un système de transport antiport proton/sérotonine commun aux monoamines assuré par le transporteur vésiculaire des monoamines (VMAT). Ce dernier transporte la sérotonine grâce au gradient électrochimique de

protons produit par une ATPase localisée dans la membrane des vésicules synaptiques (Erickson *et al.*, 1992). Au niveau de la glande pinéale, glande endocrine impliquée dans les phénomènes d'adaptation aux changements de la photopériode, la sérotonine est transformée en mélatonine, molécule clef dans la régulation du rythme circadien. En effet, la sérotonine est d'abord transformée en N-acétylsérotonine par l'enzyme N-acétyltransférase (AANAT), puis en mélatonine par l'enzyme hydroxyindol-O-méthyltransférase (HIOMT) (**Fig. 1**). La transformation de la sérotonine en mélatonine ne peut être considérée comme une dégradation de la sérotonine, puisque la mélatonine est une molécule active. Enfin, la sérotonine néo-synthétisée en périphérie est libérée dans la circulation sanguine et entreposée dans les plaquettes sanguines qui constituent le réservoir principal de cette monoamine. La demi-vie de la sérotonine (temps au bout duquel 50% de la sérotonine a été renouvelée ou turnover) est longue dans les plaquettes et l'intestin, soit de quelques jours, et très courte dans le cerveau, soit quelques minutes (Udenfriend *et al.*, 1958).

Dégradation de la sérotonine

Compte tenu des effets biologiques multiples et importants que la sérotonine puisse exercer, sa concentration dans l'organisme doit être finement régulée d'une façon spatio-temporelle. Trois mécanismes sont connus pour assurer le contrôle de la concentration de cette monoamine : la recapture, la dégradation enzymatique et la transformation.

Recapture de la sérotonine : Transporteur de la sérotonine

Le transport actif de la sérotonine est possible grâce à la présence sur les membranes cellulaires d'un transporteur de la sérotonine (SERT ou 5-HTT). Une fois à l'intérieur du compartiment intracellulaire, la sérotonine peut être soit dégradée, ou recyclée dans les vésicules de sécrétion (vésicules synaptiques des terminaisons sérotoninergiques ou granules denses de sécrétion des plaquettes sanguines). Le transporteur de la SERT est une protéine à 12 domaines transmembranaires appartenant à la famille des transporteurs Na^+/Cl^- dépendants. Le transport de la 5-HT, en même temps que celui des ions Na^+ et Cl^- , nécessite la liaison des trois composés au SERT (**Fig. 2** (1)). Le SERT subit ensuite une série de changements de conformation qui empêche l'entrée de molécules supplémentaires et expose le site de liaison au cytoplasme (**Fig. 2** (2)). Après la libération des ions et de la sérotonine à l'intérieur de la cellule (**Fig. 3** (3)), les ions K^+ intracellulaires sont capables de se lier au SERT (**Fig. 2** (4)). Le SERT subit de nouveaux

changements de conformation qui empêchent la liaison d'ions K^+ supplémentaires et qui exposent le site de liaison au milieu extracellulaire. La libération du K^+ dans le milieu extracellulaire termine le cycle (**Fig. 2 (5)**).

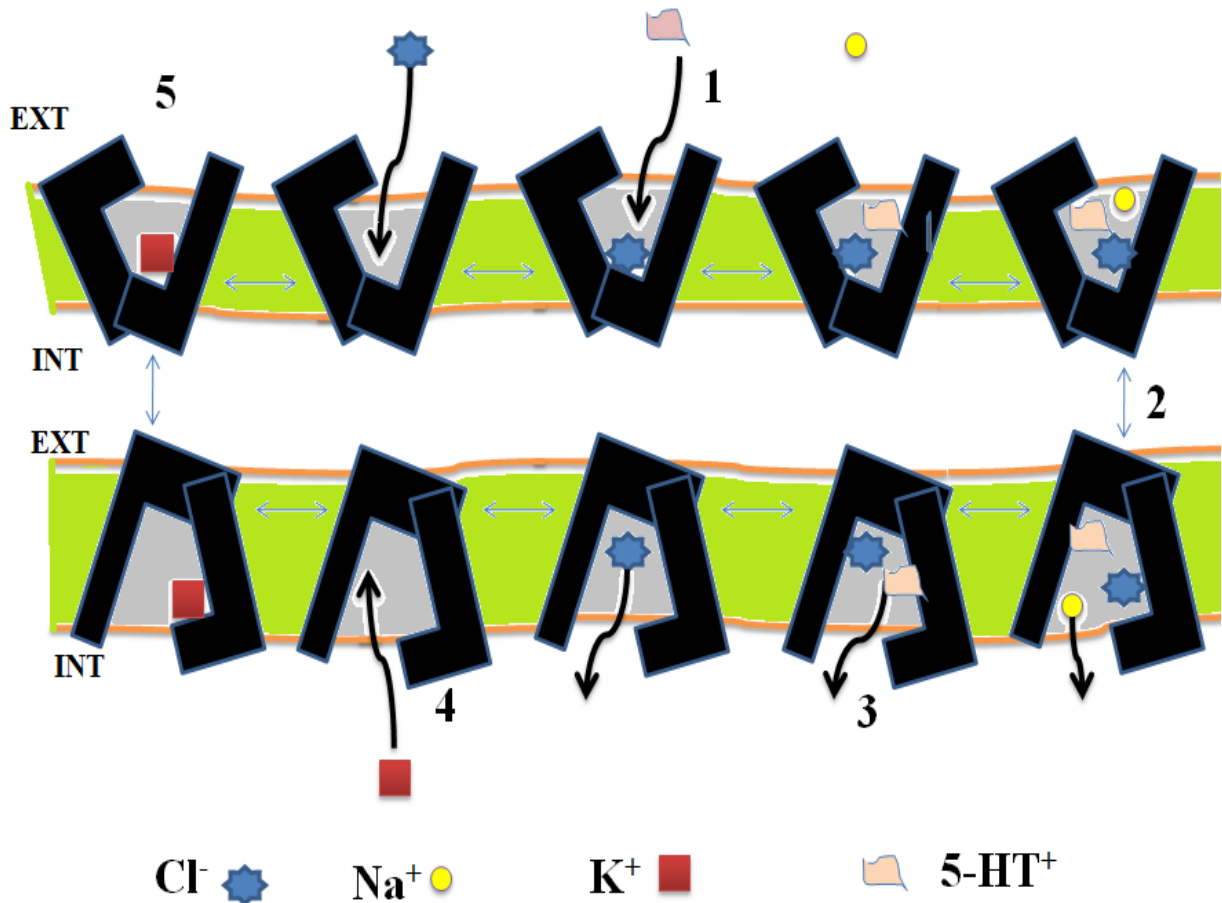


Figure 2 : Mécanisme du transport de la sérotonine par le transporteur de la sérotonine (SERT). Selon le modèle actuel décrivant la fonction du SERT, la première étape se produit lors de la liaison des ions sodium (Na^+) à la protéine SERT. Par la suite, la sérotonine, sous sa forme protonée ($5HT^+$), se lie au SERT suivie par les ions chlorures (Cl^-) (1). Ces derniers ne sont pas nécessaires à la liaison du $5HT^+$ à son transporteur, mais leur présence est primordiale pour que le transport de la sérotonine puisse avoir lieu. Le complexe formé par la sérotonine, Na^+ et Cl^- crée un changement dans la conformation du SERT (2). Le SERT, qui tout d'abord est tournée vers l'extérieur de la cellule, se place dans une position vers l'intérieure et libère la sérotonine et les ions dans le cytoplasme (3). Le potassium intracellulaire (K^+) intracellulaire se lie alors au SERT provoquant la réorientation vers l'extérieur (4). Enfin, l'ion K^+ est libéré à l'extérieur de la cellule, le site de liaison devient alors inoccupé et prêt pour un autre cycle de transport (5). Ext. : milieu extracellulaire. Int. : cytoplasme.

Dégradation enzymatique de la sérotonine : les monoamines oxydases (MAOs)

La dégradation enzymatique de la sérotonine est effectuée par les monoamines oxydases (MAO) qui sont de deux types, MAO-A et MAO-B. Ces deux enzymes sont présentes au niveau de la membrane externe des mitochondries, dans plusieurs types cellulaires (neurones, astrocytes, cellules endothéliales, plaquettes sanguines, cellules trophoblastiques), à la fois dans le SNC et en périphérie (Shih, *et al.*, 1999 ;Shih *et al.*,1999;Sivasubramaniam *et al.*, 2002;Westlund *et al.*, 1988). Elles sont responsables de la désamination oxydative des amines biogènes, dont la sérotonine, et conduisent à la production de 5-hydroxyindole acétaldéhyde. Ce dernier est oxydé par une aldéhyde déshydrogénase pour former l'acide 5-hydroxy-indol-acétique (5-HIAA), métabolite principal et inactif de la sérotonine éliminé dans les urines (**Fig. 1**). Les MAOs présentent des affinités spécifiques différentes dépendamment de leurs substrats et de leurs localisations. Dans le SNC, la MAO de type A (MAO-A) dégrade la sérotonine, la noradrénaline et l'adrénaline, alors que la MAO de type B (MAO-B) désamine préférentiellement la dopamine, la β -phényléthylamine et la benzylamine (Yamada *et al.*, 2004, Youdim *et al.*, 2006).

Dans les tissus périphériques, les MAOs désaminent les monoamines qui agissent de façon endocrine ou paracrine. Elles peuvent être exprimées spécifiquement dans un tissu comme c'est le cas de la MAO-A dans le placenta et la MAO-B dans les plaquettes sanguines. Les MAO-A et -B peuvent être co-exprimées dans d'autres tissus tels que le foie humain, les poumons et les intestins où elles peuvent agir également comme enzyme de détoxification (Nicotra *et al.*, 2004, Youdim *et al.*, 1988).

I.2) Rôles physiologiques et physiopathologiques de la sérotonine

La sérotonine joue un rôle biologique très important dans pratiquement toutes les fonctions physiologiques que ce soit dans le SNC ou en périphérie. Dans le SNC, cette pluralité fonctionnelle s'explique non seulement par la très large innervation de l'ensemble du SNC par les projections sérotoninergiques, mais également par l'existence d'au moins 14 récepteurs distincts de ce neuromédiateur. Au niveau du SNC, la sérotonine est impliquée dans de nombreuses fonctions vitales comme le contrôle du cycle veille/sommeil (Jouvet, 1999), l'activité motrice (Jacobs *et al.*, 1999), le stress (Chaouloff, 2000), la neurogenèse (Banar *et al.*, 2004), la thermorégulation (Bruck *et al.*, 1980), la prise alimentaire (Curzon, 1990), la nociception (Sufka *et al.*, 1992), les régulations endocrines (Cowen *et al.*, 1990) et neurovégétatives telles que le

contrôle du rythme cardiaque et de la pression artérielle (Ni *et al.*, 2006), ainsi que le comportement sexuel (Ahlenius *et al.*, 1980) et la cognition (Decker *et al.*, 1991). En périphérie, la sérotonine joue un rôle majeur dans l'homéostasie plaquettaire, les fonctions cardiovasculaires, la régulation de la pression artérielle et la motilité digestive (pour revue, (Wilkinson *et al.*, 1991)). En terme d'évolution, la sérotonine est l'un des plus anciens neurotransmetteurs et parmi eux, probablement celui impliqué dans le plus grand nombre de pathologies, surtout en relation avec le SNC, telles que l'anxiété, la dépression, les troubles obsessionnels-compulsifs, la schizophrénie, la phobie sociale, les troubles paniques, les comportements alimentaires anormaux et la douleur. En périphérie, la sérotonine est associée à l'hypertension artérielle systémique et pulmonaire, au syndrome de l'intestin irritable et aux tumeurs carcinoïdes (pour revue, (Hoyer *et al.*, 2002)). La section I.3.2.1.2 aborde plus en détail la physiologie et le rôle de la sérotonine et de son récepteur 5-HT_{2A} dans le SNC et en périphérie.

I.3) Récepteurs de la sérotonine

À la fin des années 1950, Gaddum et Picarelli ont identifié l'existence de deux récepteurs pour la sérotonine qu'ils ont nommé 5-HT-D et 5-HT-M (Gaddum *et al.*, 1957). Cette classification se basait sur la sensibilité de contraction de l'iléon du cochon d'Inde, en réponse à différentes drogues (Gaddum *et al.*, 1957). La réponse contractile de l'iléon pouvait être bloquée en partie par la morphine (faisant intervenir les récepteurs de type M) et en partie par la dibenzylène (faisant intervenir les récepteurs de type D). L'existence de plusieurs récepteurs sérotoninergiques a été admise, au départ pour la périphérie, mais contestée dans le SNC (pour revue, voir Green *et al.*, 2006)). En 1979, les études de liaison ont permis de démontrer l'existence de deux sites distincts de fixation pour la sérotonine (Peroutka *et al.*, 1979). Les deux types de récepteurs seront alors appelés récepteurs 5-HT₁ et 5-HT₂. Par la suite, Bradley et ses collaborateurs proposèrent en 1986 une classification en trois groupes: 5-HT₁-like, 5-HT₂ et 5-HT₃ (Peroutka *et al.*, 1979). Dans les années 1980, la venue de la biologie moléculaire permit une avancée dans l'isolement et le clonage des gènes suivie de la caractérisation du premier récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé aux protéines G, le récepteur β₂-adrénergique (Dixon *et al.*, 1986). Le récepteur sérotoninergique 5-HT_{1A} a été ensuite isolé et caractérisé par homologie de séquence en 1988 (Fargin *et al.*, 1988). La majorité des 13 autres récepteurs sérotoninergiques a été clonée entre 1988 et 1992 (Hoyer *et al.*, 1994, Hoyer *et al.*, 2002); et depuis 1997, année de l'isolement et de la caractérisation du gène codant pour le récepteur 5-

HT₇ (Eglen *et al.*, 1997), aucun nouveau récepteur sérotoninergique n'a été identifié. Sur la base de leurs homologies de séquences protéiques et de structures tertiaires, 7 classes de récepteurs de la sérotonine ont été définies (5-HT₁ à 5-HT₇), représentant ainsi l'une des familles les plus complexes de récepteurs aux neurotransmetteurs.

À l'exception du récepteur de la classe 3 qui est un canal ionotropique, les récepteurs des six autres classes sont tous des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés à une protéine G. Selon le second messager activé, ces récepteurs peuvent être classés en 4 groupes (**Fig. 3**) : les récepteurs couplés aux protéines de type G_{i/o}, qui inhibent l'adénylate cyclase (5-HT₁) ; les récepteurs couplés aux protéines de type G_q, qui activent la phospholipase C (5-HT₂), et les récepteurs couplés aux protéines G_s, qui activent l'adénylate cyclase (5-HT_{4/6/7}). En ce qui concerne les récepteurs 5-HT₅, le couplage reste encore un sujet de débat puisque certaines études ont penché pour un rôle activateur de l'adénylate cyclase (AC), alors que d'autres études suggèrent un rôle inhibiteur de l'adénylate cyclase (Francken *et al.*, 1998, Wisden *et al.*, 1993). Actuellement, il est admis que le mécanisme de couplage principal du récepteur 5-HT₅ est d'inhiber l'AC dans les cellules humaines (Francken *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 2006; Nelson *et al.*, 2004).

I.3.1) Structure et mode de transduction du signal des récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs)

Structure des RCPGs

De 3 à 6 % des gènes d'un organisme codent pour des RCPGs ce qui en fait la plus grande famille de récepteurs répertoriés à ce jour. Ces récepteurs constituent pour la majeure partie des récepteurs aux hormones, aux cytokines et à certains facteurs de croissance. L'activation des RCPGs par leurs ligands provoque plusieurs processus biologiques et physiopathologiques et la compréhension de leur mode d'action semble être compliquée par la diversité des voies de signalisation activées.

CANAUX IONIQUES
5-HT_{3A} 5-HT_{3B} 5-HT_{3C}

- **RECEPTEURS COUPLES AUX PROTEINES G** +

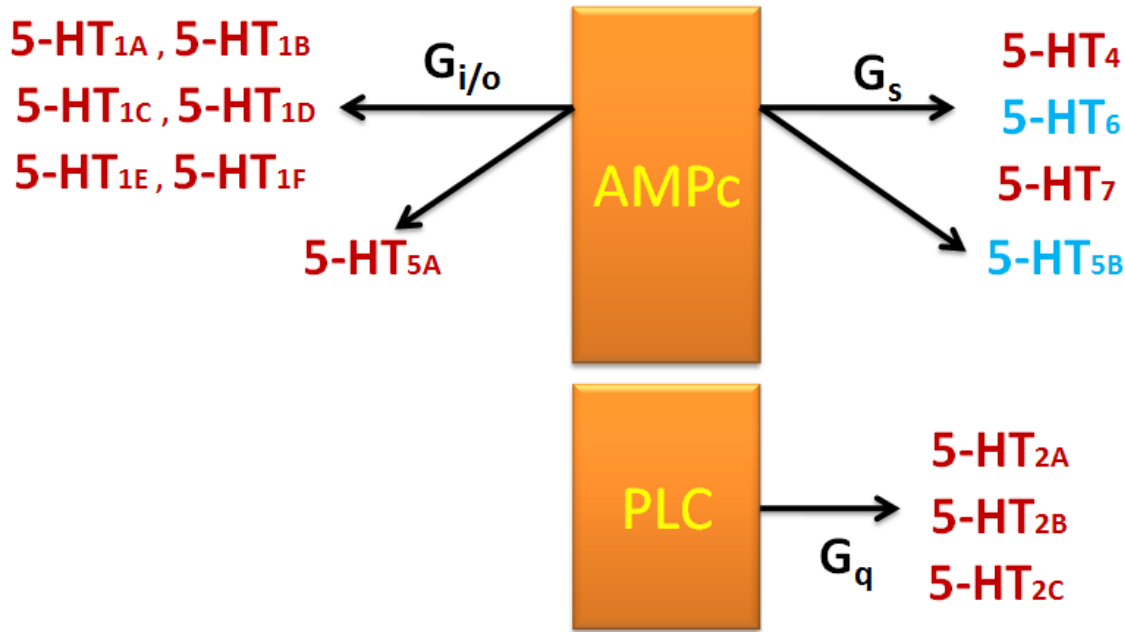


Figure 3 : Classification actuelle des récepteurs de la sérotonine. La fonction des récepteurs de la sérotonine représentés sur fond bleu n'a pas encore été clairement identifiée dans un système natif.
- : couplage négatif, + : couplage positif.

Les RCPGs sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires avec trois boucles intracellulaires et trois boucles extracellulaires (**Fig. 4**). Le nombre de domaines transmembranaires impair force la structure du récepteur à exposer son extrémité N-terminale à l'extérieur de la cellule, site de glycosylation et de fixation du ligand, et l'extrémité C-terminale à l'intérieur de la cellule, accessible pour la phosphorylation et l'initiation de la cascade de signalisation. La partie C-terminale peut subir également une modification post-traductionnelle par palmitoylation conduisant à la désensibilisation et à l'internalisation du récepteur. Dans le cas des RCPGs en général et les RCPGs pour les amines biogènes, tels que la sérotonine en particulier, il est suggéré que le domaine transmembranaire 3 soit le site de fixation du ligand,

tandis que les domaines transmembranaires 5 et 6 joueraient un rôle dans la transduction du signal (Ji *et al.*, 1998).

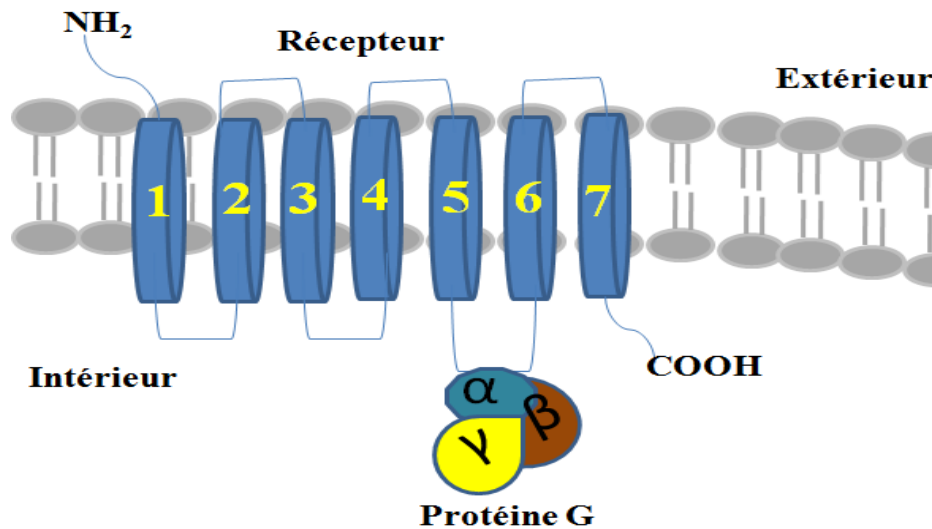


Figure 4 : Structure générale d'un récepteur couplé à une protéine G (RCPG). Les RCPG sont constitués de sept segments transmembranaires. De part cette structure, la partie N terminal est extracellulaire alors que le groupe carboxyle (C) terminal est intracellulaire. La boucle intracellulaire entre les domaines 5 et 6, plus grande que le reste des boucles, interagit avec la protéine-G. Cette dernière est constituée de trois sous-unités protéiques, α , β et γ de sorte que la sous-unité $\beta\gamma$ sert à ancrer la protéine dans la membrane.

Initiation de la signalisation par les RCPGs

La voie de signalisation commune aux RCPGs débute par l'initiation du signal produit par la fixation d'un ligand sur son récepteur. Suite à cette fixation, il y a changement de la conformation du récepteur vers une conformation active. Ce changement de conformation va permettre la liaison du récepteur à sa protéine trimérique G ($\alpha\beta\gamma$) et la stimuler en catalysant l'échange d'un GDP pour un GTP à un site spécifique de liaison des nucléotides guanylés sur la sous-unité $G\alpha$. Une fois activée, la protéine G se dissocie en une sous-unité α liée au GTP et un dimère $\beta\gamma$. Ces deux entités peuvent interagir avec différents effecteurs qui, à leur tour, vont moduler la production de seconds messagers dépendamment du type de la protéine G activée (Ji *et al.*, 1998). Il s'ensuit une cascade de transduction du signal via des kinases qui vont activer d'autres protéines menant ainsi à une amplification du signal jusqu'à la réponse physiologique. Le signal propagé par la protéine G est transitoire. Il est interrompu lorsque le GTP est hydrolysé en GDP grâce à l'activité enzymatique intrinsèque de la sous-unité $G\alpha$, entraînant la

réassociation l'hétérotrimère $\alpha\beta\gamma$ inactif portant une molécule de GDP et ramenant le système à son état basal (Ji *et al.*, 1998) (Fig. 5).

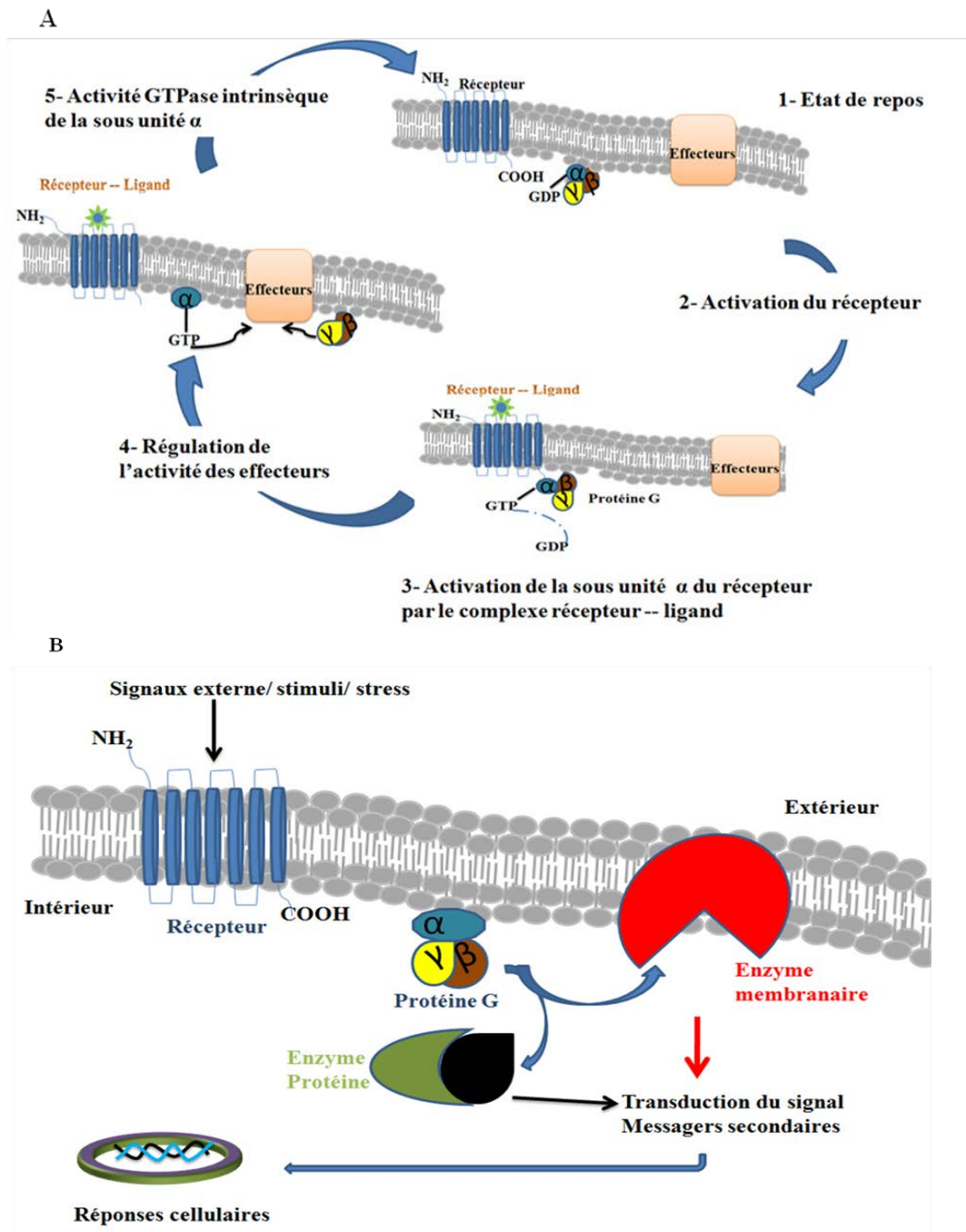


Figure 5 : (A) Le cycle des GTPase commun aux protéines G. (B) Signalisation en aval des récepteurs couplés à des protéines G (RCPGs).

Désensibilisation des RCPGs

La désensibilisation d'un RCPG peut être décrite comme la perte de la réponse signalétique du récepteur à la suite de l'administration prolongée ou répétée d'un agoniste (Aghajanian *et al.*, 1999). Expérimentalement, le terme «prolongée» peut s'avérer inapproprié puisque l'activation des RCPGs peut durer quelques secondes ou quelques heures, voire des jours. L'un des mécanismes majeur de désensibilisation est la phosphorylation des RCPGs (Krupnick *et al.*, 1998, Pitcher *et al.*, 1998).

Jusqu'au milieu des années 80, la phosphorylation des RCPGs par des protéines kinases telles que la protéine kinase A (PKA) et la protéine kinase C (PKC) a été considérée comme le principal mécanisme de désensibilisation des RCPGs (Benovic *et al.*, 1985). L'observation que le récepteur β -adrénergique (β -AR) puisse être phosphorylé et désensibilisé dans des cellules dépourvues de PKA fonctionnelle (Strasser *et al.*, 1986a, Strasser *et al.*, 1986b) a suggéré que d'autres kinases pourraient phosphoryler les RCPGs. L'identification d'une nouvelle protéine kinase capable de phosphoryler le récepteur β -AR activé par son agoniste, a marqué un tournant dans la biologie des RCPGs (Benovic *et al.*, 1985). Cette kinase, à l'origine appelée β -adrénergique kinase (β -ARK), fait partie d'une famille de kinases appelée plus tard les kinases des récepteurs couplés à la protéine G (GRK). Les GRKs jouent un rôle central dans la phosphorylation des RCPGs induite par l'agoniste et la désensibilisation de nombreuses réponses générées par les RCPGs (Premont *et al.*, 2007). Cependant, il a été reporté que la phosphorylation des RCPGs par les GRKs ou par autophosphorylation était insuffisante pour produire une vaste désensibilisation de la réponse du récepteur (Pitcher *et al.*, 1998). Une autre famille de protéines régulatrices appelées arrestines a été identifiée (Lohse *et al.*, 1990). Ces arrestines lient avec une forte affinité le complexe agoniste-GPCR phosphorylé-GRK, provoquant le découplage de la protéine G activée du complexe et induit une désensibilisation de la réponse générée par le récepteur.

En plus de leur rôle dans la désensibilisation de la réponse générée par les RCPGs, les arrestines sont également impliquées dans l'adressage cellulaire des RCPGs (**Fig. 6**). En fait, le complexe RCPG phosphorylé-arrestines est destiné aux vésicules recouvertes de clathrine et dans lesquelles les RCPGs sont internalisés et peuvent être soit déphosphorylés et recyclés à la membrane plasmique, soit ciblés vers les lysosomes pour être dégradés (Krupnick *et al.*, 1998,

Pitcher *et al.*, 1998). Le fait qu'un RCPG désensibilisé et internalisé soit recyclé ou soit régulé à la baisse (dégradée) va dépendre souvent de la durée du traitement par l'agoniste. Avec de nombreux récepteurs RCPGs, une régulation négative significative apparaît seulement après des heures de traitement par l'agoniste. En revanche, certains RCPGs tels que les récepteurs aux opioïdes- δ sont régulés à la baisse relativement rapidement après l'addition d'agoniste (Tsao *et al.*, 2000a, Tsao *et al.*, 2000b). En conclusion, la désensibilisation est un processus très important dans la signalisation initiée par les RCPGs et dont le but est de prévenir une activation prolongée de ces récepteurs. En général, le modèle classique de la désensibilisation se fait selon trois mécanismes : 1) par la phosphorylation du récepteur qui va provoquer la dissociation de la protéine G; 2) par adressage du récepteur vers des compartiments intracellulaires pour recyclage ou dégradation; 3) par une diminution du nombre de récepteurs au niveau membranaire due à une diminution du nombre de transcrits (ARNm) du récepteur et donc de l'expression protéique du récepteur (**Fig. 6**).

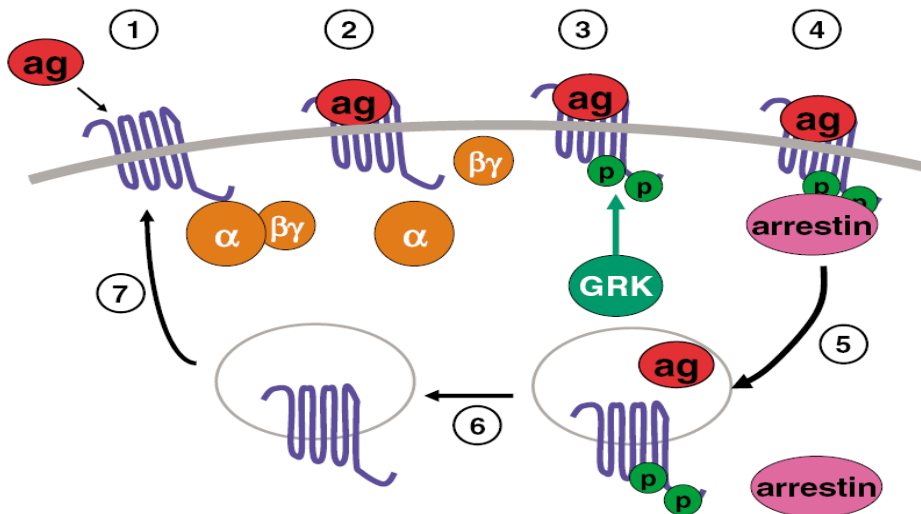


Figure 6 : Modèle classique de la régulation de l'activité des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) par les kinases des récepteurs couplés aux protéines G (GRK) et les arrestines. Le GPCR est activé par l'agoniste (1) conduisant au couplage de la protéine G au récepteur (2) et la modulation des effecteurs. Par la suite, le RCPG occupé par l'agoniste est phosphorylé par les GRK (3), ce qui permet à l'arrestine de se lier au GPCR phosphorylé et conduit à une désensibilisation du récepteur (4), l'internalisation (5), la déphosphorylation (6) et le recyclage du RCPG (7). Dans le cas d'un traitement prolongé par des agonistes, le RCPG «endocyté» peut également être la cible d'une dégradation (d'après (Kelly *et al.*, 2008)).

I.3.2) Récepteurs de la sérotonine de la classe 2 (5-HT₂)

La classe des récepteurs 5-HT₂ comprend trois sous-types codés par trois gènes différents nommés 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} et 5-HT_{2C}. Le récepteur 5-HT_{2A} est le récepteur décrit par Gaddum et Picarelli comme étant le récepteur 5-HT_M, alors que le récepteur de type 2B fait référence aux récepteurs identifiés précédemment comme étant le récepteur 5-HT_{2F} (ou SRL pour *Serotonin Receptor-Like*). Le récepteur de sous-type 5-HT_{2C} était anciennement nommé 5-HT_{1C}. Ces trois sous-types de récepteurs présentent une forte homologie de séquence (environ 70% à 80% d'homologie de séquence) (Bjorn *et al.*, 2000, Kursar *et al.*, 1992) et sont couplés à une protéine G de type Gq. Ils activent préférentiellement la phospholipase C (PLC) comme second messager et induisent une accumulation des inositol triphosphates (IP₃) et du calcium intracellulaire (Roth *et al.*, 2006).

I.3.2.1) Récepteurs de la sérotonine de type 2A (5-HT_{2A})

I.3.2.1.1) Localisation et pharmacologie des récepteurs 5-HT_{2A}

Le récepteur 5-HT_{2A} (anciennement appelé 5-HT₂) a été cloné à partir de diverses espèces, y compris l'humain, et présente une très forte homologie de séquence entre les espèces (> 90%). Les études de clonages ont permis également d'identifier deux récepteurs 5-HT_{2B} et 5-HT_{2C} présentant une forte homologie de séquence dans les parties transmembranaires avec les récepteurs 5-HT_{2A}. En effet, le récepteur 5-HT_{2A} montre, respectivement, 78% et 70% d'homologie de séquence avec les récepteurs 5-HT_{2C} et 5-HT_{2B} (Roth *et al.*, 1998, Sanders-Bush *et al.*, 2003). Les récepteurs 5-HT_{2A} sont largement exprimés dans plusieurs régions du cerveau incluant le cortex, le noyau caudé, l'hippocampe, le noyau accumbens et le tubercule olfactif (Pazos *et al.*, 1985a, Pazos *et al.*, 1985b). À la périphérie, les récepteurs 5-HT_{2A} sont exprimés dans plusieurs tissus tels que les reins (Garnovskaya *et al.*, 1995), les muscles squelettiques (Guillet-Deniau *et al.*, 1997), les muscles lisses vasculaires urinaires et gastro-intestinaux (Kennett *et al.*, 1997), les plaquettes sanguines (Cook *et al.*, 1994) et le placenta (Sonier *et al.*, 2005; *et al.*, 2009).

Sur le plan pharmacologique, il n'existe aucun agent de synthèse spécifique pouvant être utilisé pour étudier la fonction des récepteurs 5-HT_{2A} (**Tableau 1**). Les différents ligands de synthèse (antagonistes et agonistes) connus pour avoir une spécificité relative pour les récepteurs 5-HT_{2A} font partie de la classe des N-alkylpiperdines. Entre autres, la kétansérine et la spipéronne sont des

antagonistes 70 et 100 fois plus sélectifs respectivement pour les récepteurs 5-HT_{2A} que les récepteurs 5-HT_{2B} et 5-HT_{2C}. Le spipéronone constitue l'une des premières molécules ayant des propriétés antagonistes des récepteurs 5-HT_{2A}. Cet antagoniste présente également une affinité pour les récepteurs dopaminergiques de type D₂ ainsi que pour les récepteurs de la sérotonine 5-HT_{1A} et 5-HT₇ (Glennon *et al.*, 2000). Parmi les antagonistes spécifiques aux récepteurs 5-HT_{2A}, la kétansérine constitue la molécule fréquemment utilisée dans le milieu de la recherche, bien que cette molécule montre également une affinité pour les récepteurs 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C} et les récepteurs β-adrénergiques. D'autres antagonistes, dérivés de la kétansérine, ont été désignés pour lier spécifiquement les récepteurs 5-HT_{2A} dont la ritansérine. Cette molécule présente une grande affinité pour les récepteurs 5-HT_{2A}, mais comme beaucoup d'antagonistes pharmacologiques des récepteurs 5-HT_{2A}, la ritansérine a aussi une affinité pour les récepteurs 5-HT_{2B}, 5-HT₆ et 5-HT₇ (Glennon *et al.*, 2000).

Plusieurs agonistes connus pour leurs spécificités pour les récepteurs 5-HT_{2A} ont été décrits. La plupart de ces molécules sont de la classe des phénylalkylamines et sont pour le moment les plus utilisés. À titre d'exemple, le (±)-2,5 dimethoxy-4-iodoamphetamine (DOI) a une très faible affinité pour les récepteurs qui ne sont pas de la classe 5-HT₂ mais par contre, il démontre une faible sélectivité entre les différents sous-types des récepteurs de la classe 5-HT₂ (Glennon *et al.*, 2000). À ce jour, le DOI reste l'agoniste pharmacologique de choix pour étudier le rôle des récepteurs 5-HT_{2A} dans les différents processus physiologiques que ce soit au niveau du SNC ou en périphérie (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Affinités (pKi/pKd) des ligands sélectifs aux récepteurs 5-HT₂ (d'après (Baxter *et al.*, 1995)).

Ligands selon leur sélectivité	5-HT_{2A}	5-HT_{2B}	5-HT_{2C}
Récepteur 5-HT_{2A}			
Spiperone (antagoniste)	8,8	5,5	5,9
MDL100907 (antagoniste)	9,4	7,04	6,9
Ketanserin (antagoniste)	8,9	5,4	7
	nd	7,26 (H)	nd
Amperozide	7,8	nd	5,9
Risperidone	9,7	nd	7,5
Récepteur 5-HT_{2B}			
lisuride	nd	8,98 (H)	nd
5-methoxytryptamin (agoniste)	7,4	8,8	6,2
α -methyl-5-HT (agoniste)	6,1	8,4	7,3
SB204741 (antagoniste)	<5,3	7,9	<6,0
	<5,3 (H)	7,13 (H)	<6,0 (H)
BW723C86 (agoniste partiel)	<5,4	7,9	<6,9
	7,0 (H)	7,9 (H)	6,3 (H)
LY 266097 (antagoniste)	nd	9,62 (H)	nd
LY 272015 (antagoniste)	7,6	9,9	7,9
SB 215505 (antagoniste)	6,8	8,3	7,7
	nd	8,93 (H)	nd
RS 127445 / MT-500 (antagoniste)	6,3	9,5	6,4
EGIS-7625 (antagoniste)	6,2	9	7,7
Récepteurs 5-HT_{2B} et 5-HT_{2C}			
SB200646A (antagoniste)	5,2	7,5	6,9
	<5,3 (H)	nd	7,0 (H)
m-chlorophenylpiperazine (mCPP) (agoniste partiel)	6,7	7,9	7
	7,2 (H)	nd	7,3 (H)
MK212 (agoniste)	4,8	5,9	6,2
	nd	6,82 (H)	nd
Ligands non-sélectifs			
LY53857 (antagoniste)	7,3	8,2	8,1
ICI170809 (antagoniste)	9,1	nd	8,3
Ritanserin (antagoniste, agoniste inverse)	8,8	8,3	8,9
Mianserin (antagoniste)	8,1	7,3	8
DOI (agoniste)	7,3	7,4	7,8

nd : non déterminé.

I.3.2.1.2) Physiologiques de la sérotonine : focus sur l'action médiée par 5-HT_{2A}

La sérotonine exerce plusieurs effets physiologiques dans le corps humain, étant donné que ses récepteurs sont exprimés presque d'une façon ubiquitaire. La sérotonine a un rôle établi dans l'agrégation plaquettaire et dans la régulation du muscle lisse, dans le système cardiovasculaire et dans le système gastro-intestinal (Azmitia *et al.*, 1996). En tant que neurotransmetteur central, il est impliqué dans une variété de troubles du comportement, y compris la dépression et l'anxiété (Bellivier, *et al.*, 1998; Lucki *et al.*, 1998, Mann *et al.*, 2001). D'autres études ont démontré le rôle de la sérotonine dans la croissance et la différenciation cellulaire (Tecott, Shtrom *et al.* 1995), le développement neuronal et dans les voies de signalisation neuronale (Eaton *et al.*, 1995). Des données récentes impliquent la sérotonine dans la régulation de la concentration de glucose dans le sang et le métabolisme de l'os, sans que le mécanisme d'action soit élucidé.

Au niveau du SNC

Au niveau du SNC, la sérotonine est impliquée dans de nombreuses fonctions vitales comme le contrôle du cycle veille/sommeil (Jouvet *et al.*, 1999), l'activité motrice (Jacobs *et al.*, 1999), le stress (Chaouloff *et al.*, 2000), la neurogenèse (Banar *et al.*, 2004), la thermorégulation (Bruck *et al.*, 1980), la prise alimentaire (Curzon *et al.*, 1990), la nociception (Sufka *et al.*, 1992), les régulations endocrines (Cowen *et al.*, 1990) et neurovégétatives telles que le contrôle du rythme cardiaque et de la pression artérielle (Ni *et al.*, 2006), ainsi que le comportement sexuel (Ahlenius *et al.*, 1980) et la cognition (Decker *et al.*, 1991).

En périphérie

Plaquettes sanguines

La quasi-totalité de la sérotonine circulatoire est transporté dans les granules denses des plaquettes (Maurer-Spurej, Pittendreigh *et al.* 2004). La sérotonine est libérée en réponse à des signaux dont tels que l'endothélium endommagé, l'ischémie et les agonistes des récepteurs 5-HT₂. la sérotonine, via les récepteurs 5-HT_{2A} semble jouer un rôle dans l'agrégation plaquettaire et la perméabilité capillaire médié par la sérotonine mais ce pendant, la kétansérine n'a aucun effet sur l'activation des plaquettes par des stimuli physiologiques (ex. : thrombine, collagène) (Bampalis *et al.*, 2011)

Physiologie cardiovasculaire

La sérotonine exerce ses effets centraux de neurotransmetteurs sur le système cardiovasculaire par l'intermédiaire des neurones des noyaux du raphé. En activant les voies parasympathiques et sympathiques, la sérotonine exerce un effet chronotrope et inotrope sur le système cardiovasculaire (Cote, Thevenot et al. 2003, Cote, Fligny et al. 2004, Cote, Fligny et al. 2004). Ces effets sont véhiculés par l'intermédiaire des récepteurs 5-HT₁, 5-HT₂ et les 5-HT₃ (Cote *et al.*, 2004, Cote *et al.*, 2004).

Récemment, une étude vient pour la première d'identifier un rôle des récepteurs 5-HT_{2A} dans le remodelage cardiaque *in vivo*. Cette étude a démontré que le blocage sélectif des récepteurs 5-HT_{2A} a un effet bénéfique dans le développement de l'hypertrophie cardiaque. Cette amélioration est associée à une diminution de l'activation de la calmoduline kinase (CaMKII), marqueur de l'hypertrophie cardiaque, et l'état de phosphorylation de son substrat l'histone déacétylase 4 (HDAC4) (Lairez *et al.*, 2013).

Métabolisme du glucose

Bien que certains études ont assigné à la sérotonine un effet hyperglycémiant (Wozniak and Linnoila 1991), plusieurs évidences relèvent son effet hypoglycémiant (Furman and Wilson 1980, Yamada, Sugimoto et al. 1989). Le mécanisme expliquant cet effet hypoglycémiant de la sérotonine n'est pas bien compris, mais des données suggèrent l'implication des récepteurs 5-HT_{2A}. L'activation de ces récepteurs par la sérotonine induit une absorption rapide du glucose musculaire (Hajduch, Rencurel et al. 1999), due à une augmentation de l'expression et du recrutement des transporteurs de glucose à la surface des myotubules du muscle squelettique (Guillet-Deniau *et al.*, 1997). L'étude du mécanisme moléculaire montre l'implication de la voie de signalisation JAK2/STAT3 (Guillet-Deniau *et al.*, 1997), indépendamment de la voie PI3-K/PKB (Hajduch, Rencurel *et al.*, 1999).

Métabolisme osseux

La sérotonine joue un rôle dans la régulation de la différenciation des cellules osseuses (ostéoblastes, ostéocytes et ostéoclastes) (Bliziotis *et al.*, 2001, Westbroek *et al.*, 2001, Battaglini *et al.*, 2004, Bliziotis *et al.*, 2006, Gustafsson *et al.*, 2006, Gustafsson *et al.*, 2006). Des études *in vitro* suggèrent un effet stimulant direct de la sérotonine, via ses récepteurs 5-HT_{2A}

sur la formation de l'os (Westbroek *et al.*, 2001, Locker *et al.*, 2006), tandis que d'autres ont trouvé des effets inhibiteurs (Westbroek *et al.*, 2001, Yadav *et al.*, 2008). De la même façon, des effets contradictoires de la sérotonine sur les voies de la résorption osseuse ont été observés (Battaglino *et al.*, 2004, Gustafsson *et al.*, 2006, Gustafsson *et al.*, 2006).

Tractus gastro-intestinal

La sérotonine active les réflexes nerveux et joue un rôle essentiel dans la sécrétion intestinale, la sensation, et le péristaltisme. Le rôle précis de la sérotonine dans la physiologie gastro-intestinale normale est encore mal compris. Entre autre, le rôle de la sérotonine dans la physiopathologie des troubles gastro-intestinaux tels que la maladie intestinale inflammatoire et le syndrome du côlon irritable est controversée et représente actuellement un domaine de recherche très étudié. La sérotonine a été impliquée dans le syndrome carcinoïde du système gastro-intestinal caractérisée par une hypersécrétion de la sérotonine (Thorson *et al.*, 1958, Grahame-Smith *et al.*, 1967). Les observations utilisant des souris invalidées pour le gène codant pour le récepteur 5-HT_{2A} (5-HT_{2A}^{-/-}) ont démontré que la sérotonine via ce récepteur joue un rôle important dans le maintien et/ou le développement des muscles lisses et les cellules épithéliales de l'intestin (Fiorica-Howells *et al.*, 2002)

I.3.2.1.3) Voies de signalisation activées par les récepteurs 5-HT_{2A}

L'activation du récepteur 5-HT_{2A} par son ligand provoque l'activation et la dissociation de la sous-unité α de la sous-unité $\beta\gamma$ du complexe trimérique formant la protéine Gq. La sous-unité α activée stimule la phospholipase C de type β (PLC- β) et entraîne l'hydrolyse du phosphatidylinositol biphosphate membranaire (PIP₂) en IP₃ et en diacylglycérol (DAG). L'IP₃ va cibler des récepteurs des canaux calciques situés sur les membranes du réticulum endoplasmique provoquant la libération et l'augmentation du taux de calcium dans le cytosol et l'activation de protéines dépendantes du calcium comme la calmoduline (CaM), les canaux calciques et la PKC (Florian *et al.*, 1998, Turner *et al.*, 2005).

En plus de la voie de signalisation principale impliquant les protéines kinases PLC β et la PKC, d'autres effecteurs peuvent être activées par le récepteur 5-HT_{2A} telles que la voie de la phospholipase A2 (PLA₂) et la phospholipase D (PLD) (Kurrasch-Orbaugh *et al.*, 2003a, Kurrasch-Orbaugh *et al.*, 2003b). Cependant, l'effet du 5-HT_{2A} sur la PLD semble être spécifique du type cellulaire utilisé puisque l'activation du récepteur 5-HT_{2A} active la PLD dans

les cellules mésangiales du rein chez le rat, cependant, cette activation n'a aucun effet sur la PLD dans les cellules de la trachée du porc (Kurrasch-Orbaugh *et al.*, 2003a, Kurrasch-Orbaugh *et al.*, 2003b; Cox *et al.*, 1996). Le mécanisme d'activation de la PLD par le récepteur 5-HT_{2A} fait intervenir les petites protéines G (GTPases) telles que le facteur de ribosylation-ADP-1 (ARF-1 pour ADP-ribosylating factor-1) et RhoA (Johnson *et al.*, 2006). Dans les cellules gliales C6 et les cellules souches neuroectodermiques embryonnaires 1C11, l'activation du récepteur 5-HT_{2A} provoque l'activation de la PLA₂ et la libération de l'acide arachidonique (Garcia *et al.*, 1997). Le récepteur 5-HT_{2A} peut réguler la production de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) bien que ce mécanisme dépende du type cellulaire étudié. Par exemple, dans les cellules mésangiales du rein chez le rat, les récepteurs 5-HT_{2A} inhibent la formation de l'AMPc par l'intermédiaire d'une interaction directe avec la protéine G de type Gi/o probablement via le complexe βγ (Garnovskaya *et al.*, 1995). En revanche, le récepteur 5-HT_{2A} stimule la production de l'AMPc dans les cellules du carcinome médullaire de la thyroïde de rat FRTL-5 par un mécanisme impliquant la protéine Gs sensible (Tamir *et al.*, 1992). Dans les lignées du cortex embryonnaire de rat A1A1, l'activation du récepteur 5-HT_{2A} amplifie la formation d'AMPc par deux voies distinctes couplées à l'hydrolyse des inositol phosphates, la PKC et le calcium/ CaM (Berg *et al.*, 1994). Enfin, le récepteur 5-HT_{2A} active principalement les voies de signalisation MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) et JAK/STAT (*Janus kinase/signal transducers and activators of transcription*) (Greene *et al.*, 2000, Grewal *et al.*, 1999, Guillet-Deniau *et al.*, 1997).

Voie des MAPKs (kinases activées par les mitogènes)

La famille des MAPKs constitue un groupe de protéines kinases qui sont activées par différents stimuli extracellulaires et qui empruntent diverses voies de signalisation pour générer une réponse cellulaire adaptée. Chez les mammifères, les MAPKs sont classifiées en trois sous-familles: les ERK1/2 (*extra-cellular regulated protein kinases*), le JNK (*c-jun N-terminal kinases*) et les p38 (pour revue, voir (Kyriakis *et al.*, 2001)). Les ERK1/2 sont activées par les facteurs de croissance et les hormones, alors que les voies JNK et p-38 sont principalement activées par les stress environnementaux et les cytokines.

Les MAPKs sont régulées par un réseau complexe de kinases via la phosphorylation séquentielle sur des résidus tyrosines, sérines et thréonines. En général, cette régulation des MAPKs se fait au

sein d'un module de signalisation principale (*Core signaling module*) et nécessite l'activation séquentielle de trois kinases. Les premières kinases de ce module sont représentées par la famille des MAPK kinase kinase (MAPKKK) comprenant les membres raf, MEKK, MLK et ASK1. Ces MAPKKK sont des kinases sérine/thréonine et, une fois activées, elles phosphorylent les MAPK kinase (MAPKK), MEK1, MEK2 (cibles de Raf), MKK2, MKK3, MEK5, MKK7 (cibles de MEKK), MKK3, MKK4, MKK7 (cibles de MLK) et MKK3, MKK4, MKK6 (cibles de ASK1). Les MAPKK reconnaissent et phosphorylent le motif conservé *Thr-X-Tyr* (Thréonine-X-Tyrosine) présent dans la boucle d'activation des MAPKs, ce qui définit les MAPKK comme kinase de double spécificité. Les MAPKs sont les kinases finales du module et, une fois activées, elles iront phosphoryler les résidus sérine et thréonine présents dans leurs substrats. Ces derniers constituent les quatre familles de la grande voie des MAPKs, i.e. ERK1 et 2 (cibles de MEK1, MEK2), ERK5 (cibles de MEK5), JNKs (cibles de MKK4 et MKK7) et p38 MAPK (cibles de MKK3 et MKK6) (Kyriakis *et al.*, 2001, Mordret, 1993, Widmann *et al.*, 1999).

La forme non activée d'ERK1/2 montre une distribution cytoplasmique et se translocalise d'une façon très rapide dans le compartiment nucléaire une fois activée (p-ERK1/2). La localisation subcellulaire d'ERK1/2 joue un rôle important dans la spécificité de la réponse au signal cellulaire (Khokhlatchev *et al.*, 1998). Une fois activée, ERK1/2 peut induire dans les compartiments cellulaires la phosphorylation de plusieurs substrats comme les protéines membranaires (CD 120a, Syk et calnexine), des substrats nucléaires (SRC-1, Pax6, NFAT, Elk-1, MEF2, c-Fos et c-Myc) et des protéines du cytosquelette (neurofilaments et paxiline) (Roux *et al.*, 2004).

La dérégulation des voies MAPKs et plus particulièrement la voie Raf-MEK1/2-ERK1/2 est fortement associée au développement et à la progression du cancer (Dhillon *et al.*, 2007). En effet, la voie ERK1/2 est dérégulée dans pratiquement le tiers des néoplasies. Brièvement, la voie ERK1/2 est classiquement stimulée par l'interaction des ligands et de leurs RTKs via une voie bien définie impliquant la dimérisation et une autophosphorylation mutuelle des RTKs créant ainsi des sites de fixation pour le complexe des molécules adaptatrices Grb2-Sos et l'activation de la protéine Ras. Cette dernière va phosphoryler à son tour la protéine Raf-1 qui va activer MEK1/2. ERK1/2, le substrat spécifique de MEK1/2, une fois activé se dimérise et transloque dans le noyau où avec d'autres facteurs de transcription il régule l'expression de plusieurs gènes impliqués dans divers processus cellulaires (**Fig. 7**) (pour revue, voir Roux *et al.*, 2004).

L'activation de ERK1/2 via la stimulation d'un RCPG est complexe et peut avoir lieu par : (1) transactivation avec un RTK, (2) l'activation de la voie de signalisation impliquant la PLC et la PKC, et (3) l'activation de la voie AMPc/PKA. L'exemple le plus connu est le potentiel de transactivation des récepteurs à l'EGF par l'endothéline, la lipoprotéine A1 (LPA) et la thrombine dans les fibroblastes de rat menant à une activation rapide de ERK1/2 (Daub *et al.*, 1996) qui nécessite l'activation de métalloprotéases membranaires (Ivey *et al.*, 2008, Liebmann, 2001, Prenzel *et al.*, 1999). L'activation de ces métalloprotéases permet le clivage de HB-EGF (*Heparin-binding-EGF*) et la libération de sa partie active, liée à un domaine transmembranaire (**Fig. 8**). Les protéases impliquées dans ce phénomène demeurent mal connues bien que des études aient suggéré l'implication de métalloprotéases de la sous-famille ADAM (*A Disintegrin and Metalloproteinase*) (Black *et al.*, 1997, Izumi *et al.*, 1998, Moss *et al.*, 1997). L'activation d'ERK1/2 via la transactivation des RTKs peut aussi avoir lieu sans clivage des récepteurs à l'EGF. En effet, le récepteur à l'EGF (EGFR) peut être phosphorylé par le biais des protéines kinases Src et Pyk2 activées en aval des RCPGs après fixation de leurs ligands (**Fig. 8**) (Andreev *et al.*, 2001). Cependant, les protéines Src et Pyk2 ne sont pas absolument requises pour l'activation de la voie ERK1/2, ce qui démontre la fragilité du lien entre la phosphorylation des RTKs et l'activation ERK1/2 (Biscardi *et al.*, 1999, Keely *et al.*, 2000, Luttrell *et al.*, 1996).

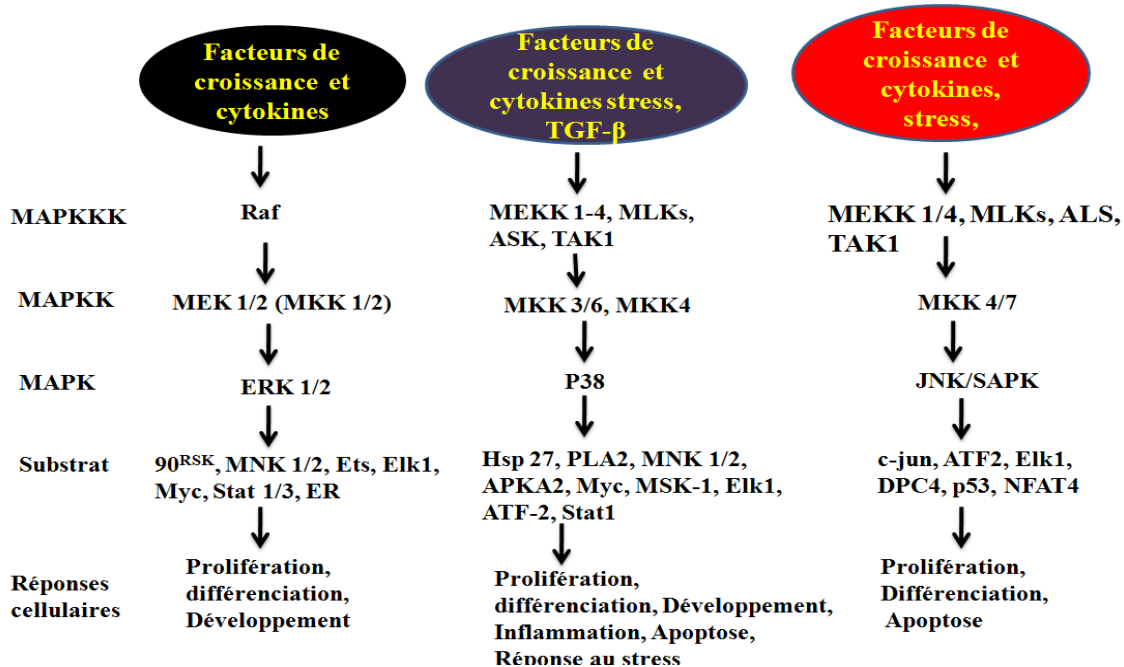


Figure 7 : Voie de signalisation des kinases activées par les mitogènes (MAPKs)

Plusieurs études ont démontré que le récepteur 5-HT_{2A} soit capable de stimuler la voie ERK1/2 bien que le mécanisme impliqué demeure mal connu (Banes *et al.*, 1999, Greene *et al.*, 2000, Grewal *et al.*, 1999). Dans les cellules mésangiales rénales du rat, l'activation de la voie ERK1/2 implique la stimulation de la PKC et la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) via l'activation de l'enzyme NAD(P)H oxydase (*NAD(P)H oxydase-like enzyme*). En revanche, la stimulation de la voie ERK1/2 par la l'activation du 5-HT_{2A} dans les cellules du muscle lisse vasculaire nécessite l'activation de la protéine Src, indépendamment des PKCs et PI3Ks ou de la transactivation du EGFR (Banes *et al.*, 1999)(Watts *et al.*, 2001). La signification biologique ainsi que le type de réponse physiologique résultant de l'activation de la voie ERK1/2 via le récepteur 5-HT_{2A} est spécifique du type cellulaire. Ainsi, la stimulation de la voie ERK1/2 via le récepteur 5-HT_{2A} dans les cellules du muscle lisse vasculaire provoque la contraction musculaire (Watts *et al.*, 2002), alors que dans les cellules mésangiales du rat, cette stimulation induit la prolifération et la production du facteur de croissance tumorale- β (TGF- β) (Grewal *et al.*, 1999).

Voie JAK/STAT

La famille des JAKs sont des tyrosines kinases cytoplasmiques comprenant quatre membres : JAK1, JAK2, TYK2 et JAK3. À l'exception de la tyrosine kinase JAK3 qui est uniquement exprimée dans les cellules hématopoïétiques (lignée myéloïde et lymphoïde), les autres kinases sont exprimées de façon ubiquitaire. Les JAKs lorsqu'elles sont activées phosphorylent à leur tour une famille de facteurs de transcription ; les STATs (*signal transducers and activators of transcription*). Cette famille comprend sept membres (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b et STAT6). La voie de JAK/STAT, classiquement activée par les médiateurs inflammatoires (cytokines) et des récepteurs aux facteurs de croissance, est impliquée dans des processus physiologiques tels que la réponse immunitaire, la différenciation, la prolifération et la survie cellulaire, et dans l'oncogénèse. Le mécanisme d'activation de la voie JAK/STAT par les cytokines est bien documenté. Brièvement, la fixation des cytokines (ligands) sur leurs récepteurs provoque la dimérisation de ces derniers et une trans-phosphorylation des tyrosines kinases JAKs. Les JAKs activées vont à leur tour phosphoryler des résidus tyrosines présents au niveau du domaine cytoplasmique des récepteurs sur lesquelles les les STATs vont se fixer. Les JAKs activées vont à leur tour phosphoryler des résidus tyrosines présents au niveau du domaine cytoplasmique des récepteurs et sur lesquelles les STATs vont se fixer. La formation du complexe récepteurs-JAK-STAT situé au niveau de la membrane va permettre aux protéines

JAKs de phosphoryler les STATs provoquant, ainsi, leur dimérisation et leur translocation dans le noyau où ils vont se fixer sur des séquences spécifiques au niveau des promoteurs des gènes cibles et moduler leurs expressions (**Fig. 9**) (pour revue, voir Leonard *et al.*, 1998, Rawlings *et al.*, 2004). Les STATs vont se fixer. Au niveau du complexe récepteurs-JAK-STAT situé au niveau de la membrane, les JAKs vont phosphoryler les STATs provoquant leur dimérisation et translocation dans le noyau où ils vont se fixer (avec d'autres facteurs de transcription) sur des séquences spécifiques au niveau des promoteurs des gènes cibles et moduler leurs expressions (**Fig. 9**) (pour revue, voir (Leonard *et al.*, 1998, Rawlings *et al.*, 2004).

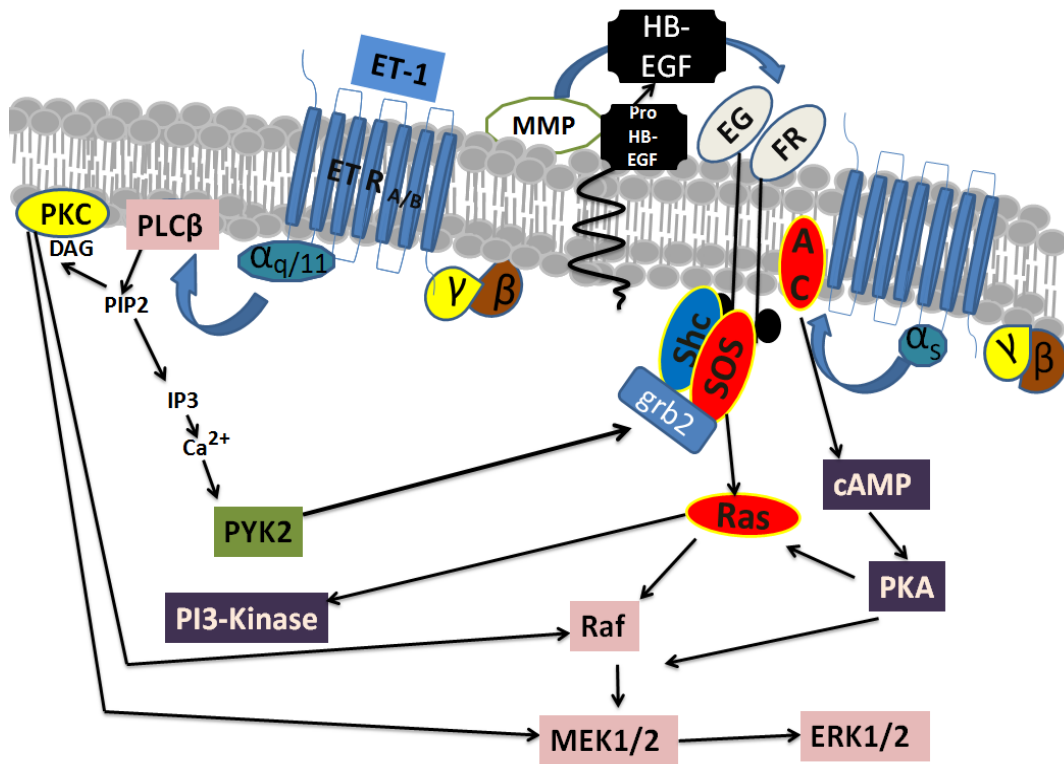


Figure 8 : Activation de la voie de signalisation des MAPKs par les récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs). Exemple du récepteur à l'endothéline-1 ($ETR_{A/B}$) dans les cellules vasculaires du muscle lisse. La stimulation du récepteurs $ETR_{A/B}$ couplé à une protéine de type Gq par son ligand ET-1 conduit à l'activation de la phospholipase C (PLC) et la formation de l'inositol (1,4,5) triphosphate (IP3) à partir du phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) et du diacylglycérol (DAG). Ce dernier active la protéine kinase C (PKC), qui phosphoryle la protéine kinase activée par les mitogènes ERK1/2 via les protéines Raf et MEK1/2. IP3 stimule la libération de Ca^{2+} par le réticulum endoplasmique. ET-1 peut également activer, via la stimulation de l'adénylate cyclase (AC), l'adénosine 3,5 -monophosphate cyclique (AMPc) qui à son tours stimule la protéine kinase A (PKA). ET-1 active les voies des MAPKs via une tyrosine kinase et d'une métalloprotéine qui clive la forme pro-active des facteurs de croissance (HB-EGF). La forme active de ces derniers se lie aux récepteurs de la tyrosine kinase (EGFR), conduisant à l'activation de la cascade de MAPKs. Parallèlement, une augmentation des concentrations du Ca^{2+} peut activer les tyrosines kinases sensibles au Ca^{2+} tels que la tyrosine kinase riche en proline -2 (PYK2), qui en formant un complexe de signalisation avec des protéines adaptatrices SHC, GRB et SOS, active les kinases Ras et Raf. ET-1 active également la voie des phosphoinositol-3-kinase (PI3-kinase) par l'intermédiaire de l'activation de Ras.

La voie JAK/STAT peut aussi être stimulée par l'activation de RCPG de type Gq, mais le mécanisme mis en jeu demeure mal connu. Plusieurs exemples illustrant l'activation des JAK/STAT par les RCPGq ont été répertoriés (**Tableau 2**). Par exemple, la gastrine via l'activation de son récepteur à 7 domaines transmembranaire (RCKK-2) active la voie JAK2/STAT3 dans les différentes lignées cellulaires tumorales du pancréas *in vitro* et *in vivo* dans des modèles de souris transgéniques. Le mécanisme d'activation de JAK2 nécessite à la fois l'association physique entre la protéine JAK2 et une séquence NPXXY situé sur le septième domaine transmembranaire du récepteur RCKK-2 et l'activation de la sous-unité α de la protéine Gq. L'activation de cette voie par la liaison de la gastrine à son récepteur induit des processus physiologiques fondamentaux tels que la croissance cellulaire et la modulation de l'adhésion cellule-cellule (Ferrand *et al.*, 2005). Un autre exemple est illustré par l'activation du récepteur AT1 (RCPG de type Gq) par son ligand l'angiotensine II qui provoque la phosphorylation de JAK2 et STAT3 dans les cellules du muscle lisse de l'aorte chez le rat (Marrero *et al.*, 1995). L'association physique entre JAK2 phosphorylé et le récepteur AT1 se fait dans un complexe impliquant la sous-unité G β de la protéine Gq, le récepteur AT1 et une protéine de connexion SHC (*sequence homology of collagen*) (Luchtefeld *et al.*, 2003). Enfin, Des études proposent que le recrutement des STATs au niveau du complexe récepteur-JAK2 serait lié à la présence d'un motif (YXXQ) sur certains RCPGs, tels que le récepteur au TSH, le récepteur α -adrénergiques et le récepteur à l'endothéline-1, tous capables de lier les protéines STAT3 (Dostal *et al.*, 1997, Park *et al.*, 2000).

La chronologie des événements et la réponse cellulaire résultant de l'association entre JAK2 et les RCPGq ne se déroule pas de la même façon pour tous les RCPGq. Par exemple, la protéine JAK2 doit subir une autophosphorylation préalable avant d'être recruté au niveau du récepteur AT1 puisque l'inhibition de JAK2 affecte sa liaison au au récepteur AT1 et inhibe la prolifération cellulaire. En revanche, cette activation préalable de JAK2 n'est pas nécessaire pour les récepteurs aux chimiokines (CXCR4), puisque l'inhibition ou la mutation de JAK2 n'affecte pas son association au récepteur CXCR4, cependant, la capacité migratoire des cellules en réponse aux chimiokines est diminuée ce qui montre tout de même l'importance de la voie JAK2 dans la réponse cellulaire induite par ce RCPGq (Soriano *et al.*, 2003).

Voie JAK/STAT

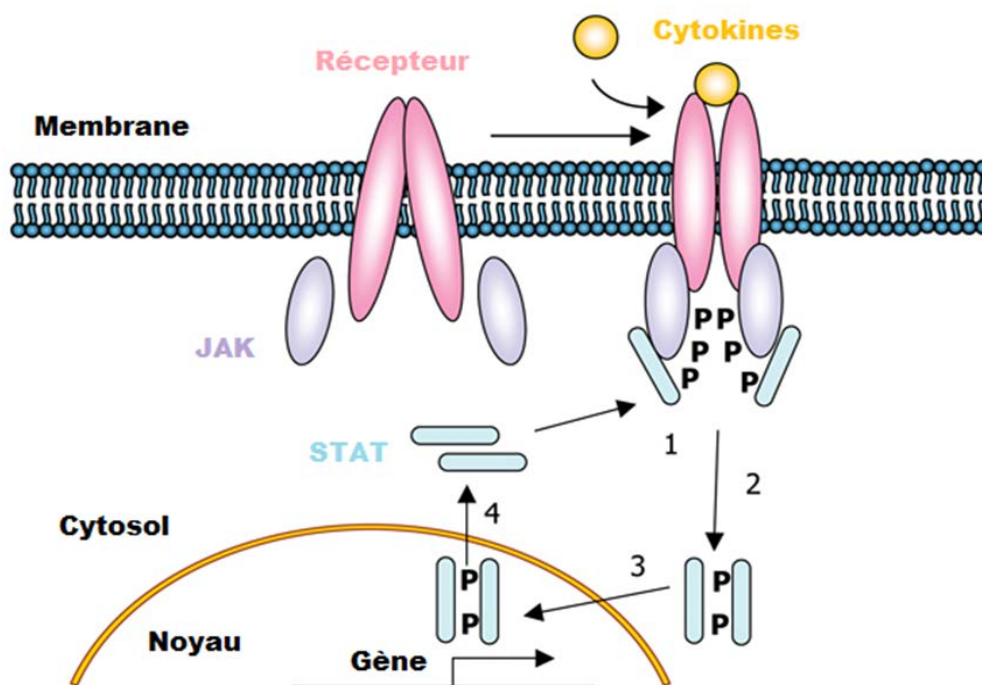


Figure 9 : Voie de signalisation JAK/STAT. La fixation du ligand (cytokines) sur son récepteur va provoquer la phosphorylation de la protéine kinase JAK et du domaine cytoplasmique du récepteur (1). Les protéines STAT sous forme monomères, recrutées au niveau du complexe JAK-récepteur, subissent une phosphorylation au niveau des résidus tyrosines, se dimérisent (2) et migrent vers le noyau (3) pour se fixer au promoteur des gènes cibles. La déphosphorylation des protéines STATs va provoquer leur dissociation et par conséquent leur expulsion dans le cytoplasme (4).

Le mode de régulation de la signalisation dépendante de la voie JAK/STAT par les protéines G reste encore obscur. D'ailleurs, ces mécanismes de régulation sont communs aux RCPGs et aux récepteurs des cytokines et des facteurs de croissance. Par exemple, la phosphatase SHP-1 (*Src homology phosphatase-1*), qui grâce à son domaine SH2, peut être recrutée à la fois au niveau du complexe récepteur aux chimiokines CXCR4-JAK-STAT et au niveau du complexe récepteur à l'angiotensine II AT1-JAK-STAT et inhibe la translocation nucléaire des protéines STATs (Marrero *et al.*, 1995, Vila-Coro *et al.*, 1999). Dans le cas de l'angiotensine, l'expression de SOCS augmente très rapidement en réponse à l'activation des protéines STAT3 pour exercer une rétroaction négative sur la phosphorylation de JAK2, atténuant ainsi l'intensité du signal et de la réponse cellulaire (Hernandez-Vargas *et al.*, 2005). La famille des protéines SOCS (pour *Suppressors of cytokine signaling*) est considérée comme des senseurs, à plusieurs niveaux, de la signalisation dépendante des STATs. Enfin, les protéines PIAS (pour *protein inhibitor of*

activated STATs) sont capables d'interagir avec les STATs en inhibant leur liaison à l'ADN. En revanche, leur implication dans la voie de transduction du signal dépendante de STATs activées par les RCPGq n'a pas été démontrée.

Tableau 2 : Sommaire des différents membres de la famille JAK et STAT activés par les récepteurs couplés à une protéine G de type G_q (RCPG_q)

Récepteurs (ligands)	JAK	STAT	Références
AT1 (angiotensine)	2	1, 3, 5, 6	(Ali <i>et al.</i> , 1997, El-Adawi <i>et al.</i> , 2003, Marrero <i>et al.</i> , 1995)
PARs (thrombine)	2	1, 3	(Huang <i>et al.</i> , 2000)
LHR (LH)	2	1, 5	(Carvalho <i>et al.</i> , 2003)
TSHR (TSH)	1, 2	3	(Park <i>et al.</i> , 2000)
BKR2 (bradykinine)	Tyk2	3	(Ju <i>et al.</i> , 2000)
5-HT _{2A} (sérotonine)	2	3	(Guillet-Deniau <i>et al.</i> , 1997)
CCR2 (CCL2)	1,2	2, 3, 5	(Biswas <i>et al.</i> , 2002)
CCR5 (CCL5)	1, 2, 3	1, 2, 3, 5	(Wong <i>et al.</i> , 1998)
CXCR4 (CXCL12)	1, 2, 3, Tyk2	1, 2, 3, 4, 5	(Vila-Coro <i>et al.</i> , 1999)
CCR7 (CCL21)	2	-	(Stein <i>et al.</i> , 2003)
ORL(1) (orphelin)	-	3	(Wu <i>et al.</i> , 2003)
FMLPR (N-formyl peptides)	-	3	(Sasaguri <i>et al.</i> , 2000, Wu <i>et al.</i> , 2003)
A-adrénergiqueR1 (catécholamines)	2, Tyk2	1	(Sasaguri <i>et al.</i> , 2000)

I.3.2.1.4 Rôle mitogène de la sérotonine et du récepteur 5-HT_{2A}

Au niveau hépatique

Le foie peut régénérer son volume après la perte de tissu majeur. Une étude intéressante parue dans le journal *Sciences*, a démontré que la sérotonine d'origine plaquettaire, via les récepteurs 5-HT_{2A}, est impliquée dans l'initiation de la régénération du foie. Dans cette étude, Chez des souris (C57BL), souris modèles pour l'étude de la régénération du foie, une déficience de l'activité des plaquettes (thrombocytopenie) conduit à l'absence de la prolifération cellulaire dans le foie. Chez ces souris, l'utilisation prolongée d'un agoniste des récepteurs 5-HT_{2A} restitue la prolifération du foie d'une manière significative. Chez des souris ayant subi une hépatectomie

partielle, provoque une augmentation significative des niveaux d'expression de 5-HT_{2A} dans le foie associé à une régénération a été observée (Lesurtel *et al.*, 2006). Papadimas et collaborateurs ont réussi à bloquer que cette régénération par la kétansérine. Cependant l'effet de la kétansérine n'est efficace que si elle est administrée pendant la phase de transition G1-S du cycle cellulaire, ce qui montre l'implication de la la sérotonine, via son récepteur 5-HT_{2A}, comme co-facteur dans la synthèse de l'ADN pendant le processus de la régénération des cellules du foie (Papadimas *et al.*, 2006)

Au niveau rénal

La sérotonine exerce un effet mitogène puissant sur les cellules mésangiales (Takuwa, Ganz et al. 1989, Montero, Rodriguez-Lopez et al. 1995, Fanburg and Lee 1997), et cette activité mitogène est impliquée dans le développement de glomérulonéphrite. L'activité mitogène de la sérotonine dépend de l'activation du récepteur 5-HT_{2A} et fait intervenir la voie PLC/PKC, une augmentation de la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS), et une accumulation de la cytokine fibrosante TGF- β (Grewal, Mukhin et al. 1999).

Au niveau du sein

Les récepteurs 5-HT_{2A} est présent dans les cellules du cancer du sein MCF-7. La sérotonine exerce un effet mitogénique bien que le mécanisme impliqué n'a pas été étudié (Sonier et *al.*, 2006).

II) PLACENTA HUMAIN

Le placenta est un organe multifonctionnel (production hormonale, échanges mère-fœtus, immunomodulation) jouant un rôle essentiel dans le déroulement de la grossesse et dans la croissance fœtale chez les mammifères. Bien que ses fonctions soient essentielles, le placenta est un organe dont le fonctionnement et le développement sont peu connus. Chez les mammifères, le placenta est l'organe dont la structure et le fonctionnement divergent le plus d'une espèce à l'autre en raison des différences de besoins nutritionnels, du nombre de rejetons et de la durée de la période de gestation. Une importante activité endocrinienne et une placentation de type hémomonochoriale sont propres à l'humain (Malassine *et al.*, 2003).

La villosité choriale (ou villosité placentaire) constitue l'unité structurale et fonctionnelle du placenta humain (Alsat *et al.*, 1998). Elle baigne directement dans le sang maternel, apporté par les artères utérines. Cette villosité est à la fois ancrée dans l'utérus maternel et appelée villosité crampon, où elle favorise l'implantation et l'invasion, et flottante (ou libre) dans la chambre intervillieuse favorisant le développement placentaire et les échanges bidirectionnels entre la mère et le fœtus (**Fig. 10**).

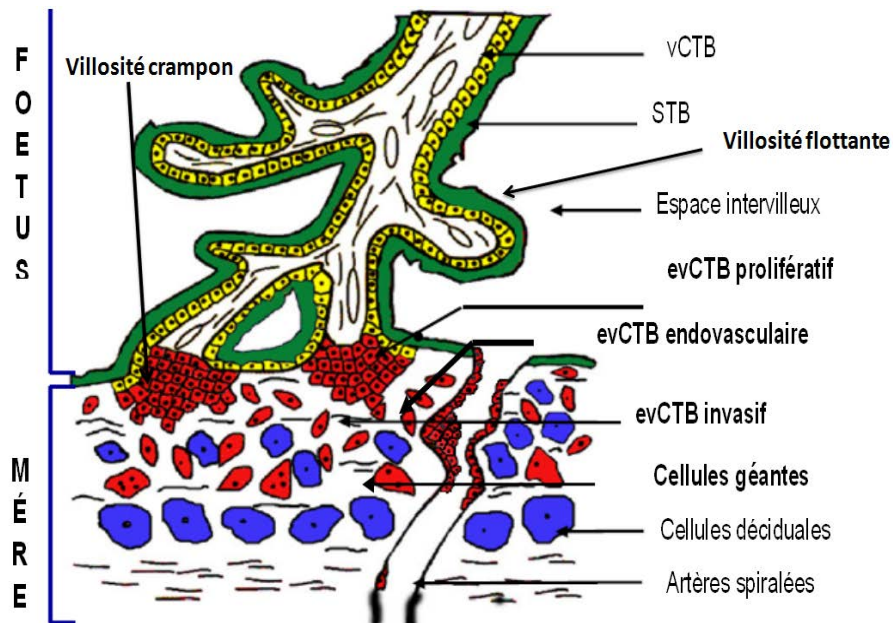


Figure 10 : Villosité placentaire ancrée à l'interface fœto-maternelle. ST : syncytiotrophoblaste ; vCT : cytotrophoblaste villositaire ; evCTB : cytotrophoblaste extravillous. Figure offerte par Dr Thierry Fournier (INSERM U767, Paris, France) et modifiée avec autorisation par Talal Oufkir.

II.1) Développement du placenta humain

Le développement du placenta se fait à partir des cellules souches trophoblastiques qui s'engagent dans deux voies : celle du trophoblaste vilieux (vCTB), assurant le développement placentaire et celle du cytotrophoblaste extravilleux (evCTB) assurant l'implantation de l'embryon dans les tissus utérins maternels (**Fig. 11**).

II.1.1) Différenciation du trophoblaste vilieux.

La villosité flottante est composée par deux types cellulaires, une assise cellulaire mononucléée le cytotrophoblaste vilieux (vCTB), recouverte d'une couche cellulaire plurinucléée appelée le syncytiotrophoblaste (STB) et qui résulte de la fusion avec les vCTB sous-jacents (**Fig. 11**) (Aplin, 1991). Ce phénomène de différenciation cellulaire est appelé syncytialisation.

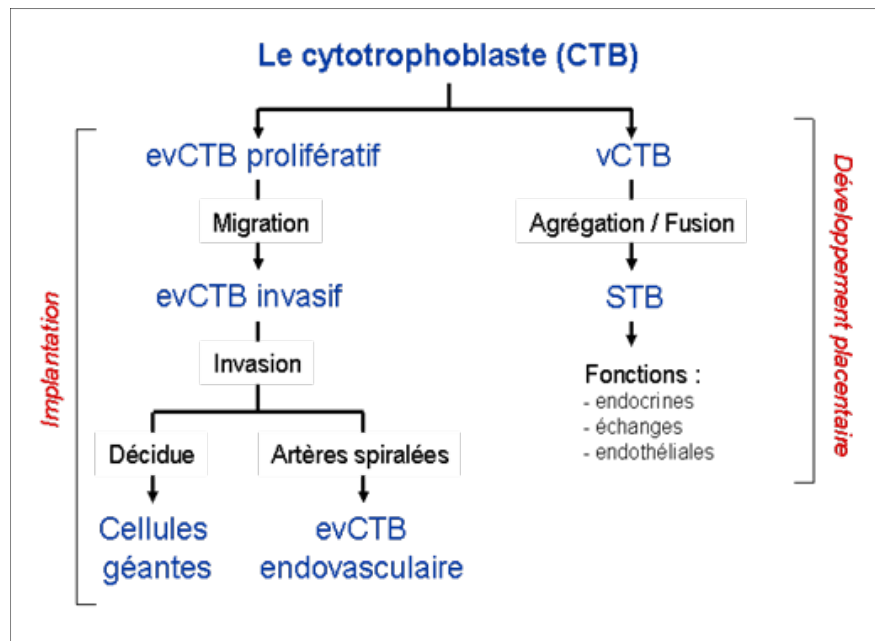


Figure 11 : Représentation des deux voies de différenciation du cytotrophoblaste humain. Le cytotrophoblaste vilieux (CTV) fusionne et forme le syncytiotrophoblaste (ST). Le cytotrophoblaste extravilleux (evCTB) prolifère puis devient invasin et migre dans la décidue et le myomètre. Il colonise les vaisseaux maternels (evCTB endovasculaire) ou se différencie en cellules géantes plurinucléées.

Le phénomène de syncytialisation est un processus très rare. Chez l'humain, trois types de tissus seulement résultent de fusions syncytiales : le syncytiotrophoblaste, les fibres musculaires striées et les ostéoclastes (Huppertz *et al.*, 2001, Vignery *et al.*, 2000). Un quatrième type plus rare de tissus multinucléés peut être formé par le processus de syncytialisation cellulaire. Il s'agit des grandes cellules géantes multinucléées (MGC) qui proviennent de la fusion des cellules de la

lignée monocytes/macrophages. La fusion des macrophages est caractéristique de la différenciation des ostéoclastes et la formation de granulomes de corps étranger, où les macrophages fusionnées assurent la dégradation optimale des os et les matières étrangères, respectivement (Anderson *et al.*, 2000, Vignery *et al.*, 2000).

La compréhension des mécanismes impliqués dans la différenciation du trophoblaste vilieux est beaucoup étudiée en raison de la possibilité d'isoler, de purifier et de maintenir ces cellules en culture (Kliman *et al.*, 1986). En effet, *in vitro*, le syncytiotrophoblaste se forme à partir de l'agrégation puis de la fusion cellulaire des cytotrophoblastes vilieux. Cette différenciation morphologique est accompagnée d'une différenciation fonctionnelle caractérisée par l'activation de certains gènes exprimés spécifiquement dans le syncytiotrophoblaste et codant à titre d'exemple pour des hormones sécrétées, telles l'hormone gonadotrophine chorionique (hCG), l'hormone lactogène placentaire (hPL), l'hormone de croissance placentaire (pGH), et la leptine (Chardonens *et al.*, 1999, Jacquemin *et al.*, 1998, Morrish *et al.*, 1987). Ce processus de fusion cellulaire n'est encore entièrement élucidé. La présence dans le syncytiotrophoblaste de deux gènes codant pour des protéines membranaires rétrovirales semble impliquée celles-ci dans ce processus de fusion. Ces protéines appelées syncytines, nommées syncytine-1 et -2 semblent agir d'une manière concertée pour induire une action fusogène *in vitro* (Mi *et al.*, 2000). La fonction de la syncytine-1 serait d'initier les étapes précoces de la fusion cellulaire entre les cellules cytotrophoblastiques, alors que la syncytine-2 semble intervenir dans le processus fusogénique proprement dit (Vargas *et al.*, 2009). Le processus de fusion cellulaire implique également la communication intercellulaire. En effet, la présence de jonctions communicantes fonctionnelles, impliquant la connexin 43, est indispensable à la formation du syncytiotrophoblaste (Malassine *et al.*, 2005). Par ailleurs, la formation du syncytiotrophoblaste est stimulée par l'AMPc (Keryer *et al.*, 1998), par certains facteurs de croissance, comme le EGF (Morrish *et al.*, 1987), par des hormones polypeptidiques dont la hCG et par des agents de synthèse stéroïdiens tel que la dexaméthasone (Malassine *et al.*, 2002). À l'inverse, cette formation syncytiale est inhibée par le facteur de croissance tumoral- β (TGF- β) (Morrish *et al.*, 1991), par le facteur inhibant la leucémie (LIF) (Nachtigall *et al.*, 1996) et par l'hypoxie (Alsat *et al.*, 1996)..

II.1.2) Différenciation du trophoblaste extravilleux

Les cytotrophoblastes extravilleux (evCTB) des colonnes à la base de la villosité crampon, sont capables de proliférer puis de migrer dans l'endomètre décidualisé. Ces cytotrophoblastes vont alors persister dans la paroi utérine et elles migrent vers les artères spiralées utérines pour devenir des cellules endovasculaires (phénotype des cellules endothéliales) ou se différencier, de façon terminale, en cellules géantes bi- ou trinuéclées (Kaufmann *et al.*, 2003, Redman *et al.*, 2003, Zhou *et al.*, 1997b).

À la base de la villosité crampon, les cytotrophoblastes extravilleux vont passer d'un phénotype épithélial polarisé vers un phénotype prolifératif. Ces cellules vont perdre leur capacité proliférative puis vont migrer pour envahir l'endomètre maternel en interagissant avec les cellules déciduales et les cellules immunocompétentes de la décidue. Ces cellules invasives vont progresser dans la décidue et vont se diriger préférentiellement vers les artères spiralées du muscle utérin pour éroder les cellules endothéliales jusqu'au premier tiers du myomètre. Ces cytotrophoblastes extravilleux vont remplacer les cellules endothéliales avec l'acquisition d'un phénotype endovasculaire. Cette invasion des artères spiralées va les transformer en artères atones, hors de tout contrôle neurovasculaire. Cette transformation implique l'apport d'un grand flux sanguin pour l'embryon afin de combler les besoins croissants du fœtus en nutriments et en oxygène pour son développement. La plupart de ce que nous connaissons des mécanismes qui régulent l'invasion trophoblastique a essentiellement été décryptée par immunohistochimie à partir de l'étude *in situ* de la zone d'implantation appelée lit placentaire, et par la possibilité d'isoler et de cultiver *in vitro* des cellules trophoblastiques extravilleuses (Tarrade *et al.*, 2001). (Fig. 10).

L'invasion des cytotrophoblastes extravilleux, contrairement à un modèle tumoral, est un processus régulé de manière spatio-temporelle. Cette régulation est le fruit de l'interaction des cytotrophoblastes extravilleux avec la matrice extracellulaire (MEC) et d'un certain nombre de signaux diffusibles.

Lors de la migration dans la décidue et les vaisseaux, le cytotrophoblaste extravilleux acquiert des phénotypes variés qui se traduisent par un changement graduel des récepteurs aux intégrines (spécifiques de la laminine) par des récepteurs capables d'interagir avec les composantes de la matrice extracellulaire (fibronectine et collagène type1) (Aplin *et al.*, 1993, Burrows *et al.*, 1993,

Damsky *et al.*, 1992, Zhou *et al.*, 1993). Différentes sous-unités d'intégrines sont observées selon que le cytotrophoblaste est de type épithélial ($\alpha 3\beta 4$, $\alpha 6\beta 4$), interstitiel ($\alpha 1\beta 3$, $\alpha 5\beta 1$) ou endovasculaire ($\alpha 1\beta 3$, $\alpha v\beta 3$) (Damsky *et al.*, 1992). Leur expression est en rapport avec l'adhérence des cellules aux constituants de la matrice extracellulaire ($\alpha 6$: laminine, $\alpha 5$: fibronectine, $\alpha 1$: collagène). Le répertoire des sous-unités intégrines a été caractérisé et son importance se traduit par la possibilité de son utilisation, avec d'autres marqueurs, comme indicateur du pouvoir prolifératif et invasif dans les grossesses normales et pathologiques.

La migration trophoblastique est également modulée par la tension en oxygène dans l'interface fœto-maternelle (Genbacev *et al.*, 1997). La pression en oxygène dans la chambre intervillieuse module l'expression de facteur de transcription inductible par l'oxygène comme le facteur de transcription d'hypoxie induit par l'hypoxie (HIF pour *Hypoxia-inducible factor*). Ce dernier va à son tour moduler l'expression de certains gènes codant pour l'érythropoïétine (hémodynamique), le VEGF (angiogénèse) et certaines enzymes du métabolisme. Le passage des cytotrophoblastes extravilloux d'un état prolifératif à un état invasif se fait en réponse au TGF- β produit par la décidue (Xu *et al.*, 2001a).

Comme toute cellule invasive, les cytotrophoblastes extravilloux produisent des protéases pour dégrader la matrice extracellulaire ; les métalloprotéases. Il existe plusieurs types de métalloprotéases qui jouent un rôle fondamental dans la destruction des protéines de la matrice extracellulaire, la progression et la dissémination des tumeurs. Le cytotrophoblaste extravilloux met en œuvre des métalloprotéases matricielles (MMPs) synthétisées et activées au cours de la progression des cellules dans la matrice extracellulaire principalement la gélatinase B (MMP9) et la gélatinase A (MMP2) (Lala *et al.*, 2002). Pour contrôler cette invasion, une double régulation s'impose. En effet, des inhibiteurs des métalloprotéases (TIMPs) sont sécrétés à la fois par les cytotrophoblastes extravilloux (autorégulation) et par la décidue afin d'éviter un processus de protéolyse excessive (Huppertz *et al.*, 1998). Les TIMP-1 et -2 sont les principaux inhibiteurs des métalloprotéases MMP-2 et -9 respectivement. Ainsi, l'équilibre entre la production des MMPs et de leurs inhibiteurs les TIMPs va déterminer la capacité des cytotrophoblastes extravilloux à envahir la décidue. Cette dernière sécrète également des facteurs solubles stimulant ou inhibant l'invasion trophoblastique en modulant la synthèse des protéines matricielles, des protéases et de leurs inhibiteurs. Il faut noter qu'un défaut dans le mécanisme d'invasion des cytotrophoblastes extravilloux mène à des pathologies de la grossesse comme la

prééclampsie précoce (Lim *et al.*, 1997). Nous allons consacrer un chapitre détaillé à la description du système MMPs/TIMPs et de son rôle dans la régulation de l'invasion trophoblastique (voir section II.3.2).

II.3) Systèmes modèles pour les études *in vitro* du trophoblaste extravilleux

Lignées cellulaires de choriocarcinomes placentaires humains

Afin de comprendre les mécanismes impliqués dans la différenciation placentaire et d'étudier les fonctions placentaires dans des conditions physiopathologiques, des modèles animaux, *ex vivo* et *in vitro* ont été développés. Parmi les modèles animaux fréquemment utilisés est le modèle murin. Ce dernier, s'apprête à des manipulations génétiques (expression de transgène et extinction de gène) est a contribué grandement à la compréhension des mécanismes impliqués dans la formation et la physiologie du placenta *in vivo*. Cependant, ce modèle souffre d'un inconvénient majeur du fait que le type de placenta chez la souris diffère de celui chez la femme sur le plan anatomique et fonctionnel. Par ailleurs, l'existence de pathologies uniques au placenta humain comme la prééclampsie et la restriction de la croissance intra-utérine font que les processus de placentation observés chez la souris restent peu extrapolables à l'humain (Carter *et al.*, 2007, Watson *et al.*, 2005).

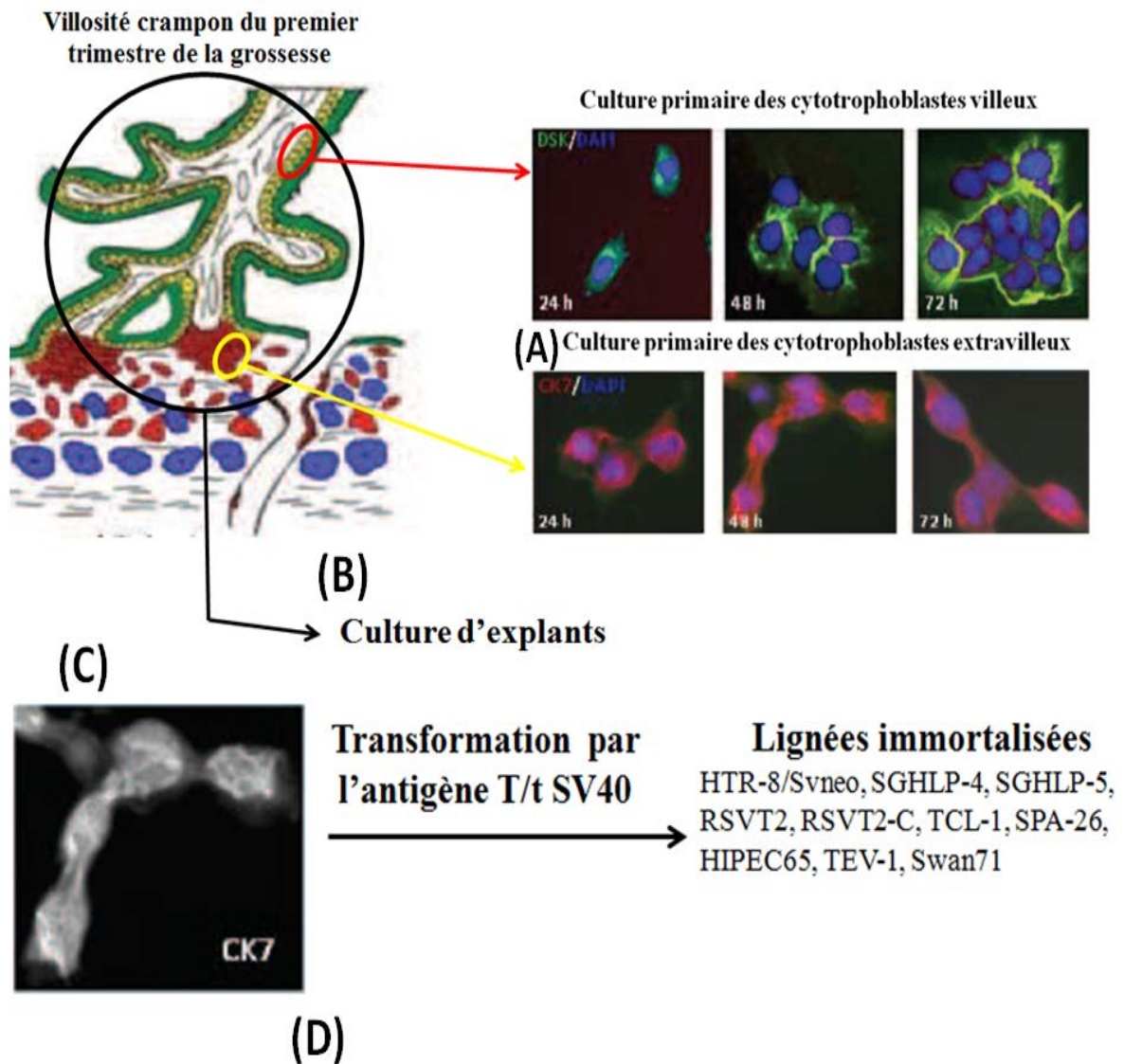
Un des modèles placentaires les plus utilisés est le modèle de cellules de lignée d'origine trophoblastique (*trophoblast-like cells*) (**Fig 12D**). Les premières lignées de cellules trophoblastiques endocrines humaines à être cultivées *in vitro* ont été les cellules BeWo. Ces cellules ont été obtenues après avoir inoculé une tumeur placentaire humaine (choriocarcinome) à des hamsters. Une fois ces tumeurs produites, elles ont été maintenues durant plusieurs années, par passages multiples entre animaux, jusqu'au développement de trois souches différentes. Une de ces souches a servi de source pour les cellules de la lignée qui ont ensuite été mises en contact (coculture) avec les explants de la membrane déciduale humaine. C'est à partir de cette coculture que les cellules BeWo ont été établies (Hertz *et al.*, 1959, Pattillo *et al.*, 1968a, Wolfe *et al.*, 2006). Ces cellules sont capables de former des syncytia lorsqu'elles sont stimulées par des molécules naturelles ou de synthèse capables d'augmenter la production de l'AMPc intracellulaire (Pattillo *et al.*, 1968a, Pattillo *et al.*, 1968b, Pattillo *et al.*, 1979, Prouillac *et al.*, 2009, Taylor *et al.*, 1991, Yashwanth *et al.*, 2006).

Ensuite, les deux autres souches de BeWo isolées ont été utilisées pour produire six clones dénommées JEG (JEG-1, -2, -3, -4, -7 et -8). Ces clones ont les mêmes caractéristiques morphologiques et de production d'hormones (hCG, hPL, estrogènes, etc.) que les cellules BeWo. Cependant, elles ne sont pas capables de former des syncytia. De plus, les différentes lignées de JEG formées démontraient un taux varié de production de hCG et de progestérone. Aujourd'hui, la souche JEG la plus utilisée et commercialisée par *l'American Tissue Culture Collection* (ATCC®) est la souche JEG-3. Une troisième lignée de cellules, les cellules JAR (Jar ou JAr), qui provenaient directement de la tumeur trophoblastique du placenta et qui possède aussi les caractéristiques morphologiques et hormonales du trophoblaste humain a été développée (Pattillo *et al.*, 1968b, Pattillo *et al.*, 1972, Pattillo *et al.*, 1979).

Les lignées BeWo, JEG-3 et JAR sont aujourd'hui considérées comme des cellules importantes pour l'étude du développement et de la fonction trophoblastique (Dalton *et al.*, 2007, Fisher *et al.*, 1989, Kudo *et al.*, 2003, Sullivan *et al.*, 2004, Ushigome *et al.*, 2000, Wolfe *et al.*, 2006). Les avantages connus de ces cellules sont leur homogénéité, leur culture *in vitro* aisée et leur facilité à être clonées et transfectées (Kovo *et al.*, 2008, Sullivan *et al.*, 2004).

Lignées cellulaires de primocultures trophoblastiques immortalisées

Malgré tous leurs avantages, les cellules du choriocarcinome placentaire ne peuvent être utilisées dans certaines conditions d'expérimentation. Par exemple, les primocultures de trophoblaste et les lignées trophoblastiques ne répondent pas de la même manière au TGF- β . Alors que cette cytokine produite localement par l'utérus inhibe la prolifération et l'invasion du trophoblaste en culture primaire (Graham *et al.*, 1992), certaines lignées trophoblastiques sont totalement réfractaires au TGF- β , bien qu'elles expriment les récepteurs à cette cytokine (Graham *et al.*, 1994). En 1993, Graham et ses collaborateurs ont créé une nouvelle lignée cellulaire qu'ils ont nommée HTR-8/SVneo. Cette lignée a été obtenue par transfection des explants de trophoblaste de premier trimestre de la grossesse (HTR-8) avec un vecteur d'expression codant pour l'antigène T du virus simiens 40 (SV40).



Les lignées du choriocarcinome

BeWo, JEG-3, JAR

Figure 12 : Modèle cellulaire pour l'étude *in vitro* de la différenciation du trophoblaste placentaire humain, d'après (Fournier *et al.*, 2011). (A) Les cellules du cytotrophoblaste villosus mononucléée (représenté en jaune sur la villosité crampon) ont été isolées à partir de la villosité chorale du premier trimestre et cultivées sur plastique pendant 72h pour une différenciation en syncytiotrophoblastes puis marquées par un anticorps contre la protéine membranaire desmoplakine (DSK) et visualisées par immunofluorescence (en vert). Les cellules du cytotrophoblaste extravilloux (représentée en rouge au niveau de l'interface fœto-maternelle de la villosité crampon) ont été cultivées sur Matrigel® et immunovisualisées en rouge grâce à un anticorps anti-cytokératine 7 (CK7). (B) Culture d'explants de villosité pour étudier la différenciation du trophoblaste humain. (C) Les différentes lignées immortalisées de cytotrophoblaste extravilloux du premier trimestre avec un antigène grand T et/ou petit du ployavirus SV40 (T/t SV40) et (D) Les lignées BeWo, JEG-3 et JAR issues du choriocarcinome placentaire.

D'autres modèles cellulaires immortalisés issus de primoculture ont été créés pour étudier l'invasion du trophoblaste telles que les cellules SGHPL (SGHLP-4 et-5) (Cartwright *et al.*, 2002a, Choy *et al.*, 2000), HIPEC65 (Pavan *et al.*, 2003), RSVT2 et RSVT2-C (Khoo *et al.*, 1998), TCL-1 (Lewis *et al.*, 1996), SPA-26 (Logan *et al.*, 1992), TEV-1 (Feng *et al.*, 2005) et Swan71 (Aplin *et al.*, 2006) (**Fig. 12C**). Même si le processus d'immortalisation apporte une solution pour l'étude de la fonction placentaire, ces lignées souffrent de plusieurs inconvénients ; à savoir la perte de certaines caractéristiques phénotypiques propres à la souche parentale et une instabilité dans le temps. Par exemple, il a été démontré récemment que les cellules SGHLP et HIPEC65 perdent leur capacité de migration à travers une matrice extracellulaire reconstituée (Matrigel) et entrent dans une phase de sénescence cellulaire après un certain nombre de passages (> 25 passages) (Bilban *et al.*, 2010). Par ailleurs, il a été démontré qu'aucune des lignées trophoblastiques extravilleuses immortalisées testées, n'expriment les molécules HLA de classe 1 remettant en cause la pertinence de l'utilisation de ces cellules comme modèle d'étude du trophoblaste extravilleux (Apps *et al.*, 2009). Enfin, et contrairement aux primocultures, une régulation négative de la cytokératine 7 et une induction de la vimentine ont été remarquées dans toutes les lignées cellulaires du trophoblaste. Toutes ces observations suggèrent que la procédure de sélection a artificiellement converti les primocultures d'un phénotype épithélial métastable à un phénotype fibroblastoïde (Knofler *et al.*, 2010).

En général, toutes les cellules citées précédemment se comportent de façon semblable. Toutefois, quelques études ont démontré que leur réponse à certains stimuli présente des caractéristiques propres à chacune. Par exemple, les cellules fusigéniques BeWo sont largement utilisées dans les études de la fusion trophoblastique (syncytialisation cellulaire), alors que les cellules non fusigéniques JEG-3 et JAR sont utilisées pour leur comportement invasif (Bahn *et al.*, 1981, Graham *et al.*, 1993). Ces caractéristiques doivent être prises en considération au moment de choisir le modèle cellulaire le mieux adapté aux objectifs d'étude.

Primocultures de trophoblaste extravilleux

Les primoculture de cytotrophoblastes extravilleuses sont obtenues après une digestion séquentielle des villosités ancrées du premier trimestre (**Fig. 12A**). Ces cellules sont récupérées grâce à un gradient de Percoll avant d'être cultivées sur des matrices de laminine, fibronectine ou de collagène (Burrows *et al.*, 1993, Handschuh *et al.*, 2006, Tarrade *et al.*, 2001). La pureté de

ces cytotrophoblastes est confirmée par l'analyse de l'expression de certains marqueurs, entre autres, la cytokératine 7 (CK7), le CD9 et l'HLA-G dont la co-expression est la signature cellulaire du cytotrophoblaste extravilleux (Vettraino *et al.*, 1996).

Outre les analyses de lignées cellulaires, les mécanismes moléculaires contrôlant l'invasion du trophoblaste devraient également être étudiés dans des modèles appropriés de cellules primaires (primocultures). Cependant, ces études sont entravées par le fait que le nombre de trophoblastes primaires est limité et que les cultures sont souvent contaminées par d'autres types de cellules placentaires telles que les fibroblastes placentaires (Kliman *et al.*, 1986). En outre, ces cellules primaires cessent rapidement la prolifération en culture et donc sont difficiles à transfecter par des protocoles standards (Kliman *et al.*, 1986).

Explants de villosités de placenta de premier trimestre de grossesse

La culture d'explants consiste à obtenir à partir d'une villosité chorale du premier trimestre de grossesse un fragment d'une taille de 1 à 2 mm³ (**Fig. 12B**). Ce fragment est soit incubé quelques heures dans des milieux physiologiques ou dans des milieux de culture, soit mis en culture sur une matrice de Matrigel de collagène de type I ou au contact d'un fragment de décidue. La culture d'explants sur une matrice extracellulaire est viable pendant une dizaine de jours et reproduit le phénotype des villosités ancrées. Des cellules de type épithélial apparaissent à l'extrémité de la villosité et expriment les marqueurs des cytotrophoblastes extravilleux décrits *in situ* telles que HLA-G et intégrines $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha 1\beta 1$ (Aplin *et al.*, 1999, Pollheimer *et al.*, 2006, Vicovac *et al.*, 1995). Ce modèle apporte l'avantage de pouvoir étudier le comportement des cytotrophoblastes extravilleux dans un environnement proche de celui existant *in vivo*. Les explants de villosités ne sont pas sans inconvénient. En effet, les résultats inter-placentaires et particulièrement inter-explants montrent souvent des niveaux élevés de variance, exigeant un grand nombre de répliques pour pouvoir obtenir des résultats fiables (Bromberg *et al.*, 1999b). Parfois, le maintien de l'architecture tissulaire peut compliquer les résultats obtenus puisque les activités des différents types cellulaires ne peuvent pas être identifiées individuellement (Bromberg *et al.*, 1999b). Enfin, ce modèle ne permet pas par exemple d'étudier séparément les différentes composantes de la fonction invasive, à savoir l'adhésion, la prolifération et la migration / invasion.

Dans cette thèse, nous avons utilisées les cellules du choriocarcinome humain JEG-3 et BeWo pour les études de la prolifération du trophoblaste. Les cellules JEG-3, HTR-8/SVneo et les primocultures du trophoblaste extravilleux du premier trimestre ont été utilisées pour étudier le processus de migration et d'invasion trophoblastique.

II.3) Régulation de l'invasion du trophoblaste extravilleux

II.3.1) Métalloprotéinases matricielles (MMPs)

Les MMPs constituent une famille d'endopeptidases impliquées dans les processus cellulaires nécessaires au développement et dans le remodelage tissulaire via la dégradation protéolytique de nombreuses protéines de la MEC. Elles sont associées à différentes pathologies telles que l'arthrite rhumatoïde, les maladies cardiovasculaires et dans le développement tumoral. Dans ce chapitre, nous allons faire un aperçu sur les MMPs en général, leur régulation et leur mode d'action. Par la suite, nous allons aborder le rôle et la régulation de l'expression et l'activité des MMPs dans le processus d'invasion trophoblastique.

Classification et structure

Les MMPs sont impliquées dans la dégradation protéolytique de nombreuses protéines de la MEC mais aussi de protéines non matricielles. Elles peuvent dégrader les composants de la matrice extracellulaire, les facteurs de croissance et les protéases. Ce clivage de la protéine en peptides ou en acides aminés, se fait soit au niveau de sites spécifiques, soit à l'une ou l'autre des extrémités de la chaîne protéique faisant passer ces protéines d'une forme latente non active à une forme active (Page-McCaw *et al.*, 2007).

Selon la spécificité de leur substrat et leur structure, la famille des MMPs compte à ce jour 24 membres classés en 5 sous-familles : les collagénases, les gélatinases, les stromélysines, les matrilysines et les MMPs de type membranaires (MT-MMPs) (**Fig. 13A**). Il faut noter que la spécificité des MMPs pour leurs substrats n'est qu'apparente puisqu'elles peuvent dégrader des substrats différents et présentent des fonctions redondantes les amenant *de facto* à dégrader l'ensemble des composants de la MEC. Pour être actif, ces enzymes nécessitent la présence d'ions comme le calcium ou le zinc. En leur absence, les métalloprotéases sont produites mais restent en état de latence (pour revue, voir Chakraborti *et al.*, 2003, Yan *et al.*, 2007). La structure primaire des MMPs comporte trois domaines : i) pré-domaine, ii) pro-domaine et iii)

domaine catalytique. Le pré-domaine, au niveau N-terminal, est un peptide signal nécessaire à la sécrétion des MMPs. Le pro-domaine maintient l'activité enzymatique sous forme latente et est classiquement constitué d'une séquence peptidique comprenant un résidu cystéine qui interagit avec l'atome de zinc au niveau du domaine catalytique (**Fig. 13B**). L'activation des MMPs, qui consiste au passage d'une configuration latente ou zymogène à un état d'activation, nécessite l'élimination ou la modification du pro-domaine. Ce dernier subit un clivage protéolytique, libérant ainsi l'atome de zinc du résidu cystéine et entraînant l'activation du domaine catalytique qui peut alors se lier à son substrat (Page-McCaw *et al.*, 2007). En plus des domaines cités ci-dessus, la plupart des MMPs possèdent un domaine riche en proline et un domaine C-terminal contenant une séquence homologue à l'hémopexine ou la vitronectine. Ce dernier domaine contribue à la reconnaissance du substrat par les MMPs. Certaines MMPs présentent des particularités de structure et donc de fonction. Par exemple les MMP-2 et MMP-9 disposent à l'intérieur de leur domaine catalytique un domaine dont la séquence est similaire à celle de la fibronectine de type II. Il semblerait que ce dernier domaine contribue à la forte affinité de la MMP-2 et MMP-9 pour la gélatine et le collagène.

A

Structure de base des MMPs

MMP-1 MMP-12
 MMP-3 MMP-13
 MMP-8 MMP-19
 MMP-10 MMP-20
 MMP-11 MMP-27

MMPs liées à la membrane

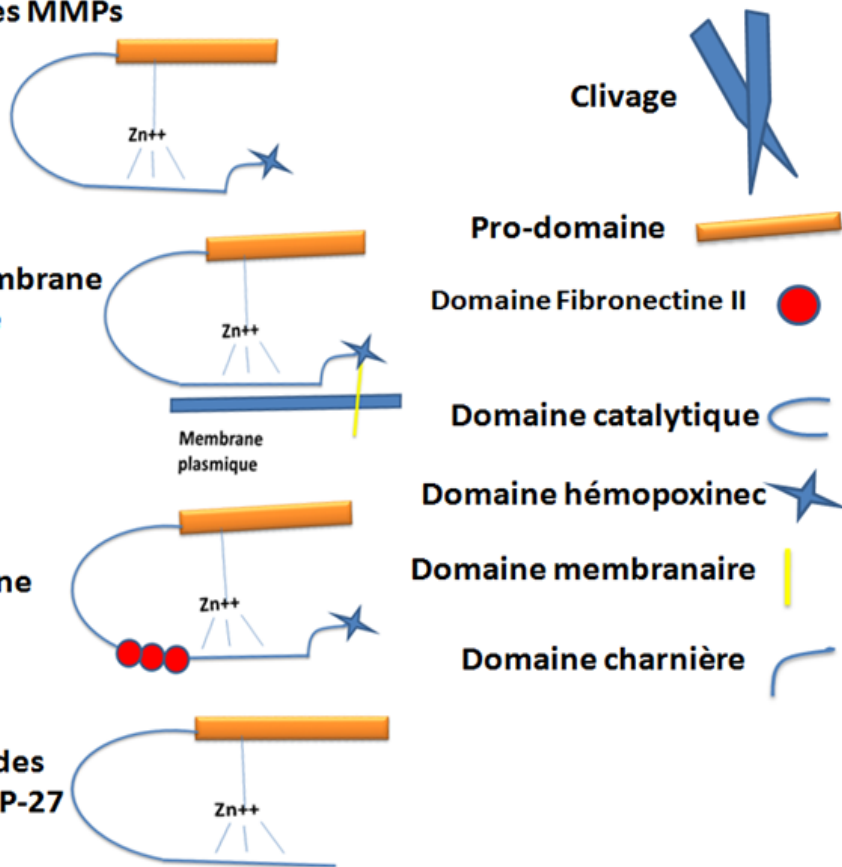
- Transmembranaire
 MMP-14 MMP-15
 MMP-16 MMP-24
 - Ancrée au GPI
 MMP-17 MMP-25
 MMP-23

MMP avec un domaine fibronectine

MMP-2 MMP-9

Domaine minimum des MMPs

MMP-7 MMP-27



B



Figure 13 : Métalloprotéases matricielles (A) Selon la structure des domaines spécifiques, les MMPs peuvent être constituées, simplement, d'un pro-peptide et un domaine catalytique (MMP-7 et MMP-26). L'addition d'un segment de liaison ou d'une région charnière à l'extrémité C-terminale du domaine catalytique permet de relier ce dernier au domaine hémopexine (MMP-1, MMP-3, MMP-8, MMP-11, MMP-12, MMP-13, MMP-18, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-27, et de la MMP-28). Ces domaines supplémentaires sont importants dans la reconnaissance du substrat et pour la liaison des MMPs. D'autres MMPs sont caractérisées par la présence d'un domaine de fibronectine de type II (MMP-2 et MMP-9), une région transmembranaire et une courte queue cytoplasmique (MMP-14, MMP-15, MMP-16, et MMP-24), ou ancré à la membrane par le *glycosyl phosphatidylinositol* (GPI) (MMP-17 et MMP-25). (B) Activation par clivage du pro-domaine. Toutes les MMPs caractérisées sont synthétisées sous une forme inactive. Pour devenir active et acquérir une activité protéolytique, les MMPs subissent un clivage du pro-domaine et de la liaison intramoléculaire Zn^{2+} -cystéine.

Régulation des MMPs

Compte tenu du rôle que jouent les MMPs dans plusieurs processus biologiques tels que l'invasion cellulaire, le remodelage tissulaire et la cicatrisation, la régulation de leur activité est primordiale pour éviter toute protéolyse excessive et un dommage des tissus. La machinerie permettant la régulation des MMPs comporte plusieurs niveaux de régulation que ce soit au niveau de l'expression, la sécrétion et la localisation. La régulation des MMPs peut se faire aussi au par modulation de leur activité (pour revue, voir Sternlicht *et al.*, 2001)..

L'invasion trophoblastique constitue un modèle unique qui permet de comprendre la régulation des MMPs. Bien que la cellule trophoblastique adopte un profil néoplasique. Ce profil n'est que transitoire (pendant le premier trimestre de la grossesse) et son pouvoir invasif est limité à l'endomètre (premier tiers proximal du myomètre). Cette régulation spatiotemporelle de l'invasion trophoblastique est le résultat d'une action autocrine des facteurs trophoblastiques ainsi qu'une action paracrine de facteurs produits par les tissus utérins maternels (décidue). Plusieurs facteurs régulateurs de l'invasion trophoblastique et produits par le placenta humain ont été répertoriés ; cytokines, hormones, facteurs de croissance et protéines de la matrice extracellulaire. Ces facteurs sont impliqués dans la régulation de l'expression, la sécrétion ou l'activation des MMPs par le biais de deux stratégies : soit en modulant la transcription des gènes à réponse précoce dont les produits vont activer ou réprimer les gènes des MMPs, ou en favorisant l'expression des inhibiteurs des MMPs ; les TIMPs qui vont limiter l'action des MMPs.

Régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle

L'expression des MMPs est normalement faible dans les tissus et est induite lorsque l'homéostasie tissulaire est affectée. Une large variété de facteurs solubles incluant des facteurs de croissance et des cytokines produits par le placenta influent sur l'expression des MMPs et par conséquent sur l'invasion trophoblastique. Il en est de même pour les protéines de la MEC notamment les collagènes (Woessner *et al.*, 1991). De plus, des facteurs non solubles tels que les contacts cellule-cellule et cellule-MEC ainsi que la forme de la cellule modulent l'expression des MMPs (Nagase *et al.*, 1999, Sternlicht *et al.*, 2001, Woessner *et al.*, 1991). Comme tous les gènes, l'analyse des promoteurs des différentes MMPs a mis en évidence la présence de séquences régulatrices capables de fixer plusieurs facteurs de transcription (**Fig. 14**).

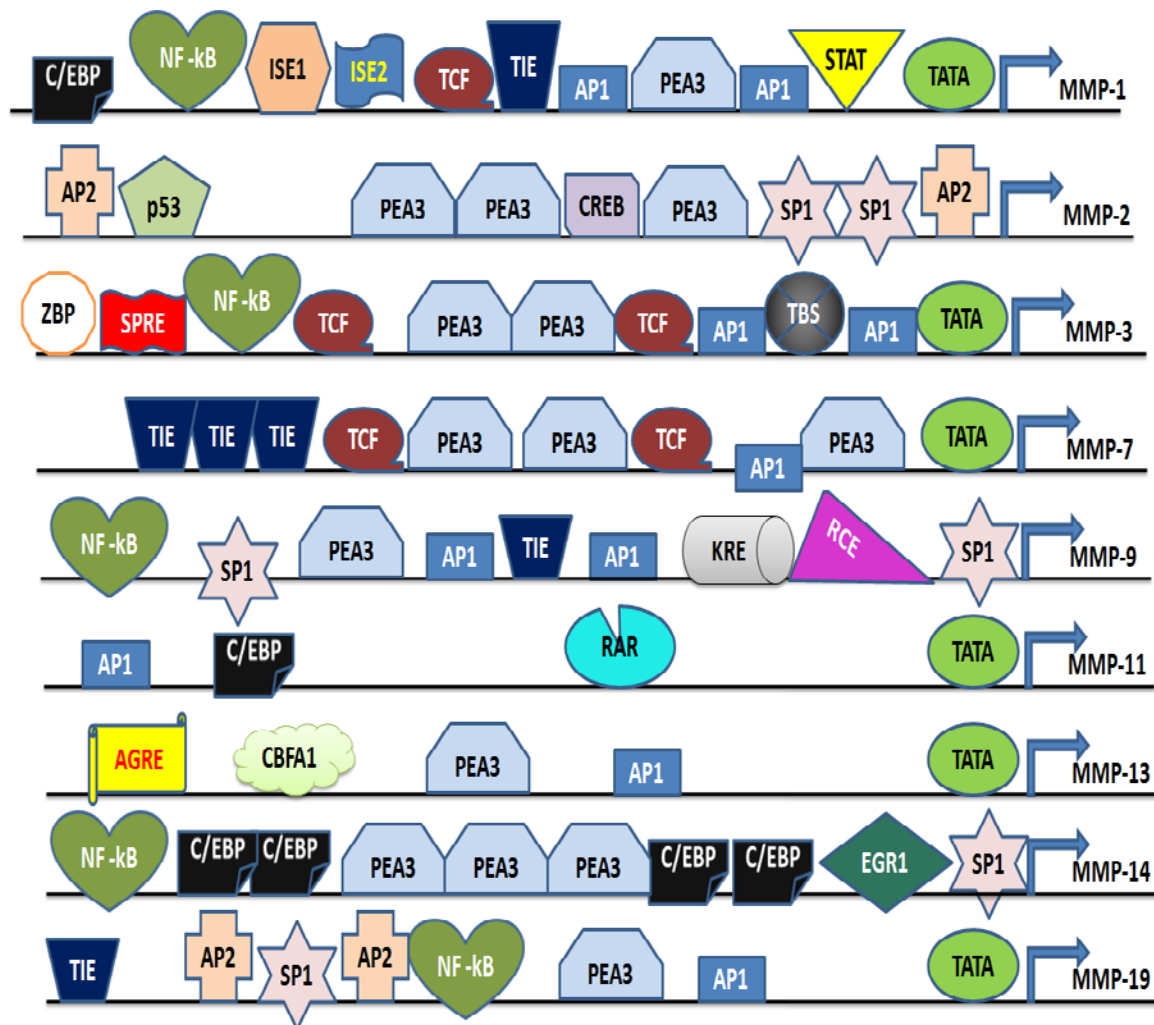


Figure 14 : Séquences régulatrices dans les promoteurs des métalloprotéinase. À partir de la région 3' vers la région 5', on distingue une séquence TATA-box et la région RCE (*retinoblastoma control element*) qui lie une protéine nommée p105 produit de l'oncogène RB1. Ces promoteurs contiennent d'autres éléments cis régulateurs tels que la séquence TRE (*TPA responsive element*), une séquence NIP (capables de lier des protéines nucléaires inhibitrice), TIE (*TGF- β inhibitory element*) et une séquence TRE couplé à PEA3 (*polyoma enhancer protein*) qui lie les produits de l'oncogène c-ets. Les éléments TRE-PEA3 forment le complexe TORU (*TPA and oncogene responsive unit*). Un site SP-1 lie le facteur de transcription nucléaire Sp-1, et un site NFkB lie p50-p65 (produits par la famille d'oncogène c-REL) et la β -caténine. L'expression des gènes des MMPs est comme tous les gènes dont la transcription peut être induite par le promoteur tumoral TPA (ester phorbol), ces gènes possèdent une séquence (TGAG/CTCA) dans la région promotrice, appelée site TRE (pour TPA responsive element). Ce site lie le complexe AP-1 (activator protein-1) qui est un des facteurs de transcription le mieux connu.

Régulation de la sécrétion des MMPs

Les MMPs sont sécrétées par de nombreux types cellulaires tels que les fibroblastes, les neutrophiles, les macrophages, les cellules épithéliales et les cellules endothéliales (Woessner, 1991). Certains types cellulaires tels que les macrophages et les neutrophiles, dont les MMPs sont entreposées dans des granules intracytoplasmiques, sont capables de les libérer par les actions de la plasmine ou de la thrombine (Raza *et al.*, 2000).

Maturation des MMPs

L'activation des MMPs dépend de l'élimination ou de la modification de leur pro-domaine par clivage protéolytique. En général, l'activation des MMPs se fait après leur sécrétion de l'espace extracellulaire et implique plusieurs mécanismes. L'un des principaux activateurs des MMPs est la plasmine produit de la dégradation du plasminogène par le biais de plasminogène de type urokinase (uPA) ou de type tissulaire (tPA) (Carmeliet *et al.*, 1997). La plasmine est connue pour activer plusieurs proMMPs telles que proMMP-1, proMMP-3, proMMP-7, proMMP-9, proMMP-10 et proMMP-13 (Lijnen, 2001). Les MMPs sont capables, elles-mêmes, d'activer d'autres MMPs. De plus, il a été rapporté que d'autres protéases telles que les kallikréines, les cathepsines et les chymases permettent la maturation des MMPs (Eeckhout *et al.*, 1977). Les ROS ont aussi été impliquées dans l'activation des MMPs (Rajagopalan *et al.*, 1996, Weiss *et al.*, 1985). L'activation de la pro-MMP11 (ou pro-stromélysine 3) et la pro-MMP14 (ou MT1-MMP) se fait à l'intérieur de la cellule avant leur sécrétion. Le mécanisme d'activation de ces MMPs fait intervenir une famille de sérine protéases intracellulaires appelées furines qui ont une affinité pour les MMPs contenant une séquence (RRKR) dans leur pro-domaine (Chakraborti *et al.*, 2003, Pei *et al.*, 1995). La régulation de la gélatinase-A (MMP-2) a lieu à la surface de la cellule et implique un complexe de trois protéines : MMP transmembranaire, la MT1-MMP et TIMP-2. La forme inactive de la MMP-2 peut se lier à la fois à la MT1-MMP, ainsi qu'à la TIMP-2 qui agit ici comme une molécule adaptatrice (nous aborderons les TIMPs à la section suivante). La formation de ce complexe à trois partenaires au niveau de la surface cellulaire permet à la MT1-MMP de couper le peptide N-terminal de la pro-MMP-2 et d'activer ainsi la protéase (Strongin *et al.*, 1995). L'activation de la MMP-2 ne se fait pas exclusivement par le biais de la MT1-MMP puisque d'autres MT-MMPs (à l'exception de MT4-MMP) sont également capables d'activer MMP-2. Cependant la protéolyse par la MT1-

MMP reste prédominante (Chakraborti *et al.*, 2003, English *et al.*, 2000). Les MMPs sont rapidement inactivées suite à une association physique avec des protéines inhibitrices ; les TIMPs. Ces dernières vont se fixer directement au niveau du domaine catalytique empêchant l'accès au substrat.

Protéines inhibitrices des MMPs (TIMPs)

In vivo, les MMPs sont spécifiquement inhibées par les TIMPs dans un ratio stoechiométrique de 1:1 (Gomez *et al.*, 1997). Quatre TIMPs ont été identifiées TIMP-1, -2, -3 et -4. Ces protéines sont synthétisées par plusieurs types cellulaires tels que les cellules épithéliales, les fibroblastes, les ostéoblastes, les chondrocytes et les cellules cancéreuses. Les TIMPs sont des protéines de petits poids moléculaires (21 à 29 kDa). Le domaine N-terminal des TIMPs joue un rôle important dans l'action inhibitrice des MMPs. En liant le domaine catalytique des MMPs, la partie N-terminal des TIMPs agit comme un substrat des MMPs et bloque l'accès à la poche contenant l'atome de zinc. Les TIMPs sont des protéines secrétées à l'exception de la TIMP-3 qui peut se retrouver à la surface cellulaire liée à des protéines de la membrane plasmique ou à des protéines de la MEC comme les glycosaminoglycanes sulfatées (Leco *et al.*, 1994). Les TIMPs sont capables d'inhiber toutes les MMPs, à l'exception de la TIMP-1 qui serait incapable d'inhiber la MT1-MMP (Will *et al.*, 1996). Les TIMPs inhibent également d'autres types de protéases. Par exemple, TIMP-3 inactive les protéases de types ADAMs (ADAM-17 (TACE), ADAM-10, ADAM-12 et les agrécanases (ADAMTS-4 et ADAMTS-5)) (Amour *et al.*, 2000, Amour *et al.*, 1998, Kashiwagi *et al.*, 2001, Loechel *et al.*, 2000). L'activité des MMPs et le degré de la réponse cellulaire qu'elles induisent est le résultat d'un équilibre entre leur activation et leur inhibition. De l'équilibre de cette balance va dépendre l'homéostasie du renouvellement de la MEC et le remodelage tissulaire. Si la balance penche du côté des MMPs, nous aurons une protéolyse excessive de la MEC, alors qu'une déficience dans le remodelage tissulaire résultera en une sur-activation des TIMPs.

II.3.2) Rôle des MMPs et des TIMPs dans l'invasion du trophoblaste extravilleux

Le pouvoir invasif du trophoblaste extravilleux va dépendre de trois facteurs : sa capacité (1) à se lier, (2) à dégrader et (3) à migrer à travers les protéines de la MEC. Au cours de la migration, le trophoblaste extravilleux exprime sur sa surface des récepteurs aux protéines de la MEC, alors que pendant l'invasion de la MEC, il sécrète les MMPs. Vue l'importance de ces

protéases dans le processus d'invasion cellulaire en général, le contrôle de leur activité est d'autant plus importante dans l'invasion trophoblastique. La décidue maternelle secrète des TIMPs qui assurent un système MMPs/TIMPs en équilibre et l'implantation du trophoblaste extravilleux dans les tissus utérins. Onze MMPs (MMP-1, -2, -3, -7, -9, -10, -13, -26, -28, MT1-MMP et MT2-MMP) et quatre TIMPs (TIMP-1 à 4) ont été identifiés dans le placenta humain. Le trophoblaste extravilleux produit une grande quantité de gélatinases de type IV (MMP-9 et MMP-2) responsable de la dégradation du collagène type IV (Huppertz *et al.*, 1998, Polette *et al.*, 1994), de la fibronectine, la lamine, l'élastine, l'entactine, les protéoglycanes et la gélatine (protéines de la matrice extracellulaire ou de la lame basale) (Woessner *et al.*, 1991). Il produit également la MMP-1 (collagénase interstitielle) qui dégrade le collagène type I, II et III abondants dans l'endomètre et la MMP-7 (matrilysine) (Huppertz *et al.*, 1998a; Vettraino *et al.*, 1996) et les MT-MMP-1 et -2 capable de convertir la pro-MMP-2 en sa forme active (Bjorn *et al.*, 2000, Hurskainen *et al.*, 1998).

L'étude de l'expression de ces MMPs montre une régulation spatio-temporelle spécifique pour le trophoblaste extravilleux avec une prédominance de l'expression des MMP-9 et MMP-2 au niveau de l'interface fœto-maternelle pendant les étapes précoces de grossesses. En effet, ces deux MMPs sont exprimées spécifiquement par le trophoblaste extravilleux pendant le premier (6 à 8 semaines d'aménorrhée) et le début du deuxième trimestre de la grossesse et une corrélation positive avec le pouvoir invasive du trophoblaste extravilleux a été observée (Isaka *et al.*, 2003, Onogi *et al.*, 2011). Cependant, certaines études ont rapporté que la MMP-2 est exprimée d'une façon constitutive dans le trophoblaste extravilleux, bien que son activité soit complètement absente dans le placenta humain de troisième trimestre et à terme (Isaka *et al.*, 2003). En outre, une expression aberrante de MMP-2 est impliquée dans des anomalies de grossesse telles que le retard de croissance intra-utérin et la prééclampsie (Merchant *et al.*, 2004a, Merchant *et al.*, 2004b, Myers *et al.*, 2005). Au fur et à mesure que la grossesse progresse, l'expression par le trophoblaste de la pro-MMP-3 et la MMP-13 actif et la MMP-23 est diminuée, tandis que les pro-formes de MMP-8, MMP-19 et MMP-23, des formes actives de MMP-9, MMP-10, MMP-12, MMP-15, MMP-16, MMP-26, et MMP-28 et les deux formes proactives de la MMP-14 sont augmentées (Anacker *et al.*, 2011). L'expression différentielle de certaines MMP a également été démontrée avant et après le travail (Tsatas *et al.*, 1999). Par exemple, l'expression de la MMP-13 se trouve subitement et fortement augmentées au cours du

post-partum, alors que cette MMP n'est pas présente ni au cours de la grossesse ni même quelques heures avant la parturition (Shum *et al.*, 2002). L'expression de la MMP-13 est induite suite à l'activation du récepteur 5-HT_{2A} par la sérotonine via un mécanisme impliquant la PLC, les PKCs et l'activation de la voie ERK1/2 (Shum *et al.*, 2002).

Comme mentionné dans le chapitre précédent, l'activité des MMPs dans un tissu donné est le résultat de l'expression du gène de cette MMP, de la traduction de son transcrit et de l'action des différents régulateurs de l'activité des MMPs; principalement les TIMPs. Ces derniers exercent leurs effets, soit directement par la liaison aux MMPs, soit indirectement par l'activation de facteurs de transcription nucléaires qui contrôlent l'expression des gènes des MMPs. Ainsi, une invasion appropriée des tissus utérins maternels par le trophoblaste nécessite une synergie fonctionnelle entre les MMPs et les TIMPs. À ce titre, l'invasion trophoblastique peut être augmentée soit en régulant à la hausse l'expression des MMPs ou par une régulation négative de l'expression de leur inhibiteur TIMPs (Moore *et al.*, 2012). Typiquement, les TIMPs inhibent les MMPs, une fois qu'elles sont actives, par une liaison directe au site de fixation du zinc, hautement conservée parmi les MMPs. La TIMP-1 est connue pour inhiber préférentiellement la MMP-9, alors que la MMP-2 est préférentiellement inhibée par la TIMP-2 (Dilly *et al.*, 2010). *In vitro*, les TIMP-1 et -2 inhibent complètement l'invasion du trophoblaste extravilleux (Librach *et al.*, 1991b). Dans certains cas, les MMPs forment des complexes avec les TIMPs alors qu'elles sont encore dans leur forme latente. Par exemple, le complexe de pro-MMP-2 et le TIMP-2 sert à promouvoir l'activation de la pro-MMP-2 à la surface de la cellule par une MMP membranaire; la MMP-14 (Nishida *et al.*, 2008). Une diminution de l'expression de TIMP-2 conduit à une réduction de la formation du complexe MMP-2/TIMP-2/MMP-14 et une inhibition de l'invasion trophoblastique (Onogi *et al.*, 2011). L'analyse par reverse transcriptase suivie d'une réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR) a détecté l'expression des transcrits de l'ensemble des quatre TIMPs dans le cytotrophoblaste de premier trimestre ainsi que dans les cellules du stroma et de l'endomètre utérin (Anacker *et al.*, 2011). Cependant, les études fonctionnelles ont démontré que seules les métalloprotéinases (MMP-1, -2, -7 et -9) et les inhibiteurs des métalloprotéases (TIMP-1 et -2) sont impliqués dans le processus d'invasion trophoblastique.

Dans le chapitre suivant, nous allons nous intéresser à la régulation du système MMPs/TIMPs par les différentes hormones et les facteurs de croissance endogènes produits par le placenta lors du processus d'invasion trophoblastique.

II.3.3) Régulation de l'expression des MMPs et TIMPs dans l'invasion du trophoblaste extravilleux

L'invasion du trophoblaste dans le premier trimestre est contrôlée à la fois temporellement et spatialement. Cela semble être médiée à la fois selon un mode autocrine par des facteurs trophoblastiques et selon un mode paracrine par des facteurs de l'utérus. Un certain nombre de facteurs, tels que les cytokines, les chimiokines, les facteurs de croissance, les hormones et la concentration en oxygène, régulent la synthèse et l'activation et/ou la sécrétion de MMPs et des TIMP à l'interface materno-fœtal, (Bischof *et al.*, 2000a, Bischof *et al.*, 2000b) (tableau 3).

Système activateur tissulaire du plasminogène (uPA)

Le système activateur du plasminogène de type urokinase (uPA), qui comprend l'uPA, le récepteur uPA (uPAR) et les deux principaux inhibiteurs uPA (PAI- 1 et PAI- 2), a un large spectre de substrats et est impliqué principalement dans le remodelage tissulaire. En se liant à uPAR présent à la surface des cellules, le pro-uPA, via un mécanisme impliquant un pouvoir redox et une activation de la voie ERK1/2, est clivé en uPA, qui à son tour se lie au plasminogène et le convertit en protéase active, la plasmine (Kim *et al.*, 2010). La plasmine agit à la fois directement comme une enzyme protéolytique pour divers composants de la matrice extracellulaire et indirectement en transformant les pro-MMPs en MMPs actives. Le PAI-1 inhibe l'activation du plasminogène en plasmine, et empêche la conversion des pro-MMP en MMPs actives en se liant directement au complexe uPA/uPAR (**Fig. 15**). L'uPA et son récepteur uPAR sont exprimés par les cellules trophoblastiques et semblent favoriser la protéolyse locale de la matrice lorsque le processus d'invasion trophoblastique commence. Cette activité est stimulée par les MMPs et inhibée par PAI-1, tous deux produits localement (Hu *et al.*, 1999, Martinez-Hernandez *et al.*, 2011). Des souris déficientes en PAI-1 présentent une réduction à la fois de la vascularisation de l'interface fœto-maternelle et une augmentation du nombre de cellules du trophoblaste (Labied *et al.*, 2011). Une altération de l'expression du PAI-1 a également été rapporté chez les patients ayant une perte récurrente de grossesse, la prééclampsie précoce, et le syndrome de HELLP (hémolyse, enzymes hépatiques élevées, faible numération plaquettaire) (Sartori *et al.*, 2008, Teng *et al.*, 2009, Wikstrom *et al.*, 2009). L'expression et l'activité de uPA régulent l'invasion trophoblastique via un mécanisme moléculaire impliquant

l'activation de la kinase mTOR, (Mammalian target of rapamycin) un membre de la famille des PI3-K et la phosphorylation de la protéine STAT3 sur son résidu sérine (Busch *et al.*, 2009).

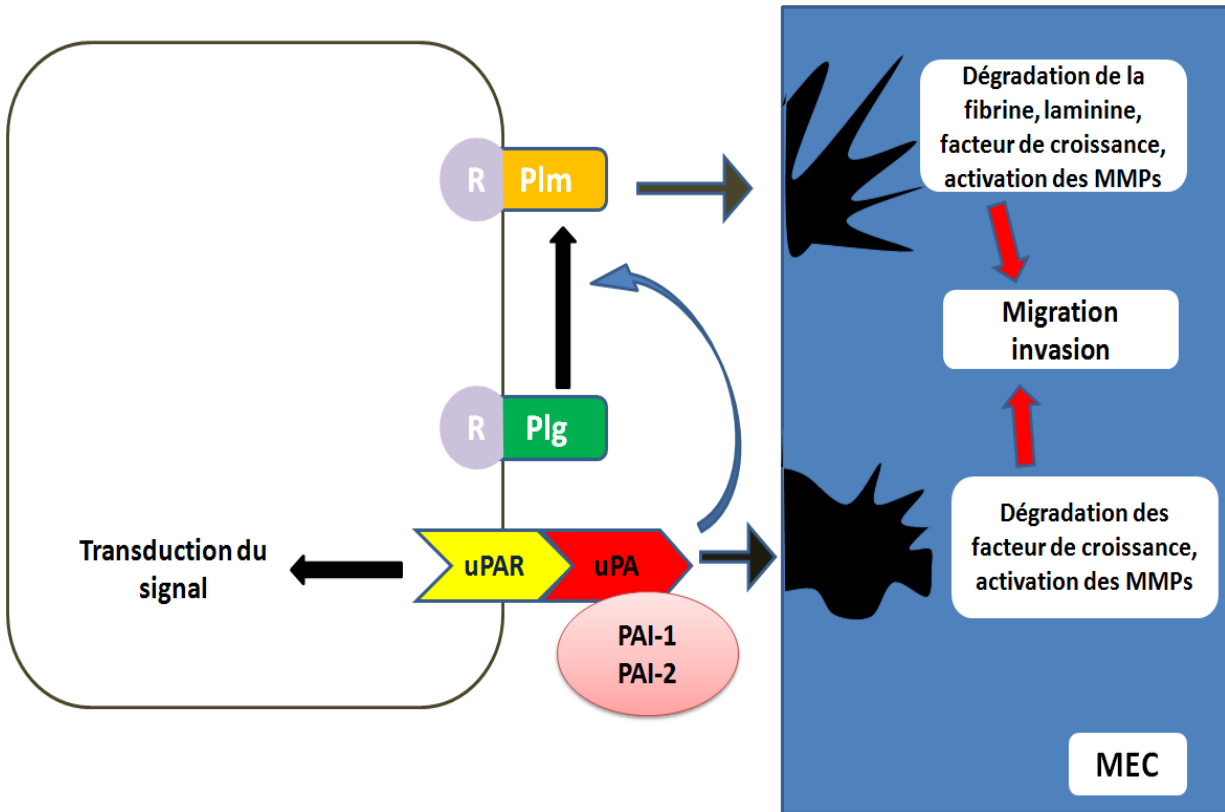


Figure 15 : Mode d'action et effecteurs du système uPA. Le système uPA est un système enzymatique extracellulaire surexprimé dans plusieurs types de tumeurs solides très agressives. Le système uPA est formé de uPA et de son récepteur uPAR et des inhibiteurs spécifiques PAI-1 et-2. La liaison du uPA à son récepteur (uPAR) provoque la conversion du plasminogène (Plg) en plasmine (Plm), qui à son tour, stimule plusieurs processus cellulaires incluant la dégradation des protéines de la MEC. Cette dégradation va permettre aux cellules tumorales d'envahir les tissus adjacents et de se retrouver dans la circulation sanguine. Par ailleurs, uPA et le plasminogène activent également des enzymes protéolytiques, qui de concert avec le système uPA, induisent les processus d'invasion tumoral.

Composantes de la matrice extracellulaire (MEC)

Kliman et Feinberg ont été les premiers à démontrer de manière élégante le rôle de la MEC dans le comportement invasif des cellules trophoblastiques *in vitro*. Les cytotrophoblastes mis en contact avec la MEC reconstituée (matrigel) répondent différemment selon l'épaisseur de la MEC. Pour une épaisseur du matrigel entre 1 et 4 microns, les cytotrophoblastes adhèrent, s'agrègent et forment un syncytium, alors que pour une épaisseur entre 4 et 14 microns, les

cytotrophoblastes demeurent ronds, s'agrègent et envahissent le matrigel. Pour une épaisseur de la matrice du matrigel au delà de 14 microns, les cytotrophoblastes restent des cellules mononucléaires sans capacité d'invasion de la matrice (Kliman *et al.*, 1990). Toutefois, le mécanisme à l'origine de ces réponses cellulaires différentes des cytotrophoblastes reste à élucider.

Les protéines composantes de la MEC influencent le pouvoir invasif des cytotrophoblastes en modulant l'équilibre entre la production des MMPs et de leurs inhibiteurs, les TIMPs. Les cytotrophoblastes du premier trimestre de grossesse mis en contact avec la fibronectine, la vitronectine et la laminine sécrètent beaucoup plus de MMP-9 et de TIMP-1 que les cytotrophoblastes cultivés sur le collagène. En revanche, l'expression de MMP-2 et de TIMP-2 par les cytotrophoblastes reste inchangée quelque soit le substrat constituant la matrice (Xu *et al.*, 2001b).

Hormones placentaires

La progestérone et la hCG à l'interface fœto-maternelle jouent un rôle clé dans la régulation de l'invasion trophoblastique dans la décidue. La progestérone inhibe l'invasion du cytotrophoblaste extravilleux via l'inhibition au niveau transcriptionnel de l'expression de la MMP-9. Cette inhibition maximale dans le cytotrophoblaste du premier trimestre est caractérisée par un pic de production de la progestérone (Shimonovitz *et al.*, 1994). Bien que le gène de la MMP-9 ne possède pas d'élément de réponse aux hormones stéroïdiennes, la progestérone synthétisée semble exercer son effet par l'intermédiaire des récepteurs PR (récepteurs de la progestérone). En outre, l'anti-progestin, un antagoniste sélectif des PRs, bloque l'effet de la progestérone et restaure à la fois l'invasion trophoblastique et l'expression de la MMP-9 (Shimonovitz *et al.*, 1998).

Le rôle de la hCG dans l'invasion trophoblastique *in vitro* demeure controversé. L'équipe de Yagel a montré que la hCG inhibe l'invasion du trophoblaste extravilleux de premier trimestre en bloquant l'activation de la pro-MMP-9 via l'inhibition de protéases, dont l'uPA (Milwidsky *et al.*, 1993, Yagel *et al.*, 1993). À l'opposé, Zygmunt et ses collaborateurs ont observé que la hCG augmente de manière significative l'activité des MMPs et l'invasion des cellules JEG-3 (Zygmunt *et al.*, 1998b). Cette contradiction dans le rôle de la hCG peut être expliquée par la différence entre les types de cellules utilisés pour les deux études (primoculture vs. lignée). Des

études cliniques ont démontré une corrélation positive entre les taux plasmatiques de hCG et le degré d'invasion trophoblastique dans les grossesses extra-utérines. Dans ce type de grossesses caractérisées par une invasion trophoblastique excessive (au-delà du tiers proximal du myomètre), le dosage de la hCG a démontré des taux plasmatiques maternels très élevés (Klein *et al.*, 1995, Oktay *et al.*, 1994). Dans les cellules du trophoblaste extravilleux de premier trimestre, la hCG stimule l'invasion via une induction de la production de MMP-9 et MMP-2 et une diminution des TIMP-1, -2 et -3 (Fluhr *et al.*, 2008).

L'hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires appelée aussi gonadolibérine (GnRH) est capable de réguler MMP-2, MMP-9, TIMP-1 et le système de protéase uPA/PAI dans les cellules du trophoblaste pendant la placentation. À cet égard, l'isoforme GnRH-II semble être plus puissant que le GnRH-I (Rosario *et al.*, 2008). Les deux isoformes GnRH-I et-II exercent leurs effets sur l'invasion du trophoblaste par activation des voies de signalisation la PKC/ERK1/2 et c-Jun N-terminal kinase (Rosario *et al.*, 2008).

Facteurs de croissance et cytokines

L'effet des cytokines et des facteurs de croissance sur la placentation a largement été étudié. Dans ce chapitre, nous allons nous limiter aux effets des cytokines et des facteurs de croissances produits par le trophoblaste et par l'endomètre.

Les cytokines influencent la sécrétion et/ou l'activité des MMPs. En général, les cytokines pro-inflammatoires interleukine (IL)-1, -6, -11 et -15 stimulent les MMPs et favorisent l'invasion alors que la cytokine anti-inflammatoire IL-10 est inhibitrice (Librach *et al.*, 1994, Zygmunt *et al.*, 1998, Roth *et al.*, 1999, Fitzgerald *et al.*, 2005). L'IL-1 favorise la différenciation trophoblastique vers la voie invasive. La découverte du rôle de cette cytokine dans l'invasion trophoblastique a été démontrée chez la souris. L'administration d'un antagoniste du récepteur à l'IL-1 (IL-1R α) à une souris pendant la période préimplantatoire réduit considérablement le nombre d'embryons implantés (Simon *et al.*, 1994). Chez l'humain, l'IL-1 est produite par les cellules stromales décidualisées ou pseudo décidualisées et les IL-1R α sont exprimées par les cellules stromales et le trophoblaste extravilleux (mais pas le trophoblaste villeux). Il a été démontré que l'IL-1 stimule l'invasion et l'activité de la MMP-9 dans les primocultures de trophoblaste extravilleux (Librach *et al.*, 1994, Meisser *et al.*, 1999b). L'IL-6 est une cytokine exprimée pendant la phase d'implantation dans l'endomètre et dans le cytotrophoblaste du

premier trimestre. Cette cytokine induit l'activité de la MMP-9 et la MMP-2 mais pas leur synthèse (Meisser *et al.*, 1999a). Le mécanisme par lequel l'IL-6 induit la MMP-9 et la MMP-2 semble indirect puisqu'il implique la stimulation de la leptine (Meisser *et al.*, 1999a). Le placenta est également une importante source d'IL-15 et d'IL-10. Ces cytokines sont produites par le trophoblaste et sont considérées comme des régulateurs autocrines. L'IL-10 diminue l'activité de la MMP-9 et l'invasion trophoblastique alors que l'IL-15 stimule la migration et l'invasion et la production de la MMP-1 sans toutefois modifier la MMP-2 et la MMP-9 (Roth *et al.*, 1999, Zygmunt *et al.*, 1998a).

Le TNF- α exerce une action soit inhibitrice soit activatrice du processus invasif du trophoblaste extravilleux *in vitro*. Par contre la concordance entre le pouvoir invasif du TNF- α et l'activité des protéases reste mal comprise. En effet, le TNF- α inhibe la migration du cytotrophoblaste extravilleux d'explants placentaires bien qu'il stimule l'expression de MMP-9 (Bauer *et al.*, 2004). En fait, la régulation négative du TNF- α sur l'invasion serait le résultat d'un équilibre entre MMP-9 et l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI) puisque le TNF- α stimule également la sécrétion du PAI dans le cytotrophoblaste extravilleux (Bauer *et al.*, 2004). Un effet pro-invasif du TNF- α sur les cytotrophoblastes villeux via la stimulation de la synthèse et l'activité de la MMP-9 (mais pas la MMP-2) a également été montré. Le mécanisme moléculaire à l'origine de cet effet du TNF- α implique l'activation concomitante des facteurs de transcription AP-1 and NF- κ B (Cohen *et al.*, 2006).

Le LIF (facteur inhibiteur de la leucémie) est une cytokine importante dans la régulation de l'invasion trophoblastique. Son rôle a été au départ découvert chez les souris invalidées pour le gène LIF (LIF^{-/-}) qui montrent une absence d'implantation (Aghajanova *et al.*, 2004). *In vitro*, le LIF inhibe l'activité des MMPs dans les cytotrophoblastes extravilleux qui expriment les récepteurs des laminines, mais pas dans ceux exprimant les récepteurs des fibronectines (Bischof *et al.*, 1995a). L'effet du LIF sur l'invasion trophoblastique reste spécifique du modèle comme du contexte cellulaire. Le LIF induit l'invasion des cellules HTR-8/SVneo par un mécanisme impliquant l'augmentation de la production des prostaglandines E2 (PGE2) et l'expression de leurs récepteurs (Horita *et al.*, 2007). Dans les cellules JEG-3, le LIF régule positivement la prolifération et le pouvoir invasif via la diminution de l'expression de TIMP-1 et l'augmentation de l'expression de la caspase-4 (Fitzgerald *et al.*, 2005b). La TIMP-1 inhibe MMP-9 alors que la

caspase-4 (connue également sous le nom de *IL-1 converting enzyme*) est responsable du clivage de la pro-IL-1 en IL-1 β bioactive, indispensable au processus d'implantation (Goldberg *et al.*, 1992, Kamens *et al.*, 1995, Librach *et al.*, 1991). L'activation de STAT3 par le LIF a aussi été associée, dans le trophoblaste extravilleux, à l'augmentation de l'expression de TIMP-1, sans aucun effet sur la sécrétion de MMP-2 et de MMP-9 (Tapia *et al.*, 2008).

Le TGF- β , l'EGF et l'IGFBP-1 (*Insulin-like growth factor-binding protein 1*) sont les principaux facteurs de croissance produits par les cellules déciduales maternelles. *In vitro*, le TGF- β 1 exerce un effet anti-invasif sur le trophoblaste extravilleux par divers mécanismes dont certains impliquent les MMPs et les TIMPs. L'effet anti-invasif du TGF- β 1 est médié majoritairement par l'inhibition de la MMP-9 via un mécanisme impliquant à la fois la synthèse de TIMP-1 (inhibiteur préférentiel de la MMP-9) et de TIMP-2 et la production de glycoprotéines de la MEC par les cytotrophoblastes (Karmakar *et al.*, 2002). De plus, en inhibant la production de l'uPA et en augmentant celle de PAI-1, TGF- β 1 bloque l'activation de MMP-9 indépendamment des TIMPs (Zhao *et al.*, 2006). En revanche, l'effet anti-invasif, de TGF- β 1 sur les cellules HTR-8/SVneo est associé à une augmentation de l'expression de MMP-2, mais non de son activité (Graham *et al.*, 1993). Il est intéressant de noter que la réponse des cellules trophoblastiques (primoculture et HTR-8/SVneo) au TGF- β 1 est différente de celle des lignées de choriocarcinome placentaire (JAR et JEG-3). La résistance des lignées de choriocarcinomes placentaires aux effets antiprolifératifs et anti-invasifs du TGF- β 1 est le résultat d'une sous expression de TIMP-1 et de PAI-1 (Graham *et al.*, 1994).

Dans les cellules cytotrophoblastiques, l'EGF produit par les cellules déciduales stimule la synthèse et l'activation de MMP-9 et de MMP-2. L'EGF, comme d'autres facteurs de croissance VEGF, FGF-4 (*fibroblast growth factor-4*) et FGF-10, stimule également l'activité de uPA et de PAI-1 dans le trophoblaste (Anteby *et al.*, 2004). Les effets et le type d'effecteur relayant le signal initié par l'EGF est spécifique du type cellulaire. Dans les cellules HTR-8/SVneo, l'EGF augmente l'expression de MMP-9 (mais pas MMP-2) et de TIMP-1 par un mécanisme impliquant les voies de signalisation PI3K/Akt et ERK1/2 (Qiu *et al.*, 2004b), alors que dans les lignées JAR et les primocultures de trophoblaste extravilleux, ce facteur de croissance stimule l'expression de MMP-9 et MMP-2 via l'AMPc (Staun-Ram *et al.*, 2004). Un effet stimulateur d'IGFB-1 sur l'invasion des cellules trophoblastiques impliquant une augmentation de la sécrétion de TIMP-1 et l'activité gélatinolytique de MMPs autres que MMP-2 et MMP-9

(Bischof *et al.*, 1998) a été démontré. L'IGFB-1 stimule la migration et l'invasion des cellules trophoblastiques via un mécanisme impliquant la liaison du domaine RGD (Arg-Gly-Asp) de l'IGFB-1 aux chaînes $\alpha 5\beta 1$ des intégrines (Irving *et al.*, 1995) et l'activation des protéines FAK (*Focal adhesion kinase*) et ERK1/2 (Gleeson *et al.*, 2001).

Un nouveau facteur de croissance produit par le placenta a été décrit; l'EG-VEGF (*endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor*) (Lecouter *et al.*, 2004). L'expression de ce facteur se limite au syncytium et atteint des taux élevés durant le premier trimestre de grossesse (Hoffmann *et al.*, 2006). Sur le plan fonctionnel, l'EG-VEGF est considéré comme un facteur anti-invasif. Des résultats *in vitro* ont démontré ses effets sur la migration et l'invasion d'explants de premier trimestre et la lignée HTR-8/SVneo cultivée sur des matrices reconstituées. Le pouvoir anti-invasif de l'EG-VEGF est associé à une baisse drastique de sécrétion et d'activité de MMP-9 et MMP-2 (Hoffmann *et al.*, 2009).

La placentation (prolifération et invasion) du cytotrophoblaste extravilleux est donc un processus complexe contrôlé par plusieurs régulateurs autocrines ou paracrines décrits ci-dessus. Ces derniers exercent leur effets récepteurs-dépendants en activant diverses voies de signalisation qui conduisent à l'expression et/ou à l'activation des facteurs de transcription (STAT3, fos, jun, NF- κ B, AP-1, Sp-1...) et leur fixation sur des éléments de réponse de la région promotrice des gènes. L'instauration d'un équilibre entre la production des MMPs et des TIMPs semble être primordiale pour une placentation réussie.

Rôle de l'oxygène

Le trophoblaste extravilleux invasif joue un rôle important dans l'implantation du fœtus dans la décidue maternelle et dans le maintien de la grossesse. Le trophoblaste extravilleux envahit les parois des artères spiralées utérines qui deviennent des vaisseaux atones (sans tonus). Le remodelage de ces artères assure un approvisionnement en sang maternel, exigé durant le deuxième et troisième trimestre de la grossesse, indépendamment de la vasoconstriction des artères maternelles (Zhou *et al.*, 1997b). Au début de la grossesse, les trophoblastes extravilleux invasifs forment des bouchons trophoblastiques qui obstruent les artères spiralées et empêchent le sang de la mère d'entrer dans l'espace intervilloux, créant ainsi un environnement hypoxique physiologique (Burton *et al.*, 2009, Burton *et al.*, 2011, Hustin *et al.*, 1987). De 8 à 10 semaines de gestation, la pression partielle d'oxygène dans le placenta (17,9 mm Hg) est significativement

plus faible que l'endomètre (39,6 mm Hg) (Rodesch *et al.*, 1992). De telles conditions favorables au développement de l'embryon le protègent du stress oxydatif lié à l'oxygène hautement tératogène (Burton, 2009). En outre, de 12 à 13 semaines de gestation, le relâchement des bouchons trophoblastiques fait augmenter la pression en oxygène intraplacentaire qui atteint un niveau comparable à celui de l'endomètre (Jauniaux *et al.*, 2001, Rodesch *et al.*, 1992). Vers la fin du premier trimestre les bouchons trophoblastiques se résorbent progressivement exposant le placenta à la circulation sanguine maternelle (Jaffe *et al.*, 1993, Jauniaux *et al.*, 1992, Rodesch *et al.*, 1992, Jauniaux *et al.*, 1992). Bien qu'il y ait tout un ensemble d'éléments démontrant le rôle du bouchon trophoblastique dans l'instauration d'un environnement pauvre en oxygène dans lequel baigne le trophoblaste au cours du premier trimestre, d'autres faits expérimentaux viennent contredire ce constat. Des études ont montré que les bouchons trophoblastiques ne sont pas capables de contenir l'écoulement du sang maternel vers l'espace intervilloux au-delà de 6 semaines de gestation. Par ailleurs, une autre étude montre que la majorité des artères spiralées ne sont pas obstruées et que le flux de sang maternel vers la chambre intervillieuse survient tôt dans le premier trimestre (Kurjak *et al.*, 1993a, Kurjak *et al.*, 1993b, Meekins *et al.*, 1997). Ces contradictions nous poussent à s'interroger sur le rôle de la pression en oxygène dans l'invasion du trophoblaste du premier trimestre. En d'autres termes, le processus de différenciation invasive du trophoblaste du premier trimestre serait-il favorisé par un environnement enrichi en oxygène ou plutôt par des conditions d'hypoxie ? Cette question semble légitime d'autant plus que les résultats semblent contradictoires. Des études suggèrent que l'hypoxie peut induire la différenciation du trophoblaste extravilloux vers un phénotype invasif via un mécanisme impliquant une augmentation de l'expression de l'uPA. En effet, Graham et ses collaborateurs ont démontré que les capacités invasives des cellules trophoblastiques HTR-8/SVneo cultivées dans un environnement hypoxique (1% d'oxygène) sont nettement plus fortes que celles des cellules HTR-8/SVneo cultivées dans des conditions de 20% d'oxygène. Ces cellules cultivées en hypoxie montrent une régulation positive des récepteurs uPA et une augmentation de l'activité de MMP-9 (Choi *et al.*, 2012, Graham *et al.*, 1998). En revanche, des études ont démontré que des cytotrophoblastes isolés au premier trimestre de la grossesse cultivés en condition d'hypoxie (2% d'oxygène) n'expriment pas l'intégrine $\alpha 1\beta 1$, un marqueur de l'acquisition du phénotype invasif et perdent leur capacité invasive associée à une diminution de l'activité de la MMP-2 (Crocker *et al.*, 2003, Genbacev *et al.*, 1996, Genbacev *et al.*, 1997). Ces études suggèrent que le

trophoblaste primaire extravilleux nécessite des tensions élevées d'oxygène apporté par le sang maternel dans l'espace intervilloux afin de s'engager dans la voie de la différenciation invasive.

Tableau 3 : Hormones et cytokines présentes au niveau de l'interface fœto-maternelle et leurs effets sur les capacités prolifératifs, migratoires et invasives des cellules trophoblastiques humaines, et sur les voies de transduction du signal.

Cytokines et hormones	Invasion	Prolifération	Migration	Transduction du signal	Réponse cellulaire
EGF (Epithelial growth factor)	↑	↑	↑	PI3K	Migration
CSF-1 (colony stimulating factor)	—	↑	?	?	?
VEGF (Vasoendothelial growth factor)	↑ (↑MMP)	↑	↓	MAPK (JEG3)	Invasion
PIGF (Placental growth factor)	↓	↑	↓	MAPK	Vasculogénèse
IGF-2 (Insulin-like growth factor-2)	↑	—	↑	MAPK	Migration
TGF-β (transforming growth factor- β)	↓ ↓MMP-9	↓	↓	Smad3 RhoA	?
Décorine	↓ (↓MMP-9)	↓	↓	Trophoblaste ? Cellules endothéliales PKB	?
IGF-1 (Insulin growth factor-1)	↑	↑		?	?
GM-CSF (granulocyte macrophage-colony stimulating factor)	↑	↑	?	PKC (JEG-3, JAR)	Production d'IFN-γ ovin
HGF (Hepatocyte growth factor)	↑	↑	↑	MAPK, PI3K	Motilité
LIF (Leukemia-inhibitory factor)	↑	↑	?	gp130, STAT3	Invasion, prolifération
TNF-α (Tumor necrosis factor-α)	↓ (↑PAI-1)	↓	↓	NF-κB (evCTB, HTR-8/SVneo)	prostaglandine production
Leptine	↑ (souris), ↑(MMP↑)	↑(JAR)	?	Stat (Oocyte murin), MAPK JAR et BeWo	maturation, Prolifération

IL-10	↓	?	?	?	?
IL-6	↑	↑	?	Trophoblastes ? Lymphocytes gp130	?
IL-1 β	↑	–	↑	Trophoblaste ? MAPK, NF- κ B (décidue du babouin)	?
Adiponectine	↑(HIPEC) ↑MMP-9, ↑MMP-2, ↓TIMP-1 et 2	↓ (BeWo et JEG-3)	?	MAPK BeWo JEG-3	Prolifération MAPK

↑ : stimulation ; ↓ : inhibition ; – : pas d'effet ; effet non déterminé.

II.4) Voies de signalisation impliquées dans l'invasion du trophoblaste extravilleux

Voie FAK (Focal adhesion kinase)

FAK est une famille de kinases d'adhérence focale correspondant à des protéines tyrosine kinases (PTK) cytoplasmiques riches en proline, dépourvues de récepteur membranaire. Cette famille se compose de deux membres: Pyk2 (*proline-rich tyrosine kinase 2*) et FAK (*focal adhesion kinase*) (pour revue, voir Avraham *et al.*, 2000). Elles sont localisées préférentiellement près des intégrines au niveau des complexes d'adhérence (ou d'adhérences focales) et ont été impliquées dans le contrôle de plusieurs processus cellulaires comme la migration et la survie. Parmi les autres protéines de ces complexes d'adhérence, on retrouve les protéines du cytosquelette telles que l'actine, la paxilline, la taline et des protéines participant au remaniement du cytosquelette telles que la PI3K et la protéine de 130 kDa associée à Crk (P130CAS) (**Fig. 16**).

FAK a été retrouvée dans de nombreuses lignées cellulaires ainsi que dans la plupart des tissus étudiés. Elle est notamment exprimée sur toutes les lignées hématopoïétiques en dehors de la lignée érythroïde (Kume *et al.*, 1997). Les fibroblastes invalidés pour ce gène (FAK^{-/-}) perdent leur capacité de motilité. FAK est surexprimée dans différentes lignées cancéreuses (Nakagawa *et al.*, 1998, Weisberg *et al.*, 1997). FAK est une protéine de 125 kDa divisée en trois domaines, un domaine amino-terminal et un domaine carboxy-terminal délimitant un domaine central

portant l'activité catalytique (**Fig. 16**) (Schaller *et al.*, 1992). La région FAT (*focal adhesion targeting*), située dans le domaine carboxy-terminal, est nécessaire pour la localisation dans le complexe d'adhérence par l'intermédiaire de liaisons avec la taline et la paxilline. La taline, médiateur de l'activation de FAK par les intégrines, permet l'interaction avec le réseau de filaments d'actine nécessaire pour l'activation de FAK. Le domaine amino-terminal est impliqué dans les interactions avec les domaines cytoplasmiques des récepteurs transmembranaires (Schaller *et al.*, 1992).

La protéine FAK activée subit une phosphorylation en cascade de résidus tyrosine. C'est d'abord l'autophosphorylation du résidu tyrosine 397 (Y397) qui est le témoin de son activation (Schaller *et al.*, 1994). Ce résidu est important dans l'activité enzymatique de FAK puisqu'une mutation au niveau de ce résidu provoque l'incapacité pour FAK d'avoir une activité biologique. Cette phosphorylation libère un site de liaison de forte affinité pour des protéines contenant un domaine SH2. Les kinases de la famille Src, Fyn et c-Src, vont être recrutées et activées sur ce site. Elles vont phosphoryler d'autres résidus tyrosine dans le domaine catalytique (Y407, Y576 et Y577) ainsi que dans la région carboxy-terminale (Y861 et Y925). Les phosphorylations des tyrosines Y576 et Y577 par c-Src augmentent l'activité enzymatique de FAK et permettent la création de nouveaux sites de liaison pour d'autres effecteurs (Calalb *et al.*, 1995, Eide *et al.*, 1995). L'activation de FAK et de c-Src est donc le point central du signal de transduction. Si l'autophosphorylation du résidu Y397 est reconnue comme le témoin de l'activation de FAK, il a été décrit dans les cellules épithéliales que FAK pouvait être sous forme phosphorylée à l'état basal mais avec une répartition intracellulaire diffuse et non plus focale, sous-membranaire. Si l'activation de FAK est généralement liée aux intégrines, il existe d'autres modèles où son activation est réalisée par d'autres mécanismes. Par exemple, dans les plaquettes sanguines, son activation est indépendante des intégrines et nécessite une régulation par les flux intracellulaires du calcium et l'activation des PKCs (Achison *et al.*, 2001).

L'invasion du cytotrophoblaste extravilleux est caractérisée par un changement progressif dans le répertoire des intégrines membranaires (*Integrin switch*). À ce titre, l'expression de FAK et de sa forme phosphorylée sur le résidu Y397 est abondante dans le cytotrophoblaste interstitiel durant les premières semaines de grossesse et diminue par la suite. Dans le cytoplasme de ces cellules, FAK et sa forme active Y397 co-localisent avec d'autres marqueurs exprimés par les cytotrophoblastes extravilleux comme la MMP-2 et la chaîne $\alpha 5$ des intégrines (Ilic *et al.*, 2001,

MacPhee *et al.*, 2001). *In vitro*, la diminution de l'expression de FAK en transfectant des cytotrophoblastes extravilleux par un adénovirus portant une forme anti-sens de FAK réduit de façon significative la croissance et l'invasion (Ilic *et al.*, 2001, MacPhee *et al.*, 2001). Le rôle de FAK a été également montré dans les lignées HTR-8/SVneo. Le traitement de cette lignée par l'IGFBP-1 induit la migration et l'invasion via la phosphorylation de FAK sur son résidu Y397 (Gleeson *et al.*, 2001). De la même manière, la stimulation des cellules trophoblastiques avec de l'IGF-1 entraîne la phosphorylation de FAK et sa co-localisation avec la paxilline et la vinculine au niveau des complexes d'adhérence et un réarrangement des microfilaments d'actine (Kabir-Salmani *et al.*, 2002).

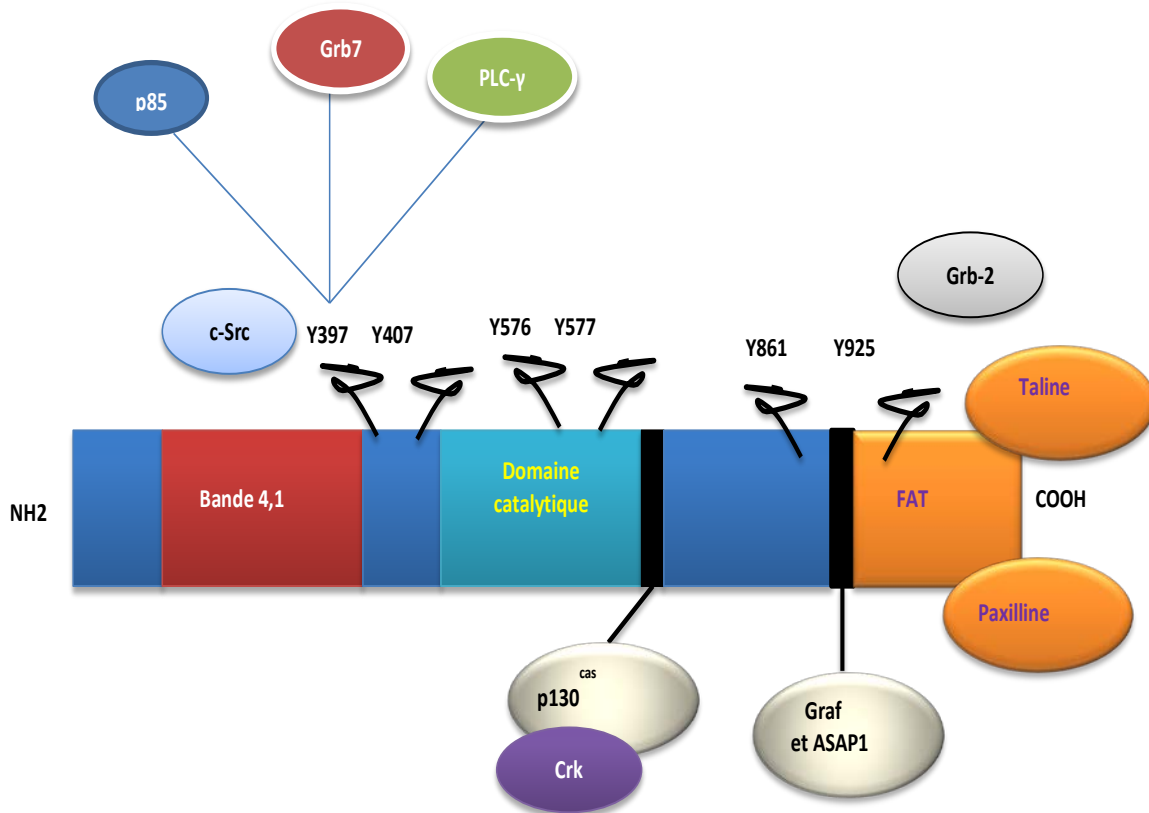


Figure 16 : La protéine FAK (Focal adhesion kinase) d'après Schaller *et al.*, 1992). FAK est divisée en trois domaines, un domaine amino-terminal et un domaine carboxy-terminal délimitant un domaine central portant l'activité catalytique. La région FAT (*focal adhesion targeting*), située dans le domaine carboxy-terminal est nécessaire pour la localisation dans le complexe d'adhérence par l'intermédiaire de liaisons avec la taline et la paxilline. FAK possède de nombreux résidus tyrosines de phosphorylations impliquées soit dans la modulation de l'activité de FAK soit constituant des sites pour le recrutement des kinases effectrices de la voie de transduction du signal.

Voie des petites protéines G (GTPases)

La famille Rho des petites protéines G apparentées à Ras compte plus d'une dizaine de membres dont Rho (A, B, C), Rac (1,2) et Cdc42 (Fukata *et al.*, 2003). Ces protéines fonctionnent comme des interrupteurs moléculaires de la signalisation intracellulaire : elles existent sous deux conformations, la forme active liée au GTP et la forme inactive liée au GDP. La forme inactive interagit avec des facteurs d'échange (GEFs) qui déplacent le GDP et permettent la fixation du GTP (Fukata *et al.*, 2003). La forme active stimule des protéines effectrices dont plusieurs Ser/Thr kinases telles que ROCK ou PKN pour RhoA et PAK pour Rac et Cdc42. Le cycle se termine par l'hydrolyse du GTP, stimulée par les protéines GAP (**Fig. 17**) (Jaffe *et al.*, 2005). Les protéines Rho régulent l'organisation du cytosquelette d'actine et contrôlent la formation de fibres de stress ancrées au niveau de la plaque d'adhésion (Rho), ainsi que les mouvements de la membrane cellulaire et la migration cellulaire (Rac et Cdc42) (pour revue, voir (Matozaki *et al.*, 2000, Takai *et al.*, 1995, Van Aelst *et al.*, 1997)). L'activation des protéines Rho induit la contractilité des filaments d'actine et participe à l'activation de FAK en favorisant l'assemblage des complexes d'adhérence. En retour, FAK va inhiber Rho via un rétrocontrôle négatif, ce qui va aboutir à un remodelage de la structure des complexes d'adhérence. Ces données suggèrent que FAK règle le *turn-over* de l'adhérence focale en modulant l'activité de Rho (Schaller *et al.*, 2001). FAK, via le complexe FAK-src, régule également l'activité de Rho par la modulation de la liaison et de la phosphorylation des GAPs et Rho-GEFs (Schlaepfer *et al.*, 2004, Tomar *et al.*, 2009). Les Rho permettent l'assemblage des filaments d'acto-myosine par deux groupes d'effecteurs : les ROCK et les Dia (Hall *et al.*, 2005). Les kinases dépendent des Rho (ROCK sont des serine/thréonine kinases) et jouent un rôle dans la formation des fibres de stress et des points focaux d'adhésion dépendant de RhoA. Deux isoformes ont été identifiées : ROCKI (ou ROK β) et ROCKII (ou ROK α) (Nakagawa *et al.*, 1996). Dans le placenta humain, la cascade de signalisation Rho-ROCK est impliquée dans la migration trophoblastique. Des études *in situ* ont détecté une immunoréactivité de ROCK dans le cytotrophoblaste extravilleux et dans le syncytium, alors que Rho A est exprimé exclusivement dans le cytotrophoblaste extravilleux (Shiokawa *et al.*, 2002). L'interruption de la voie Rho-ROCK, Rho, Rac1, CDC42 et ROCK inhibe la migration trophoblastique induite par PGE2 et IGF-II (Shiokawa *et al.*, 2002). De la même manière, l'inhibition sélective pharmacologique des activités des protéines Rho et ROCK dans des fragments d'explants issus de placenta de premier trimestre réduit drastiquement la

migration des cellules du trophoblaste extravilleux cultivées sur une matrice de fibronectine (Shiokawa *et al.*, 2002).

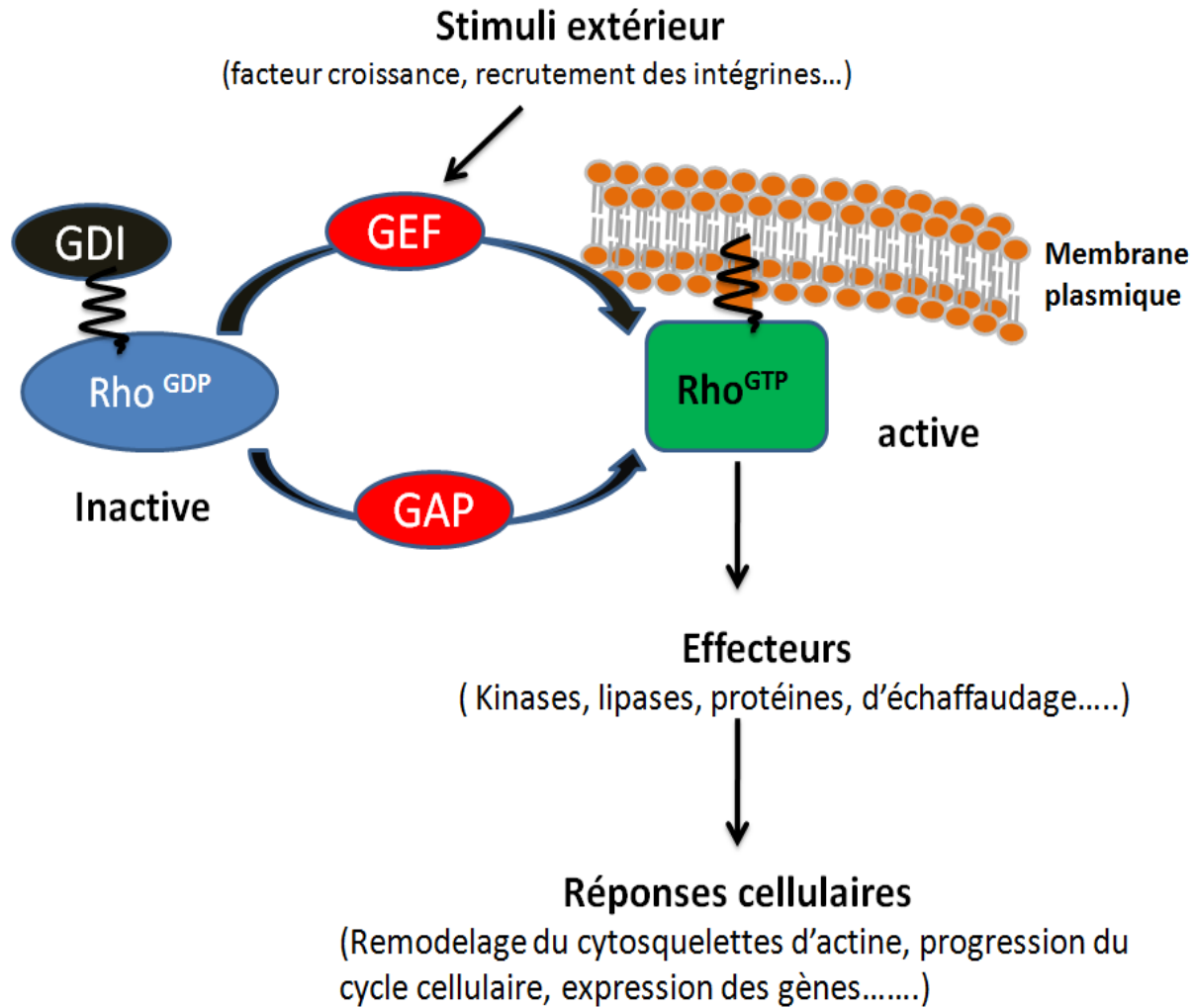


Figure 17 : La régulation des protéines GTPase Rho. Le cycle des GTPase Rho, un état actif (lié au GTP) et un état inactif (lié au GDP). Dans un état de repos, les GDIs séquestrent les GTPases-GDP dans le cytoplasme. L'interaction des GTPases avec les GEFs va provoquer le déplacement du GDP, permettre la fixation du GTP et par conséquent la translocation des protéines Rho au niveau de la membrane plasmique. Les GTPases-GTP (actives) vont activer une panoplie d'effecteurs dont l'activité va moduler plusieurs réponses biologiques. La plupart des protéines Rho possèdent une capacité intrinsèque d'hydrolyse du GTP en GDP à travers les protéines GAPs. GEF: Guanine nucleotide Exchange Factor, GAP: GTPase Activating Protein, GDI: Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor.

Voie phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)

La voie de signalisation PI3K-AKT est impliquée dans une variété de processus cellulaires, y compris la croissance cellulaire, la prolifération, la migration et la survie (Manning *et al.*, 2007). La PI3K est un hétérodimère composé de deux sous-unités, une sous-unité catalytique (P110, PIK3CA) dotée d'une activité lipide kinase, et une sous-unité régulatrice (p85, PIK/R1) dotée d'un domaine SH2. L'activation des récepteurs (RTK ou RCPG) a pour conséquence le recrutement/activation au niveau de la membrane cellulaire des sous-unités p85 et p110 de la PI3K, respectivement (**Fig. 18**)

PI3K assure la phosphorylation du lipide membranaire phosphatidylinositol-4,5 diphosphate, pour former le phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate. Cette action de PI3K est contrebalancée par une déphosphorylation assurée par la phosphatase PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*). Cette dernière assure la régulation négative de cette voie de signalisation en convertissant la PIP3 en PIP2. Le phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate est reconnu par des protéines possédant un domaine PH (*Pleckstrin-homology domain*) en particulier PDK1 (*phosphoinositide-dependent kinase1*) et AKT (ou protéine kinase B (PKB)). L'une des cibles de la kinase AKT est mTOR (*Mammalian target of rapamycin*) nommée par analogie avec une protéine de levure inhibée par un produit naturel, la rapamycine. Lors de l'activation de mTOR, plusieurs protéines en aval de mTOR sont ciblées comme par exemple le facteur de traduction EIF4E (*Eukaryotic translation initiation factor 4 E*) qui régule la synthèse des protéines et la protéine kinase p70S6K. Cette dernière à son tour est impliquée dans la phosphorylation de la protéine S6 des ribosomes (**Fig. 18**).

L'importance de la voie PI3K dans la migration du trophoblaste extravilleux induite par les facteurs de croissance a été démontrée par diverses équipes. Par exemple, dans les cellules SGHPL-5, l'inhibition de la voie PI3K diminue la motilité cellulaire basale et la motilité induite par le facteur HGF (Cartwright *et al.*, 2002b). Dans les cellules HTR-8/SVneo, EGF induit l'invasion et la migration cellulaire en activant les voies de signalisation MAPK et PI3K (Qiu *et al.*, 2004b). Les deux voies semblent avoir la même importance dans la migration et l'invasion cellulaire puisque l'inhibition de l'une ou de l'autre des voies par des inhibiteurs pharmacologiques renverse l'effet de EGF (Qiu *et al.*, 2004b). Par ailleurs, l'inhibition de mTOR

par la rapamycine entraîne une perte du pouvoir migratoire induit par EGF dans les cellules HTR-8/SVneo (Qiu *et al.*, 2004a).

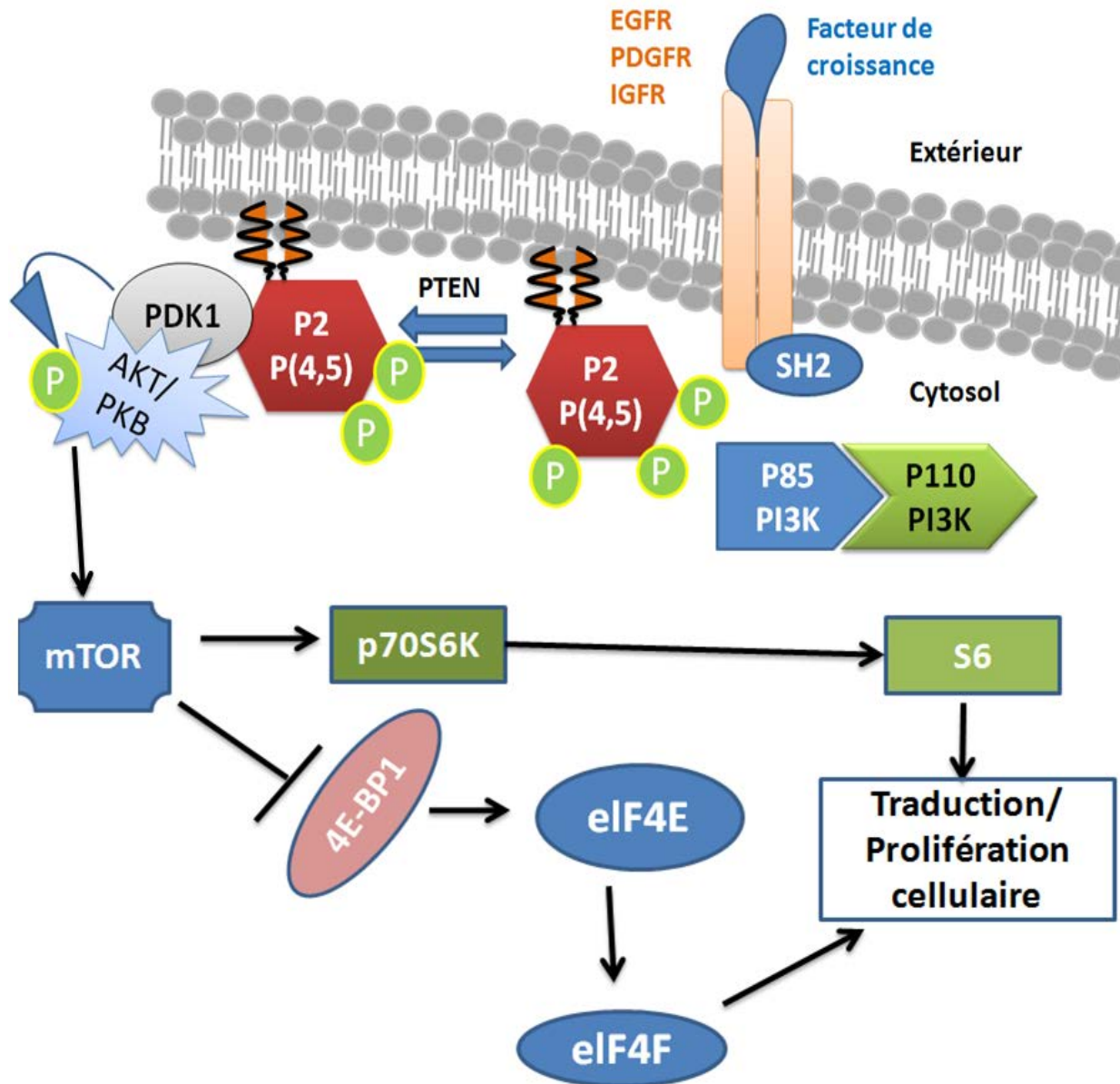


Figure 18 : Description schématique de la voie PI3K. La voie PI3K est activée par la fixation des facteurs de croissances à leur récepteurs tyrosine kinases (EGFR, PDGFR...) et l'activation de la kinase clé PKB (appelée aussi AKT). L'une des cibles de PKB est la kinase mTOR dont l'activation cible le facteur de traduction EIF4E qui peut exercer ses effets sur la synthèse des protéines et la protéine kinase p70S6K et joue ainsi un rôle dans la survie et la prolifération cellulaire.

Voie des facteurs de transcription Smad

Les protéines de la famille Smad sont les effecteurs de la voie de la superfamille du TGF- β (TGF- β , activin, *les protéines morphogénétiques de l'os*) qui contrôle plusieurs fonctions cellulaires telles que la prolifération, la différenciation et la production des protéines de la matrice extracellulaire. Les premières protéines Smad ont été identifiées chez la drosophile : les protéines Mad. Le nom Smad est un condensé entre le gène *mad* de la Drosophile et son homologue *ma* chez *C.elegans*. Chez l'humain, la protéine Smad4 a été la première identifiée (Miyazono *et al.*, 2000).

Les Smads sont divisées en trois catégories qui diffèrent par leur structure et leur fonction (Miyazono *et al.*, 2000). 1) Les R-Smads ; Smad-1, -2, -3, -5 et -8, phosphorylées par le récepteur de type I sur un motif en C-terminal, Ser-X-Ser. 2) La Co-Smad (*Common-partner Smad*), Smad-4, initialement identifiée comme gène suppresseur de tumeur dans les cancers pancréatiques sous le nom de *DPC4*, qui va se lier aux R-Smads phosphorylés afin de les transloquer au noyau et réguler la transcription de gènes cibles. 3) Les I-Smads (*Inhibitory Smad*), Smad-6 et -7 qui inhibent les voies de transduction par compétition avec les R-Smads en se fixant aux récepteurs ou en empêchant la formation du complexe R-Smad/Co-Smad (Wrana *et al.*, 2000). Les sous-types de R-Smads sont dépendants du ligand : Smad-2 et -3 sont les effecteurs du TGF- β , de l'activine et de Nodal, alors que Smad-1, -5 et -8 sont les effecteurs des BMPs (*Bone morphogenetic proteins*). Smad-6 inhibe préférentiellement les BMPs alors que Smad-7 inhibe indifféremment les BMPs et le TGF- β (Hata *et al.*, 1998, Kretzschmar *et al.*, 1998, Massague *et al.*, 1998).

À l'état basal, les Smads existent sous la forme de monomère qui naviguent entre le cytoplasme et le noyau (Hill *et al.*, 2009). Une fois activé par le TGF- β , le récepteur de type I phosphoryle les R-Smads. Les R-Smads activées forment des homo- ou hétéro-dimères qui vont recruter Smad-4 pour former une oligomère au niveau du cytoplasme ou du noyau. Une fois dans le noyau, ce complexe se lie aux promoteurs des gènes cibles et active leur transcription (**Fig. 19**). Bien qu'il existe peu de Smads, il y a une très grande diversité de gènes cibles. Cela peut s'expliquer par les nombreux partenaires protéiques recrutés par le complexe R-Smads/Co-Smad au niveau des promoteurs. La régulation de la signalisation du TGF- β peut se faire grâce à des protéines telles que les I-Smads, ou par des modifications post-traductionnelles, telles que la

sumoylation. Smad-7 fait partie des I-Smads, capable d'inhiber la signalisation du TGF- β . Smad-7 peut contrecarrer la signalisation du TGF- β de différentes manières. Elle peut former un complexe avec les récepteurs au TGF- β du groupe I (T β RI), empêchant la phosphorylation des R-Smads ou recruter des protéines de type ubiquitine ligase comme Smurf1 et Smurf2 (**Fig. 19**). En s'associant aux T β R-I phosphorylés, Smad-7 provoque la dégradation du récepteur et sa propre dégradation. Smad-7 joue également un rôle de protéine adaptatrice permettant le recrutement d'autres ubiquitines ligases dégradant aussi bien T β R-I que les R-Smads. Enfin, Smad-7 est impliquée dans de nombreuses voies TGF- β -dépendantes non Smad-dépendantes (Yan *et al.*, 2009).

Le rôle des protéines Smads dans l'invasion du trophoblaste extravilleux a été surtout étudié dans les lignées HTR-8/SVneo et JEG-3. Les cellules HTR-8/SVneo et JEG-3 expriment les Smad-2, -4 et -7 alors que seules les cellules HTR-8/SVneo expriment Smad-3 (Xu *et al.*, 2001a). Smad-3 est phosphorylée et transloquée aux noyaux des cellules HTR-8/SVneo qui voient leur pouvoir invasif inhibé suite au traitement avec du TGF- β . En revanche, l'expression ectopique de Smad-3 dans les lignées de choriocarcinome JAR rend ces cellules réfractaires au traitement par le TGF- β bien qu'elle restaure l'expression de PAI-1 et TIMP-1 (Xu *et al.*, 2001a), ce qui suggère que d'autres mécanismes contribuent à la résistance de ces cellules à l'action anti-invasive de la cytokine TGF- β (Xu *et al.*, 2001a, Xu *et al.*, 2002). La fonctionnalité des protéines Smads (Smad-2 et Smad-4) dans la signalisation dépendante du TGF- β a également été analysée dans les cellules JEG-3. En utilisant des constructions contenant un gène rapporteur codant pour la luciférase sous le contrôle de séquence inductible par le TGF- β , Wu a démontré que l'expression de Smad-2 et -4 stimule l'activité transcriptionnelle du TGF- β 1, alors que l'expression de Smad-7 inhibe cette activité (Wu *et al.*, 2001).

Voie Wingless (Wnt)

Les protéines de la famille Wingless (Wnt), au nombre de 19 chez les mammifères, sont des glycoprotéines agissant localement, par liaison à des corécepteurs membranaires de la famille Frizzled (Fz) et LRP (*Low density lipoprotein Receptor-related Protein*) présents à la surface des cellules cibles. Ces signaux Wnt extracellulaires activent plusieurs cascades de transduction de signaux intracellulaires : i) la voie dite « canonique », la plus étudiée, régulant l'activité transcriptionnelle de gènes cibles via la β -caténine et ii) des voies « non-canoniques »,

indépendantes de la β -caténine, incluant la voie Wnt/PCP (*Planar Cell Polarity*) et la voie Wnt/ Ca^{2+} . Il existe un pool cytoplasmique de β -caténine dont la concentration, la localisation et l'activité sont modulées par l'état d'activation de la voie Wnt. En l'absence de signal Wnt extracellulaire (Fig. 20).

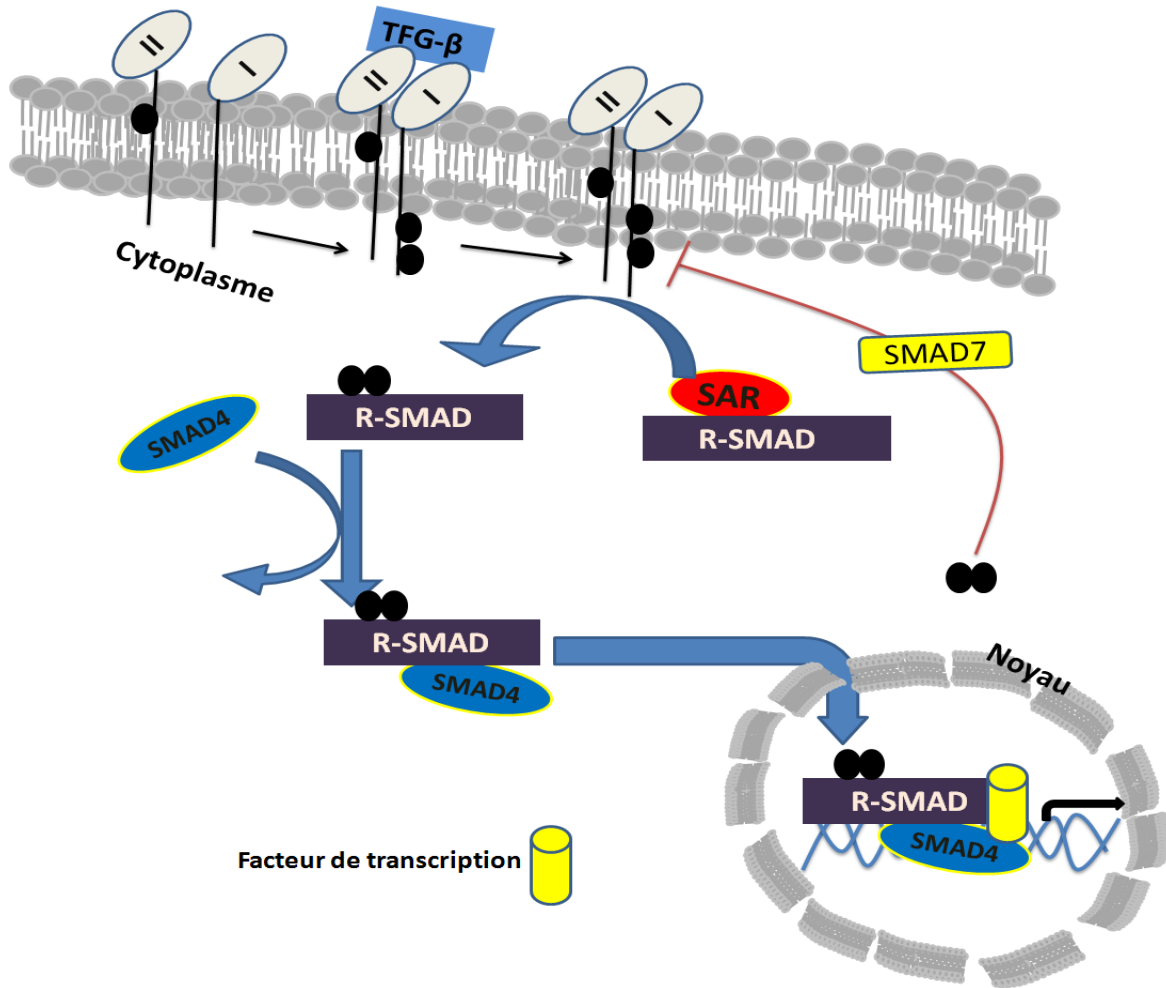


Figure 19 : La voie de signalisation Smads activée par le TGF- β . Après la liaison du ligand TGF- β au récepteur de type II, il s'en suit formation d'un complexe hétérodimère entre le récepteur type II et de type I et phosphorylation de ces derniers. La conséquence de cette phosphorylation est l'activation de l'activité kinase du récepteur de type I et le recrutement et la phosphorylation de Smad 2 ou 3. Ces derniers vont s'associer avec Smad 4 (Co-Smad) et le complexe Co-Smad/R-Smad vers le noyau. La liaison du complexe Smads à l'ADN, avec d'autres facteurs de transcription, stimule ou réprime la transcription de gènes d'intérêt. L'atténuation du signal en réponse au TGF- β se fait par une augmentation de la transcription de Smad 7 qui prévient le recrutement et la phosphorylation des R-Smads (Smad2).

La β -caténine cytoplasmique est recrutée au sein d'un complexe de destruction assemblé autour d'une protéine d'échafaudage, l'axine (*Axis inhibition protein*) (Behrens *et al.*, 1998, Fagotto *et al.*, 1999). Ce complexe comprend, outre l'axine, le suppresseur de tumeur APC (*Adenomatous Polyposis Coli*) ainsi que les sérine-thréonine kinases GSK3 (*Glycogen synthase-3*) et CK1 (*Casein Kinase-1*). Ces deux dernières phosphorylent la β -caténine sur des résidus sérine et thréonine situés dans son domaine N-terminal, provoquant sa reconnaissance par la protéine β -TrCP (*β -Transducin repeat Containing Protein*), l'une des composantes du complexe E3-ubiquitine-ligase. L'ubiquitinylation de la β -caténine par ce complexe a comme conséquence la dégradation rapide par le protéasome et le maintien d'une concentration faible de β -caténine dans le cytosol (Aberle *et al.*, 1997). L'interaction d'un ligand Wnt avec les domaines extracellulaires des co-récepteurs Fz et LRP-5/6 initie la cascade de signalisation dont l'une des étapes est l'inhibition du complexe de destruction de β -caténine. Ce mécanisme a pour conséquence une hypophosphorylation de la β -caténine, laquelle échappe au système de dégradation du protéasome et s'accumule sous forme stable dans le cytoplasme, favorisant sa translocation dans le noyau. La β -caténine nucléaire interagit avec les facteurs de la famille Tcf/Lef (*T-cell-specific transcription factor/Lymphoid enhancer binding factor*) pour réguler la transcription de gènes cibles impliqués dans la régulation de la prolifération et de l'invasion cellulaire tels que cyclin D1, c-myc, MMP-7 et la MT1-MMP (Behrens *et al.*, 1996, Brunner *et al.*, 1997).

L'action de Wnt est soumise à une régulation négative par une variété d'effecteurs qui agissent soit en modulant l'activité des molécules impliquées dans la signalisation intracellulaire du récepteur membranaire de Wnt, soit à l'extérieur de la cellule, en contrôlant la liaison de Wnt avec ce récepteur. Il y a cinq familles d'antagonistes connus de la signalisation Wnt, dont celle des récepteurs solubles (*secreted frizzled-related protein*, sFRP) et celle de Dickkopf (DKK) formée de quatre membres (DKK 1 à 4). Le plus connu de la famille Dickkopf est DKK 1, dont la liaison avec LRP-5 bloque la signalisation de Wnt (pour revue, voir (Ahn *et al.*, 2011)).

L'importance du rôle de la voie de signalisation Wnt/TCF dans le développement placentaire a été mise en évidence dans des modèles murins. Des mutations ou invalidations des gènes Wnt2, Wnt4, Wnt7 et Tcf/Lef sont associées à des défauts de développements placentaires notamment un défaut d'implantation (Monkley *et al.*, 1996, Paria *et al.*, 2001, Parr *et al.*, 2001). Chez l'humain, le placenta exprime 14 des 19 ligands Wnt et 8 des 10 récepteurs FZD. L'étude du profil d'expression des différents membres de la famille Wnt tout au long de la grossesse et dans

le trophoblaste montre une distribution variable en fonction des trimestres de grossesse et du type de trophoblaste étudié (Sonderegger *et al.*, 2007). Ainsi, l'acquisition du phénotype invasif par le trophoblaste extravilleux est le résultat d'une accumulation du TCF dans le compartiment nucléaire (Pollheimer *et al.*, 2006). Le pouvoir invasif du trophoblaste dû à l'activation de la voie Wnt est inhibé par le facteur soluble DKK1 surexprimé par la décidue lors de la phase d'implantation. Cette régulation négative par le DKK1 semble être nécessaire pour contrôler le degré d'invasivité du trophoblaste (Pollheimer *et al.*, 2006).

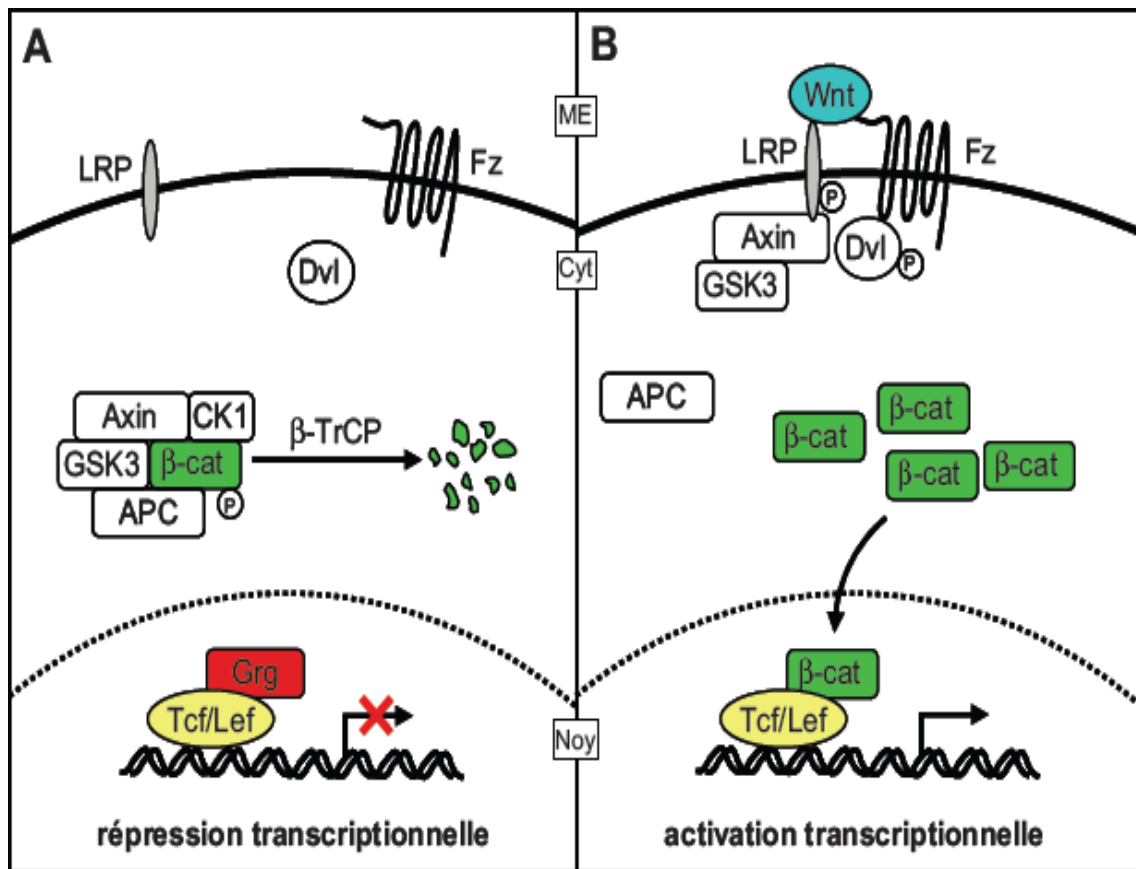


Figure 20 : La voie Wnt canonique ou Wnt/β-caténine, d'après (Aberle *et al.*, 1997). **A**) En l'absence de signal Wnt, la β-caténine est associée à un complexe multiprotéique de destruction composé de l'axine, l'APC et des sérine-thréonine kinases CK1 et GSK3α/β. Ces dernières phosphorylent la β-caténine, laquelle est alors reconnue par un complexe d'ubiquitinylation comprenant β-TrCP. La β-caténine ubiquitinylée est ensuite rapidement dégradée par le protéasome. Dans le noyau, l'interaction des facteurs Tcf/Lef avec des co-répresseurs transcriptionnels, notamment Groucho (Grg), inhibe la transcription des gènes cibles de la voie Wnt. **B**) La liaison du ligand Wnt au complexe de co-récepteurs Frizzled(Fz)/LRP induit la phosphorylation de LRP et le recrutement de l'axine à la membrane cytoplasmique probablement *via* l'activation de Dsh. L'inhibition du complexe de destruction Axine-APC-GSK3 entraîne l'accumulation cytosolique de β-caténine libre et sa translocation au niveau nucléaire. Dans le noyau, la β-caténine déplace Grg pour promouvoir, en partenariat avec les facteurs Tcf/Lef, la transcription des gènes cibles de la voie Wnt. ME, Milieu Extracellulaire ; Cyt, Cytoplasme ; Noy, Noyau.

Voie des MAPKs

Pour la description de la voie de signalisation des MAPKs, il faut se référer à la section I.3.2.1.2. Dans le placenta, le rôle de la protéine ERK1/2 dans l'invasion trophoblastique a été démontré indirectement par l'analyse de l'expression et de l'activation de cette protéine durant les différents trimestres de la grossesse. Plusieurs études suggèrent, indirectement, que la voie ERK1/2 n'est pas impliquée dans la régulation de l'invasion du trophoblaste. Cependant, une étude récente a démontré par immunohistochimie et hybridation *in situ*, l'expression et l'activation de la protéine ERK1/2 dans les cellules du trophoblaste villositaire humain (mais pas dans le syncytiotrophoblaste) durant toute la grossesse (Kita *et al.*, 2003). Par ailleurs, la forme phosphorylée d'ERK1/2 n'est présente que pendant les 12 premières semaines de grossesse correspondant à la période d'implantation du fœtus et l'invasion trophoblastique (Kita *et al.*, 2003). De la même façon, les formes phosphorylées et totales d'ERK1/2 ont été détectées dans le trophoblaste intermédiaire, de phénotype invasif et perdant sa capacité proliférative, ce qui suggère un lien entre l'activation de ces MAPKs et la capacité invasive du trophoblaste extravillous (Ichikawa *et al.*, 1998). L'importance de la protéine ERK1/2 dans la régulation du processus de migration du trophoblaste a été largement étudiée dans les lignées trophoblastiques. Les cellules HTR-8/SVneo et SGHPL-4, traitées par les facteurs de croissance (IGF-II, IGFBP-1, EGF, HGF) et l'endothéline (ligand de RCPGq) voient leur migration augmentée par l'activation des protéines ERK1/2 (Bifulco *et al.*, 2003, Chakraborty *et al.*, 2002, Fitzgerald *et al.*, 2005a, Gleeson *et al.*, 2001, Ino *et al.*, 2003, McKinnon *et al.*, 2001, Qiu *et al.*, 2004a). L'activation d'ERK1/2 stimule et influence une autre composante du processus d'invasion du trophoblaste, la prolifération cellulaire. Bien que l'expression et l'activité de ERK1/2 au niveau des cytotrophoblastes extravillous primaires n'ont jamais été étudiées, plusieurs facteurs de croissance (d'origine placentaire ou non) et hormones se sont montrés capables de moduler la prolifération des lignées d'origine trophoblastique via l'activation de la voie ERK1/2 (Athassiades *et al.*, 1998, Bifulco *et al.*, 2003, Cauzac *et al.*, 2003, Cha *et al.*, 2001, Lysiak *et al.*, 1993, Lysiak *et al.*, 1995)

Voie JAK/STAT

Pour la description de la voie de signalisation activée conventionnellement par les cytokines, il faut se référer à la section I.C.2.1.2. À ce jour, l'isoforme STAT3 est reconnu

comme le facteur de transcription clé dans la modulation de l'implantation embryonnaire et dans l'invasion trophoblastique (Fitzgerald *et al.*, 2005a, Fitzgerald *et al.*, 2005b). Ce rôle du facteur de transcription STAT3 a été mis en évidence dans des modèles murins invalidés pour le gène STAT3 (Stat3^{-/-}). Chez ces souris, le processus d'implantation fait défaut et les embryons meurent précocement. L'injection de la protéine STAT3 constitutivement active très tôt pendant la phase préimplantatoire permet de renverser ce phénomène et d'avoir des souriceaux viables (Takeda *et al.*, 1997). Les investigations chez l'humain ont démontré une parfaite corrélation entre l'activité de la protéine STAT3 et le degré d'invasivité du trophoblaste extravilleux. Corvinus et collaborateurs ont détecté respectivement par Western blot et par retard sur gel une forte activité de STAT3 et une liaison de STAT3 à l'ADN dans le trophoblaste extravilleux du premier trimestre, des processus qui sont absents dans les cellules du trophoblaste villositaire à terme (Corvinus *et al.*, 2003). À noter, que le pool de STAT3 constitutivement active est beaucoup plus important dans les cellules des choriocarcinomes que dans les cellules trophoblastiques primaires (Corvinus *et al.*, 2003). L'invasion des cellules JEG-3, HTR-8/SVneo et les primocultures de premier trimestre est stimulée suite à l'activation de la STAT3 (Fitzgerald *et al.*, 2005a, Paiva *et al.*, 2007, Poehlmann *et al.*, 2005). Par ailleurs, STAT5 est un autre facteur STAT impliqué dans l'invasion du trophoblaste. L'hormone de croissance placentaire humaine (hPGH) stimule l'activité de liaison STAT5 à l'ADN et l'invasion des primocultures de premier trimestre purifiées d'une manière dépendante de la protéine JAK2 (Lacroix *et al.*, 2005).

En conclusion, la compréhension des voies de transduction du signal dans l'invasion du trophoblaste, et en comparaison avec l'invasion néoplasique, nécessite des investigations approfondies. D'une part, parce que les données concernant l'invasion du trophoblaste font défaut. Et d'autre part, du fait de l'expression au niveau de l'interface materno-fœtale de multiples molécules (facteurs de croissances, cytokines et hormones) impliqués dans la régulation de la migration et de l'invasion du trophoblaste (**Fig. 21**). La plupart de ces facteurs, et comme dans d'autres types de cellules, ne stimule pas l'invasion cellulaire via une seule cascade de signalisation mais à travers plusieurs voies de signalisation. En particulier deux voies de signalisation, la voie des STAT3 et les MAPKs médiées par ces facteurs, ont été distinguées comme étant impliquées dans ce processus. Plusieurs études suggèrent que ces deux voies s'entrecroisent au point de modulation, mais les théories exactes ne sont pas facilement conciliables et invitent plutôt à une exploration plus poussée. La compréhension des mécanismes

de transduction du signal lors de l'invasion du trophoblaste est également freinée par la méconnaissance des différents effecteurs en aval de ces voies de signalisation tels que les facteurs de transcription et de leurs gènes cibles. Toutefois, certains de ces facteurs nucléaires, par exemple, STAT, les récepteurs nucléaires PPAR- γ et les gènes homéotiques, identifiés sur la base d'analyses fonctionnelles ou de leur profil d'expression, jouent probablement un rôle clé dans l'invasion du trophoblaste. On peut supposer que ces gènes peuvent contrôler les différents marqueurs de la différenciation invasive du trophoblaste comme les intégrines, les hormones spécifiques des cytotrophoblastes extravilleux, et les différents systèmes de protéases.

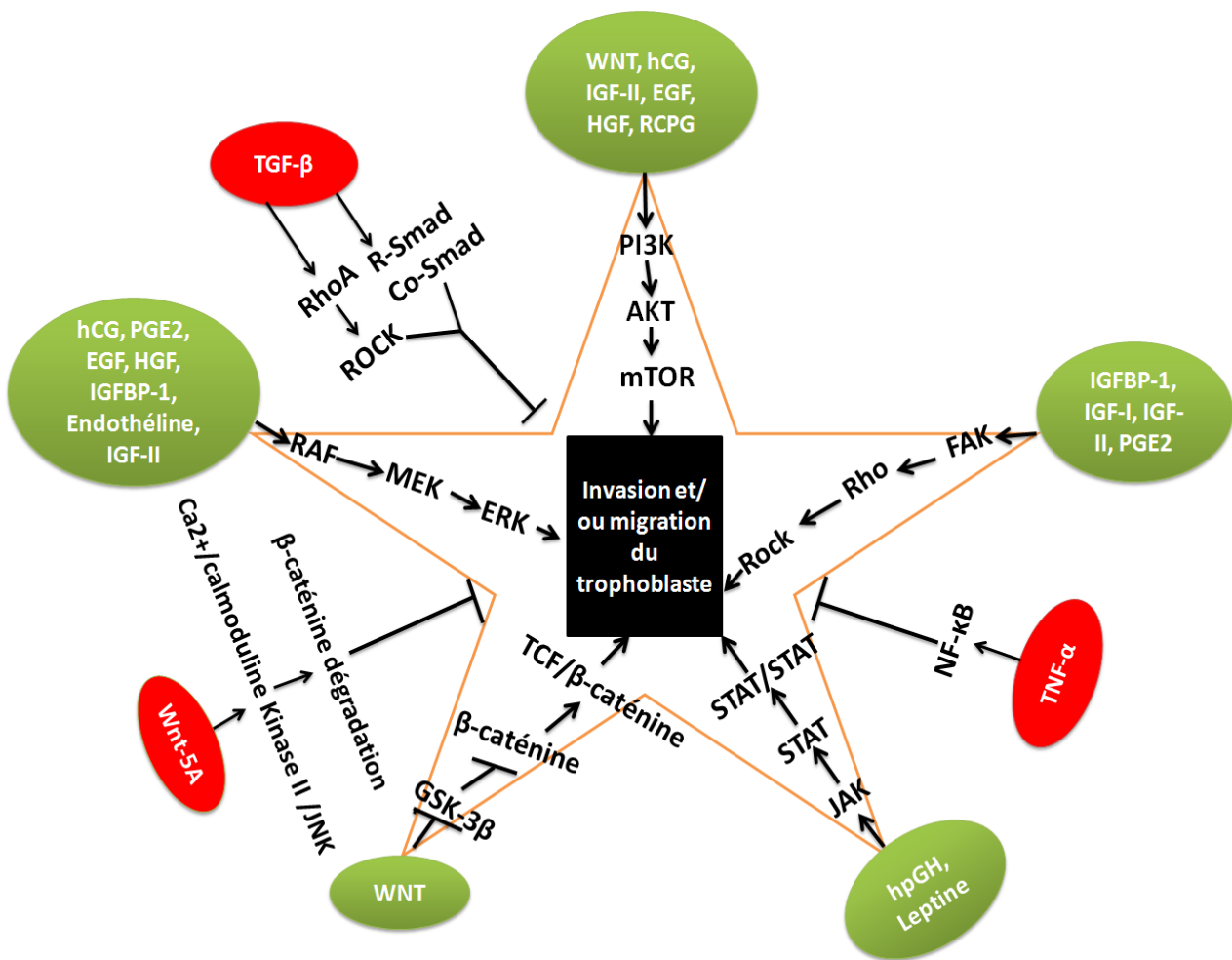


Figure 21 : Représentation des différentes voies de signalisation impliquées dans la stimulation de l'invasion/migration du trophoblaste humain. De nombreux facteurs de croissance solubles exprimés au niveau de l'interface fœto-maternelle exerce, via des récepteurs tyrosine kinase (RTK), des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), un effet pro-migratoire et pro-invasif sur le trophoblaste en activant des voies de signalisation telles que la voie MEK/ERK, la voie PI3K/AKT/mTOR, la voie Rho/ROCK, la voie TCF/ β -caténine et la voie JAK/STAT (en vert). En revanche, peu d'informations sont connues sur les voies de signalisation impliquées dans la régulation négative de la migration et de l'invasion du trophoblaste (en rouge).

III) SÉROTONINE ET GROSSESSE

Le rôle de la sérotonine dans les premiers stades de développement fœtale a été suggéré suite à la découverte de la présence de la sérotonine, de ses récepteurs, et de son transporteur (SERT) dans des embryons de pré-implantation et par la capacité des agents pharmacologiques antagonistes spécifiques de la sérotonine à interférer avec le développement embryonnaire (Amireault *et al.*, 2013, Cote *et al.*, 2007, Cote *et al.*, 2004). Toutefois, la source de la sérotonine a échappé à toute identification jusqu'à très récemment. Pourtant, et avant la découverte d'un second isoforme de la TPH (TPH2), la présence de la sérotonine et l'activité de l'enzyme responsable de la synthèse de la sérotonine (TPH) ont été détectées dans les zygotes de souris peu après la fécondation, ce qui suggère que l'embryon lui-même a la capacité de produire de la sérotonine (Walther *et al.*, 1999). Une autre étude est venue contredire cette conclusion en démontrant que l'embryon n'exprime pas la TPH1 et que la sérotonine présente n'est pas synthétisée par l'embryon lui-même, mais capturée à partir du milieu environnant par le SERT présent et fonctionnel tout au long du développement préimplantatoire (Cote *et al.*, 2007). La contradiction apparente dans les résultats entre les deux études vient du fait que la TPH présente dans les zygotes de souris peu après la fécondation est en réalité l'isoforme 2 de la TPH (TPH2) et que les transcrits *Tph2* sont présents dans les ovocytes et dans les embryons à deux cellules (Basu *et al.*, 2008). Ces derniers résultats ont été confirmés par des études réalisées par Côté et ses collaborateurs qui ont montré une émergence d'une activité enzymatique *Tph2* croissante et une capacité de synthèse de la sérotonine par l'embryon à deux cellules au stade blastocyste, alors que la sérotonine produite dans l'utérus et l'oviducte serait liée à l'activité de la TPH1. Fait intéressant, les niveaux de sérotonine dérivés de la TPH1 s'élèvent peu après la fécondation dans ces deux tissus impliquant que les embryons préimplantatoires non seulement synthétisent la sérotonine, mais aussi baignent dans la sérotonine maternelle. Pourtant, la source de cette sérotonine reste à identifier car aucune activité enzymatique TPH n'a été détectée ni dans l'oviducte ni dans l'utérus (Amireault *et al.*, 2013, Cote *et al.*, 2007). Pris ensemble, ces résultats révèlent une interaction complexe et une redondance possible des mécanismes de coopération entre la source embryonnaire et la source maternelle de la sérotonine, afin d'assurer le début du développement embryonnaire. Il est probable que la sérotonine provenant des tissus maternels (synthétisée par la TPH1) se combine avec la sérotonine dérivée à partir de l'embryon

(synthétisée par la TPH2) pour moduler les divisions cellulaires et la viabilité embryonnaire et l'implantation.

Au cours des étapes de développement post-implantatoire, la sérotonine synthétisée via la TPH1 joue un rôle dans la régulation de la morphogenèse. Étant donné que l'embryon ne dispose pas d'activité TPH1, il est évident que la source maternelle de la sérotonine est critique pour le développement murin normale durant les phases de post-implantation bien avant l'apparition des neurones sérotoninergiques (Yavarone *et al.*, 1993). En utilisant des souris invalidées pour la Tph1 (Tph1^{-/-}), Côte et ses collaborateurs ont montré que 1) ces souris donnent naissance à des souriceaux viables mais plus petits en taille que la progéniture de souris hétérozygotes ou de type sauvage (WT) (Cote *et al.*, 2007) et 2) une réduction du nombre de nouveau-nés démontrant une résorption des embryons (Cote *et al.*, 2007) À partir de ces résultats, Côte et ses collègues ont émis l'hypothèse que la sérotonine maternelle circulant dans le sang est indispensable au bon développement embryonnaire. Récemment, Bonnin et ses collègues ont contesté ces travaux. En utilisant des souris déficientes pour le gène PET1 (Pet1^{-/-}), qui est un facteur essentiel pour le développement des neurones sérotoninergiques du raphé; et des souris invalidées pour le gène SERT (SERT^{-/-}), ces auteurs ont démontré que la source exogène de la sérotonine dans le cerveau postérieur n'est pas d'origine maternelle mais provient du placenta (synthèse *de novo*) (Bonnin *et al.*, 2011a). Cette sérotonine placentaire serait métabolisée à partir du tryptophane maternel dans les cellules trophoblastiques exprimant la TPH1. Bonnin et ses collègues affirment que la sérotonine synthétisée par la TPH1 dans le placenta murin et humain se comporte comme une hormone essentielle dans le développement du cerveau du fœtus pour influencer son comportement plus tard dans la vie (Bonnin *et al.*, 2011a, Bonnin *et al.*, 2011b). Cette capacité de néo-synthèse de la sérotonine a également été observée dans la villosité placentaire humaine à 11 semaines de gestation (Bonnin *et al.*, 2011a).

Quelles que soient les théories avancées, il reste fort probable que la sérotonine placentaire a un rôle local pendant la grossesse puisque le trophoblaste dispose d'un système sérotoninergique complet à savoir, la présence de la sérotonine, du transporteur de la sérotonine, et les récepteurs de la sérotonine de type 2 (5-HT₂). Ce système sérotoninergique est également présent dans les lignées cellulaires du trophoblaste (Balkovetz *et al.*, 1989, Huang *et al.*, 1998, Klempan *et al.* 2011, Sonier *et al.*, 2005, Viau *et al.*, 2009, Yavarone *et al.*, 1993). En particulier, la sérotonine d'origine maternelle et/ou placentaire pourrait jouer un rôle local (autocrine et/ou paracrine) dans

le développement et la fonction du placenta à travers l'implication du SERT et/ou des récepteurs 5-HT_{2A} dans la différenciation invasive du trophoblaste. Dans des grossesses pathologiques telles que la prééclampsie, caractérisée par un défaut d'invasion, et le diabète gestationnel, une altération des niveaux plasmatiques de la sérotonine et de l'expression des récepteurs 5-HT_{2A}, a été observée (Filshie *et al.*, 1992, Viau *et al.*, 2009).

IV) HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

La sérotonine stimule la prolifération de plusieurs types cellulaires via l'activation des récepteurs à la sérotonine ; dont le récepteur 5-HT_{2A}. Ce dernier est exprimé dans le trophoblaste villositaire humain de placenta normal à terme et dans les lignées cellulaires de choriocarcinomes JEG-3 et BeWo (modèles *in vitro* du trophoblaste placentaire humain). Le récepteur 5-HT_{2A} est un récepteur couplé à des protéines G de type Gq connues pour activer la PLC et stimuler les voies de signalisation JAK2/STAT3 et MEK/ERK1/2. Ces voies de signalisations sont impliquées dans la prolifération, la migration et l'invasion cellulaire représentant les trois composantes du processus de différenciation invasive du trophoblaste extravilloux durant les étapes précoces du développement placentaire.

L'hypothèse de recherche est que les récepteurs 5-HT_{2A}, via l'activation des voies ERK1/2 et JAK2/STAT3, stimulent la prolifération, la migration et l'invasion du trophoblaste extravilloux

Pour vérifier cette hypothèse, les objectifs spécifiques sont: (1) Déterminer le rôle des récepteurs 5-HT_{2A} placentaires dans la régulation de la prolifération des cellules trophoblastiques et les voies de signalisation activées; (2) Déterminer le mécanisme moléculaire responsable de l'effet mitogénique du récepteur 5-HT_{2A} sur les cellules du trophoblaste extravilloux; (3) Déterminer le rôle des récepteurs 5-HT_{2A} dans la modulation des capacités invasives et migratoires du trophoblaste extravilloux et étudier le mécanisme moléculaire impliqué.

V) RÉSULTATS

I - CHAPITRE 1

THE 5-HT_{2A} SEROTONIN RECEPTOR ENHANCES CELL VIABILITY, AFFECTS CELL CYCLE PROGRESSION AND ACTIVATES MEK-ERK1/2 AND JAK2-STAT3 SIGNALLING PATHWAYS IN HUMAN CHORIOCARCINOMA CELL LINES.

Talal Oufkir, Madeleine Arseneault, J. Thomas Sanderson and Cathy Vaillancourt

Placenta 2010, 31:439-447

Résumé de l'article en français

Bien que la sérotonine, via ses récepteurs de type 2A (5-HT_{2A}), exerce des effets mitogéniques sur plusieurs types cellulaires autant néoplasiques que sains, l'effet de l'activation des récepteurs 5-HT_{2A} dans la prolifération du trophoblaste placentaire humain n'a jamais été étudié. Ces récepteurs sont présents dans le trophoblaste placentaire et dans les lignées du choriocarcinome placentaire JEG-3 et BeWo, cellules modèles pour l'étude *in vitro* du trophoblaste. Récemment, il a été rapporté que le placenta est capable de synthétiser *de novo* la sérotonine, ce qui suggère que la sérotonine, via ses récepteurs 5-HT_{2A}, peut moduler la prolifération et donc la fonction du trophoblaste. Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'effet de l'activation des récepteurs 5-HT_{2A} sur 1) la prolifération et la viabilité des cellules JEG-3 et BeWo (test de viabilité MTT et cytométrie en flux) et 2) l'activation des voies de signalisation JAK2/STAT3 et MEK1/2/ERK1/2 (immunoprécipitation et immunobuvardage de type Western). Les résultats montrent que l'activation spécifique des récepteurs 5-HT_{2A} par un agoniste sélectif le (\pm)-2,5-Dimethoxy-4-iodoamphetamine hydrochloride (DOI) stimule la prolifération des cellules JEG-3 et BeWo. L'effet mitogénique du DOI serait le résultat d'un effet sur la progression du cycle cellulaire des cellules JEG-3 et BeWo. En effet, les résultats de cytométrie en flux montrent que le DOI stimule la synthèse de l'ADN dans les cellules BeWo tandis qu'il active la division cellulaire des cellules JEG-3. L'analyse par immunoprécipitation et immunobuvardage de type Western de la voie de transduction du signal montre que l'activation des récepteurs 5-HT_{2A} stimule les voies de signalisation MEK/ERK1/2 et JAK2/STAT3. En conclusion, cette étude démontre que la sérotonine, via l'activation des récepteurs 5-HT_{2A} exerce un effet sur la fonction proliférative du trophoblaste humain et suggère fortement un rôle du système sérotoninergique dans le développement placentaire.

Contribution de l'étudiant

À l'exception des résultats de la prolifération cellulaire (test de viabilité) réalisés par Madeleine Arsenault, l'étudiant a réalisé toutes les expériences, rédigé le manuscrit, participé au choix de la revue de publication et effectué toutes les corrections nécessaires pour la version finale de cet article.

ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

May 18, 2013

This is a License Agreement between oufkir talal ("You") and Elsevier ("Elsevier") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Elsevier, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

Supplier	Elsevier Limited The Boulevard, Langford Lane Kidlington, Oxford, OX5 1GB, UK
Registered Company Number	1982084
Customer name	oufkir talal
Customer address	11 RUE DU quinconce PARIS, None 77200
License number	3151960598767
License date	May 18, 2013
Licensed content publisher	Elsevier
Licensed content publication	Placenta
Licensed content title	The 5-HT _{2A} serotonin receptor enhances cell viability, affects cell cycle progression and activates MEK-ERK1/2 and JAK2-STAT3 signalling pathways in human choriocarcinoma cell lines
Licensed content author	T. Oufkir, M. Arseneault, J.T. Sanderson, C. Vaillancourt
Licensed content date	May 2010
Licensed content volume number	31
Licensed content issue number	5
Number of pages	9
Start Page	439
End Page	447
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Intended publisher of new work	other
Portion	full article
Format	electronic
Are you the author of this Elsevier article?	Yes
Will you be translating?	No
Order reference number	None
Title of your thesis/dissertation	5-H _{2A} receptors and trophoblast invasion
Expected completion date	Nov 2013
Estimated size (number of pages)	235
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Permissions price	0.00 USD



The 5-HT_{2A} serotonin receptor enhances cell viability, affects cell cycle progression and activates MEK–ERK1/2 and JAK2–STAT3 signalling pathways in human choriocarcinoma cell lines

T. Oufkir, M. Arseneault, J.T. Sanderson, C. Vaillancourt*

INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, QC H7V 1B7, Canada

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 25 February 2010

Keywords:

Serotonin
5-HT_{2A} receptor
JAK–STAT
MAPK
JEG-3
BeWo
Cell proliferation
Cell cycle
Placenta

ABSTRACT

Previous results from our group have demonstrated the expression of the 5-HT_{2A} receptor and a mitogenic effect of serotonin in human trophoblast. The objectives of the present study were to investigate the role of the 5-HT_{2A} receptor in trophoblast cells and to determine the signalling pathways activated by this receptor. We investigated the effect of (±)-2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine hydrochloride (DOI), a selective 5-HT_{2A} agonist, on cell cycle progression and cell viability in BeWo and JEG-3 cells. We also investigated, by co-immunoprecipitation and western blot analysis, the involvement of the MEK–ERK1/2 and JAK2–STAT3 signalling pathways following activation of the placental 5-HT_{2A} receptor. Our results showed a concentration-dependent increase of cell viability by DOI, which was reversed by ketanserin, a selective 5-HT_{2A} receptor antagonist. Furthermore, activation of the 5-HT_{2A} receptor by DOI increased cell entry into the G2/M and S phase (DNA synthesis) in BeWo and JEG-3 cells, respectively. In addition, stimulation of BeWo and JEG-3 cells by DOI activated both the MEK–ERK1/2 and the JAK2–STAT3 signalling pathways. This study demonstrated that the 5-HT_{2A} receptor increases cell viability and affects cell cycle progression in human trophoblast cell lines as well as activates the MEK–ERK1/2 and JAK2–STAT3 intracellular signalling pathways, which are related to survival, differentiation, migration and invasion. These findings indicate that serotonin through the activation of the 5-HT_{2A} receptor is a key regulator of placentation and may play a role in the pathophysiology of certain pregnancy disorders associated with alterations in placental development, such as preeclampsia, gestational diabetes and preterm birth.

Crown Copyright © 2010 Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) is produced and stored in several tissues, including the central nervous system (CNS), blood platelets and gastrointestinal enterochromaffin cells [1]. This monoamine acts as a neurotransmitter, hormone and growth factor to regulate a wide range of cellular processes, such as cell differentiation, cell growth, cell proliferation, gene expression, apoptosis and cell survival [2,3]. Serotonin regulates many behavioural and physiological processes and acts as a developmental signal in early embryogenesis and regulation of fetal development and pregnancy well-being [3–6]. Studies have suggested that serotonin is involved in placental development (placentation) and function [7–10].

Serotonin exerts its biological activities by binding to multiple serotonin receptor classes. Among these, the 5-HT₂ class comprises

three subtypes: 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} and 5-HT_{2C} [11]. The 5-HT_{2A} receptor subtype is widely distributed in peripheral tissues, including the human trophoblast [8]. This serotonin receptor subtype has been shown to regulate cell differentiation, proliferation and migration in different cell types including glomerular mesangial, skeletal muscle and vascular smooth muscle cells [12–15]. Stimulation of the 5-HT_{2A} receptor may exert its effect via the janus kinases/signal transducer and activator of transcription (JAK–STAT) and extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) pathways [13,14,16]. Direct activation of JAK2–STAT3 through stimulation of the 5-HT_{2A} receptor has been demonstrated to enhance cell differentiation and proliferation in rat skeletal muscle cells [13]. To date, no study has characterized the signal transduction pathways initiated by serotonin via its 5-HT_{2A} receptor in trophoblast cells.

Both the mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and the JAK/STAT pathways are implicated in cell proliferation, differentiation, survival, and apoptosis [17,18]. The JAK2–STAT3 and ERK1/2 (p42/44–MAPK) pathways have been shown to target genes involved in the regulation of cell proliferation and viability in different cell

* Corresponding author. INRS-Institut Armand-Frappier, 531 blvd des Prairies, Laval, QC H7V 1B7, Canada. Tel.: +1 450 687 5010 x8812; fax: +1 450 686 5309.

E-mail address: cathy.vaillancourt@iaf.inrs.ca (C. Vaillancourt).

types including the trophoblast [19,20]. Moreover, activation of ERK1/2 promotes villous cytotrophoblast differentiation (syncytialization) [21,22], while STAT3 is involved in extra-villous cytotrophoblasts invasion [23,24]. Activation of ERK1/2 pathway has also been shown to increase extra-villous cytotrophoblast invasion and migration [25,26]. Taken together, these data suggest that the 5-HT_{2A} receptor regulates placental trophoblast cellular processes through the activation of JAK-STAT and/or MAPK pathways.

Previously we demonstrated the expression of the 5-HT_{2A} receptor in human primary villous trophoblast and in BeWo and JEG-3 trophoblastic-like cell lines [7,8]. In this study, in order to explore the signalling mechanism and the role of the 5-HT_{2A} receptor in trophoblast cells, we evaluated the effect of (±)-2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine hydrochloride (DOI) on cell viability, cell cycle progression and activation of the MEK-ERK1/2 and the JAK-STAT3 pathways in BeWo and JEG-3 cell lines.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Minimum essential medium Eagle's (MEM Eagle), nutrient mixture F12 Ham Kaighn's modification (Ham's F-12K), MEM/F-12K, antibiotics (penicillin and streptomycin), sodium pyruvate, trypsin, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), trypsin I, protease and phosphatase inhibitor cocktails, acrylamide/bis-acrylamide solution, (±)-2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine hydrochloride (DOI), ketanserin, and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reagent, were all purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). Fetal bovine serum (FBS) was obtained from Hyclone Laboratories (Logan, UT, USA). RNase was obtained from Roche Diagnostics (Laval, QC, Canada). MACS[®] separation columns and μMACS Protein G microbeads were obtained from Miltenyi Biotec (Auburn, CA, USA). Cell-Bind T75- and T25- flasks and 6- and 96-wells microplates were purchased from Corning Life Science (Corning, NY, USA). Biotin-conjugated BCA protein assay reagent was obtained from Pierce Biotechnology (Rockford, IL, USA). Polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes, horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies, Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate, and Re-Blot Plus Mild Antibody Stripping Solution were obtained from Millipore (Mississauga, ON, Canada). Polyclonal antibodies against 5-HT_{2A} (H-75), JAK2 (sc-34479) and phospho-MEK1/2 (sc-7995) for western blot analysis were obtained from Santa Cruz Biotechnology (CA, USA), while those against MEK1/2 (05-747), phospho-ERK1/2 (05-481), ERK1/2 (06-182), STAT3 (06-596), and phospho-STAT3 (Tyr-705) (05-485) were purchased from Millipore. Monoclonal antibody against glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, MAB374) was purchased from Millipore. All other reagents and chemicals were purchased from Sigma-Aldrich or Fisher Scientific (Ottawa, ON, Canada).

2.2. Cell culture

BeWo and JEG-3 human placental choriocarcinoma cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD, USA). BeWo cells were maintained in MEM/Ham's F-12K containing 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin. JEG-3 cells were maintained in MEM Eagle containing 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 100 U/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin. Cells were maintained in 75 cm² culture flasks in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37 °C. Cells were split when they reached about 90% confluence, using 0.5% trypsin.

2.3. MTT cell viability assay

The conversion of MTT to formazan, a measure of the mitochondrial reductive activity of the cell was used to determine the effect of serotonin, DOI and ketanserin on human placental cell viability. BeWo and JEG-3 cells were seeded in 96-well plates at a density of 5×10^3 cells/well (final volume of 100 μl/well). After 24 h, the cells were treated with increasing concentrations of DOI (0, 5, 10, 15, 20, 25, and 40 μM) or with 0.1 μM ketanserin (selective 5-HT_{2A} antagonist) before addition of 20 μM (BeWo) and 25 μM (JEG-3) DOI or with 10 μM ketanserin before addition of 20 μM (BeWo) and 40 μM (JEG-3) serotonin. The experiment was realized in presence of 0.5% (DOI) or 10% FBS (serotonin) and DOI and serotonin were diluted in fresh medium containing 0.5% or 10% FBS respectively. After 48 h of incubation at 37 °C in 5% CO₂, the culture medium was removed and 8 μl MTT reagent was added to 50 μl of fresh culture medium at a final concentration of 0.64 mg/ml. Cells were incubated for 4 h at 37 °C in 5% CO₂. After incubation, medium containing MTT was removed and the resulting formazan crystals were dissolved in 120 μl of MTT detergent solution (95% isopropanol, 1% HCl 12 N, and 4% Triton X-100) by pipetting up and down 30 times. The absorbance was measured spectrophotometrically at

a wavelength of 570 nm (with a reference wavelength of 690 nm) using a SpectraMax M5 with SoftMax Pro v5 software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Each assay included blank wells (culture medium without cells) and control wells (culture medium with cells). Cell viability (% of control) was expressed using the following formula:

$$\left(\frac{A_{(570 \text{ nm}-690 \text{ nm})} \text{ of each treated well}}{A_{(570 \text{ nm}-690 \text{ nm})} \text{ average of control wells}} \right) \times 100$$

2.4. Cell cycle analysis by flow cytometry

BeWo and JEG-3 (2.5×10^5 cells) were transferred to T25 flasks. For synchronization, cells were kept for 24 h in culture medium supplemented with 0.5% FBS and then were incubated with 20 μM (BeWo) and 25 μM (JEG-3) DOI for 48 h. Cells were fixed using ice-cold 70% ethanol/30% PBS for at least 1 h on ice. Fixed cells were harvested by centrifugation and resuspended in 800 μl of PBS. After a second wash in PBS, 20 μl of RNase (10 mg/ml) and 100 μl of propidium iodide (400 mg/ml) were added. DNA content was then assessed using a Becton Dickinson FACSCalibur Flow Cytometer (Becton Dickinson Inc, Oakville, ON, Canada). Propidium iodide was excited at 488 nm and fluorescence was read at 640 nm. Cells were gated by measuring forward and orthogonal light scatter and a DNA histogram of cell number against fluorescence was obtained. DNA histograms were analyzed using WinMDI (multiple document interface for windows), Version 2.9 for flow cytometry.

2.5. Protein extraction

After FBS deprivation (0.5% vs. 10% FBS) for 12 h, BeWo and JEG-3 cells were stimulated for 0, 5, 15, 30, and 60 min with 20 μM and 25 μM of DOI (diluted in medium containing 0.5% FBS) respectively. For total protein extraction, cells were washed twice with cold PBS, harvested by scraping in 500 μl of cold lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 175 mM NaCl, 1 mM EDTA) containing 5 μl Protease Inhibitor Cocktail and 5 μl Phosphatase Halt™ Inhibitor Cocktail and transferred to a microcentrifuge tube. The lysates were agitated for 30 min at 4 °C and centrifuged for 15 min at $21000 \times g$ at 4 °C. The supernatants (total proteins) were carefully removed and stored at -80 °C until analysis. Protein concentrations were measured using the BCA protein assay reagent according to the instructions of the manufacturer.

2.6. Co-immunoprecipitation

For the co-immunoprecipitation analyses, 100 μg of total protein lysates were mixed with 3 μl of anti-JAK2 or anti-5-HT_{2A} antibodies and 50 μl of protein G-conjugated microbeads (Miltenyi Biotec). The lysates were then incubated for 30 min on ice and applied to the MACS[®] separation columns in a magnetic field (ThermoMACS™ Separation Unit Miltenyi Biotec). The columns were washed with high salt solution (500 mM NaCl in lysis buffer) followed by four washes with low salt buffer (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, 137 mM NaCl, 0.1% Triton X-100). Bound proteins were eluted using SDS buffer (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 50 mM DTT, 1% SDS, 0.005% bromophenol blue, 10% glycerol) pre-heated to 95 °C and stored at -80 °C.

2.7. Immunoblotting

Total proteins diluted in SDS buffer were heated for 10 min at 95 °C for denaturation. Then, total and immunoprecipitated proteins were fractionated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis on 10% separating and 4% stacking gels, followed by transfer to PVDF membranes. The membranes were blocked in TBS-T (TBS: 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween 20) containing 5% skim milk for 1 h at room temperature. Membranes were then incubated with the primary antibody diluted in 5% skim milk in TBS-T as follows: anti-5-HT_{2A} receptor (1:250 for 3 h at room temperature), anti-MEK1/2 (1:1000 overnight at 4 °C), anti-p-MEK1/2 (1:2000 for 2.5 h at room temperature), anti-ERK1/2 (1:1000 overnight at 4 °C), anti-p-ERK1/2 (1:1000 overnight at 4 °C), anti-JAK2 (1:1000 for 3 h at room temperature), anti-STAT3 (1:200 for 2 h at room temperature), anti-p-STAT3 (1:1000 overnight at 4 °C), or anti-GAPDH (1:20000 for 30 min at room temperature). Membranes were washed three times with TBS containing 0.1% Tween 20, then incubated with HRP-conjugated anti-rabbit IgG (1:5000) or anti-mouse IgG (1:5000) as secondary antibodies for 1 h at room temperature and then washed 3 times with TBS-T 0.05%. Bands were visualized with Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate and their intensities were quantified by densitometric analysis using FluorChem HD2 software version 6.0 (Alpha Innotech, San Leandro, CA). In certain instances, the PVDF membranes were stripped with Re-Blot Plus Mild solution at room temperature for 15 min, washed twice for 5 min with TBS-T, and quickly rinsed 5 times in water before reprobing with another antibody.

2.8. Statistical analysis

For the cell viability assays, data were presented as means ± SEM of at least three separate experiments with 6 replicates. For cell cycle experiments, data were

presented as means \pm SEM of at least three separate experiments. For both cell viability and cell cycle analysis, statistically significant differences were determined by Student's *t* test using Prism version 5.0 (GraphPad, San Diego, CA). For densitometric analysis, data were presented as means \pm SD and statistical significance was determined by one-way ANOVA followed by Newman–Keuls post-hoc test. A probability value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Activation of the 5-HT_{2A} receptor promotes viability of BeWo and JEG-3 cells

Cell viability in BeWo and JEG-3 was increased by DOI in a concentration-dependent manner after 48 h of treatment (Fig. 1A and B). A maximal increase of $25 \pm 3\%$ ($P < 0.001$) with 20 μM of

DOI in BeWo and of $11 \pm 4\%$ ($P < 0.05$) with 25 μM in JEG-3 cells was observed, compared to untreated cells under low (0.5% FBS) serum conditions. Higher concentrations of DOI decreased viability of BeWo and JEG-3 cells, probably due to receptors down-regulation. Under conditions with 10% FBS, DOI did not significantly stimulate cell viability (data not shown). Therefore, we used the conditions of 20 μM of DOI for BeWo, 25 μM of DOI for JEG-3 as well as 0.5% low serum to characterize the signalling pathways activated by the placental 5-HT_{2A} receptor.

Pre-treatment with ketanserin (0.1 μM), a selective 5-HT_{2A} receptor antagonist, completely blocked the effect of DOI on cell viability in both trophoblast-like cell lines (Fig. 1C and D). Increased cell proliferation by serotonin, which we described previously [7], was also abolished by 10 μM ketanserin in both cell lines (Fig. 1E

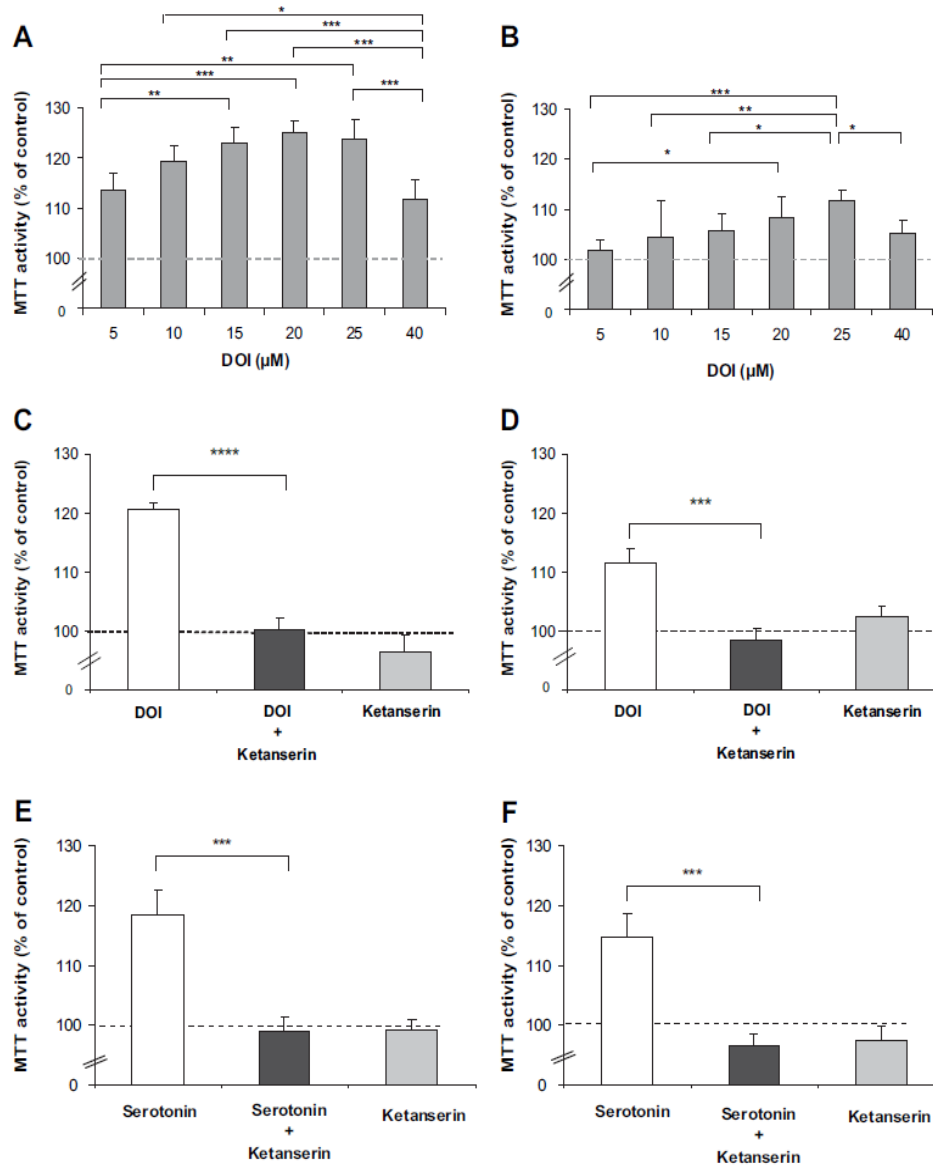


Fig. 1. Effect of serotonin and 5-HT_{2A} agonist and antagonist on the proliferation of BeWo and JEG-3 cells. (A) BeWo and (B) JEG-3 cells were treated with increasing concentrations of DOI (selective 5-HT_{2A} agonist) and cell proliferation was determined by MTT assay as described in Materials and Methods. Choriocarcinoma cells were treated with 0.1 μM ketanserin (selective 5-HT_{2A} antagonist) before addition of (C) 20 μM (BeWo) and (D) 25 μM (JEG-3) DOI or with 10 μM ketanserin before addition of (E) 20 μM (BeWo) and (F) 40 μM (JEG-3) serotonin. The experiment was repeated three times with at least six replicates per experiment in presence of 0.5% (DOI; A–D) or 10% FBS (serotonin; E, F). Data are expressed as mean \pm SEM. Statistically significant differences (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$) were determined by Student's *t* test.

and F). Ketanserin alone had no effect on viability of either cell lines. Cell size and conformation did not change during DOI, serotonin or ketanserin treatment.

3.2. Activation of the 5-HT_{2A} receptor affects the cell cycle of BeWo and JEG-3 cells

To characterize the effect of 5-HT_{2A} receptor activation on cell cycle distribution of BeWo and JEG-3 cells, changes in cell DNA content were measured by flow cytometry. Forty-eight hours treatment of BeWo with 20 μM DOI induces a substantial increase in number of cells in G2/M phase (21.19% ± 1.79 *P* < 0.05 vs. 15.96% ± 2.56; *P* < 0.01), while JEG-3 treated with 25 μM DOI were at a higher proliferative state as indicated by a greater number of cells in S phase (31.82% ± 1.09 vs. 25.28% ± 2.71; *P* < 0.01) (Fig. 2). Both cell lines treated for 24 h present a similar rate of DNA content (data not shown). The analysis of cell cycle showed neither apoptotic nor necrotic cells in the absence (control) and in the presence of DOI. In addition, the flow cytometry analyses showed that the viability of BeWo and JEG-3 cells was not affected by DOI treatment as indicated by the absence of propidium iodide FL2-A's fluorescence in the sub-G1 phase of cell cycle (Fig. 2).

3.3. Activation of the 5-HT_{2A} receptor by DOI induces MEK1/2 and ERK1/2 phosphorylation in BeWo and JEG-3 cells

BeWo and JEG-3 cells treated with DOI significantly increased the phosphorylation of MEK1/2 in a time-dependent manner (Fig. 3A and B). Maximal phosphorylation was reached after 15 min with 20 μM DOI for BeWo (450 ± 60% of 0 min; *P* < 0.05), and at 30 min with 25 μM DOI for JEG-3 (270 ± 35% of 0 min; *P* < 0.001). DOI had no effect on the expression of the non-phosphorylated form of MEK1/2.

We further determined the effect of DOI on the phosphorylation of ERK1/2 (p42/44-MAPK), the target of p-MEK1/2. As expected, DOI increased the phosphorylation of ERK1/2 in both cell lines in a time-dependent manner. Similar to what we observed for p-MEK1/2, the activation of ERK1/2 reached its maximum after 15 min of incubation with 20 μM DOI (410 ± 47%; *P* < 0.001) and at 30 min incubation with 25 μM DOI (363 ± 33%; *P* < 0.0001) in BeWo and JEG-3 cells, respectively (Fig. 3C and D). DOI had no effect on expression of the non-phosphorylated form of ERK1/2.

Involvement of protein kinase C (PKC) in ERK1/2 activation has been described by others [27,28]. Classically, the 5-HT_{2A} receptor activates the PLC-β/PKC signalling pathway through a G_{q/11} protein

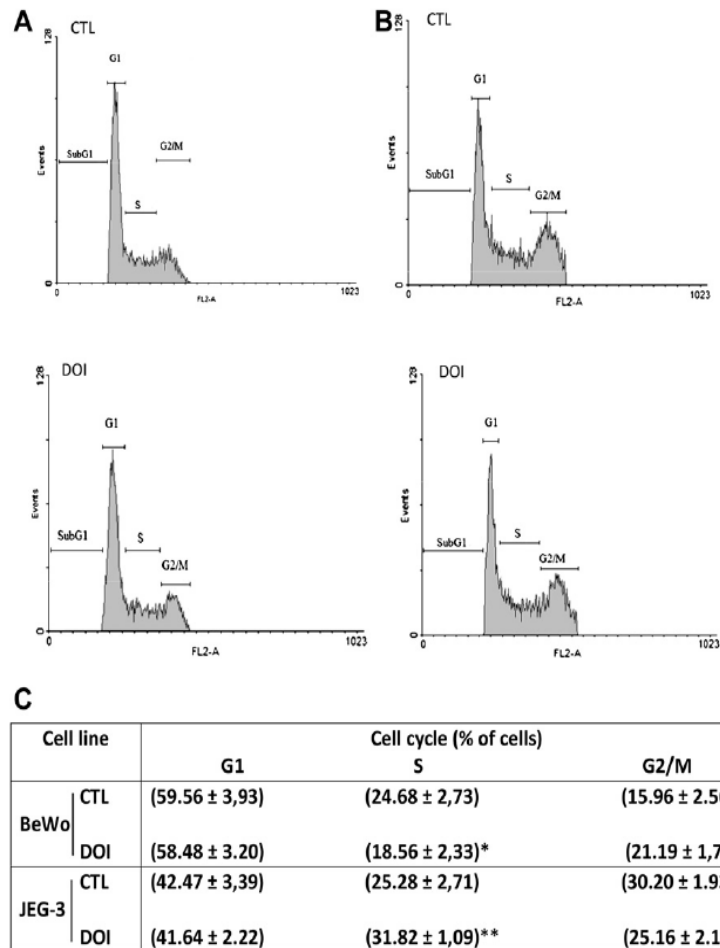


Fig. 2. Effect of DOI on cell cycle distribution of BeWo and JEG-3 cells. Choriocarcinoma cell lines were incubated with (A) 20 μM (BeWo) and (B) 25 μM (JEG-3) DOI for 48 h. Cells were stained for DNA content with propidium iodide. The relative percentage (%) of the cells in each cycle's phase is presented in (C). Each value represents the mean ± SEM from three independent experiments with different cell passages. Statistically significant differences for each cell cycle phase from control (**P* < 0.05, ***P* < 0.01) were determined by Student's *t* test. Y-axis: events or number of cells and X-axis: FL-2A, fluorescence intensity of propidium iodide.

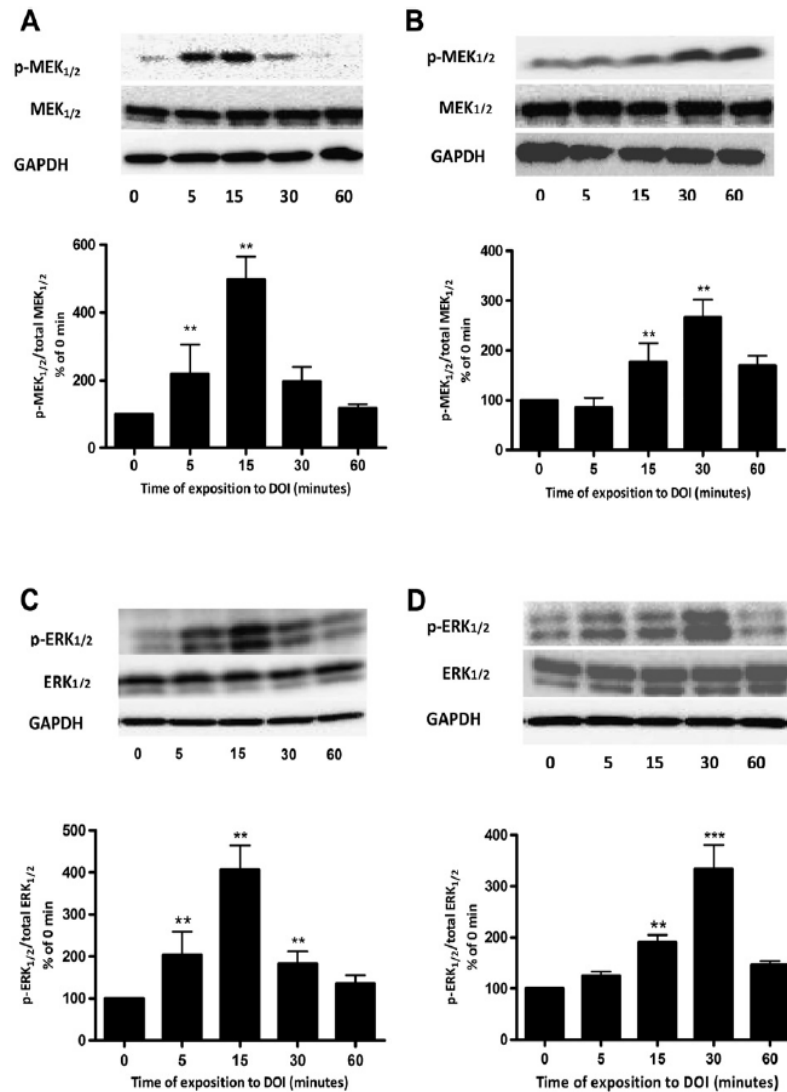


Fig. 3. Effect of DOI on the activation of MEK–ERK1/2 pathway in BeWo and JEG-3 cells. Choriocarcinoma cells were incubated with (A, C) 20 μM (BeWo) and (B, D) 25 μM (JEG-3) DOI for 0, 5, 15, 30 and 60 min. Cells were then lysed, and proteins were separated by SDS-PAGE and immunoblotted with phosphospecific (p-MEK1/2 and p-ERK1/2) and non-phosphospecific (total MEK1/2 and total ERK1/2) antibodies as described in Materials and Methods. The expression of total MEK1/2, total ERK1/2 and GAPDH were analyzed by reprobing the membrane with specific antibody after detection of phosphospecific proteins. The lower panel shows the densitometric analysis of band intensities expressed as the ratio of p-MEK1/2 to MEK1/2 or p-ERK1/2 to ERK1/2, after standardization with GAPDH, relative to the level at 0 min (arbitrarily set at 100%). Densitometric data are average of three independent experiments expressed as mean ± SD. Statistically significant differences vs. 0 min (** $P < 0.001$; *** $P < 0.0001$) were determined by one-way ANOVA followed by a Newman–Keul’s post-hoc test.

[29]. To determine if the placental 5-HT_{2A} receptor activates the G_{q/11} protein we determined by co-immunoprecipitation whether DOI promoted the association of 5-HT_{2A} with G_{q/11}. An increased interaction between the two proteins was observed in both cell lines after stimulation with DOI (Fig. 4). A maximal interaction was observed after 15 min with 20 μM DOI in BeWo (318 ± 11%; $P < 0.001$), and at 30 min with 25 μM DOI in JEG-3 (291 ± 21%; $P < 0.0001$) cells.

3.4. DOI induces the association between 5-HT_{2A} receptor and JAK2 protein in BeWo and JEG-3 cells

As described in smooth muscle [13], another signalling pathway possibly activated by the 5-HT_{2A} receptor in trophoblast-like cells is JAK2–STAT3. To determine whether this occurs in placenta, we first

analyzed by co-immunoprecipitation if DOI promoted the association of 5-HT_{2A} with JAK2. An increased interaction between the two proteins was observed in both cell lines after stimulation with DOI (Fig. 5A and B). A maximal interaction was observed after 15 min with 20 μM DOI (272 ± 45%; $P < 0.05$), and at 30 min with 25 μM DOI in JEG-3 (322 ± 26%; $P < 0.0001$) cells. Furthermore, DOI induced JAK2 phosphorylation in a time-dependent manner, with maximal activation after 15 min with 20 μM DOI in BeWo and at 30 min with 25 μM DOI in JEG-3 cells (Fig. 5C and D). To determine if this interaction was due to increased 5-HT_{2A} or JAK2 expression, the effect of DOI on the expression of these proteins was determined. DOI treatment (0–60 min) had no effect on the expression of the 5-HT_{2A} receptor or JAK2 protein in both cell lines. These results demonstrated that the increased signal observed in Fig. 5 was due to an increased 5-HT_{2A}–JAK2 protein–protein interaction.

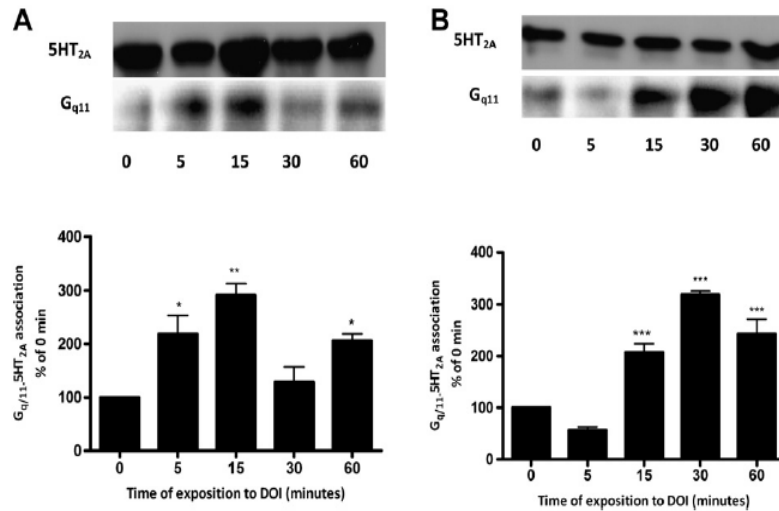


Fig. 4. Effect of DOI on the association between G_{q11} protein and 5-HT_{2A} receptor in BeWo and JEG-3 cells. Choriocarcinoma cells were incubated with (A) 20 μ M (BeWo) and (B) 25 μ M (JEG-3) DOI for 0, 5, 15, 30 and 60 min. Cells were then lysed, and proteins subjected to immunoprecipitation with anti-5-HT_{2A} receptor, separated by SDS-PAGE and then immunoblotted with anti- G_{q11} or anti-5-HT_{2A} receptor as described in Materials and Methods. The expression of 5-HT_{2A} receptor was analyzed by reprobating the membrane after detection of G_{q11} protein. The lower panel shows the densitometric analysis of band intensities expressed as the ratio of G_{q11} to 5-HT_{2A} receptor relative to the level at 0 min (arbitrarily set at 100%). Densitometric data are the average of three independent experiments and are expressed as mean \pm SD. Statistically significant differences vs. 0 min (* P < 0.05; ** P < 0.001; *** P < 0.0001) were determined by one-way ANOVA followed by Newman–Keul’s post-hoc test.

3.5. Activation of the 5-HT_{2A} receptor by DOI induces JAK2–STAT3 phosphorylation in BeWo and JEG-3 cells

Activation of JAK2 by DOI increased its association with p-STAT3 in both cell lines (Fig. 6A and B). The interaction was maximal after 15 min with 20 μ M DOI in BeWo (195 \pm 18%; P < 0.05), and at

30 min with 25 μ M DOI in JEG-3 (230 \pm 15%; P < 0.001) cells. This suggests that 5-HT_{2A} receptor activation induces the phosphorylation of STAT3 proteins in trophoblast cells.

DOI treatment promoted the phosphorylation of STAT3 at tyrosine 705 in both cell lines (Fig. 6C and D). Similar to JAK2, phosphorylation of STAT3 was maximal after 15 min with 20 μ M

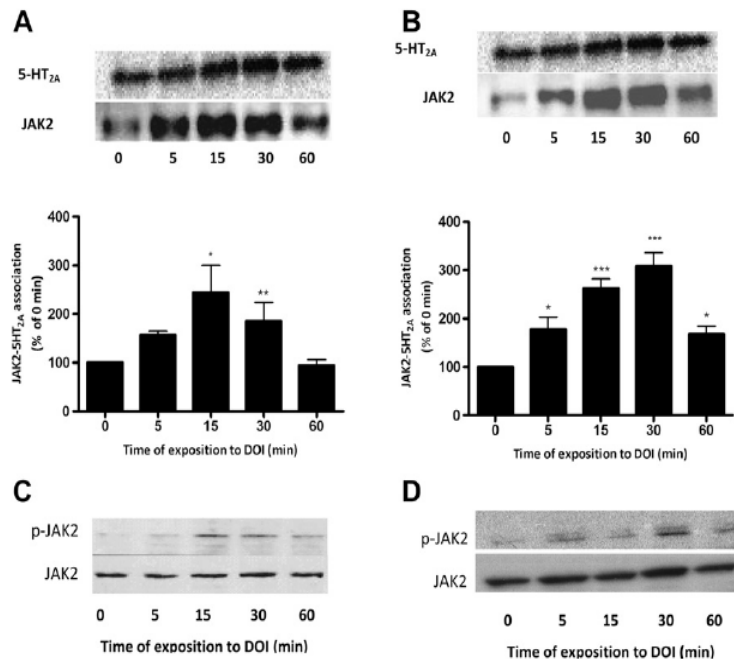


Fig. 5. Effect of DOI on the association between 5-HT_{2A} receptor and JAK2 and on the activation of JAK2 in BeWo and JEG-3 cells. Choriocarcinoma cells were incubated with (A, C) 20 μ M (BeWo) and (B, D) 25 μ M (JEG-3) DOI for 0, 5, 15, 30 and 60 min. Cells were then lysed, and proteins subjected to immunoprecipitation with anti-5-HT_{2A} receptor, separated by SDS-PAGE and then immunoblotted with JAK2 and 5-HT_{2A} receptor antibodies (A, B) or immediately separated by SDS-PAGE and immunoblotted with phospho- and non-phosphospecific JAK2 antibodies (C, D) as described in Materials and Methods. The expression of 5-HT_{2A} receptor (A, B) and JAK2 (C, D) was analyzed by reprobating the membrane after detection of JAK2 and p-JAK2 respectively. The lower panel shows the densitometric analysis of band intensities expressed as the ratio of JAK2 to 5-HT_{2A} receptor, relative to the level at 0 min (arbitrarily set at 100%). Densitometric data are the average of three independent experiments and are expressed as mean \pm SD. Statistically significant differences vs. 0 min (* P < 0.05; *** P < 0.0001) were determined by one-way ANOVA followed by Newman–Keul’s post-hoc test.

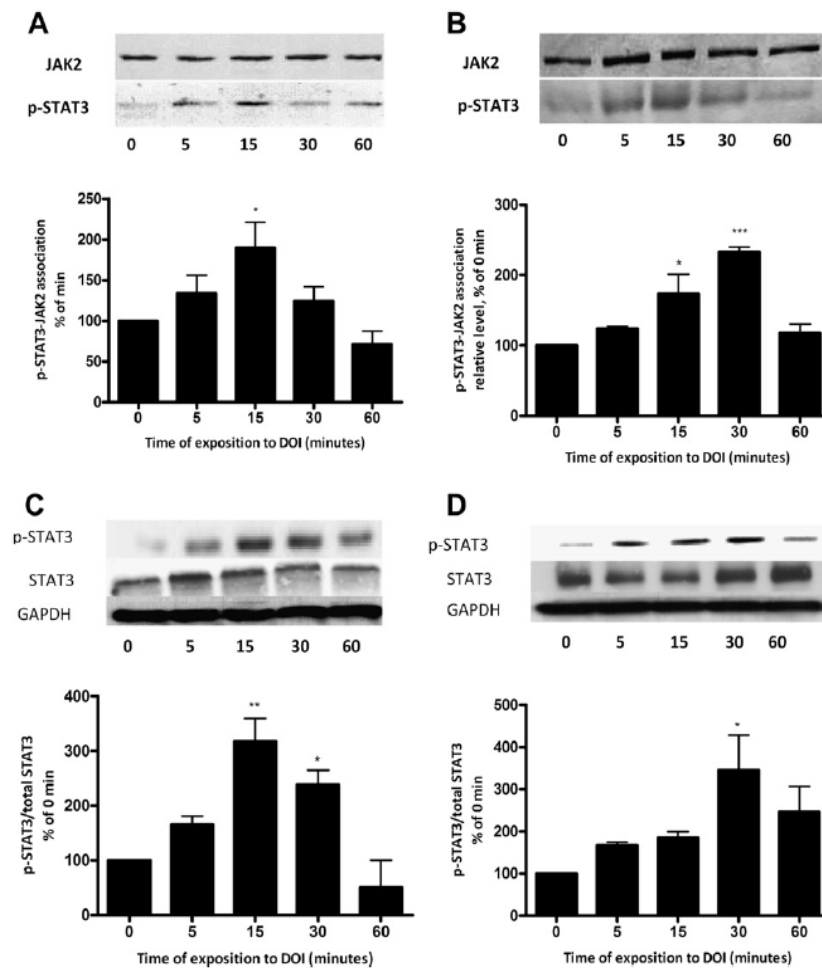


Fig. 6. Effect of DOI on the activation of JAK2–STAT3 in BeWo and JEG-3 cells. Choriocarcinoma cells were incubated with (A, C) 20 μ M (BeWo) and (B, D) 25 μ M (JEG-3) DOI for 0, 5, 15, 30 and 60 min and cells lysed. (A, B) Proteins were subjected to immunoprecipitation with anti-JAK2, separated by SDS-PAGE and then immunoblotted with phosphotyrosine-specific STAT3 (Tyr-705; p-STAT3) and non-phosphospecific JAK2 antibodies as described in Materials and Methods. The expression of JAK2 was analyzed by reprobating the membrane after detection of p-STAT3 (C, D). Proteins were separated by SDS-PAGE and immunoblotted with p-STAT3 and non-phosphospecific STAT3 antibodies as described in Materials and Methods. The expression of total STAT3 was analyzed by reprobating the membrane after detection of p-STAT3. The lower panel shows the densitometric analysis of band intensities expressed as the ratio of p-STAT3 to JAK2 (A, B) or p-STAT3 to STAT3 (C, D), after standardization to GAPDH, relative to the level at 0 min (arbitrarily set at 100%). Densitometric data are the average of three independent experiments and are expressed as mean \pm SD. Statistically significant differences vs. 0 min (* P < 0.05; ** P < 0.001; *** P < 0.0001) were determined by one-way ANOVA followed by Newman–Keuls post-hoc test.

DOI in BeWo ($220 \pm 19\%$; $P < 0.001$), and at 30 min with 25 μ M DOI in JEG-3 ($340 \pm 28\%$; $P < 0.05$) cells and declined thereafter. DOI treatment (0–60 min) had no effect on the expression of STAT3 (non-phosphorylated form) in either cell line, confirming that the increase in tyrosine phosphorylation was not due to increased amounts of STAT3 protein.

4. Discussion

In this study, we have demonstrated that the 5-HT_{2A} receptor improves cell viability, affects cell cycle progression and activates MEK–ERK1/2 and JAK2–STAT3 intracellular signalling pathways in trophoblast cancer cell lines.

Serotonin is known to be a mitogenic biogenic amine. It has been demonstrated that binding of serotonin to its 5-HT_{2A} receptor increases cell proliferation/viability in many cell types [12,14, 30–33]. In accordance with this, we demonstrate here that the mitogenic effect of serotonin we have previously shown in BeWo and JEG-3 cells [7] is directly linked to the 5-HT_{2A} receptor subtype.

Although DOI is known to have some affinity for the 5-HT_{2C} receptor, we have shown that ketanserin, which has 7 times greater affinity for 5-HT_{2A} than 5-HT_{2C}, reversed the effect of DOI and serotonin on cell viability, thus confirming that this effect is 5-HT_{2A} receptor-mediated. The effect of DOI on cell viability in these trophoblast-like cells was absent in cells incubated with serum-supplemented medium (10% instead of 0.5% FBS; data not shown). A similar effect of DOI has been described in MCF-7 cells [33]. It is unclear why the proliferative effect of DOI is only present in cells incubated with culture medium containing very a low concentration of FBS and this phenomenon requires further study.

Progression through the cell cycle determines the rate of proliferation. Thus, to confirm that the effect of DOI we observed in MTT assay was due to an increase in cell proliferation, we evaluated the effect of DOI on the cell cycle of BeWo and JEG-3 cells. Our results showed that DOI increased the number of BeWo and JEG-3 cells in the G2/M phase and S phases, respectively. The observed effect in both cell lines was not a consequence of increased survival or viability but the result of the progression of cell cycle. Interestingly,

cell cycle analysis combined with MTT viability assay showed that DOI induced BeWo cell viability and at the same time decreased the number of cell that underwent DNA synthesis (S phase). The differential effects of DOI on BeWo and JEG-3 cells may reflect certain genetic differences between the cell lines, even though they are both derived from choriocarcinomas. For example, BeWo are able to fuse spontaneously [34] causing a blockade of cell cycle progression, thus counteracting the proliferative effect of DOI. JEG-3 cells, on the other hand, are highly proliferative and invasive and fuse poorly. Cell proliferation is internally regulated by a balance of cell cycle activator and inhibitor proteins. We are currently pursuing detailed studies of the cell cycle to determine which signalling pathways (e.g. cyclins, cyclin kinases...) are involved in the action of DOI on cell cycle progression of BeWo and JEG-3 cells. Cyclins are targeted following ERK1/2 nuclear translocation and appear to be differentially regulated between BeWo and JEG-3.

BeWo and JEG-3 cells possess different characteristics and do not always respond similarly to various physiological or pharmacological stimuli. One study showed that insulin treatment increased the expression of endothelin-B receptor in BeWo cells, but decreased it in JEG-3 [35]. Another study showed that in BeWo cells, increased invasion was associated with a decrease in cell differentiation, whereas in JEG-3 cells the opposite occurred [36]. Those findings are in agreement with our results showing differential concentration- and time-courses for DOI-induced cell proliferation and activation of signalling cascades in the two cell lines. The greater mitogenic effect of DOI in BeWo than in JEG-3 cells may be explained by a higher density of 5-HT_{2A} receptors in BeWo cells. Binding studies could verify this hypothesis.

Our study has demonstrated that 5-HT_{2A} receptor activation by DOI stimulates MEK1/2 and ERK1/2 phosphorylation in both trophoblast-like cell lines. Previous studies have demonstrated the involvement of PKC in 5-HT_{2A} receptor activation of ERK1/2 [30,31]. As with the activation of MEK1/2 and ERK1/2, DOI promotes the interaction between 5-HT_{2A} and G_{q/11} in both cell lines, suggesting that the placental 5-HT_{2A} receptor activates MEK1/2–ERK1/2 through the G_{q/11}-PLC-β-PKC-Ras signalling pathway. The activation of the MEK1/2–ERK1/2 pathway by the 5-HT_{2A} receptor could also be the result of a PLC-PKC-independent mechanism, such as the activation of calmodulin, Src, phosphoinositide-3 kinase (PI3K), or the epidermal growth factor (EGF) receptor tyrosine kinase [32,37,38]. This remains open to further investigation.

The ERK1/2 signalling pathway has been shown to induce villous trophoblast cell differentiation [21,22], and extra-villous trophoblast migration [25,26]. Our present study suggests that the 5-HT_{2A} receptor is involved in trophoblast development (invasion/migration, proliferation, and differentiation) through activation of the ERK1/2 signalling pathway.

The JAK2–STAT3 signalling cascade has been reported to be coupled to the 5-HT_{2A} receptor in skeletal muscles [13]. We have presently demonstrated in BeWo and JEG-3 cells that 5-HT_{2A} receptor activation increases the association between JAK2 and STAT3 leading to the phosphorylation of STAT3 on tyrosine 705. 5-HT_{2A} receptor activation by DOI also increased the phosphorylation of JAK2. For the immunoprecipitation with JAK2, we used an antibody that recognized total JAK2 (non- and phosphorylated) [39]. Thus, these results reflect the association of p-JAK2 with STAT3, since only p-JAK2 would be able to interact with and activate STAT3. The phosphorylation of this conserved C-terminal tyrosine is required for STAT3 dimerization and translocation to the nucleus where it binds to target DNA sequences. Genes regulated by STAT3 include anti-apoptotic and proliferation-associated genes such as Bcl-xL, Bcl-2, Fas, cyclin D1, survivin, and c-Myc [40]. In addition, STAT3 has been found to induce angiogenesis, and increase cell migration and invasion [41]. Our findings suggest that serotonin

may regulate trophoblast development (invasion/migration, proliferation, and apoptosis) through activation of STAT3. In support of this, it has been shown that STAT3 activation plays a crucial role in the invasive phenotype of trophoblast cells [23] and correlates with choriocarcinoma cell invasiveness [24]. The activation of JAK2–STAT3 by the 5-HT_{2A} receptor also appears to be involved in myogenic differentiation in rat fetal myoblast cells [13].

The MAPK signalling pathway has also been shown to interact with STAT [42]. JAK2 phosphorylates STAT3 on tyrosine leading to dimerization and nuclear localization, whereas MAPK phosphorylates STAT3 on serine 727, leading to maximal transcriptional activation of STAT3 [42]. Given that serotonin through its 5-HT_{2A} receptor activates the MAPK pathway, STATs and MAPK may cooperate in mediating the proliferative response of BeWo and JEG-3 cells to 5-HT_{2A} receptor agonists, although this remains to be studied.

The results of this study are important for a better understanding of placental health and pregnancy well-being. A number of studies suggest that serotonin might be implicated in placental development and function. We recently showed a decrease in both 5-HT_{2A} receptor and serotonin transporter expression in human placental tissues from gestational diabetes vs. normal pregnancy [8]. Moreover, it has been suggested that serotonin may play a crucial role in preeclampsia and ketanserin has been described as a drug that appears to be tailored for treating pregnancy-induced hypertensive disorders [43,44], suggesting a role for serotonin and its 5-HT_{2A} receptor in the pathophysiology of these diseases. For example, several studies have emphasized the importance of trophoblast homeostasis in pregnancy health. Specifically, alterations in trophoblast development (differentiation, invasion, proliferation, apoptosis) are associated with pregnancy disorders, such as preeclampsia, gestational diabetes, intrauterine growth restriction and preterm birth [45]. It is important to better understand the mechanisms of 5-HT_{2A} receptor function in the trophoblast cell processes, in order to identify its role in placental function, fetal development and pregnancy well-being.

In summary, this study demonstrated that 5-HT_{2A} receptor improves cell viability and affect cell cycle progression in human choriocarcinoma cell lines and represents the first report that the activation of the 5-HT_{2A} receptor in trophoblast cells activates intracellular signal, MEK–ERK1/2 and JAK2–STAT3 pathways, that can be related to survival, differentiation, migration and invasion. These findings suggest that serotonin through the activation of the 5-HT_{2A} receptor may be an important regulator of placentation and play a role in the pathophysiology of pregnancy disorders associated with alterations in placental development, such as preeclampsia, gestational diabetes and preterm birth. Further studies are necessary to better understand and characterize the signal transduction pathways initiated by serotonin via its placental 5-HT_{2A} receptor and their role in regulating human placentation.

Acknowledgements

This study was financed by a Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) grant to C Vaillancourt (262011) and a Canadian Institutes of Health Research (CIHR) grant to JT Sanderson and C. Vaillancourt (IGO 93972) as well as an NSERC studentship to M. Arseneault.

References

- [1] Jonnakuty C, Gragnoli C. What do we know about serotonin? *J Cell Physiol* 2008;217:301–6.
- [2] Azmitia EC. Serotonin neurons, neuroplasticity, and homeostasis of neural tissue. *Neuropsychopharmacology* 1999;21:335–455.
- [3] Buznikov GA, Lambert HW, Lauder JM. Serotonin and serotonin-like substances as regulators of early embryogenesis and morphogenesis. *Cell Tissue Res* 2001;305:177–86.

- [14] Cote F, Fligny C, Bayard E, Launay JM, Gershon MD, Mallet J, et al. Maternal serotonin is crucial for murine embryonic development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:329–34.
- [15] Bolte AC, van Geijn HP, Dekker GA. Pathophysiology of preeclampsia and the role of serotonin. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001;95:12–21.
- [16] Radenkovic M, Radunovic N, Momcilov P, Grbovic L. Altered response of human umbilical artery to 5-HT in gestational diabetic pregnancy. *Pharmacol Rep* 2009;61:520–8.
- [17] Sonier B, Lavigne C, Arseneault M, Ouellette R, Vaillancourt C. Expression of the 5-HT_{2A} serotonergic receptor in human placenta and choriocarcinoma cells: mitogenic implications of serotonin. *Placenta* 2005;26:484–90.
- [18] Viau M, Lafond J, Vaillancourt C. Expression of placental serotonin transporter and 5-HT_{2A} receptor in normal and gestational diabetes mellitus pregnancies. *Reprod Biomed Online* 2009;19:207–15.
- [19] Huang WQ, Zhang CL, Di XY, Zhang RQ. Studies on the localization of 5-hydroxytryptamine and its receptors in human placenta. *Placenta* 1998;19:655–61.
- [20] Bottalico B, Larsson I, Brodzski J, Hernandez-Andrade E, Casslen B, Marsal K, et al. Norepinephrine Transporter (NET), Serotonin Transporter (SERT), Vesicular Monoamine Transporter (VMAT2) and Organic Cation Transporters (OCT1, 2 and EMT) in human placenta from pre-eclamptic and normotensive pregnancies. *Placenta* 2004;25:518–29.
- [21] Hoyer D, Hannon JP, Martin GR. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 2002;71:533–54.
- [22] Nebigil CG, Garnovskaya MN, Spurney RF, Raymond JR. Identification of a rat glomerular mesangial cell mitogenic 5-HT_{2A} receptor. *Am J Physiol* 1995;268(1 Pt 2):F122–7.
- [23] Guillet-Deniau I, Burnol AF, Girard J. Identification and localization of a skeletal muscle serotonin 5-HT_{2A} receptor coupled to the Jak/STAT pathway. *J Biol Chem* 1997;272:14825–9.
- [24] Banes AKL, Shaw SM, Tawfik A, Patel BP, Ogbi S, Fulton D, et al. Activation of the JAK/STAT pathway in vascular smooth muscle by serotonin. *Am J Physiol* 2005;288:C805–12.
- [25] Azmitia EC. Modern views on an ancient chemical: serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis. *Brain Res Bull* 2001;56:413–24.
- [26] Watts SW, Yang P, Banes AK, Baez M. Activation of Erk mitogen-activated protein kinase proteins by vascular serotonin receptors. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001;38:539–51.
- [27] Liebmann C. Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathway: paradigms of multiplicity. *Cell Signal* 2001;13:777–85.
- [28] Imada K, Leonard WJ. The Jak–STAT pathway. *Mol Immunol* 2000;37:1–11.
- [29] Forbes K, Westwood M, Baker PN, Aplin JD. Insulin-like growth factor I and II regulate the life cycle of trophoblast in the developing human placenta. *Am J Physiol* 2008;294:C1313–22.
- [30] Marino VJ, Roguin LP. The granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) activates Jak/STAT and MAPK pathways in a trophoblastic cell line. *J Cell Biochem* 2008;103:1512–23.
- [31] Daoud G, Amyot M, Rassart E, Masse A, Simoneau L, Lafond J. ERK1/2 and p38 regulate trophoblasts differentiation in human term placenta. *J Physiol* 2005;566:409–23.
- [32] Vaillancourt C, Lanoix D, Le Bellego F, Daoud G, Lafond J. Involvement of MAPK signalling in human villous trophoblast differentiation. *Mini Rev Med Chem* 2009;9:962–73.
- [33] Poehlmann TG, Fitzgerald JS, Meissner A, Wengenmayer T, Schleussner E, Friedrich K, et al. Trophoblast invasion: tuning through LIF, signalling via Stat3. *Placenta* 2005;26(Suppl. A):S37–41.
- [34] Corvinus FM, Fitzgerald JS, Friedrich K, Markert UR. Evidence for a correlation between trophoblast invasiveness and STAT3 activity. *Am J Reprod Immunol* 2003;50:316–21.
- [35] Chakraborty C, Gleeson LM, McKinnon T, Lala PK. Regulation of human trophoblast migration and invasiveness. *Can J Physiol Pharmacol* 2002;80:116–24.
- [36] Prast J, Saleh L, Husslein H, Sonderegger S, Helmer H, Knofler M. Human chorionic gonadotropin stimulates trophoblast invasion through extracellularly regulated kinase and AKT signaling. *Endocrinology* 2008;149:979–87.
- [37] Rozengurt E. Mitogenic signaling pathways induced by G protein-coupled receptors. *J Cell Physiol* 2007;213:589–602.
- [38] Naor Z, Benard O, Seger R. Activation of MAPK cascades by G-protein-coupled receptors: the case of gonadotropin-releasing hormone receptor. *Trends Endocrinol Metab* 2000;11:91–9.
- [39] Raymond JR, Mukhin YV, Gelasco A, Turner J, Collinsworth G, Gettys TW, et al. Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. *Pharmacol Ther* 2001;92:179–212.
- [40] Greene EL, Houghton O, Collinsworth G, Garnovskaya MN, Nagai T, Sajjad T, et al. 5-HT(2A) receptors stimulate mitogen-activated protein kinase via H(2)O(2) generation in rat renal mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000;278:F650–8.
- [41] Grewal JS, Mukhin YV, Garnovskaya MN, Raymond JR, Greene EL. Serotonin 5-HT_{2A} receptor induces TGF-beta1 expression in mesangial cells via ERK: proliferative and fibrotic signals. *Am J Physiol* 1999;276:F922–30.
- [42] Watts SW. Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway via the 5-HT_{2A} receptor. *Ann N Y Acad Sci* 1998;861:162–8.
- [43] Sonier B, Arseneault M, Lavigne C, Ouellette RJ, Vaillancourt C. The 5-HT_{2A} serotonergic receptor is expressed in the MCF-7 human breast cancer cell line and reveals a mitogenic effect of serotonin. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;343:1053–9.
- [44] Mounier C, Barbeau B, Vaillancourt C, Lafond J. Endocrinology and cell signaling in human villous trophoblast. *Methods Mol Biol* 2009;550:89–102.
- [45] Bilban M, Barth S, Cervar M, Mauschitz R, Schaur RJ, Zivkovic F, et al. Differential regulation of endothelin secretion and endothelin receptor mRNA levels in JAR, JEG-3, and BeWo choriocarcinoma cell lines and in human trophoblasts, their nonmalignant counterpart. *Arch Biochem Biophys* 2000;382:245–52.
- [46] Hohn HP, Linke M, Ugele B, Denker HW. Differentiation markers and invasiveness: discordant regulation in normal trophoblast and choriocarcinoma cells. *Exp Cell Res* 1998;244:249–58.
- [47] Quinn JC, Johnson-Farley NN, Yoon J, Cowen DS. Activation of extracellular-regulated kinase by 5-hydroxytryptamine(2A) receptors in PC12 cells is protein kinase C-independent and requires calmodulin and tyrosine kinases. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;303:746–52.
- [48] Banes A, Florian JA, Watts SW. Mechanisms of 5-hydroxytryptamine(2A) receptor activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;291:1179–87.
- [49] Thompson BR, Mazurkiewicz-Munoz AM, Suttles J, Carter-Su C, Bernlohr DA. Interaction of adipocyte fatty acid-binding protein (AFABP) and JAK2: AFABP/aP2 as a regulator of JAK2 signaling. *J Biol Chem* 2009;284:13473–80.
- [50] Bromberg J. Stat proteins and oncogenesis. *J Clin Invest* 2002;109:1139–42.
- [51] Yu H, Kortylewski M, Pardoll D. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol* 2007;7:41–51.
- [52] Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R. STATs in oncogenesis. *Oncogene* 2000;19:2474–88.
- [53] Bolte AC, van Eyck J, Gaffar SF, van Geijn HP, Dekker GA. Ketanserin for the treatment of preeclampsia. *J Perinat Med* 2001;29:14–22.
- [54] Weiner CP, Socol ML, Vaisrub N. Control of preeclamptic hypertension by ketanserin, a new serotonin receptor antagonist. *Am J Obstet Gynecol* 1984;149:496–500.
- [55] Regnault TRH, Galan HL, Parker TA, Anthony RV. Placental development in normal and compromised pregnancies – a review. *Placenta* 2002;23:5119–29.

II- CHAPITRE 2

PHOSPHORYLATION OF JAK2 BY SEROTONIN 5-HT_{2A} RECEPTOR ACTIVATES BOTH STAT3 AND ERK1/2 PATHWAYS AND INCREASES GROWTH OF JEG-3 HUMAN PLACENTAL CHORIOCARCINOMA CELL

Talal Oufkir and Cathy Vaillancourt

Placenta 2011, 32:1033-1040

Résumé de l'article en français

Dans l'article précédent nous avons démontré que l'activation spécifique des récepteurs 5-HT_{2A} stimule la prolifération des cellules trophoblastiques JEG-3 et active les voies de signalisation JAK2/STAT3 et MEK/ERK1/2. Ces récepteurs couplés à une protéine de type G_{q/11} sont connus pour stimuler les voie de transduction du signal impliquant la phospholipase C-β (PLCβ) et la protéine kinase C (PKC). Une activation aberrante de ces deux voies de signalisation est impliquée dans plusieurs cancers. Le but de cette étude est de 1) déterminer l'implication des voies JAK2/STAT3 et MEK/ERK1/2 dans le pouvoir mitogène des récepteurs 5-HT_{2A} sur la prolifération des cellules trophoblastiques JEG-3 et 2) caractériser les différents effecteurs impliqués dans la prolifération des cellules JEG-3 et dans l'activation de la protéine ERK1/2. Les résultats démontrent que les voies de signalisation PLC-β/PKC/ERK1/2 et JAK2/STAT3 sont impliquées dans l'effet mitogénique du DOI sur les cellules JEG-3. De plus, les résultats montrent que l'activation de la voie de signalisation ERK1/2 se fait via l'axe PLC-β/PKC et nécessite la phosphorylation préalable de la protéine JAK2. En conclusion, cette étude démontre le rôle du récepteur 5-HT_{2A} dans la régulation de la fonction proliférative trophoblastique. Cet effet mitogénique se fait principalement via la modulation des voies de signalisation JAK2/STAT3 et MEK/ERK1/2 et l'activation des effecteurs dépendants du calcium ; la PLC et la PKC. Cette étude démontre également le rôle important de l'interaction entre les voies de signalisation JAK2/STAT3 et MEK/ERK1/2 dans la médiation de l'effet prolifératif du récepteur 5-HT_{2A} sur le trophoblaste humain.

Contribution de l'étudiant

L'étudiant a réalisé toutes les expériences et analysé les résultats dans cet article. Il a également rédigé l'article, participé au choix du journal de publication et aux corrections pour la soumission de la version finale de cet article.

ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

May 18, 2013

This is a License Agreement between oufkir talal ("You") and Elsevier ("Elsevier") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Elsevier, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

Supplier	Elsevier Limited The Boulevard, Langford Lane Kidlington, Oxford, OX5 1GB, UK
Registered Company Number	1982084
Customer name	oufkir talal
Customer address	11 RUE DU quinconce PARIS, None 77200
License number	3151960350447
License date	May 18, 2013
Licensed content publisher	Elsevier
Licensed content publication	Placenta
Licensed content title	Phosphorylation of JAK2 by serotonin 5-HT2A receptor activates both STAT3 and ERK1/2 pathways and increases growth of JEG-3 human placental choriocarcinoma cell
Licensed content author	T. Oufkir, C. Vaillancourt
Licensed content date	December 2011
Licensed content volume number	32
Licensed content issue number	12
Number of pages	8
Start Page	1033
End Page	1040
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	full article
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	Yes
Will you be translating?	No
Order reference number	None
Title of your thesis/dissertation	5-H2A receptors and trophoblast invasion
Expected completion date	Nov 2013
Estimated size (number of pages)	235
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Permissions price	0.00 EUR
VAT/Local Sales Tax	0.0 USD / 0.0 GBP
Total	0.00 EUR



Phosphorylation of JAK2 by serotonin 5-HT_{2A} receptor activates both STAT3 and ERK1/2 pathways and increases growth of JEG-3 human placental choriocarcinoma cell

T. Oufkir, C. Vaillancourt*

INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531 boul. des Prairies, Building 18, Laval, QC, Canada H7V 1B7

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 14 September 2011

Keywords:

5-HT_{2A} receptor
Serotonin
Cell signalling
Mitogen-activated kinase (MAPK)
phospholipase C (PLC)
Protein kinase C (PKC)
Janus kinase (JAK)

ABSTRACT

Serotonin 5-HT_{2A} receptor activation improves viability, increases DNA synthesis and activates JAK2-STAT3 and MEK1/2-ERK1/2 signalling pathways in JEG-3 human trophoblast choriocarcinoma cells. The goal of this study was to characterize the signal transduction cascade involved in 5-HT_{2A} receptor-induced growth of JEG-3 cells. Selective 5-HT_{2A} receptor agonist, DOI, induced JEG-3 cell growth was inhibited by the inhibitor of JAK2 (AG490), MEK1/2 (U0126), phospholipase C-β (PLC-β; U73122) and protein kinase C-β (PKC-β; G66976), whereas the selective phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitor (LY294002) had no effect. Specific inhibitors of PLC-β, PKC-β and Ras (farnesylthiosalicylic acid) inhibit activation of ERK1/2, whereas the PKC-ζ inhibitor GF109203X had no effect. Interestingly, inhibition of JAK2 prevented DOI-induced phosphorylation of ERK1/2 whereas inhibition of ERK1/2 pathway had no effect on DOI-induced activation of STAT3. Taken together, our results demonstrate that both the JAK2-STAT3 and PLC-β-PKC-β-Ras-ERK1/2 signalling pathways are involved in the stimulation of JEG-3 cell growth mediated by DOI. Moreover, this study shows that activation of JAK2 by the 5-HT_{2A} receptor is essential to activate both STAT3 and ERK1/2 signalling pathways as well as to increase JEG-3 choriocarcinoma cell growth and survival.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Accumulating evidence shows that serotonin (5-hydroxytryptamine 5-HT) regulates cell growth. Serotonin promotes cell growth through various receptor-mediated pathways, in particular via the 5-HT_{2A} receptor [1–5]. The 5-HT_{2A} receptor has been described as a mitogenic receptor in various cell types, particularly in skeletal and smooth muscle [5], mesangial [4], breast cancer [2] and choriocarcinoma cells [6].

The 5-HT_{2A} seven-transmembrane receptor is widely distributed in peripheral tissues [7] and is known to be coupled to G_{αq}, and to activate phospholipase C (PLC) and protein kinase C (PKC) signalling pathway [8]. However, studies have reported JAK2-STAT3 as another pathway activated by 5-HT_{2A} receptor [1,6,9]. The 5-HT_{2A} receptor can activate at least two mitogenic pathways, JAK2-STAT3 and PKC-Ras-Raf-1-MAPK (mitogen-activated protein kinase) in several cell types (reviewed in Refs. [10,11]). Several studies suggest

that placenta may produce and act as target organ for serotonin [12–14].

A successful pregnancy requires normal placental development, a complex process in which growth of trophoblast cells is one of several critical events. Abnormal growth of trophoblast cells leads to gestational trophoblastic diseases, such as hydatidiform mole or event choriocarcinoma [15]. Thus, it is essential to understand the molecular mechanisms that control correct trophoblast cell growth. Human choriocarcinoma cell lines represent an excellent model to study trophoblast development (growth, proliferation, differentiation and invasion) and its auto, para- and endocrine functions [16,17]. These placental cell lines with malignant phenotypes have also been used to study epithelial tumour progression and to identify molecular and genetic changes responsible for phenotypic changes during trophoblastic tumour progression [18].

Studies from our laboratory have demonstrated that JEG-3 cell expresses the 5-HT_{2A} receptor [3,19]. We recently reported that (±)-2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine hydrochloride (DOI), a selective 5-HT_{2A} receptor agonist, stimulated JEG-3 cell viability and growth as well as the JAK2-STAT3 and MEK1/2-ERK1/2 signalling pathways [6]. However, the mechanism by which activation

* Corresponding author. Tel.: +1 450 687 5010 (8812); fax: +1 450 686 5309.
E-mail address: cathy.vaillancourt@iaf.inrs.ca (C. Vaillancourt).

of the placental 5-HT_{2A} receptor increased JEG-3 cells growth has never been studied. To goal of the present study is to gain insight into the signal transduction cascade involved in 5-HT_{2A} receptor-induced growth of JEG-3 cells.

2. Materials and methods

2.1. Pharmacological compounds/chemicals

DOI, AG490, LY294002 and Wortmannin were purchased from Sigma–Aldrich (St-Louis, MO). G66976, GF109203X, U73122, U0126, farnesylthiosalicylic acid (FTS) were purchased from Tocris Cookson Inc. (Ellisville, MO). All stock solutions were made in dimethyl sulfoxide (DMSO). Further dilutions were made fresh on the experimental day and the final concentration of DMSO was <0.1%.

2.2. Cell culture

JEG-3 choriocarcinoma cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD) and maintained in MEM Eagle (Sigma–Aldrich) containing 10% fetal bovine serum (FBS; Hyclone Laboratories, Logan, UT), 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 100 U/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin. Cells were cultured in 75 cm² cell culture flasks (Corning, Lowell, MA) in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37 °C. Cells underwent a passage into new flasks when they reached about 90% confluence, using 0.5% trypsin–0.2% EDTA.

2.3. Cell growth assay

The effects of pharmacological compounds treatment on cell growth were determined in 96-well plates (5 × 10³ cells/well in 100 μl) using a WST-1 assay kit (Roche Diagnostics, Laval, QC). After culture under low serum conditions for 24 h (0.5% FBS), cells were pre-treated for 1 h with selective cell signalling pathways inhibitors diluted in fresh medium containing 0.5% FBS after which 25 μM of DOI was added as previously described [6]. Culture medium was removed after 48 h of incubation at 37 °C in 5% CO₂ and 10 μl WST-1 reagent added to 100 μl of fresh culture medium containing 0.5% FBS. Cells were incubated for 4 h at 37 °C in 5% CO₂ and then absorbance was measured spectrophotometrically at a wavelength of 480 nm (with a reference wavelength of 650 nm) using a SpectraMax M5 with SoftMax Pro v5 software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Each assay included blank (culture medium without cells) and vehicle control (cell exposed to 0.1% DMSO) wells. Cell growth (% of control) was expressed using the following formula: $(A_{(480\text{ nm}-650\text{ nm})} \text{ of each treated wells} / \text{mean } A_{(480\text{ nm}-650\text{ nm})} \text{ of control wells}) \times 100$.

2.4. Western blot analysis

JEG-3 cells were cultured in 25-cm² Flask (Corning) at a density of 2.5 × 10⁵ cells in complete growth medium for 12 h. After 24 h of culture in medium containing 0.5% FBS, cells were pre-treated for 1 h with selective cell signalling pathways inhibitors diluted in fresh medium containing 0.5% FBS after which they were exposed to 25 μM of DOI for 30 min. Then total protein was extracted as previously described [6]. Briefly, cells were washed with cold PBS, harvested by scraping in 500 μL of cold lysis buffer (50 mM Tris–HCl pH 7.4, 175 mM NaCl, 1 mM EDTA) containing Protease Inhibitor Cocktail (Sigma–Aldrich) and Phosphatase Halt™ Inhibitor Cocktail (Sigma–Aldrich) at final concentration of 100 μg/mL. Lysates were gently agitated on ice for 30 min and then centrifuged at 21 000 × g for 15 min at 4 °C. Total proteins were stored at –80 °C until analysed. Protein concentrations were measured using a bicinchoninic acid assay (BCA) kit with bovine serum albumin (BSA) (Pierce, Rockford, IL) as standard according to enclosed instructions.

Total protein extracts were denatured at 95 °C for 10 min and fractionated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) on 4% stacking and 10% separating gels, followed by transfer to PVDF membranes (Millipore, Mississauga, ON). The membranes were blocked in TBS-T (20 mM Tris–HCl, pH 7.4; 150 mM NaCl; 0.05% (v/v) Tween 20) containing 5% skim milk for 1 h at room temperature. Membranes were incubated with phosphospecific antibodies against pERK1/2 (1:250), pSTAT3 (1:500) or pAKT/PKB (1:1000) diluted in TBS-T containing 5% skim milk. Membranes were quickly washed three times with TBS containing 0.1% Tween 20 and then incubated with horseradish peroxidase conjugated anti-rabbit IgG or anti-mouse IgG secondary antibodies at room temperature and then washed 3 times with TBS-T. Bands were visualized with Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) and their intensities quantified by densitometric analysis using FluorChem HD2 software version 6.0 (Alpha Innotech, San Leandro, CA). The PVDF membranes were stripped with Re-Blot plus Mild solution (Millipore) at room temperature for 15 min, washed twice for 5 min with TBS-T, and quickly rinsed 5 times in water before reprobing with antibodies against the non-phosphorylated proteins (i.e. total protein). All antibodies were purchased from Upstate (Millipore) except anti-pAKT-PKB, which was obtained from Cell Signalling Technology (Beverly, MA).

2.5. Statistical analysis

All data were presented as means ± SEM of at least three separate experiments from different cell passages. For the WST-1 assays statistically significant differences were determined by Student *t*-test and for Western blot analyses by one-way ANOVA followed by Tukey–Kramer's test using GraphPad Prism version 5.03 (San Diego, CA). A probability value of *P* < 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Inhibition of JAK2 and MEK1/2 phosphorylation abolishes DOI-induced JEG-3 cell growth

We previously showed that DOI activates the JAK2-STAT3 and MEK1/2-ERK1/2 signalling pathways and increases growth in choriocarcinoma cell lines [6]. To investigate the direct involvement of these signalling pathways in 5-HT_{2A} receptor-mediated induction of placental choriocarcinoma cell growth, the effect of selective pharmacological inhibitors of MEK1/2 (U0126) and JAK2 (AG490) were determined in DOI-stimulated JEG-3 cells. A concentration range of 10–50 μM for U0126 and 10–100 μM for AG490 was used to determine the optimum concentration that inhibit DOI-induced JEG-3 cell growth without causing cytotoxicity (not shown). In the presence of 25 μM U0126 and 30 μM AG490, the growth response of JEG-3 cells to 25 μM DOI was fully inhibited (Fig. 1A and B).

3.2. Inhibition of PLC-β or PKC-β activation prevents DOI-induced JEG-3 cells growth

To test whether the proliferative effect of DOI on JEG-3 cells requires PLC-β and/or PKC-β activation, cells were treated with increasing concentrations (100 nM–1 μM) of U73122 or G66976 (250 nM–1 μM), selective inhibitors of PLC-β and PKC-β, respectively, to determine a maximal inhibitory concentration (not shown). U73122 at concentration of 560 nM completely blocked DOI-stimulated JEG-3 cell growth, whereas G66976 at concentration of 250 nM partially reversed the effect of DOI on JEG-3 cells (Fig. 1C and D).

3.3. DOI activates the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-AKT pathway, yet inhibition of PI3K phosphorylation has no effect on DOI-induced JEG-3 cell growth

We further examined the phosphorylation of AKT (also called protein kinase B) after stimulation of with 25 μM of DOI for various durations (0–60 min). DOI increased AKT phosphorylation in a time-dependent manner, reaching maximal activation at 30 min (Fig. 2A). The selective PI3K inhibitors LY294002 (10 μM) and Wortmannin (200 nM), fully abolished the activation of AKT by DOI without an effect on expression levels of total AKT (Fig. 2B). The PI3K inhibitor LY294002 (10 μM) had no effect on DOI-induced JEG-3 cell growth (Fig. 2C).

3.4. Selective inhibitors of PLC-β, PKC-β or Ras inhibit DOI-induced phosphorylation of ERK1/2 in JEG-3 cells

The PLC-β inhibitor U73122 inhibited DOI-induced ERK1/2 phosphorylation concentration-dependently, resulting in a 55% and 100% significant reduction at 2 and 4 μM, respectively (Fig. 3A). The selective PKC-β inhibitor G66976 [20] at 0.25 μM significantly decreased DOI-mediated ERK1/2 activation by 75% (Fig. 3), whereas the selective PKC-ζ inhibitor GF109203X (also known as G66850 or bisindolylmaleimide 1) [21] had no effect (Supplement 1). None of the treatments affected the expression of total ERK1/2. At 0.25 μM, G66976 falls within the reported nanomolar concentration range inhibiting PKC in mesenteric arteries (0.3 μM) [22]. Our data also

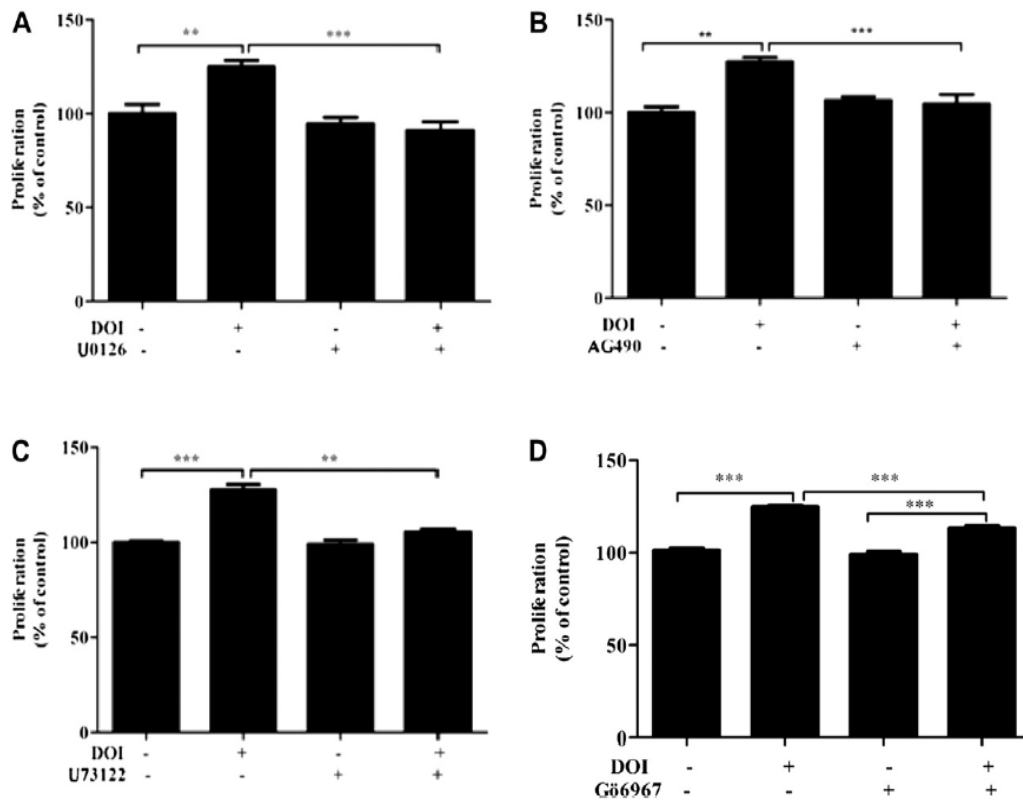


Fig. 1. Effect of JAK2, MEK1/2, PLC- β and PKC- β inhibitor on DOI-induced JEG-3 cell growth. Cells were pre-treated for 1 h with (A) MEK1/2 (25 μ M U0126); (B) JAK2 (30 μ M AG490); (C) PLC- β (560 nM U73122) or (D) PKC- β (250 nM Gö6967) inhibitors before exposure to 25 μ M DOI for 48 h. Cell growth was determined by WST-1 assay as described in experimental procedures. Effect of DOI +/- inhibitors on JEG-3 cells proliferation is expressed as the percentage of cell growth compared to control non-treated cells (at which growth is considered 100%). Results show that activation JAK2, PLC- β , PKC- β and MEK1/2 involved in DOI-induced JEG-3 cell proliferation. These results represent the mean (\pm SEM) values obtained from at least three different assays (with three different cell passages) each comprising quadruplicate. The coefficient of variation is less than 10%. Statistically significant differences (* P > 0.05; ** P > 0.01; *** P > 0.001) were determined by Student *t*-test.

demonstrated that GF109203X which is known to inhibit PKC ζ in the lower micromolar range (IC_{50} = 5 μ M) had no effect on ERK1/2 activation within the concentration range used. This is in good agreement with our observation that PKC- ζ does not appear to be involved in 5-HT $_2A$ receptor-induced JEG-3 proliferation (data not shown). The selective Ras inhibitor FTS, completely reduced DOI-stimulated ERK1/2 phosphorylation at 10 μ M and 50 μ M, without affecting total ERK1/2 expression (Fig. 3B).

3.5. Phosphorylation of JAK2 is required for ERK1/2 phosphorylation by DOI in JEG-3 cells

U0126 selectively inhibited DOI-induced ERK1/2 phosphorylation with no effect on DOI-induced STAT3 phosphorylation on Tyr705 (Fig. 4A and B). Interestingly, treatment of JEG-3 cells with 30 μ M of AG490 blocked completely the DOI-induced phosphorylation of ERK1/2 without affecting total ERK1/2 expression (Fig. 4B) and decreased JAK2-mediated phosphorylation of STAT3 on Tyr705, as expected (Fig. 4B).

4. Discussion

Our previous study showed that the 5-HT $_2A$ receptor agonist DOI increased DNA synthesis (S phase of cell cycle) and had no effect on apoptosis in JEG-3 cells [6]. Here we show that both the JAK2-STAT3 and PLC β -PKC- β -Ras-ERK1/2 signalling pathways are involved in the stimulation of JEG-3 cell growth mediated by DOI. Moreover,

this is the first study to show that activation of JAK2 by the 5-HT $_2A$ receptor increases the phosphorylation of ERK1/2, suggesting that JAK2 phosphorylation is the dominant signalling event activated by DOI in choriocarcinoma cell.

We previously demonstrated that the DOI increases the association between the 5-HT $_2A$ receptor and G $_{q/11}$ protein and the phosphorylation of both MEK1/2 and ERK1/2 in JEG-3 cells [6]. Stimulation of G $_{q/11}$ protein is known to activate the PLC- β -PKC- β -Ras-MEK1/2-ERK1/2 signalling cascade [23–26]. JEG-3 cells express two isoforms of PKCs; PKC- β and PKC- ζ [27]. To identify which PKCs isoform mediated the effect of DOI on JEG-3 cells, Gö6976 and GF109203X were used as selective inhibitors of calcium-dependent PKC- β [20,28] and calcium independent PKC- ζ , respectively [21,28]. Thus we clearly demonstrated that PKC- β , but not PKC- ζ , is involved in DOI-induced JEG-3 cell growth and ERK1/2 phosphorylation even its inhibition did not fully reversed the observed effect of DOI on JEG-3 cells. This partial inhibition is not surprising as the rising in the concentration of intracellular calcium trigger the stimulation not only PKC/ERK1/2 pathway but also other calcium-dependent pathways implicated in cell cycle progression [29]. However, to our knowledge, the present study is the first to show the contribution of PKC- β to DOI-induced JEG-3 cell growth.

Ras protein is one of the key effectors in the signal transduction leading to the activation of MEK1/2-ERK1/2 pathway in many systems [30]. Activation of G $_{q/11}$ -coupled receptors mediates Ras-dependent ERK1/2 activation in diverse cellular and physiological contexts [31,32]. This is in accord with our findings which show

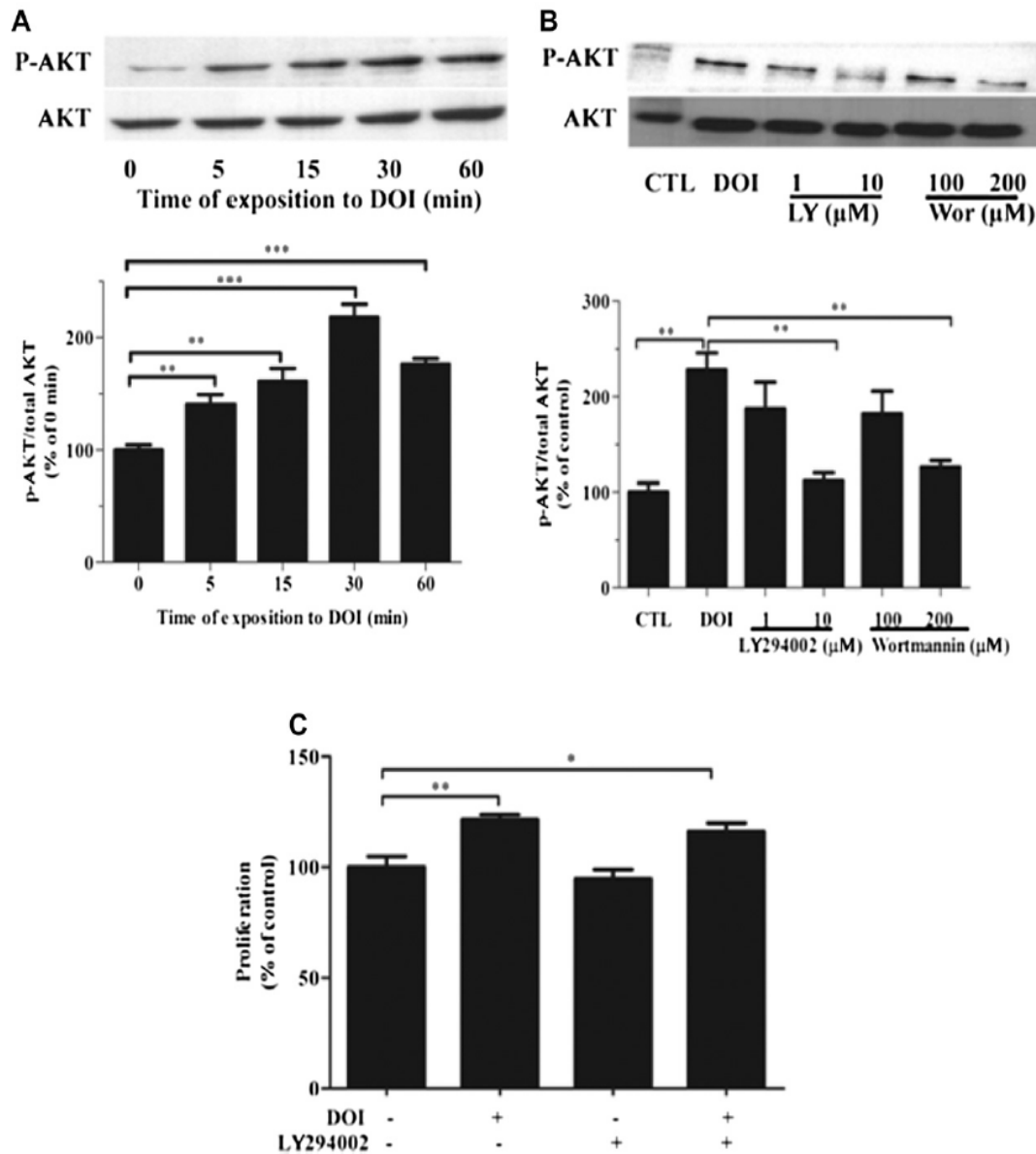


Fig. 2. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-AKT signalling pathway by DOI has no effect on JEG-3 cell growth. Cells (A) were treated with 25 μ M DOI for 0, 5, 15, 30 and 60 min or (B) pre-treated for 1 h with increased concentrations of LY294002 and Wortmannin; selective inhibitors of PI3K before treatment with 25 μ M DOI for 30 min. Total proteins were separated by SDS-PAGE and immunoblotted with phosphospecific antibody (P-AKT). The expression of total AKT was analysed by stripping and reprobing the membrane with non-phosphospecific-AKT antibody. The lower panels show the densitometric analysis of band intensities as the ratio of P-AKT to total AKT and expressed as the percentage of the untreated control cells (CTL; arbitrary set as 100%). (C) JEG-3 cell line were pre-treated with 10 μ M LY294002 before treatment with 25 μ M DOI for 48 h. Cell proliferation was determined by WST-1 assay as described in experimental procedures. Effects of DOI +/- inhibitors on JEG-3 cell proliferation are expressed as the percentage of cell growth compared to control non-treated cells (at which growth is considered 100%). Results represent the mean (\pm SEM) values of three experiments realized with three different cell passages. Cell proliferation assays were done in quadruplicate. Statistically significant differences ($*P > 0.05$; $**P < 0.01$; $***P < 0.001$) were determined by one-way ANOVA followed by a Tukey-Kramer's post-hoc for densitometric analysis and by Student's *t*-test for cell proliferation.

that the selective Ras inhibitor, FTS, blocked DOI-stimulated ERK1/2 phosphorylation and JEG-3 growth. Ras activation is known to trigger Raf-1 phosphorylation leading to MEK1/2-ERK1/2 activation [30]. However, if Raf-1 is involved in the signalling cascade induced by DOI in JEG-3 cells remains to be studied.

DOI activated the JAK2-STAT3 pathways in choriocarcinoma cell lines [6]. Blocking JAK2 phosphorylation with its specific antagonist AG490 significantly reduced DOI-induced JEG-3 cell growth, indicating that 5-HT_{2A} receptor-mediated activation of JAK2 is involved in this effect. This is in agreement with a study of Deniaue et al. who show

that serotonin via its 5-HT_{2A} receptor activated the JAK2-STAT3 pathway in vascular smooth muscle [1]. Some G-protein-coupled receptors have been found to activate JAK-STAT pathways. For example, the angiotensin AT1 receptor can associate with JAK2 and cause STAT3 activation in vascular smooth muscle cells and cardiomyocytes [33–35]. This effect appears to involve direct interaction of JAK2 with the carboxy tail of the AT1 receptor through a YIPP motif [36]. However, the presence of this motif remains to demonstrate within the 5-HT_{2A} receptor protein. Endothelin and thrombin, both G_q-coupled receptors, also activate JAK2-STAT pathways [1,37,38].

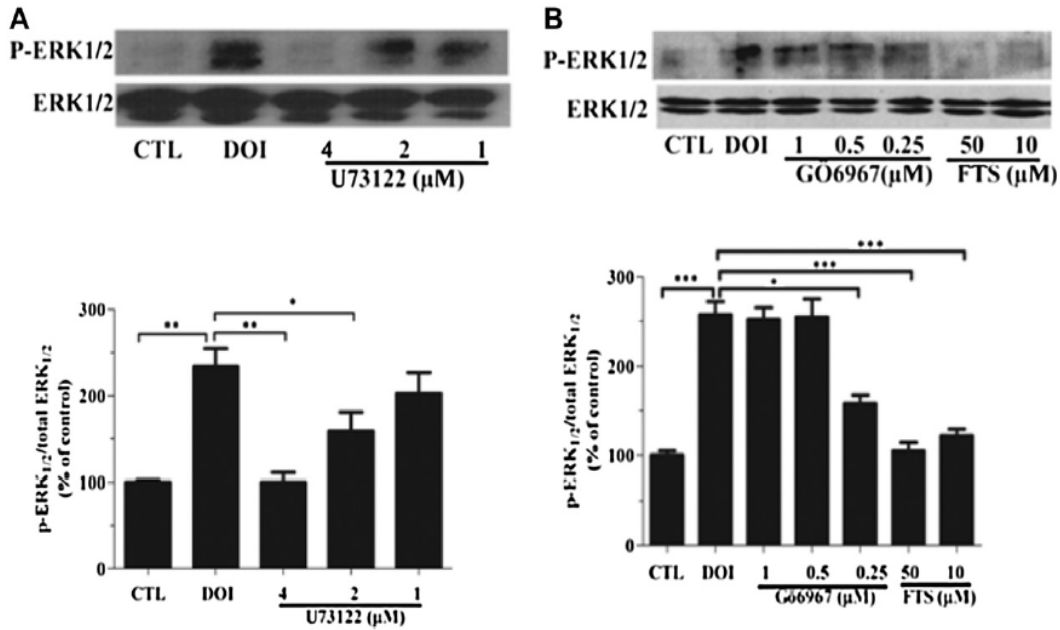


Fig. 3. Specific inhibitors of phospholipase C-β (PLC-β), protein kinase C-β (PKC-β), and Ras inhibit the phosphorylation of ERK1/2 induced by DOI in JEG-3 cells. Cells were pre-treated for 1 h with increased concentration of U73122, specific inhibitor of PLC-β, G66976, specific inhibitor of PKC-β, and farnesylthiosalicylic acid (FTS), specific inhibitor of Ras before addition of 25 μM DOI for 30 min. Total proteins were separated by SDS-PAGE and immunoblotted with phosphospecific antibody (P-ERK1/2). The expression of total ERK1/2 was analysed by stripping and reprobing the membrane with non-phosphospecific-ERK1/2 antibody. The lower panels show the densitometric analysis of band intensities presented as the ratio of P-ERK1/2 to total ERK1/2 and expressed as the percentage of the untreated control cells (CTL; arbitrary set as 100%). Densitometric data represent the mean (±SEM) values of three experiments realized with three different cell passages. Statistically significant differences (**P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001) were determined by one-way ANOVA followed by a Tukey-Kramer's post-hoc test.

Although a direct association of these receptors with the JAK2 molecule is controversial, we have previously demonstrated by immunoprecipitation that a physical association between the 5-HT_{2A} and JAK2 protein occurs in choriocarcinoma cell lines [6]. Interestingly, inhibition of JAK2 fully blocked 5-HT_{2A} receptor-induced ERK1/2 activation while the inhibition of ERK1/2 has no

effect on tyrosine phosphorylation of STAT3. It is likely that STAT3 and ERK1/2 cooperate in mediating the growth response in JEG-3 cells. Indeed, an important dependency between these two pathways has been described for the activation of cells by cytokines and growth hormones [39–41]. A key convergence point may be the activation of the protein Raf. Others have reported that tyrosine

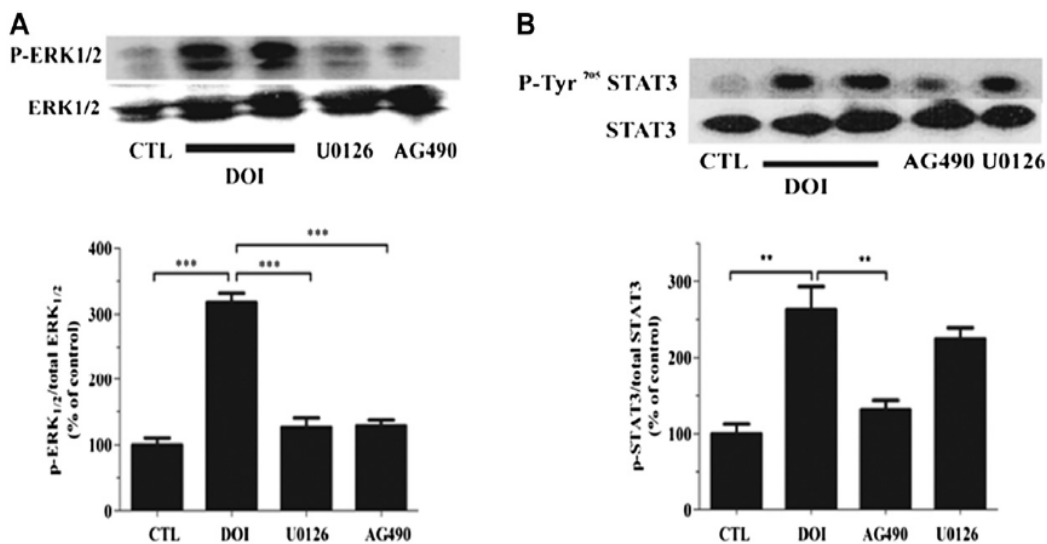


Fig. 4. JAK2 tyrosine kinase activation is required for DOI-induced ERK1/2 phosphorylation in JEG-3 cells. Cells were pre-treated for 1 h with 25 μM U0126 and 30 μM AG490 specific inhibitors of MEK1/2 and JAK2 respectively before the addition of 25 μM DOI for 30 min. Total proteins were separated by SDS-PAGE and immunoblotted with phosphospecific antibodies (P-STAT3 or P-ERK1/2). The expression of total ERK1/2 and total STAT3 were analysed by stripping and reprobing the membrane with specific non-phosphospecific antibodies. The lower panels show the densitometric analysis of band intensities presented as the ratio of P-ERK1/2 to total ERK1/2 and P-STAT3 to total STAT3 and expressed as the percentage of the untreated control cells (CTL; arbitrary set as 100%). Densitometric data represent the mean (±SEM) values of three experiments done with three different cell passages. Statistically significant differences (***P* < 0.01; ****P* < 0.001) were determined by one-way ANOVA followed by a Tukey-Kramer's post-hoc test.

kinases, including JAK2, can phosphorylate Raf enhancing its activity. Marrero et al. [33] reported that angiotensin II and platelet-derived growth factor (PDGF) induced JAK2-Raf complex formation, Raf-1 tyrosine phosphorylation, and ERK1/2 kinase activation. Based on this study, we propose that JAK2 is “upstream” of the ERK1/2 pathway and regulates DOI-mediated Ras activation. Whether JAK2 interacts with Raf-1 or other kinases in our trophoblast system remain to be study.

Chung et al. showed a modulation of STAT proteins by ERK1/2. Indeed, they demonstrated that phosphorylation of STAT3 on serine 727 via an ERK1/2-dependent pathway negatively modulated the phosphorylation of STAT3 at tyrosine 705 in Cos, A431, and HepG2 cells [42]. In contrary in our study the inhibition of ERK1/2 had no effect on 5HT_{2A}-activated P-Tyr705-STAT3. However, we cannot rule out the possibility of ERK1/2-independent phosphorylation of STAT3 on its serine residue by another pathway. For example, Bush et al. showed that siRNA-mediated intracellular signalling molecule mammalian target of rapamycin (mTOR) knockdown inhibited cell proliferation and invasion of HTR-8/SVneo immortalized first-trimester trophoblast cells [43]. This effect was associated with impaired serine but not tyrosine phosphorylation of STAT3. If mTOR plays a role in DOI-stimulation of STAT3 and growth in JEG-3 cells remains to be studied.

The 5-HT_{2A} receptor activates the PI3K-AKT pathway, which is implicated in survival and growth of neuronal and pulmonary artery smooth muscle cells [44,45]. Even if the mechanism by which this effect occurs is not well understood, it appears that PI3K interacts with JAK-STAT signalling in a complex manner that depends on cell phenotype [46]. Consistent with this, DOI activated the PI3K-AKT

pathway in JEG-3 cell required JAK2 stimulation but not ERK1/2 phosphorylation (data not shown) suggesting that JAK2 acts upstream of the AKT pathway. However, the activation of PI3K-AKT is not involved in JEG-3 cell growth by 5-HT_{2A} receptor, since the inhibition of this pathway has no effect on DOI-induced growth of JEG-3 cells. This is consistent with previous data showing that PI3K-AKT is involved in cell survival instead of cell growth [47].

Based on our results, it is unlikely that a single signalling pathway is responsible for 5-HT_{2A}-induced JEG-3 cell growth. The effect of DOI on JEG-3 cell growth involves the activation of multiple targeted signalling pathways to maximise its effect which reflects the issue of redundancy in the signalling pathway. However, the involvement of JAK2 as dominant pathway in the activation of both STAT3 and ERK1/2 demonstrates the importance of those signalling pathways in mediating the effect of DOI on JEG-3 cell growth (Fig. 5). A number of issues remain to be clarified. The p38-MAPK pathway is an additional signal cascade component that can be activated by G_q-protein-coupled receptors [48]. However, this is not the case in JEG-3 cells. We did not see any effect of inhibition of p38 by SB203580 on DOI-induced JEG-3 cell growth (data not shown). One interesting pathway that we will explore in our follow-up study is that of phospholipase A2 (PLA2) which has been shown to be activated by the 5-HT_{2A}-PKC-ERK1/2 axis [49,50]. Wang et al., demonstrated that stimulation of the JAK2-STAT3 pathway counteracts PLA2-induced apoptosis in cortical neurons [51]. Although this is not entirely consistent with our data showing that activation of ERK1/2 pathway and likely PLA2 activity requires JAK2-STAT3 stimulation, but it reinforces our observation that JAK2 is a key modulator of ERK1/2 signalling, as well as those initiated by the 5-HT_{2A} receptor.

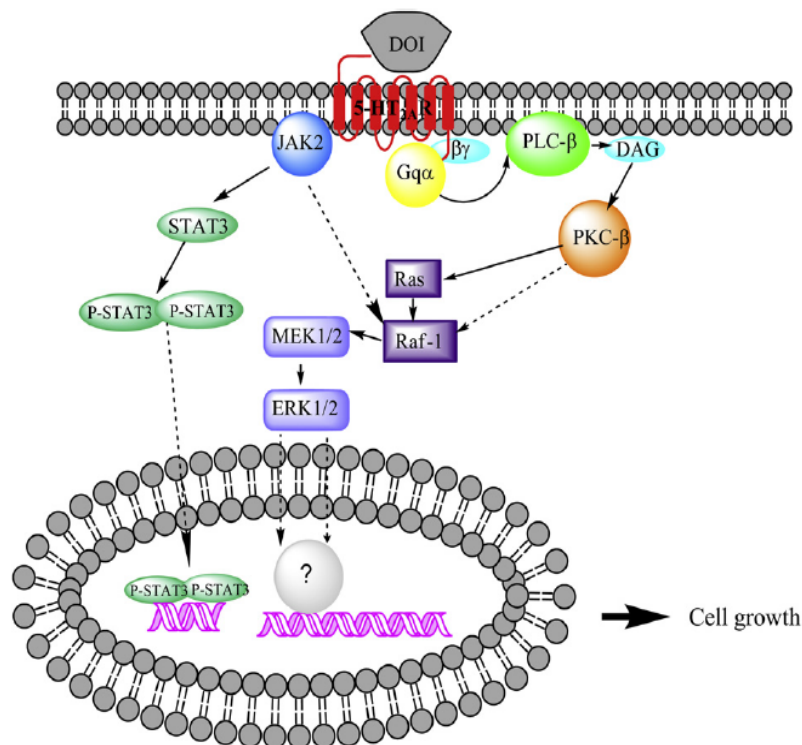


Fig. 5. Hypothetical model of 5-HT_{2A}-receptor (5-HT_{2A}R)-mediated JEG-3 human placental choriocarcinoma cell growth. Both JAK2/STAT3 and MEK/ERK1/2 are involved in 5-HT_{2A}R-mediated growth stimulation by DOI in JEG-3 cells. Phosphorylation of ERK-1/2 by DOI requires independent activation of JAK2 or PLC-β, PKC-β and Ras. DOI, (±)-2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine hydrochloride; PLC, phospholipase C; PKC, protein kinase C; JAK2, Janus kinase 2; STAT3, signal transducers and activators of transcription 3; ERK1/2, extracellular related kinase 1/2; MEK1/2, Mitogen-activated kinase 1/2. Solid arrows illustrate our findings while dashed arrows indicate interactions that are either putative or involve multiple steps based on previous studies.

In this study, we have demonstrated that the 5-HT_{2A} receptor plays an important role in the control of trophoblast growth. Experiments need to be extended to the isolated (primary culture) trophoblast and others cancer epithelial cells to confirm that our results apply to placenta or epithelial tumours. In summary, this is the first study to report that phosphorylation of JAK2 by the 5-HT_{2A} receptor activates both STAT3 and ERK1/2 pathways and increases growth of JEG-3 human placental choriocarcinoma cells.

Acknowledgements

This work is financially supported by a Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada – discovery grant (NSERC # 262011-2009). The authors express their gratitude to Dr J Thomas Sanderson for his critical reading of the manuscript.

Abbreviations

5-HT	5-hydroxytryptamine or serotonin
5-HT _{2A}	5-hydroxytryptamine receptor 2A
AG490	2-Cyano-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-N-(benzyl)-2-propenamide, 2-Cyano-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-N-(phenylmethyl)-2-propenamide
DOI	(±)-2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine hydrochloride
ERK	extracellular-regulated MAPK
FTS	farnesylthiosalicylic acid
Gö6976	12-(2-cyanoethyl)-6,7,12,13-tetrahydro-13-methyl-5-oxo-5Hindolo(2,3-a)pyrrolo(3,4-c)-carbazole
GF109203X	[2-[1-(3-Dimethylaminopropyl)-1H-indol-3-yl]-3-(1H-indol-3-yl) maleimide, Bisindolylmaleimide I]
JAK	janus kinase
LY294002	[2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one]
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MEK	mitogen-activated kinase
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase
PKC	protein kinase C
PLC	phospholipase C
STAT	signal transducers and activators of transcription
U0126	3-(2-Aminoethyl)-5-((4-ethoxyphenyl)methylene)-2,4-thiazolidinedione hydrochloride
U73122	1-[6-(((17...)-3-Methoxyestra-1,3,5[10]-trien-17-yl)amino)hexyl]-1H-pyrrole-2,5-dion

Appendix. Supplementary material

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.placenta.2011.09.005.

References

- Guillet-Deniau I, Burnol AF, Girard J. Identification and localization of a skeletal muscle serotonin 5-HT_{2A} receptor coupled to the Jak/STAT pathway. *J Biol Chem* 1997;272(23):14825–9.
- Sonier B, Arseneault M, Lavigne C, Ouellette RJ, Vaillancourt C. The 5-HT_{2A} serotonin receptor is expressed in the MCF-7 human breast cancer cell line and reveals a mitogenic effect of serotonin. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;343(4):1053–9.
- Sonier B, Lavigne C, Arseneault M, Ouellette R, Vaillancourt C. Expression of the 5-HT_{2A} serotonin receptor in human placenta and choriocarcinoma cells: mitogenic implications of serotonin. *Placenta* 2005;26(6):484–90.
- Nebigil CG, Garnovskaya MN, Spurney RF, Raymond JR. Identification of a rat glomerular mesangial cell mitogenic 5-HT_{2A} receptor. *Am J Physiol* 1995;268(1 Pt 2):F122–7.
- Banes A, Florian JA, Watts SW. Mechanisms of 5-hydroxytryptamine(2A) receptor activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;291(3):1179–87.
- Oufkir T, Arseneault M, Sanderson JT, Vaillancourt C. The 5-HT_{2A} serotonin receptor enhances cell viability, affects cell cycle progression and activates MEK-ERK1/2 and JAK2-STAT3 signalling pathways in human choriocarcinoma cell lines. *Placenta* 2010;31(5):439–47.
- Bonhaus DW, Bach C, DeSouza A, Salazar FH, Matsuoka BD, Zuppan P, et al. The pharmacology and distribution of human 5-hydroxytryptamine_{2B} (5-HT_{2B}) receptor gene products: comparison with 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. *Br J Pharmacol* 1995;115(4):622–8.
- Urban JD, Clarke WP, von Zastrow M, Nichols DE, Kobilka B, Weinstein H, et al. Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther* 2007;320(1):1–13.
- Banes AK, Shaw SM, Tawfik A, Patel BP, Ogbi S, Fulton D, et al. Activation of the JAK/STAT pathway in vascular smooth muscle by serotonin. *Am J Physiol* 2005;288(4):C805–12.
- Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA. The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci* 2004;117(Pt 8):1281–3.
- Zhang W, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res* 2002;12(1):9–18.
- Huang WQ, Zhang CL, Di XY, Zhang RQ. Studies on the localization of 5-hydroxytryptamine and its receptors in human placenta. *Placenta* 1998;19(8):655–61.
- Fecteau KA, Eiler H. Placenta detachment: unexpected high concentrations of 5-hydroxytryptamine (serotonin) in fetal blood and its mitogenic effect on placental cells in bovine. *Placenta* 2001;22(1):103–10.
- Balkovetz DF, Tirupathi C, Leibach FH, Mahesh VB, Ganapathy V. Evidence for an imipramine-sensitive serotonin transporter in human placental brush-border membranes. *J Biol Chem* 1989;264(4):2195–8.
- Chan HY, Siu MK, Zhang HJ, Wong ES, Ngan HY, Chan KY, et al. Activated Stat3 expression in gestational trophoblastic disease: correlation with clinicopathological parameters and apoptotic indices. *Histopathology* 2008;53(2):139–46.
- Grummer R, Hohn HP, Mareel MM, Denker HW. Adhesion and invasion of three human choriocarcinoma cell lines into human endometrium in a three-dimensional organ culture system. *Placenta* 1994;15(4):411–29.
- Pattillo RA, Gey GO. The establishment of a cell line of human hormone-synthesizing trophoblastic cells in vitro. *Cancer Research* 1968;28(7):1231–6.
- Lala PK, Lee BP, Xu G, Chakraborty C. Human placental trophoblast as an in vitro model for tumor progression. *Can J Physiol Pharmacol* 2002;80(2):142–9.
- Viau M, Lafond J, Vaillancourt C. Expression of placental serotonin transporter and 5-HT_{2A} receptor in normal and gestational diabetes mellitus pregnancies. *Reprod Biomed Online* 2009;19(2):207–15.
- Koivunen J, Aaltonen V, Koskela S, Lehenkari P, Laato M, Peltonen J. Protein kinase C alpha/beta inhibitor Gö6976 promotes formation of cell junctions and inhibits invasion of urinary bladder carcinoma cells. *Cancer Research* 2004;64(16):5693–701.
- Toullec D, Pianetti P, Coste H, Bellevergue P, Grand-Perret T, Ajakane M, et al. The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J Biol Chem* 1991;266(24):15771–81.
- Matrougui K, Eskildsen-Helmond YE, Fiebeler A, Henrion D, Levy BI, Tedgui A, et al. Angiotensin II stimulates extracellular signal-regulated kinase activity in intact pressurized rat mesenteric resistance arteries. *Hypertension* 2000;36(4):617–21.
- Julius D, Huang KN, Livelli TJ, Axel R, Jessell TM. The 5HT₂ receptor defines a family of structurally distinct but functionally conserved serotonin receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87(3):928–32.
- Kursar JD, Nelson DL, Wainscott DB, Cohen ML, Baez M. Molecular cloning, functional expression, and pharmacological characterization of a novel serotonin receptor (5-hydroxytryptamine_{2F}) from rat stomach fundus. *Mol Pharmacol* 1992;42(4):549–57.
- Peroutka SJ. 5-HT receptors: past, present and future. *Trends Neurosci* 1995;18(2):68–9.
- Cox DA, Cohen ML. 5-Hydroxytryptamine_{2B} receptor signaling in rat stomach fundus: role of voltage-dependent calcium channels, intracellular calcium release and protein kinase C. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;272(1):143–50.
- Bamberger AM, Bamberger CM, Wald M, Jensen K, Schulte HM. PKC isoenzyme expression and cellular responses to phorbol ester in JEG-3 choriocarcinoma cells. *Endocrine* 1997;6(2):111–6.
- Martiny-Baron G, Kazanietz MG, Mischak H, Blumberg PM, Kochs G, Hug H, et al. Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Gö 6976. *J Biol Chem* 1993;268(13):9194–7.
- Kahl CR, Means AR. Regulation of cell cycle progression by calcium/calmodulin-dependent pathways. *Endocr Rev* 2003;24(6):719–36.
- Webb CP, Van Aelst L, Wigler MH, Woude GF. Signaling pathways in Ras-mediated tumorigenicity and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(15):8773–8.
- Eguchi S, Matsumoto T, Motley ED, Utsunomiya H, Inagami T. Identification of an essential signaling cascade for mitogen-activated protein kinase activation by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. Possible requirement of Gq-mediated p21ras activation coupled to a Ca²⁺/calmodulin-sensitive tyrosine kinase. *J Biol Chem* 1996;271(24):14169–75.
- LaMorte VJ, Thorburn J, Absher D, Spiegel A, Brown JH, Chien KR, et al. Gq- and Ras-dependent pathways mediate hypertrophy of neonatal rat ventricular myocytes following alpha 1-adrenergic stimulation. *J Biol Chem* 1994;269(18):13490–6.
- Marrero MB, Schieffer B, Li B, Sun J, Harp JB, Ling BN. Role of Janus kinase/signal transducer and activator of transcription and mitogen-activated protein

- kinase cascades in angiotensin II- and platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell proliferation. *J Biol Chem* 1997;272(39):24684–90.
- [34] Bhat GJ, Thekkumkara TJ, Thomas WG, Conrad KM, Baker KM. Angiotensin II stimulates sis-inducing factor-like DNA binding activity. Evidence that the AT1A receptor activates transcription factor-Stat91 and/or a related protein. *J Biol Chem* 1994;269(50):31443–9.
- [35] McWhinney CD, Hunt RA, Conrad KM, Dostal DE, Baker KM. The type I angiotensin II receptor couples to Stat1 and Stat3 activation through Jak2 kinase in neonatal rat cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29(9):2513–24.
- [36] Ali MS, Sayeski PP, Dirksen LB, Hayzer DJ, Marrero MB, Bernstein KE. Dependence on the motif YIPP for the physical association of Jak2 kinase with the intracellular carboxyl tail of the angiotensin II AT1 receptor. *J Biol Chem* 1997;272(37):23382–8.
- [37] Bhat GJ, Baker KM. Angiotensin II stimulates rapid serine phosphorylation of transcription factor Stat3. *Mol Cell Biochem* 1997;170(1–2):171–6.
- [38] Peeler TC, Conrad KM, Baker KM. Endothelin stimulates sis-inducing factor-like DNA binding activity in CHO-K1 cells expressing ETA receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;221(1):62–6.
- [39] Winston LA, Hunter T. JAK2, Ras, and Raf are required for activation of extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase by growth hormone. *J Biol Chem* 1995;270(52):30837–40.
- [40] David M, Petricoin 3rd E, Benjamin C, Pine R, Weber MJ, Larner AC. Requirement for MAP kinase (ERK2) activity in interferon alpha- and interferon beta-stimulated gene expression through STAT proteins. *Science* 1995;269(5231):1721–3.
- [41] Taniguchi T. Cytokine signaling through nonreceptor protein tyrosine kinases. *Science* 1995;268(5208):251–5.
- [42] Chung J, Uchida E, Grammer TC, Blenis J. STAT3 serine phosphorylation by ERK-dependent and -independent pathways negatively modulates its tyrosine phosphorylation. *Mol Cell Biol* 1997;17(11):6508–16.
- [43] Busch S, Renaud SJ, Schlessner E, Graham CH, Markert UR. mTOR mediates human trophoblast invasion through regulation of matrix-remodeling enzymes and is associated with serine phosphorylation of STAT3. *Exp Cell Research* 2009;315(10):1724–33.
- [44] Johnson-Farley NN, Kertesz SB, Dubyak GR, Cowen DS. Enhanced activation of Akt and extracellular-regulated kinase pathways by simultaneous occupancy of Gq-coupled 5-HT2A receptors and Gs-coupled 5-HT7A receptors in PC12 cells. *J Neurochem* 2005;92(1):72–82.
- [45] Nebigil CG, Etienne N, Messaddeq N, Maroteaux L. Serotonin is a novel survival factor of cardiomyocytes: mitochondria as a target of 5-HT2B receptor signaling. *FASEB J* 2003;17(10):1373–5.
- [46] de Groot RP, Coffey PJ, Koenderman L. Regulation of proliferation, differentiation and survival by the IL-3/IL-5/GM-CSF receptor family. *Cell Signal* 1998;10(9):619–28.
- [47] Wong K-K, Engelman JA, Cantley LC. Targeting the PI3K signaling pathway in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2010;20(1):87–90.
- [48] Lazou A, Sugden PH, Clerk A. Activation of mitogen-activated protein kinases (p38-MAPKs, SAPKs/JNKs and ERKs) by the G-protein-coupled receptor agonist phenylephrine in the perfused rat heart. *Biochem J* 1998;332(Pt 2):459–65.
- [49] Kurrasch-Orbaugh DM, Watts VJ, Barker EL, Nichols DE. Serotonin 5-hydroxytryptamine 2A receptor-coupled phospholipase C and phospholipase A2 signaling pathways have different receptor reserves. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;304(1):229–37.
- [50] Kurrasch-Orbaugh DM, Parrish JC, Watts VJ, Nichols DE. A complex signaling cascade links the serotonin2A receptor to phospholipase A2 activation: the involvement of MAP kinases. *J Neurochem* 2003;86(4):980–91.
- [51] Wang G, Zhou D, Wang C, Gao Y, Zhou Q, Qian G, DeCoster MA. Hypoxic preconditioning suppresses group III secreted phospholipase A2-induced apoptosis via JAK2-STAT3 activation in cortical neurons. *J Neurochem* 2010;114(4):1039–48.

III- CHAPITRE 3

THE ACTIVATION OF SEROTONIN 5-HT_{2A} RECEPTOR BY (±)-2,5-DIMETHOXY-4-IODOAMPHETAMINE HYDROCHLORIDE (DOI) INDUCES TROPHOBLAST CELL INVASION

Talal Oufkir, Marie Cohen and Cathy Vaillancourt

Soumis à Biology of Reproduction le 12 janvier 2015

Résumé de l'article en français

Il a été rapporté que le placenta humain synthétise *de novo* la sérotonine et exprime les récepteurs de la sérotonine de type $2A$ (5-HT $_{2A}$), ce qui suggère un rôle de ce système sérotoninergique dans l'invasion du trophoblaste placentaire. Dans les lignées cellulaires du choriocarcinome JEG-3, un modèle pour étudier *in vitro* le trophoblaste extravilleux, l'activation des récepteurs 5-HT $_{2A}$ stimule la prolifération cellulaire et active les voies de signalisation MEK/ERK1/2 et JAK2/STAT3. Un rôle crucial de la voie de signalisation STAT3 dans la stimulation des capacités invasives de plusieurs types de cellules néoplasiques a été rapporté. Cependant, le rôle des récepteurs 5-HT $_{2A}$ dans la modulation de l'invasion du trophoblaste extravilleux n'a jamais été étudié. Nous suggérons que le récepteur 5-HT $_{2A}$, via les voies de signalisation JAK2/STAT3, peuvent moduler l'invasion du trophoblaste extravilleux. Dans cette étude, nous avons étudié le rôle des récepteurs 5-HT $_{2A}$ dans la stimulation des capacités invasives du trophoblaste extravilleux humain ainsi le mécanisme moléculaire impliqué. Des tests d'invasion sur matrigel et de cicatrisation ont été réalisés pour évaluer, respectivement, l'invasion et la migration du trophoblaste extravilleux (cellules JEG-3 et HTR-8/Svneo et des primoculture de trophoblaste extravilleux du premier trimestre de grossesse). L'activité des MMP-9 et MMP-2 a été déterminée par zymographie et leur expression par RT-PCR et par immunobuvardage de type Western. L'activation spécifique du récepteur 5-HT $_{2A}$ par son agoniste, le DOI, augmente la migration et l'invasion du trophoblaste extravilleux. Cet effet pro-invasif du DOI dans les trophoblastes humains est associé à une augmentation de l'expression et de l'activité des MMP- 2 et MMP-9 dans les lignées cellulaires JEG-3 et HTR-8/SVneo, mais pas dans les primocultures de trophoblaste extravilleux. L'inhibition de la voie de signalisation de JAK2/STAT3 bloque l'expression des MMP-9 et MMP-2 induite par le DOI dans la lignée

cellulaire trophoblastique, tandis que l'inhibition de la voie MEK/ERK1/2 n'a aucun effet. En conclusion, cette étude montre que les récepteurs 5-HT_{2A}, via l'activation de la voie de signalisation JAK2/STAT3, stimulent l'activité de la MMP-9 et de la MMP-2 et par conséquent induisent les capacités invasives du trophoblaste extravilleux.

Contribution de l'étudiant

L'étudiant a réalisé toutes les expériences et analysé les résultats dans cet article. Il a également rédigé l'article et participé au choix du journal de publication.

-----Message d'origine-----

De : bor@ssr.org [mailto:bor@ssr.org]

Envoyé : 12 janvier 2015 15:56

À : Vaillancourt, Cathy

Cc : bor@ssr.org

Objet : BIOLREPROD/2015/128132 Manuscript Submission

MS ID#: BIOLREPROD/2015/128132

MS TITLE: The activation of serotonin-5-HT_{2A} receptor by (&[plusmn])-2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine hydrochloride (DOI) induces trophoblast cell invasion

Talal Oufkir, Marie Cohen, and Cathy Vaillancourt

Dear Dr. Vaillancourt:

This is an automatic message acknowledging your submission to Biology of Reproduction. Thank you for choosing to submit your paper to our Journal.

As Corresponding Author, your responsibilities include financial obligations for the publication costs. In general, these are \$650 per article when the Corresponding Author is a Regular or Emeritus member of the SSR, or \$1400 when the Corresponding Author is not. If not, the SSR encourages you to thoughtfully consider SSR membership, for which there are many benefits including reduced publication costs: <http://www.biolreprod.org/site/lforA/editorialpolicies.xhtml>

We also encourage you to review your other responsibilities and obligations as an author: <http://www.biolreprod.org/site/misc/gfporr.xhtml>

Please reference BIOLREPROD/2015/128132 in all communications with the Journal's office regarding your paper. To check the status of your manuscript, please visit <http://submit.biolreprod.org/> and enter your Author Area.

The disposition of your paper will be emailed to you as soon as all the reviews are in and the Editors have made a decision; the average turn-around time is approximately 25 days.

If you have questions or concerns prior to receiving the decision letter by email, please contact the Journal's Office at <bor@ssr.org>

Sincerely,
BOR Editorial and Publications Office
Biology of Reproduction

The activation of serotonin-5-HT_{2A} receptor by (±)-2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine hydrochloride (DOI) induces trophoblast cell invasion

Talal Oufkir³, Marie Cohen⁴, and Cathy Vaillancourt^{2,3}

³INRS-Institut Armand-Frappier and BioMed Research Center, Université du Québec, Laval, QC, Canada; ⁴Department of Gynecology Obstetrics, University of Geneva, Geneva, Switzerland

Running title: Serotonin and placental cell invasion

Summary sentence: The activation placental 5-HT_{2A} receptor by DOI induced trophoblast cell invasion throughout the JAK2/STAT3 signaling pathway.

Keywords: Extravillous trophoblast, placenta, human, cell invasion, MMP-2, MMP-9, serotonin, JAK2, STAT3, PLC, ERK1/2

¹This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) grant no. 262011-2009 (to C.V.) as well as by studentship awards to T.O from the *Fonds de recherche du Québec Nature et Technologie-Réseau Québécois de Reproduction* (FRQNT-RQR).

²Correspondence: Cathy Vaillancourt, INRS-Institut Armand Frappier, Université du Québec, 531 Boulevard des Prairies, Laval, QC, Canada, H7V 1B7. cathy.vaillancourt@iaf.inrs.ca

ABSTRACT

Serotonin (5-HT) is a hormone with proliferative, pro-differentiating, and pro-invasive effects. It exerts its effects through several receptors including 5-HT_{2A} receptors which in turn initiate JAK2/STAT3 and MEK/ERK1/2 signaling pathways cascades. Human placenta expressed the 5-HT_{2A} receptor suggesting a role for this receptor in placental development. The invasion of extravillous trophoblast in maternal decidua is crucial for placentation. We previously showed that activation of the 5-HT_{2A} receptor stimulates trophoblast cell proliferation, but the role of this serotonin receptor on invasive capacities of the human extravillous trophoblast has not yet been studied. Here, we showed that DOI ((±)-2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine hydrochloride), a selective 5-HT_{2A} receptor agonist, increases extravillous trophoblastic cells migration and invasion. The invasive effect DOI is associated with increased expression and activity of MMP-2 and MMP-9 in the JEG-3 and HTR-8/SVneo cell lines, but not in the primary extravillous trophoblast cells. The study of molecular mechanism demonstrated that inhibition of JAK2/STAT3 signaling pathway blocks the DOI-induced MMP-2 and MMP-9 activity and expression in both cell lines whereas the inhibition of MEK/ERK1/2 pathway had no effect. Altogether, this study demonstrates that DOI-stimulated trophoblast invasion required the activation of MMP-9 and MMP-2 via JAK2/STAT3 signaling pathway. These data suggest a potential association between serotonergic dysfunction and trophoblast invasion default (insufficient or excessive invasion) in pathological pregnancies, such as preeclampsia and intrauterine growth restriction. However, this study shows that caution should be taken when extrapolating the results obtained in trophoblast cell lines to primary extravillous trophoblast.

INTRODUCTION

Defective invasion of extravillous trophoblast may result in gestational complications including preeclampsia, intrauterine growth restriction, placenta accreta and percreta, and choriocarcinoma [1-4]. Trophoblast invasion depends on a controlled program of intercellular signaling mediated by growth factors, cytokines, and hormones of both fetal and maternal origin [5-7]. In contrast of tumor, trophoblast invasion during pregnancy is strictly spatiotemporally regulated; this process occurs early in pregnancy (the first 12 weeks), and is limited to the first third of the uterine smooth muscle, the myometrium [5]. Extravillous trophoblast invasion involves proteolytic degradation of decidual and endothelial extracellular matrix (ECM) in the direction of migration followed by extravillous trophoblast adhesion to ECM elements and active cell invasion through the degraded matrix. For these processes, the action of matrix metalloproteinases (MMPs), particularly the MMP-2 and -9, is important [6, 8]. The activities of these proteases are further regulated by the major natural tissue inhibitors of metalloproteinases TIMP-1 and TIMP-2 which bind the MMPs [9].

Serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) is mainly produced by enterochromaffine cells in the gastrointestinal tract. Recently, Bonnin and our group demonstrated that serotonin is synthesized *de novo* by mouse and human trophoblast [10, 11], suggesting that serotonin may act in paracrine/autocrine manner on placental function and development.

Serotonin mediates its effects through 14 serotonin receptor subtypes which can be classified into seven classes (for review, see [12]). Among those, the 5-HT_{2A} seven-transmembranes receptor belongs to the family of G_q-coupled receptor that activate phospholipase C (PLC) and protein kinase C (PKC) signaling pathway [12]. The 5-HT_{2A} receptor is expressed in placental derived choriocarcinoma cell lines, JEG-3 and BeWo, and in

primary villous trophoblast from term placenta, but its expression in primary extravillous trophoblast has never been described [13, 14]. Activation of the 5-HT_{2A} receptor stimulates the growth of JEG-3 and BeWo cells throughout the stimulation of MEK1/2-ERK1/2 and JAK2/STAT3 signaling pathways [15, 16]. STAT3 is a pleiotropic transcription factor involved in a wide variety of physiological processes. It can be activated by numerous cytokines, growth factors, and oncogenic proteins found in fetal-maternal environment and can regulate human trophoblast invasion [17-22]. The presence of constitutively activated STAT3 correlates positively with the invasiveness of extravillous trophoblast phenotypes or their malignant derivative; the choriocarcinoma cells which constitutively expressed activated STAT3 to a much higher degree than the primary trophoblast [23]. Moreover, it was demonstrated that constitutive activation of STAT3 ceased progressively from first trimester to term at the same time as loss of invasive properties of trophoblast cells. To date, the role of serotonin and the effect of the activation of STAT3 by the 5-HT_{2A} receptors on trophoblast invasion have never been studied.

Here, we study the effects and mechanism of action of (±)-2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine hydrochloride (DOI), a selective 5-HT_{2A} receptor agonist, on invasion/migration of extravillous trophoblast and the expression and activity of MMP-9 and MMP-2 in primary extravillous trophoblast and HTR-8/SVneo and JEG-3 cell lines. We hypothesized that activation of 5-HT_{2A} receptor throughout the stimulation of JAK2/STAT3 pathway activates human extravillous trophoblast invasion.

MATERIALS AND METHODS

Human primary extravillous trophoblast and cell lines.

This research has been approved by the departmental ethics committee of maternity and pediatrics, University Hospital of Geneva. Informed written consent was obtained from all patients before their inclusion in the study. Placenta tissue was obtained from patients undergoing a legal abortion during the first trimester (8–12 weeks of gestation). Human primary extravillous cytotrophoblast (evCTB) was prepared from tips of placental terminal villi as previously described [24]. Briefly, fresh tissue specimens were isolated and washed several times in sterile Hanks balanced salt solution (HBSS). Tissue was then enzymatically digested five times for 20 min at 37°C (0.25% trypsin, 0.25 mg/ml Dnase I; Roche, Diagnostics GmbH, USA). After incubation, the trypsin cocktail was neutralized with 10 % fetal bovine serum (FBS), and the cells suspended in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Invitrogen, Switzerland). This cell suspension was filtered through a 50- μ m mesh, laid onto a Percoll gradient (70-5%) and centrifuged for 25 min at 1200 g without using brake. The 30–45% Percoll layer containing trophoblast cells were collected, the cells washed and suspended in DMEM. Cells were then immunopurified with anti-CD45 antibodies (1/20, Dako) at 4°C for 30 min. Cells obtained from first trimester trophoblast with this method contain both villous and extravillous trophoblastic cells. To obtain primary evCTB, the immunopurified cells were seeded on Petri dishes for 15 min. Supernatant containing evCTB was centrifuged and the cells were suspended in culture medium. Ninety percent of 48 h cultured evCTB were positive for cytokeratin 7 and HLA-G and negative for vimentin.

JEG-3 choriocarcinoma cell line were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD) and maintained in Minimum essential medium Eagle's (MEM Eagle; Sigma, Oakville, ON, Canada) containing 10% fetal bovine serum (FBS; Hyclone Laboratories, Logan, UT), 2 mM L-glutamine, and 1 mM sodium pyruvate. The first-trimester

cytotrophoblast HTR-8/SVneo cells (a gift from Dr. C.H. Graham, Queens University, Kingston, ON, Canada) were cultured in RPMI 1640 containing 5% FBS.

Cell treatment

Cells were starved in serum-free media for 16 h before being treated with increasing concentrations (0, 2.5, 25, 50 or 100 μM) of DOI (Sigma) diluted in 0.5 % FBS supplemented-culture media for 48 h in a humidified atmosphere of 5% CO_2 at 37°C. To determine the specificity of DOI on the 5-HT_{2A} receptor, ritanserin (10 μM ; Sigma), a selective 5-HT_{2A} antagonist, was added 30 min before treatment with DOI (25 μM).

Viability/proliferation assay

The Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche Applied Science, Laval, QC, Canada) was used to determine the effect of DOI on cell viability according to the manufacturer's protocol. Briefly, JEG-3 and HTR-8/SVneo cells (5×10^3) were seeded and cultivated in 96 wells plate under low serum conditions (0.5% FBS) for 16 h and then treated for 48 h with increase concentrations of DOI with or without ritanserin. After 48 h of incubation at 37° C under 5% CO_2 , culture medium was removed and 10 μl WST-1 reagent added to 100 μl of fresh culture medium containing 0.5% of FBS. Cells were incubated for 3 h at 37 °C under 5% CO_2 and then absorbance was measured spectrophotometrically at a wavelength of 450 nm with a reference wavelength of 650 nm using a SpectraMax M5 with SoftMax Pro v5 software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

Wound healing and migration assay

Wound healing assay was performed to study the effect of DOI on JEG-3 cell motility and HTR-8/SVneo. Cells seeded in equal number into six well plates were grown till 90% confluence, scrapped with a sterile tip to create an artificial wound, and allowed to heal for the next 48 h in presence of 0.5 % FBS-supplemented culture media (control), 25 μ M of DOI with or without combination with 10 μ M of ritanserin. Photos were taken just after scrapping (T = 0 h) and at the same position of the wound after 48 h (T = 48 h). After wounding, phase-contrast images of migrating cell were acquired using microscope and processed using Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). This software determined the rate of forward migration and the mobilization of cells between the wound edges.

Invasion assay

Cell invasion assay was performed in an invasion chamber based on the Boyden chamber principle [25]. Each insert is fitted with an 8 μ M pore size polycarbonate membrane (Costar, Corning, NY, USA) pre-coated with rat tail collagen I (5 μ g/cm²) (Sigma). Inserts were washed in free serum-culture media and incubated for 30 min at room temperature. JEG-3 (5×10^4), HTR-8/SVneo (2.5×10^4) or primary extravillous trophoblast (5×10^5) cells were starved in media containing 0.5% FBS for 16 h and added in 100 μ l of culture media to the upper compartment of the transwell chambers in 100 μ l of media, were added to the upper compartment of the transwell chambers. Cells were treated with culture media or with increasing drug (DOI and/or ritanserin) and then 400 μ l of 0.5 % FBS supplemented media was added to the lower chamber. Cells were incubated for 24 h and 48 h at 37°C under 5% CO₂ incubator. Cells that did not invade but were still attached to the collagen were swept away with a cotton swab and invaded viable cells were stained with 0.9% of crystal violet for 15 min at room temperature.

After vigorous washing, the stain was extracted with a solution of 1% acetic acid: 50% ethanol for 15 min at room temperature and 100 μ l of the dye mixture transferred to a 96-well plate (Corning) for colorimetric measurement at 560 nm with collagen type I coated inserts incubated with medium without cells served as blank. In parallel, cell viability (proliferation) was assessed as described above using WST-1 assay. The viability assay was performed at the same time, with the same preparation of cells and the same condition of culture as used for the invasion assay. Data were expressed as the absorbance of treated cells that invaded the collagen-coated membrane relative to untreated controls cells. The percentage of invasion was expressed as cells that invaded the collagen-coated membrane relative to the viability (proliferation) assay (reflecting the number of total cells) [26]. For morphological study, collagen-coated insert membranes were stained with Diff-Quick stain or crystal violet (Biochemical Science, Inc., Swedesboro, NJ) and viewed under a microscope.

Western blot analysis

The JEG-3 cells were cultured in collagen I pre-coated 6 well plates (Corning) at a density of 25×10^4 cells in complete growth medium for 12 h. After 16 h of culture in medium containing 0.5% FBS, cells were treated for 48 h with increase concentration of DOI with or without ritanserin. Total protein was extracted as previously described [15]. Protein concentrations were measured using a bicinchoninic acid assay (BCA; Pierce, Rockford, IL) kit with bovine serum albumin (BSA) as standard. Total protein extracts were denatured at 95°C for 10 min and fractionated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) on 4% stacking and 10% separating gels, followed by transfer to PVDF membranes (Millipore, Mississauga, ON). Membranes were blocked in TBS-T (20 mM Tris-HCl, pH 7.4; 150 mM NaCl; 0.05% (v/v)

Tween 20) containing 5% skim milk for 1 h at room temperature. Membranes were incubated with specific antibodies against 5-HT2A (1:250), anti-MEK1/2 (1:1000), anti-p-MEK1/2 (1:2000), anti-ERK1/2 (1:1000), anti-p-ERK1/2 (1:1000), anti-JAK2 (1:1000), anti-STAT3 (1:200), anti-p-Tyr STAT3 (1:1000), MMP-2 (1/1000) or MMP-9 (1/1000) diluted in TBS-T containing 5% skim milk at 4°C overnight. Membranes were washed three times with TBS containing 0.1% Tween 20, then incubated with HRP-conjugated anti-rabbit IgG (1:5000) or anti-mouse IgG (1:5000) as secondary antibodies for 1 h at room temperature and then washed 3 times with TBS-T 0.05%. Bands were visualized with Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) and their intensities quantified by densitometry analysis using FluorChem HD2 software version 6.0 (Alpha Innotech, San Leandro, CA). The PVDF membranes were stripped with Re-Blot plus Mild solution (Millipore) at room temperature for 15 min, washed twice for 5 min with TBS-T, and quickly rinsed 5 times in water before reprobing with antibodies against β -actin (1:10000) for equal loading control. Polyclonal antibodies against 5-HT2A (H-75), JAK2 (sc-34479) and phospho-MEK1/2 (sc-7995) for western blot analysis were obtained from Santa Cruz Biotechnology (CA, USA), while those against MEK1/2 (05-747), phospho-ERK1/2 (05-481), ERK1/2 (06-182), STAT3 (06-596), phospho-STAT3 (Tyr-705) (05-485), MMP-9 (AB6014), MMP-2 (MAB13489) and secondary antibodies were purchased from Millipore.

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis

Total RNA of 5×10^6 extravillous trophoblast cells were extracted using RNeasy Mini kit from Qiagen (Mississauga, ON) following the manufacturer's instructions. Genomic DNA was digested by DNase I digestion for 15 min. Concentration and purity of RNA was determined by

measuring the 260/280 nm absorbance ratio using a spectrophotometer (SpectraMax M5, Molecular Devices, Sunnyvale, CA), with quality assessed visually from 18S and 28S ribosomal bands on agarose gels. Original extracts and 50 ng/ μ l dilutions in RNAase-free water were stored at -80 °C until RT-PCR analysis.

For primary extravillous trophoblast, reverse transcription was performed with 400 ng of total RNA in a final volume of 20 μ l using QuantiTect Reverse Transcription kit (QIAGEN, Basel, Switzerland). The quantitative detection of the qPCR product was performed using the qPCR Mastermix Plus for SYBR Green I (Eurogentec, Seraing, Belgium), supplemented with fluorescein (Bio-Rad, Reinach, Switzerland), with the iCycler iQ System (Bio-Rad). The relative expression was normalized to the housekeeping gene cyclophilin A. For JEG-3 and HTR8/SVneo cells, reverse transcription was performed with 100 ng of total RNA using the one step RT-PCR kit (Access RT-PCR kit, Promega, Madison, WI) with β -actin as a reference gene. Oligonucleotide primers (Invitrogen, Carlsbad, CA) which were constructed based on the conserved sequences were as follows: 5'-TACGGGTCCTGGCATCTTGT-3' (fwd) and 5'-CCATTTGTGTTGGGTCCAGC-3' (rev) for human cyclophilin A; 5'-GTACCCTGGCATTGCCGAC-3' (fwd) and 5'-TAACGCAACTAAGTCATAGTCC-3' (rev) for β -actin; 5'-ATGACAGCTGCACCACTGAG-3' (fwd) and 5'-GCCTCGTATACCGCATCAAT-3' (rev) for human MMP-2; 5'-GTGCTGGGCTGCTGCTTTGCTG-3' (fwd) and 5'-GTCGCCCTCAAAGGTTTGGGAAT-3'(rev) for human MMP-9; and 5'-GGCATCAAGGTTGGTTCAGT-3' (fwd) and 5'-GGCTACAACATAGGCCTCCA-3' (rev) for 5-HT_{2A} receptor. PCR products were visualized by electrophoresis on a 2% agarose gel containing ethidium bromide and photographed under a UV light. Densitometry was carried out using AlphaEaseFC Imaging software (version 6.0.0,

Alpha Innotech, San Leandro, CA). The exponential amplification range was determined for each set of primers to optimize the number of cycles in the PCR method for semi-quantitative analysis of gene products. Experiments were repeated at least three times in triplicate with cells from different passage/purification.

Gelatin zymography

Gelatinases (MMP-9 and MMP-2) activities in serum-free conditioned media were determined using SDS-polyacrylamide gel zymography as described previously [27, 28]. Briefly, cell culture supernatants were collected and centrifuged to remove cell debris. Supernatants were then concentrated using Centricon centrifugal filter devices (Millipore) and protein contents was determined by Bradford kit according to manufacturer's instructions. Then 20µg of proteins were loaded per lane and electrophoresed on 10% SDS-polyacrylamide gels containing 1 mg/ml of gelatin under non-reducing conditions. Following electrophoresis, gels were washed twice for 30 min in 2.5% Triton X-100 (v/v) to remove SDS, and were then rinsed twice for 10 min in dH₂O. After overnight incubation in reaction buffer (50 mmol/l Tris-HCl, pH 7, containing 5 mmol/l CaCl₂) at 37°C, gels were stained with Coomassie brilliant blue R-250 for 30 min at RT and were destained in 30% methanol and 10% glacial acetic acid (v/v). Proteinase activity was observed as a clear band of digested gelatin. Gelatinase activities were semi-quantified by densitometric analysis of zymograms using the FluorChem HD2 software version 6.0. Zymography experiments were repeated at least three times with cells from different passage/purification.

Statistical analysis

Experiments were performed three times using cells from different passages or purification and were conducted in triplicate. Densitometry analyses of the immunoblots and RT-PCR were expressed as normalized means \pm S.E.M (standard error of the mean (S.E.M)). Statistically significant differences ($*P < 0.05$) were determined using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by tukey's post-hoc test. All analyses were performed using GraphPad Prism v5.03 (GraphPad Software, San Diego, CA).

RESULTS

DOI activation of the 5-HT_{2A} receptor stimulates human trophoblast proliferation. We previously showed that DOI throughout the activation of the 5-HT_{2A} receptor stimulate JEG-3 and BeWo cell proliferation and survival [15]. Figure 1 shows that DOI in a dose-dependent manner can stimulates HTR-8/SVneo cell proliferation as observed in JEG-3 cell. The maximum of proliferation ($115 \pm 7\%$; $P < 0.001$) was reached when HTR-8/SVneo cells were treated with 25 μ M of DOI and decreased after to reach basal level at 100 μ M of DOI after 48 h of treatment (**Fig. 1**). Of note, DOI treatment has no effect on HTR-8/SVneo cell proliferation after 24 h of treatment (data not shown). The co-treatment of HTR-8/SVneo and JEG-3 cells with 10 μ M of the 5-HT_{2A} receptor antagonist ritanserin reversed the DOI-induced cell proliferation in both cell lines (**Fig. 1**).

DOI-activated 5-HT_{2A} receptor stimulates JAK2/STAT3 and ERK1/2 signaling pathways in human trophoblasts. Figure 2 demonstrated that activation of 5-HT_{2A} by DOI stimulates, in a time dependent-manner, JAK2/STAT3 and MEK/ERK1/2 signaling pathways in HTR-8/SVneo cells as previously reported for JEG-3 and BeWo cell lines [15]. The activation of the 5-HT_{2A} receptor by DOI induces the phosphorylation of JAK2/STAT3 ($275 \pm 20\%$; $P <$

0.001) and MEK/ERK1/2 ($240 \pm 20\%$ vs. 0 min; $P < 0.01$) signaling pathways reaching its maximum effect after 30 min. of exposition to 25 μM DOI without any effects on the expression of the non-phosphorylated protein (**Fig 2**).

DOI activation of the 5-HT_{2A} receptor to stimulates migration and invasion of trophoblastic cells. To establish whether activation of 5-HT_{2A} receptor may influence extravillous trophoblast invasion and migration, HTR-8/SVneo, JEG-3 and primary evCTB cells were exposed to increasing dose of DOI (0, 2.5 25, 50, 100 μM) and cell migration or invasion analyzed. Collagen invasion and wound healing results showed that the potentially effective concentrations of DOI to induce maximum migration and invasion of trophoblastic cell lines and evCTB after 48 h of culture was, respectively, 25 μM and 100 μM (**Fig 4A and 4C**). The addition of 10 μM of ritanserin completely abolished the stimulatory effect of 25 μM of DOI on JEG-3 and HTR8/SVneo cells migration and invasion (**Fig. 3 and Fig 4D**). Due to some cytotoxicity effect of DOI at concentration of 100 μM observed on first trimester evCTB (data not shown), only 25 and 50 μM of DOI were used for the rest of study.

DOI increases MMP-2 and MMP-9 mRNA expression in trophoblastic cells. To determine if the expression of MMP-9 and MMP-2 mRNA is regulated by the 5-HT_{2A} receptor activation in human trophoblasts, evCTB, JEG-3 and HTR-8/SV neo cells were incubated with increasing concentrations of DOI for 48 h. The expression of MMP-9 and MMP-2 mRNA evaluated by RT-PCR analysis indicates that MMP-2 and MMP-9 mRNA expression is significantly increased in response to increasing concentrations of DOI in trophoblastic cell JEG-3 and HTR-8/Svneo (**Fig. 5A and B**), while the increase observed in evCTB is not statically significant (**Fig 5C**). Stimulation of JEG-3 and HTR-8/SVneo cells by 25 μM DOI increases MMP-2 and MMP-9 mRNA levels by 1.6 and 1.5 fold vs. control respectively (**Fig. 5A and B**),

then decrease at 100 μM of DOI to reach control level for both cell lines. The kinetics of DOI-induced MMP-2 and MMP-9 mRNA expression was evaluated by exposing human trophoblast cells JEG-3 and HTR-8/SVneo with 25 μM of DOI for 24 h. RT-PCR analysis of MMP-2 and MMP-9 mRNA level in the presence or absence of DOI reveals no difference between the two conditions (data not shown). Treatment with 10 μM of ritanserin completely prevented the stimulatory effect of DOI (25 μM) on MMP-2 and MMP-9 mRNA expression in JEG-3 and HTR-8/SVneo cells (**Fig. 5D and Fig.5E**). These results indicate that MMP-2 and MMP-9 mRNA levels increase as a result of 5-HT_{2A} receptor activation in JEG-3 and HTR-8/SVneo cells.

DOI induces MMP-2 and MMP-9 protein expression and activities in trophoblastic cells. Next the effect of 5-HT_{2A} activation by DOI on the MMP-2 and MMP-9 proteins expression and activity in JEG-3 and HTR-8/SVneo cell was determined by western blot and zymography analysis. The expression of MMP-2 (72 kDa) and MMP-9 (92 kDa) protein is induced by 25 μM of DOI (about 1.5 fold) in JEG-3 and HTR-8/SVneo cells (**Fig. 6A and 6B**). Figure 6C shows that 48 h incubation with DOI increases the activity of MMP-2 and MMP-9 in JEG-3 and HTR-8/SVneo cells. Maximal effect is observed at 25 μM and 50 μM of DOI reaching about 1.5 fold *vs.* untreated control in JEG-3 and HTR-8/SVneo cells. The activity of MMP-2 and MMP-9 decreased to reach control level at 100 μM of DOI (**Fig. 6C and 6D**). In primary evCTB, 50 μM of DOI induces a slight increase of MMP-2 and MMP-9 activity, although not statistically significant (**Fig 6E**). This finding showed that trophoblast secretes increased levels of MMP-9 and MMP-2 in response to DOI treatment which is consistent with the increased expression of MMP-2 and MMP-9 mRNA and protein.

DOI-induced MMP-2 and MMP-9 gene expression is inhibited by JAK2 pathway inhibition. To get insights into the role of STAT3 and ERK1/2 phosphorylation in the stimulatory effect of DOI on MMP-2 and -9, AG490 and U0126 specific pharmacological inhibitors of JAK2 and ERK1/2, respectively were used. **Figure 7** demonstrates that AG490 and U0126 respectively reverse the DOI-induced STAT3 and ERK1/2 phosphorylation (activation) in a dose dependent manner (**Fig. 7A-D**) with maximal effect reach at 30 μ M of AG490 and 25 μ M of U0126. Thus, these concentrations were used to study if DOI-induced MMP-2 and MMP-9 mRNA expression involves STAT3 and ERK1/2 pathway. AG490 reverses by 75%, while U0126 has no effect on DOI-induced MMP-9 mRNA expression in JEG-3 and HTR-8/SVneo cells. Interestingly the combination of both inhibitors, AG490 and U0126, completely blocked the stimulatory effect of DOI on MMP-9 expression in JEG-3 and HTR-8/SVneo cells (**Fig. 7E**). The DOI-induced MMP-2 mRNA expression is completely reversed by AG490 in JEG-3 and HTR-8/SVneo, while U0126 has no effect (**Fig 7F**). These results indicate that the induction of MMP-2 and MMP-9 mRNA expression by DOI is mainly mediated mainly through JAK2 signaling pathway in these human trophoblastic cell lines.

DISCUSSION

This study demonstrates that the serotonin 5-HT_{2A} receptor acts as pro-invasive receptor in trophoblastic cell. The activation of the 5-HT_{2A} receptor by DOI stimulates trophoblast invasion. DOI-stimulated trophoblast invasion required the activation of MMP-9 and MMP-2 throughout the activation of JAK2/STAT3 signaling pathway which is consistent with our previous work showing that JAK2/STAT3 acts as key signaling pathway downstream to the 5-HT_{2A} receptor activation in the regulation of JEG-3 cell proliferation and ERK1/2 stimulation [16]. Here we

show that inhibition of JAK2, but not ERK1/2 inhibits the effect of DOI on MMP-9 and MMP-2 mRNA expression in JEG-3 and HTR-8/SVneo cell lines.

Three types of cells were used as *in vitro* model to investigate the role of 5-HT_{2A} in the invasion of trophoblastic cells. It has been extensively shown that JEG-3 choriocarcinoma cells are not an *in vitro* model of normal invasive human trophoblast, but possess a trophoblast-like behavior common to all cancer cells. To overcome this problem, we chose two other placental trophoblast models, the HTR-8/SVneo immortalized extravillous cell line and primary first trimester extravillous trophoblast from first trimester placenta. First, as observed previously in primary villous trophoblast and choriocarcinoma cell line [13, 14], we demonstrated that the 5-HT_{2A} receptor is expressed in primary extravillous trophoblastic cells and in HTR-8/SVneo cells. The expression of the 5-HT_{2A} receptor appears higher in HTR-8/SVneo and JEG-3 cell lines compared to primary extravillous trophoblast. This suggests that overexpression of the 5-HT_{2A} receptor reflects one of the phenotypic difference between the primary trophoblast *vs.* cell lines and could be associated with the process of transformation of trophoblast from normal cell to neoplastic cell. This is consistent with the observation that 5-HT_{2A} receptor acts as a proto-oncogene in NIH-3T3 fibroblasts [28]. Introduction of functional 5-HT_{2A} receptor into NIH-3T3 fibroblast cells results in the generation of transformed foci. Moreover, generation and maintenance of the transformed foci requires continued activation of the 5-HT_{2A} by serotonin [28]. This remains to be investigated in normal *vs.* tumor trophoblast cell.

Overexpression of the 5-HT_{2A} receptor and an alteration of the 5-HT_{2A} receptor signaling have been observed in highly invasive osteosarcoma cells *vs.* normal osteoblast cells (non-invasive) [29]. The same observations were reported for the cancer cells of glioma *vs.* healthy human fetal astrocytes [30]. In these latter the transcripts encoding the different types of

serotonin receptors are present except for transcripts encoding the 5-HT_{2A} receptor. Treatment of glioma cell lines (expressing 5-HT_{2A}) by serotonin stimulates their proliferative, migratory and invasive abilities via 5-HT_{2A} receptors; although the molecular mechanism involved has not been studied [30]. These data show that the 5-HT_{2A} receptor is involved in cell invasion. In accord with this, here we demonstrate that 5-HT_{2A} stimulates the invasion of trophoblastic cell lines and primary extravillous trophoblast. Trophoblast invasion is a key process for successful pregnancy circulation to the fetus circulation. This process depends, in part, on the regulated production and activities of MMP-9 and MMP-2, which functions to degrade the extracellular matrix of maternal decidua [31, 32]. The activation of the 5-HT_{2A} receptor by DOI stimulates expression and the activity of MMP-9 and MMP-2 in JEG-3 and HTR8/SVneo trophoblastic cell lines but not in the primary extravillous trophoblast. This highlights the importance to careful when extrapolating the results obtained in trophoblastic cell lines to primary trophoblast and could be explained by the difference between the phenotypes of trophoblastic cell lines vs. primary trophoblast. JEG-3 cells possess highly invasive phenotypes and express constitutively activated pool of STAT3 protein at higher level than the primary cells [23, 33, 34]. The primary extravillous trophoblastic cells could also use mechanisms independent of MMP-2 and MMP-9 activation to invade the maternal uterine tissues, such as the participation of TIMPs, and p53 [4, 8, 35, 36]. These inhibitors counteract the action of the respective proteases. Further studies are required to determine if DOI regulate TIMP-1 and TIMP-2, specific inhibitors of MMP-2 and MMP-9 respectively.

Our results obtained in JEG-3 and HTR-8/SVneo cell lines are consistent with earlier studies confirming the role of MMP-9 and MMP-2 in the invasion of trophoblast [27, 37, 38]. The expression and activity of MMP-9 and MMP-2 are regulated by several growth factors and

hormones via the activation of the STAT3 signaling pathways [39-41]. STAT3 is known to directly up-regulate the expression of MMP-2, and MMP-9, involved in the degradation of basement membrane and extracellular matrix [42]. MMP-9 promoter contains multiple putative Stat3-binding sites, two of which can be considered as high-affinity binding sites [41]. However, a direct association between STAT3 and the MMP-9 promoter has never been demonstrated. A high-affinity Stat3-binding element was also identified in the MMP-2 promoter and it was shown STAT3 protein bound directly to the MMP-2 promoter, and blockade of activated STAT3 through expression of a dominant-negative STAT3 significantly suppressed MMP-2 expression in the metastatic tumor cells [41]. These observations led us to suggest that activation of MMP-2 and MMP-9 in trophoblastic cells by DOI mainly involves the activation of STAT3 signaling pathways. In accord with this, the inhibition of STAT3 pathway, but not ERK1/2, blocks the stimulating effect of DOI on the expression of MMP-2 and MMP-9. Moreover, our findings are consistent with our previous reports demonstrating the importance of JAK2/STAT3 in modulating the proliferative effects of DOI on JEG-3 cells [16].

The similarities between the process of invasion of trophoblast cells and cancer lead us to extrapolate the knowledge from one domain to another. The tumor invasion process has identified the importance of STAT3 activity. Aberrant activity of the phosphorylated form of STAT3 has been reported in cells with neoplastic behavior as hyperplasia and invasion [43, 44]. Constitutively active STAT3 is involved in the regulation of transcription factors associated with cell motility and production of proteases required for tumor invasion [45-47]. In this context, the involvement of STAT3 in the trophoblastic invasion of pathological pregnancies associated with altered extravillous trophoblast invasion, such as preeclampsia and intrauterine growth restriction, should be considered. In these pathological pregnancies, the placenta suffers from a

lack of blood supply [48-51]. Thus, one can speculate that pregnancies complications associated with altered placental invasion could be associated with reduced activation of STAT3 activity due to altered 5-HT_{2A} signaling. In preeclamptic pregnancies, the plasma concentration of serotonin and urinary excretion of metabolites of serotonin (5-hydroxyindolacetic acid, 5-HIAA) are increased [52, 53]. Furthermore, a reduction in the catalytic activity of monoamine oxydase-A (MAO-A), which is highly expressed in the placenta and the major degrading-enzyme of serotonin, and a reduction in the production of serotonin has been reported in preeclamptic pregnancy [54-57]. Another pathological pregnancies associated with alteration in serotonin systems is gestational diabetes mellitus in which women without previously diagnosed diabetes exhibit high blood glucose (blood sugar) levels during pregnancy. Our laboratory reported a reduction in the levels of expression of the 5-HT_{2A} receptor and the serotonin transporter in those pregnancies [14]. This alteration of serotonergic system might affect STAT3 signaling pathway and leads to a default in both extravillous trophoblast invasion and villous trophoblast functions such as glucose transport. Indeed, STAT3 proteins activated by 5-HT_{2A} receptors have been involved in the regulation of glucose uptake in skeletal muscle [58]. Of course, the effect of serotonin on the function of the trophoblast is not limited to the 5-HT_{2A} receptor, since other serotonin receptors are expressed by the trophoblast (5-HT_{1A}, 5-HT_{2B} and 2C) [Unpublished data]. Thus, extensive characterization of the serotonin system in the trophoblast (production of serotonin, serotonin receptor, and transporter) is necessary to better understand the role and mechanism of action of serotonin and its receptors in trophoblast development and functions.

In conclusion, this study demonstrates for the first time a link between serotonergic system, the 5-HT_{2A} receptor, and placentation (proliferation, migration and invasion of trophoblast). These data suggest that serotonergic system dysfunction could alter trophoblast

invasion (insufficient or excessive invasion) and by consequence be implicates in the etiology of pathological pregnancies, such as preeclampsia, choriocarcinoma, and intrauterine growth restriction.

ACKNOWLEDGMENT

We are very thankful to Christine Wullemin for her technical help.

REFERENCES

1. Kadyrov M, Kingdom J, Huppertz B. Divergent trophoblast invasion and apoptosis in placental bed spiral arteries from pregnancies complicated by maternal anemia and early-onset preeclampsia/intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 2006; 194:557-563.
2. Anin S, Vince G, Quenby S. Trophoblast invasion. *Hum Fertil (Camb)* 2004; 7:169-174.
3. Norwitz E, Schust D, Fisher S. Implantation and the survival of early pregnancy. *N Engl J Med* 2001; 345:1400-1408.
4. Lala PK, Lee BP, Xu G, Chakraborty C. Human placental trophoblast as an in vitro model for tumor progression. *Can J Physiol Pharmacol* 2002; 80:142-149.
5. Bischof P, Meisser A, Campana A. Mechanisms of endometrial control of trophoblast invasion. *J Reprod Fertil Suppl* 2000; 55:65-71.
6. Cohen M, Meisser A, Bischof P. Metalloproteinases and human placental invasiveness. *Placenta* 2006; 27:783-793.
7. Knofler M, Simmons DG, Lash GE, Harris LK, Armant DR. Regulation of trophoblast invasion - a workshop report. *Placenta* 2008; 29 Suppl A:S26-28.
8. Staun-Ram E, Goldman S, Gabarin D, Shalev E. Expression and importance of matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and -9) in human trophoblast invasion. *Reprod Biol Endocrinol* 2004; 2:59.
9. Huppertz B, Kertschanska S, Demir AY, Frank HG, Kaufmann P. Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases (MMP), their substrates, and their inhibitors (TIMP) during trophoblast invasion in the human placenta. *Cell Tissue Res* 1998; 291:133-148.

10. Bonnin A, Goeden N, Chen K, Wilson ML, King J, Shih JC, Blakely RD, Deneris ES, Levitt P. A transient placental source of serotonin for the fetal forebrain. *Nature* 2011; 472:347-350.
11. Deroy K, Côté F, Fournier T, Sanderson J, Vaillancourt C. Serotonin Production by Human and Mouse Trophoblast: Involvement in Placental Development and Function. *Placenta* 2013; 34:A71.
12. Raymond JR, Mukhin YV, Gelasco A, Turner J, Collinsworth G, Gettys TW, Grewal JS, Garnovskaya MN. Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. *Pharmacol Ther* 2001; 92:179-212.
13. Sonier B, Lavigne C, Arseneault M, Ouellette R, Vaillancourt C. Expression of the 5-HT_{2A} serotonergic receptor in human placenta and choriocarcinoma cells: mitogenic implications of serotonin. *Placenta* 2005; 26:484-490.
14. Viau M, Lafond J, Vaillancourt C. Expression of placental serotonin transporter and 5-HT_{2A} receptor in normal and gestational diabetes mellitus pregnancies. *Reproductive biomedicine online* 2009; 19:207-215.
15. Oufkir T, Arseneault M, Sanderson JT, Vaillancourt C. The 5-HT_{2A} serotonin receptor enhances cell viability, affects cell cycle progression and activates MEK-ERK1/2 and JAK2-STAT3 signalling pathways in human choriocarcinoma cell lines. *Placenta* 2010; 31:439-447.
16. Oufkir T, Vaillancourt C. Phosphorylation of JAK2 by serotonin 5-HT_{2A} receptor activates both STAT3 and ERK1/2 pathways and increases growth of JEG-3 human placental choriocarcinoma cell. *Placenta* 2011; 32:1033-1040.

17. Bass KE, Morrish D, Roth I, Bhardwaj D, Taylor R, Zhou Y, Fisher SJ. Human cytotrophoblast invasion is up-regulated by epidermal growth factor: evidence that paracrine factors modify this process. *Dev Biol* 1994; 164:550-561.
18. Athanassiades A, Hamilton GS, Lala PK. Vascular endothelial growth factor stimulates proliferation but not migration or invasiveness in human extravillous trophoblast. *Biol Reprod* 1998; 59:643-654.
19. Athanassiades A, Lala PK. Role of placenta growth factor (PlGF) in human extravillous trophoblast proliferation, migration and invasiveness. *Placenta* 1998; 19:465-473.
20. Chakraborty C, Gleeson LM, McKinnon T, Lala PK. Regulation of human trophoblast migration and invasiveness. *Can J Physiol Pharmacol* 2002; 80:116-124.
21. Aplin JD, Haigh T, Lacey H, Chen CP, Jones CJ. Tissue interactions in the control of trophoblast invasion. *J Reprod Fertil Suppl* 2000; 55:57-64.
22. Kauma SW, Bae-Jump V, Walsh SW. Hepatocyte growth factor stimulates trophoblast invasion: a potential mechanism for abnormal placentation in preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:4092-4096.
23. Corvinus FM, Fitzgerald JS, Friedrich K, Markert UR. Evidence for a correlation between trophoblast invasiveness and STAT3 activity. *Am J Reprod Immunol* 2003; 50:316-321.
24. Cohen M, Ribaux P, Epiney M, Irion O. Role of prostate apoptosis response 4 in translocation of GRP78 from the endoplasmic reticulum to the cell surface of trophoblastic cells. *PLoS One* 2013; 8:e80231.

25. Arnaudeau S, Arboit P, Bischof P, Shin-ya K, Tomida A, Tsuruo T, Irion O, Cohen M. Glucose-regulated protein 78: a new partner of p53 in trophoblast. *Proteomics* 2009; 9:5316-5327.
26. Imamura H, Takao S, Aikou T. A modified invasion-3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay for quantitating tumor cell invasion. *Cancer Res* 1994; 54:3620-3624.
27. Cohen M, Bischof P. Coculture of decidua and trophoblast to study proliferation and invasion. *Methods Mol Biol* 2009; 550:63-72.
28. Lash GE, Otun HA, Innes BA, Bulmer JN, Searle RF, Robson SC. Inhibition of trophoblast cell invasion by TGF β 1, 2, and 3 is associated with a decrease in active proteases. *Biol Reprod* 2005; 73:374-381.
29. Bracha S, Viall A, Goodall C, Stang B, Ruaux C, Seguin B, Chappell PE. The expression and role of serotonin receptor 5HT β 2A in canine osteoblasts and an osteosarcoma cell line. *BMC Vet Res* 2013; 9:251.
30. Merzak A, Koochekpour S, Fillion MP, Fillion G, Pilkington GJ. Expression of serotonin receptors in human fetal astrocytes and glioma cell lines: a possible role in glioma cell proliferation and migration. *Brain Res Mol Brain Res* 1996; 41:1-7.
31. Librach CL, Werb Z, Fitzgerald ML, Chiu K, Corwin NM, Esteves RA, Grobelyny D, Galardy R, Damsky CH, Fisher SJ. 92-kD type IV collagenase mediates invasion of human cytotrophoblasts. *J Cell Biol* 1991; 113:437-449.
32. Librach CL, Feigenbaum SL, Bass KE, Cui TY, Verastas N, Sadovsky Y, Quigley JP, French DL, Fisher SJ. Interleukin-1 beta regulates human cytotrophoblast metalloproteinase activity and invasion in vitro. *J Biol Chem* 1994; 269:17125-17131.

33. Fitzgerald JS, Busch S, Wengenmayer T, Foerster K, de la Motte T, Poehlmann TG, Markert UR. Signal transduction in trophoblast invasion. *Chem Immunol Allergy* 2005; 88:181-199.
34. Fitzgerald JS, Tsareva SA, Poehlmann TG, Berod L, Meissner A, Corvinus FM, Wiederanders B, Pfitzner E, Markert UR, Friedrich K. Leukemia inhibitory factor triggers activation of signal transducer and activator of transcription 3, proliferation, invasiveness, and altered protease expression in choriocarcinoma cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37:2284-2296.
35. Cohen M, Wullemin C, Bischof P. Trophoblastic p53 is stabilised by a cis-trans isomerisation necessary for the formation of high molecular weight complexes involving the N-terminus of p53. *Biochimie* 2008; 90:855-862.
36. Cohen M, Wullemin C, Irion O, Bischof P. Regulation of MMP-9 by p53 in first trimester cytotrophoblastic cells. *Hum Reprod* 2008; 23:2273-2281.
37. Fluhr H, Bischof-Islami D, Krenzer S, Licht P, Bischof P, Zygmunt M. Human chorionic gonadotropin stimulates matrix metalloproteinases-2 and -9 in cytotrophoblastic cells and decreases tissue inhibitor of metalloproteinases-1, -2, and -3 in decidualized endometrial stromal cells. *Fertil Steril* 2008; 90:1390-1395.
38. Onogi A, Naruse K, Sado T, Tsunemi T, Shigetomi H, Noguchi T, Yamada Y, Akasaki M, Oi H, Kobayashi H. Hypoxia inhibits invasion of extravillous trophoblast cells through reduction of matrix metalloproteinase (MMP)-2 activation in the early first trimester of human pregnancy. *Placenta* 2011; 32:665-670.
39. Smola-Hess S, Schnitzler R, Hadaschik D, Smola H, Mauch C, Krieg T, Pfister H. CD40L induces matrix-metalloproteinase-9 but not tissue inhibitor of metalloproteinases-

- 1 in cervical carcinoma cells: imbalance between NF-kappaB and STAT3 activation. *Exp Cell Res* 2001; 267:205-215.
40. Takino T, Miyamori H, Watanabe Y, Yoshioka K, Seiki M, Sato H. Membrane type 1 matrix metalloproteinase regulates collagen-dependent mitogen-activated protein/extracellular signal-related kinase activation and cell migration. *Cancer Res* 2004; 64:1044-1049.
41. Xie TX, Wei D, Liu M, Gao AC, Ali-Osman F, Sawaya R, Huang S. Stat3 activation regulates the expression of matrix metalloproteinase-2 and tumor invasion and metastasis. *Oncogene* 2004; 23:3550-3560.
42. Huang S. Regulation of metastases by signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway: clinical implications. *Clin Cancer Res* 2007; 13:1362-1366.
43. Bromberg JF, Darnell JE, Jr. Potential roles of Stat1 and Stat3 in cellular transformation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1999; 64:425-428.
44. Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, Zhao Y, Pestell RG, Albanese C, Darnell JE, Jr. Stat3 as an oncogene. *Cell* 1999; 98:295-303.
45. Boccaccio C, Ando M, Tamagnone L, Bardelli A, Michieli P, Battistini C, Comoglio PM. Induction of epithelial tubules by growth factor HGF depends on the STAT pathway. *Nature* 1998; 391:285-288.
46. Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R. STATs in oncogenesis. *Oncogene* 2000; 19:2474-2488.
47. Zhang J, Cao YJ, Zhao YG, Sang QX, Duan EK. Expression of matrix metalloproteinase-26 and tissue inhibitor of metalloproteinase-4 in human normal cytotrophoblast cells and a choriocarcinoma cell line, JEG-3. *Mol Hum Reprod* 2002; 8:659-666.

48. Bischof P, Campana A. A model for implantation of the human blastocyst and early placentation. *Hum Reprod Update* 1996; 2:262-270.
49. Matthiesen L, Berg G, Ernerudh J, Ekerfelt C, Jonsson Y, Sharma S. Immunology of preeclampsia. *Chem Immunol Allergy* 2005; 89:49-61.
50. Zhou Y, Damsky CH, Fisher SJ. Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. One cause of defective endovascular invasion in this syndrome? *J Clin Invest* 1997; 99:2152-2164.
51. Zhou Y, Fisher SJ, Janatpour M, Genbacev O, Dejana E, Wheelock M, Damsky CH. Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion? *J Clin Invest* 1997; 99:2139-2151.
52. Bolte AC, van Geijn HP, Dekker GA. Pathophysiology of preeclampsia and the role of serotonin. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001; 95:12-21.
53. Carrasco G, Cruz MA, Gallardo V, Miguel P, Lagos M, Gonzalez C. Plasma and platelet concentration and platelet uptake of serotonin in normal and pre-eclamptic pregnancies. *Life Sci* 1998; 62:1323-1332.
54. Carrasco G, Cruz MA, Dominguez A, Gallardo V, Miguel P, Gonzalez C. The expression and activity of monoamine oxidase A, but not of the serotonin transporter, is decreased in human placenta from pre-eclamptic pregnancies. *Life Sci* 2000; 67:2961-2969.
55. Carrasco G, Cruz MA, Gallardo V, Miguel P, Dominguez A, Gonzalez C. Transport and metabolism of serotonin in the human placenta from normal and severely pre-eclamptic pregnancies. *Gynecol Obstet Invest* 2000; 49:150-155.

56. Lanoix D, Guerin P, Vaillancourt C. Placental melatonin production and melatonin receptor expression are altered in preeclampsia: new insights into the role of this hormone in pregnancy. *J Pineal Res* 2012; 53:417-425.
57. Sivasubramaniam SD, Finch CC, Billett MA, Baker PN, Billett EE. Monoamine Oxidase Expression and Activity in Human Placentae from Pre-eclamptic and Normotensive Pregnancies. *Placenta* 2002; 23:163-171.
58. Guillet-Deniau I, Burnol AF, Girard J. Identification and localization of a skeletal muscle serotonin 5-HT_{2A} receptor coupled to the Jak/STAT pathway. *J Biol Chem* 1997; 272:14825-14829.

FIGURE LEGENDS

FIG. 1: DOI induces JEG-3 and HTR-8/SVneo cells proliferation. 5×10^3 cells/well of JEG-3 (■) and HTR-8/SVneo (□) cells were plated in 96 well plates and treated with culture media (CTL) and with increasing concentrations of DOI (2.5, 25, 50, 100 μ M) for 48 h as described in Materials and Methods. Cells were treated or not with 10 μ M of ritanserin (Rit) in addition to 25 μ M of DOI (Rit + DOI). Cell growth was measured by WST-1 assay as described in Materials and Methods. Data are expressed as mean \pm S.E.M. of three independent experiments using different cell passages. **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$.

FIG. 2: Protein samples (50 μ g) were extracted from HTR-8/SVneo treated 25 μ M of DOI for 0, 5, 15, 30 and 60 min and resolved on SDS-PAGE using 10% acrylamide gel and transferred onto PVDF membrane. Membrane was then incubated with phospho-specific antibodies directed against JAK2, STAT3, MEK1/2 and ERK1/2 as described in Materials and Methods. The membranes were then stripped and reprobed with antibodies against total proteins for equal loading. The lower panel under each blot shows the densitometric analysis of bands intensities expressed as the ratio of phosphor-protein to total protein relative to the level at 0 min (arbitrarily set at 100%). Data are expressed as mean \pm S.E.M. from three separate experiments using different passage of HTR-8/SVneo cells; * $P < 0.05$, **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

FIG. 3: DOI induces JEG-3 and HTR-8/SVneo cells migration. Wound healing assay was performed as described in Materials and Methods to evaluate migration of JEG-3 (A) and HTR-8/SVneo (B). Cells were treated with culture media (CTL) and DOI (25 μ M) or with 10 μ M of ritanserin (Rit) and 25 μ M of DOI (Rit + DOI) for 48 h. Images were obtained from photos (A)

and (B), respectively, using image J software where the black zones delimit the border of the scratch injury and the percentage wound closure was calculated. (C) The relative migration is expressed as ratio of the percentage of DOI- and of Rit + DOI-treated JEG-3 (■) and HTR-8/SVneo (□) cells vs. non-treated control cells (set at 100 %). The results are compiled from at least three independent experiments.**, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$.

FIG. 4: DOI induces trophoblastic cells invasion. Matrigel invasion assay was performed as described in Materials and Methods to evaluate invasion of trophoblastic cells. JEG-3 and HTR-8/SVneo (A) and evCTB (C) were treated with culture media (CTL) and increasing concentrations of DOI (2.5, 25, 50, 100 μ M) for 48 h. In some experiments JEG-3 and HTR-8/SVneo cells (D) were treated with a combination of 10 μ M of 5-HT_{2A} antagonist ritanserin (Rit) and 25 μ M of DOI (Rit + DOI). 10% of FBS served as positive control. Typical photos were obtained from invading cells that penetrate to the downward surface of the insert at each condition of treatment (B). The relative invasion of cells under different conditions is normalized to non-treated control cells (set at 100 %). The results are compiled from three independent experiments using different passages of JEG-3 (■) and HTR-8/SVneo (□) cells and data are expressed as mean \pm S.E.M, **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

FIG. 5: DOI induces MMP-9 and MMP-2 mRNA expression through 5-HT_{2A} receptor. Total RNA from JEG-3 (A), HTR-8/SVneo (B) and evCTB (C) treated with culture media and increasing concentrations of DOI (2.5, 25, 50, 100 μ M) were extracted and amplified using specific primers for MMP-2 and MMP-9 gene as described in Materials and Methods. β -actin and cyclophilin A served as references genes for trophoblastic cell lines and evCTB respectively.

In some experiments, JEG-3 cells (D) and HTR-8/SVneo (E) were treated with culture media (CTL), 10 μ M of ritanserin (Rit) and 25 μ M of DOI (Rit + DOI). Densitometric analysis represents the ratios of densities of the bands of MMP-9 and MMP-2 to β -actin of DOI-treated cell normalized to control cells (set at 100%). Data are expressed as mean \pm S.E.M. from three separate experiments using different passage of JEG-3 (■) and HTR-8/SVneo (□) cells; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

FIG.6: Effects of on protein expression and activity of MMP-9 and MMP-2 in trophoblastic cells. Total proteins from JEG-3 (A) and HTR-8/SVneo (B) exposed to increasing doses of DOI (0, 2.5, 25, 50, 100 μ M) were analyzed by Western blots as described in Materials and Methods. The membranes were incubated with MMP-9 and MMP-2 antibodies. Then, membranes were stripped and reprobated with β -actin antibody for equal loading control. Supernatants from JEG-3 (C), HTR-8/SVneo (D) and evCTB (E) exposed to increasing doses of DOI (0, 2.5, 25, 50, 100 μ M) were collected after 48 h, concentrated and resolved on 10% of SDS-polyacrylamide gels containing 1mg/ml of gelatin according to Materials and Methods. In Western blot and zymography, densitometric analysis represents, respectively, the ratios of optical densities of the bands of MMP-9 and MMP-2 to β -actin of DOI-treated cell normalized to control cells (set at 100%) and the ratios of the bands of MMP-9 and MMP-2 of DOI-treated cells normalized to non-treated control cells (set at 100%). Results are obtained from at least three independent experiments using different passages of JEG-3 (■) and HTR-8/SVneo (□) cells; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

FIG. 7: DOI-induced MMP-9 and MMP-2 expression requires STAT3 but not ERK1/2 activation in HTR-8/SVneo. HTR-8/SVneo were pre-treated for 60 min. with the indicated concentrations of ERK1/2 inhibitor U0126 (A and D) and JAK2 inhibitor AG490 (B and C) respectively and then challenged with 25 μ M of DOI. 50 μ g of total protein were resolved with gel electrophoresis and transferred to PVDF membrane, which was then incubated with the indicated phospho-specific antibodies. The membranes were stripped and reprobed with antibodies against β -actin for equal loading. In some experiments, total RNA were extracted from JEG-3 (E) and HTR-8/SVneo (F) treated with culture media (CTL), 25 μ M of DOI (DOI), 25 μ M of U0126 (U), 30 μ M of AG490 (AG) and a combination of U0126 plus AG490 (U+AG). Total RNA were then amplified by RT-PCR using specific primers for MMP-2 and MMP-9 gene according to Materials and Methods. β -actin gene served as reference gene. Densitometric analysis represents the ratios of densities of the bands of MMP-9 and MMP-2 to β -actin of DOI-treated cells normalized to control cells (set at 100%). Data are expressed as mean \pm S.E.M. from three separate experiments using different passage of JEG-3 (■) and HTR-8/SVneo (□) cells; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

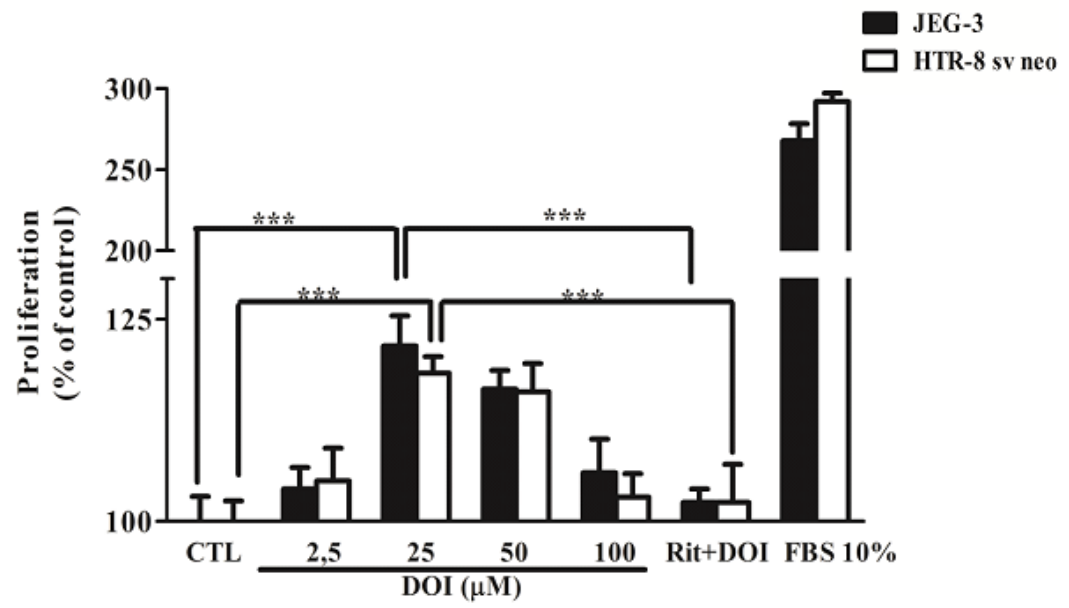


Figure 2

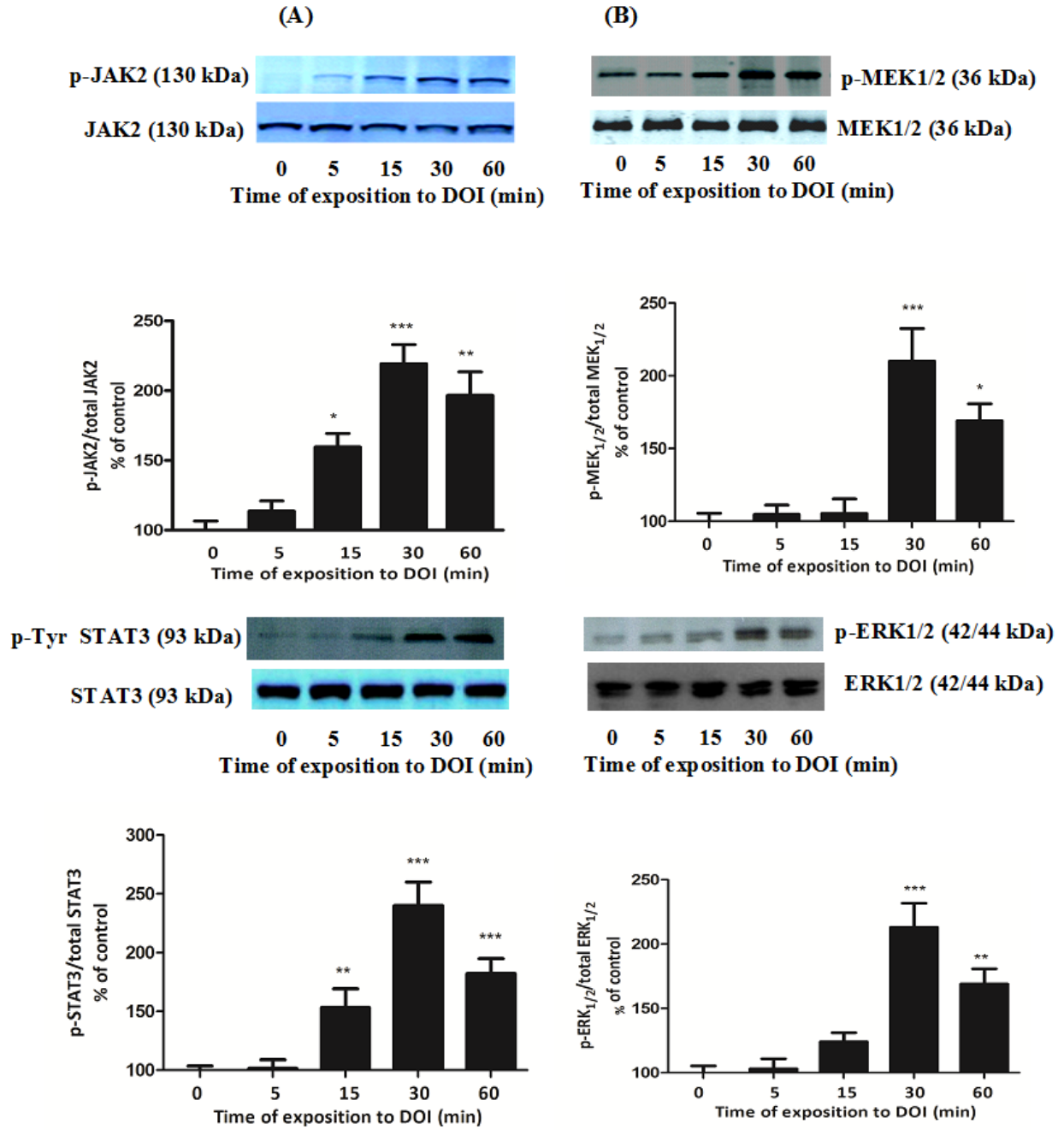
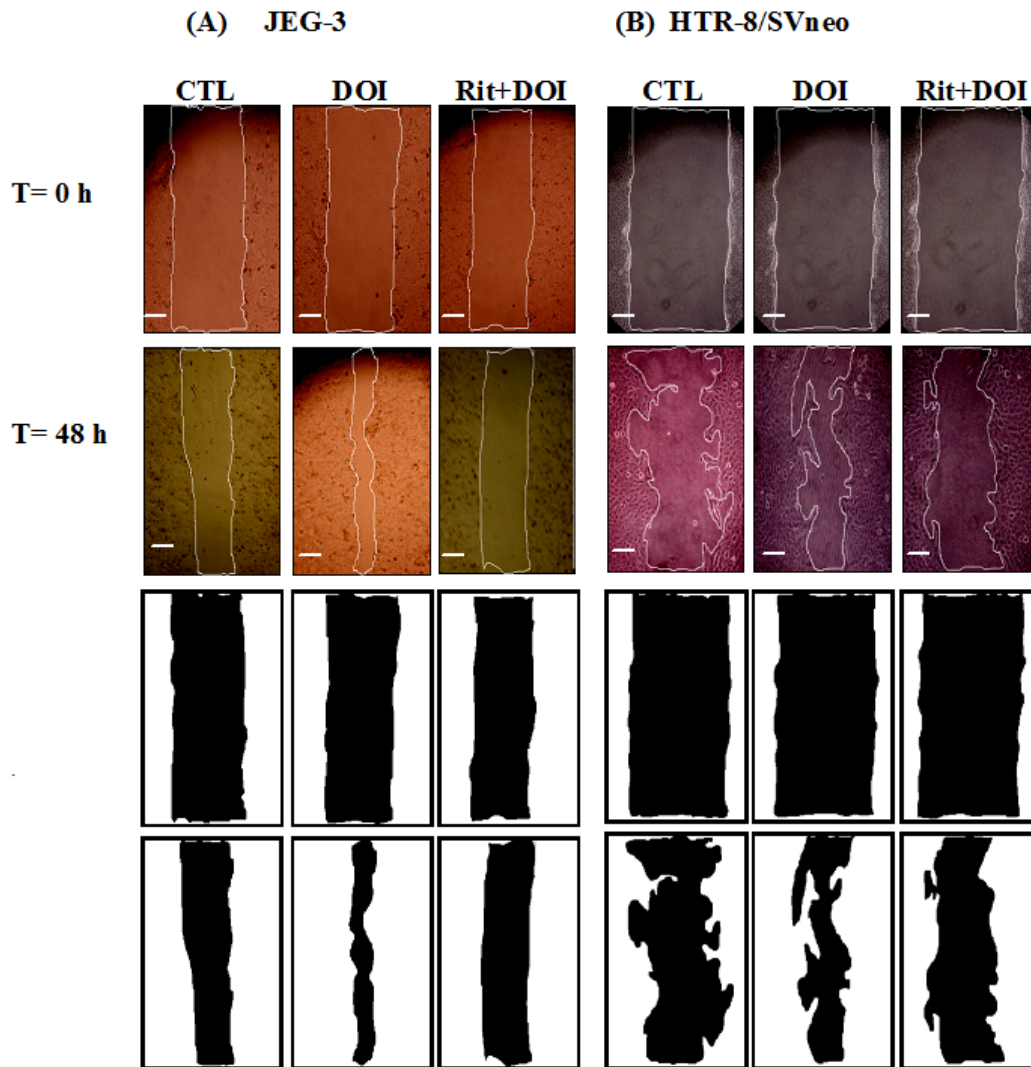


Figure 3



(C)

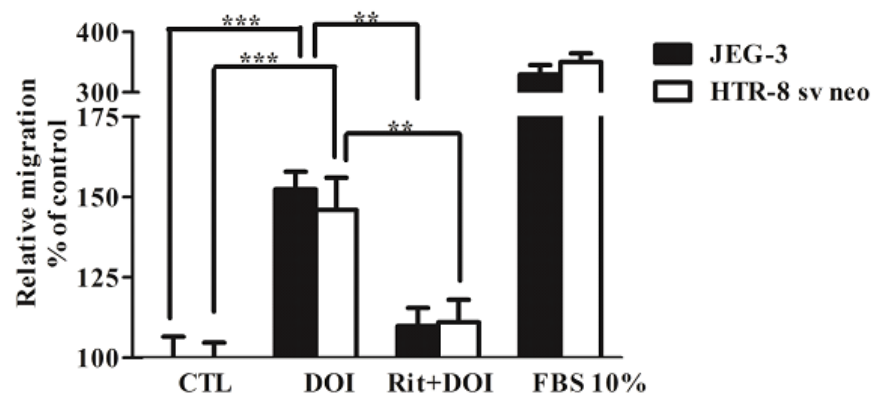
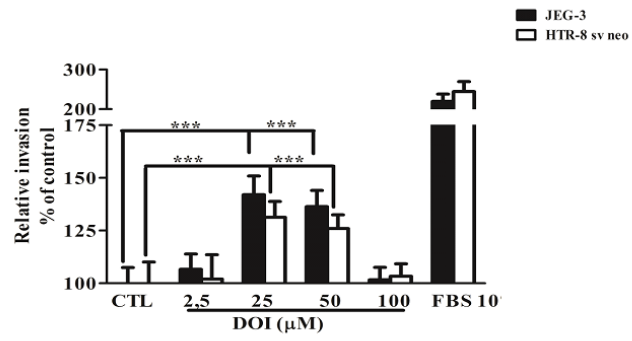
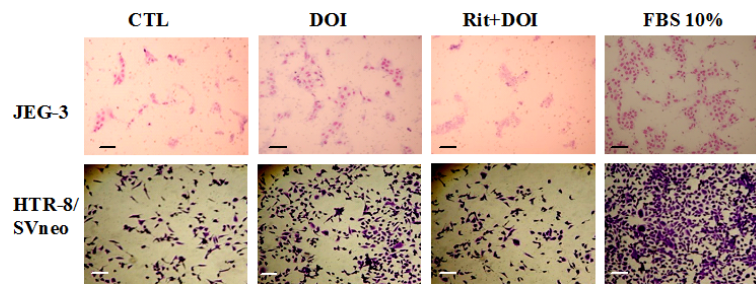


Figure. 4

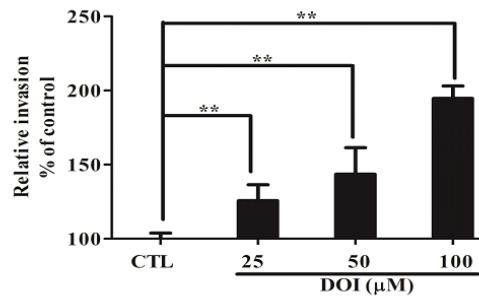
(A)



(B)



(C)



(D)

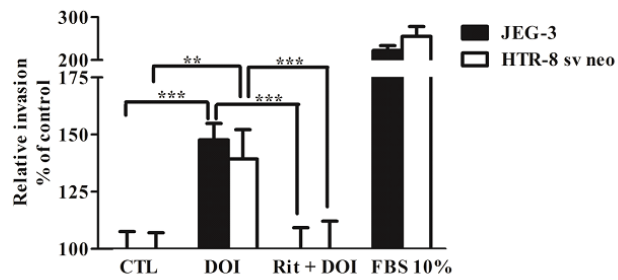


Figure 5

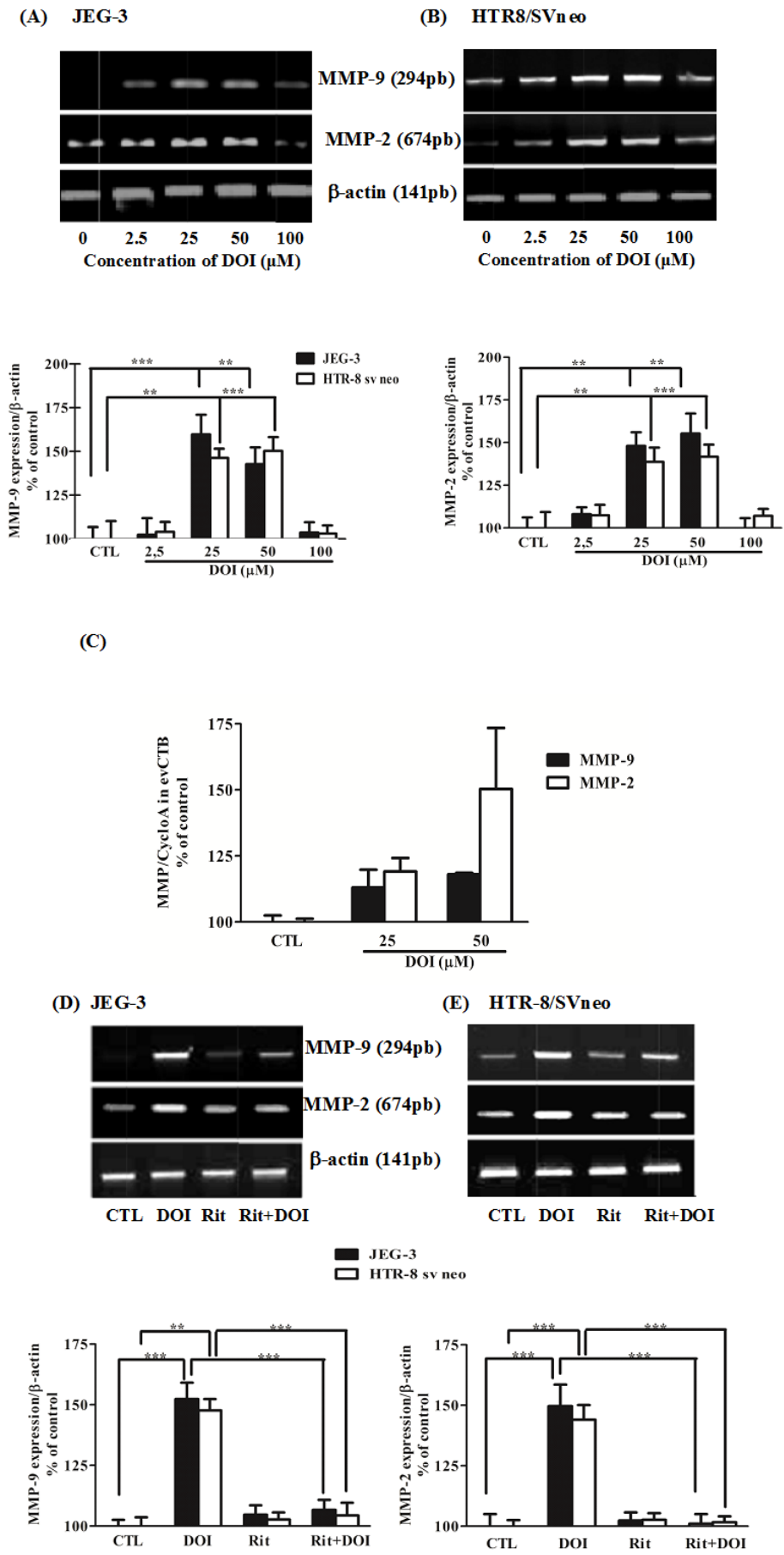


Figure 6

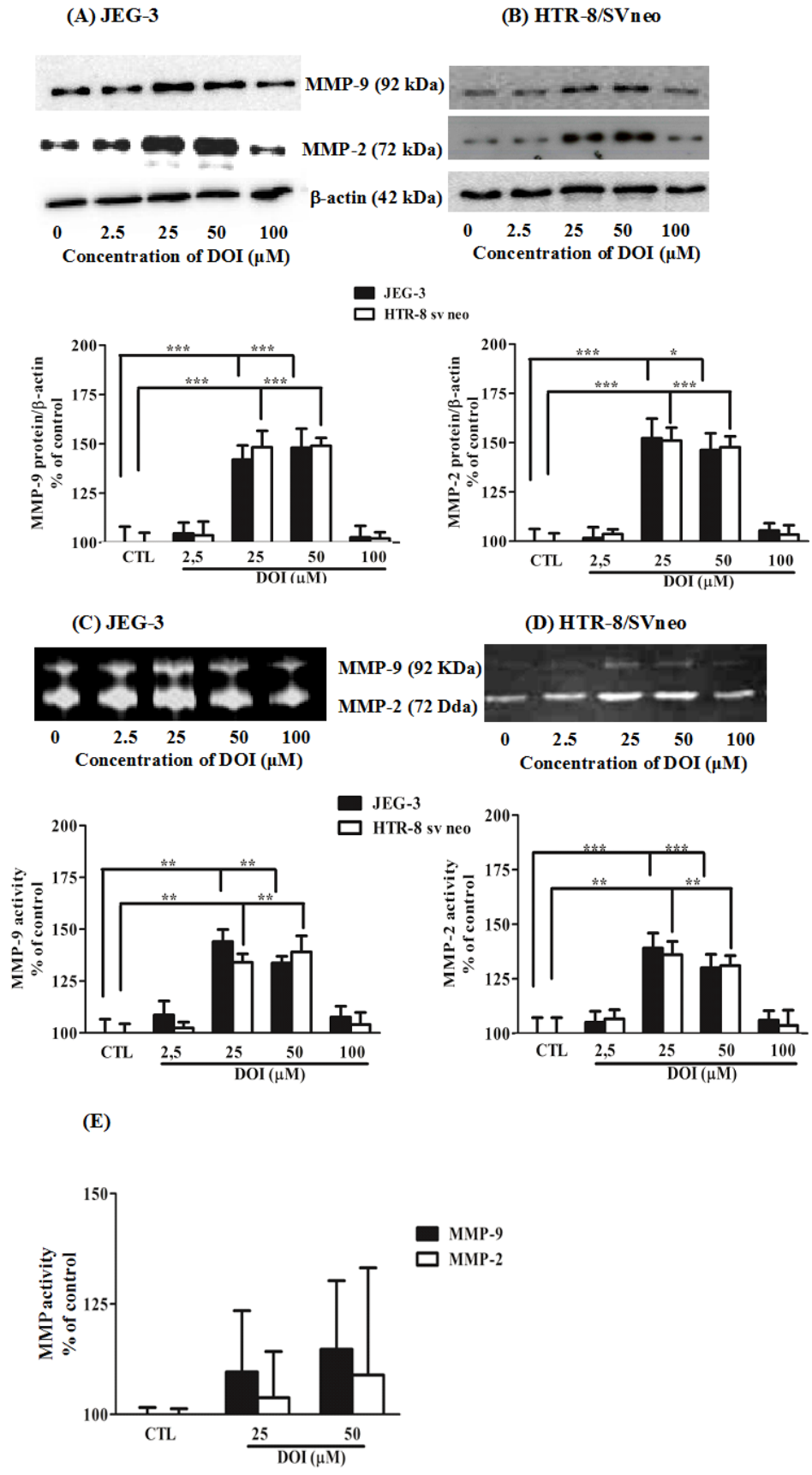
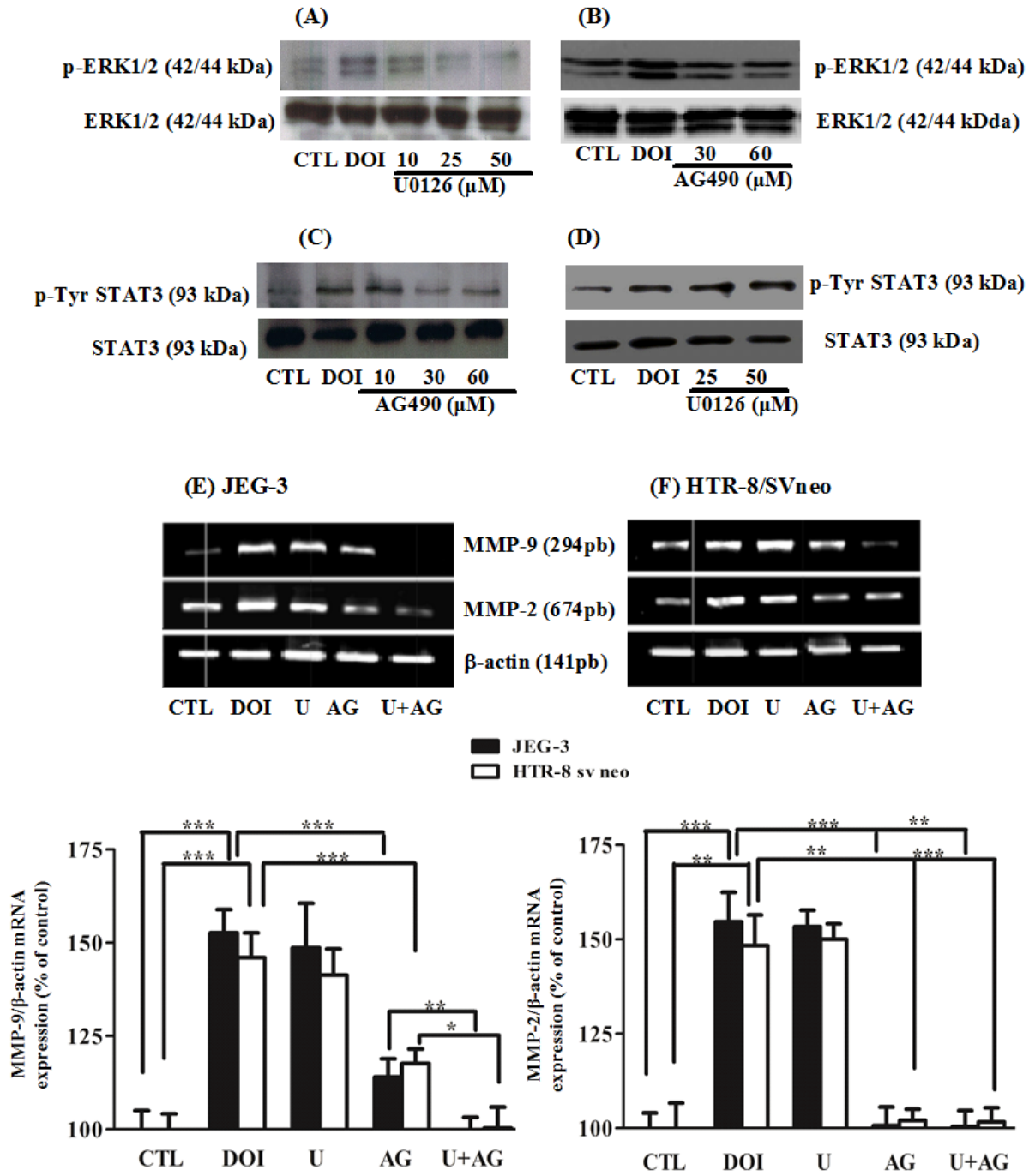


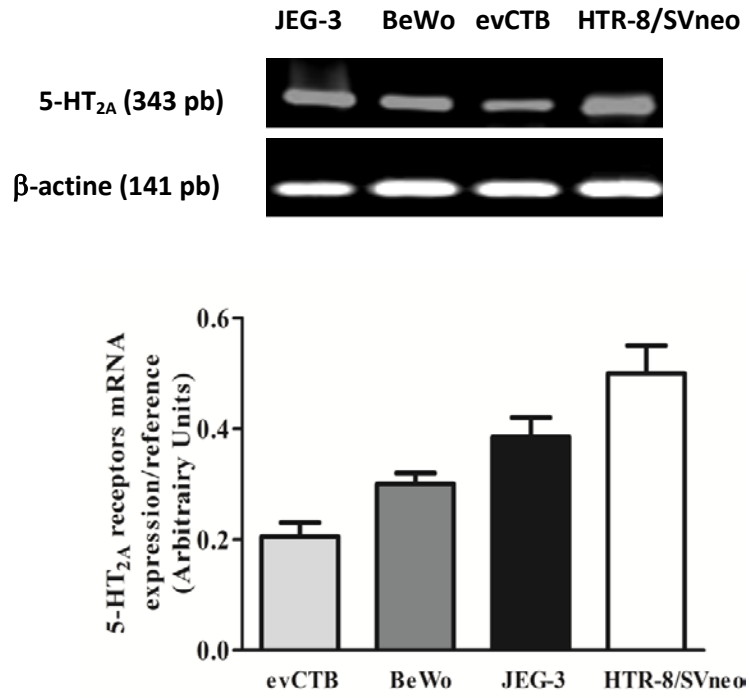
Figure 7



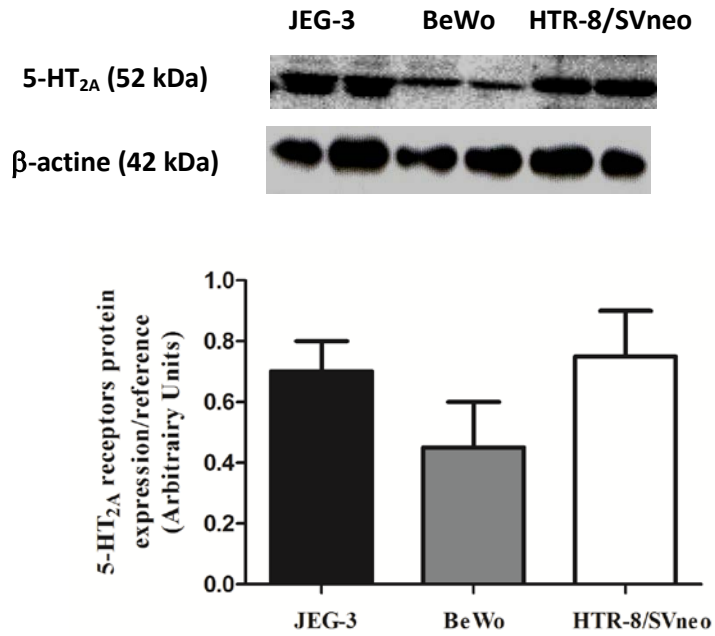
Supplemental data 1: Expression of 5-HT_{2A} receptor in extravillous trophoblastic cells. (A) Expression of the 5-HT_{2A} receptor mRNA in primary extravillous trophoblastic cells (evCTB), extravillous trophoblast-derived HTR-8/SVneo cell line and choriocarcinoma JEG-3 and BeWo cell lines (used as positive controls) detected by RT-PCR. Total RNAs were reverse transcribed and amplified with polymerase chain reaction by using primers specific for the 5-HT_{2A} receptor. The samples were separated by electrophoresis on 1.5% agarose gel. (B) Expression of the 5-HT_{2A} receptor protein in primary extravillous trophoblastic cells (evCTB), extravillous trophoblast-derived HTR-8/SVneo cell line and choriocarcinoma JEG-3 and BeWo cell lines (used as positive controls) detected by Western blots. Protein samples extracted from HTR-8/SVneo and choriocarcinoma cell lines (30 µg) were resolved on SDS-PAGE using 10% acrylamide gel and transferred onto PVDF membrane, which was then incubated with 5-HT_{2A} receptor antibody. The membranes were stripped and probed with β-actin antibody. The ratios of bands densities of 5-HT_{2A} receptors expressions to β-actin (histogram) were quantified by densitometry (A and B).

SUPPLEMENTAL- 1

(A)



(B)



DISCUSSION GÉNÉRALE

Ce projet contribue à une meilleure compréhension du rôle du récepteur 5-HT_{2A} dans le processus invasif des cellules trophoblastiques (prolifération, migration, invasion). Les résultats démontrent que l'activation sélective, par le DOI, du récepteur 5-HT_{2A} stimule la prolifération des cellules BeWo et JEG-3 et que cette prolifération est associée à l'induction des voies de signalisation JAK2/STAT3 et MEK/ERK1/2. Ces deux voies de signalisation sont impliquées dans l'effet mitogénique observé, suite à la stimulation du récepteur 5-HT_{2A} et l'activation de la voie PLC/PKC/ERK1/2 est dépendante de l'activation de la voie JAK2/STAT3. Cette étude montre également que l'activation du récepteur 5-HT_{2A} induit l'invasion des lignées trophoblastiques de phénotype invasif (JEG-3 et HTR-8/SVneo) et les primocultures de trophoblaste extravilleux. Cependant, la stimulation des capacités migratoires et invasives des cellules se fait via une augmentation de l'expression et de l'activité des métalloprotéinases MMP-9 et MMP-2 et est dépendante, comme pour l'effet mitogénique, de l'activation de la voie de signalisation JAK2/STAT3 dans les cellules JEG-3 et HTR-8/SVneo, mais pas dans les primocultures de trophoblaste extravilleux.

Les résultats du **chapitre 1**, montrent que la sérotonine et l'agoniste sélectif du récepteur 5-HT_{2A}, le DOI, stimulent la prolifération des cellules JEG-3 et BeWo. Cet effet mitogénique du DOI et de la sérotonine est inhibé par l'antagoniste sélectif du récepteur 5-HT_{2A}; la kétansérine. Le pourcentage de sérum (sérum foetal bovin (FBS)) est déterminant dans l'effet du DOI et de la sérotonine sur la prolifération trophoblastique. Le DOI stimule la prolifération cellulaire des cellules JEG-3 et BeWo en présence de faibles concentrations de sérum (0,5% de FBS), tandis qu'il n'a aucun effet sur la prolifération dans un milieu supplémenté avec 10% FBS. Le même phénomène a été observé dans les cellules MCF-7 du cancer du sein (Sonier *et al.*, 2006). Ce résultat peut être expliqué par le fait que la sérotonine provoque une désensibilisation des récepteurs 5-HT_{2A}. Par exemple, il a été démontré dans les fibroblastes 3T3 que la sérotonine présente dans le sérum provoque une désensibilisation du récepteur 5-HT_{2A} (> 75%), une diminution de son expression (60%) et une inhibition de la prolifération cellulaire (Saucier *et al.*, 1998). Ce phénomène représenterait une valve de sécurité (*safety valve*) pour empêcher une croissance anormale due à une activation continue du récepteur 5-HT_{2A} par la sérotonine. À noter qu'il existe des méthodes alternatives (autre que de

travailler à faible concentration de FBS) pour diminuer le quantité de sérotonine dans le sérum, tels que le traitement au dextran activé par le charcoale ou la dialyse avec une solution saline osmo-équivalente en présence de membranes avec une capacité de 12000 daltons. Dans ce dernier cas, les concentrations des petits composés comme les ions, sels, acides aminés, vitamines et autres molécules de moins de 12000 daltons (e.g. sérotonine) sont considérablement réduites.

L'un des obstacles avec les études pharmacologiques utilisant des antagonistes et/ou agonistes des récepteurs de la sérotonine est le manque de sélectivité de ces derniers. Le DOI présente également une affinité pour les récepteurs 5-HT_{2C} et 5-HT_{2B}, et la kétansérine a une affinité pour les récepteurs α -adrénergiques et sérotoninergiques 5-HT_{2C} et 5-HT_{2B} (Kennett *et al.*, 1997). Par ailleurs, notre groupe a montré la présence des transcrits 5-HT_{2C} et 5-HT_{2B} dans les cellules trophoblastiques (Mémoire de maîtrise de Mélanie Viau, INRS-IAF 2009). Cependant, certains éléments sont en faveur du rôle mitogénique du DOI, via le récepteur 5-HT_{2A}, dans les cellules du choriocarcinome JEG-3 et BeWo. La kétansérine présente une affinité 70 fois plus élevée pour les récepteurs 5-HT_{2A} que pour les récepteurs 5-HT_{2C}, ce qui en fait un antagoniste efficace pour étudier sélectivement le rôle des récepteurs 5-HT_{2A} dans les effets induits par la sérotonine (Baxter *et al.*, 1995). Dans l'impossibilité de trouver un agoniste ou un antagoniste sélectif des récepteurs 5-HT_{2A}, le pré-traitement des cellules JEG-3 et BeWo par un anticorps spécifique anti-5-HT_{2A} permettrait de neutraliser ces récepteurs et par conséquent confirmer ou infirmer leur rôle dans la prolifération cellulaire due au DOI. La diminution de l'expression des récepteurs 5-HT_{2A} par l'utilisation de la technique d'ARN interférent (ARNi) ciblant les récepteurs 5-HT_{2A} permettrait également de confirmer le rôle de ce récepteur dans l'effet prolifératif du DOI sur les cellules JEG-3 et BeWo.

Le rôle mitogénique du récepteur 5-HT_{2A} a été démontré dans plusieurs cellules saines et néoplasiques (Greene *et al.*, 2000, Grewal *et al.*, 1999, Guillet-Deniau *et al.*, 1997) (voir section I.3.2.1.2). La prolifération cellulaire est la résultante de deux composantes : l'augmentation du nombre de cellules et la progression dans le cycle cellulaire. Nos résultats montrent que le DOI induit une progression du cycle cellulaire des cellules BeWo et JEG-3 bien que ce soit d'une manière différente pour les deux types cellulaires.

En effet, le DOI augmente le nombre de cellules BeWo et JEG-3 en phase S et en phase G2/M respectivement. Cette différence dans la réponse des cellules BeWo et JEG-3 au traitement par le DOI reflète la différence phénotypique entre les deux types cellulaires due probablement à leurs caractéristiques intrinsèques uniques. Plusieurs exemples ont été rapportés quant à la différence des cellules BeWo et JEG-3 en réponse à un même traitement. Par exemple, le TGF- β bloque l'invasion des cellules JEG-3 alors qu'il n'a aucun effet sur les cellules BeWo (Al-Nasiry *et al.*, 2006, Pospechova *et al.*, 2009). Par ailleurs, les cellules JEG-3 et BeWo réagissent différemment aux inducteurs de l'apoptose et aux inducteurs de la fusion cellulaire et de l'invasion cellulaire (Al-Nasiry *et al.*, 2006, Pospechova *et al.*, 2009). Un autre exemple a été observé en réponse à une indolamine dérivée de la sérotonine : la mélatonine. Cette dernière exerce des effets antiprolifératifs pour les cellules JEG-3 en bloquant ces cellules dans la phase G1 du cycle cellulaire, en revanche elle exerce un effet pro-apoptique sur les cellules BeWo via la perméabilisation mitochondriale (Lanoix *et al.*, 2013, Shiu *et al.*, 2000). En fait, la différence phénotypique entre les JEG-3 et les cellules BeWo serait liée à l'expression différentielle de centaines de gènes associés à la réponse au stress cellulaire, à l'adhésion cellulaire, à la transduction du signal et au métabolisme des protéines et des nucléotides (Burleigh *et al.*, 2007). Dans le cadre de notre étude, un autre aspect traduisant la différence entre les cellules JEG-3 vs BeWo est l'intensité même de la réponse au traitement par le DOI. Le DOI induit une forte prolifération des cellules BeWo (125% vs témoin) par rapport aux cellules JEG-3 (112% vs témoin) et BeWo, ce qui nous pousse à nous questionner quant à l'origine de cette différence de réponse au DOI entre les deux types cellulaires. Cette différence serait-elle corrélée au nombre de récepteurs 5-HT_{2A} exprimés à la surface membranaire des cellules JEG-3 et BeWo, ou plutôt serait-elle le résultat d'une amplification du signal mitogénique en aval des récepteurs 5-HT_{2A} intégrant davantage d'effecteurs de la signalisation 5-HT_{2A} dans les cellules BeWo vs JEG-3. Des études de liaison du DOI marqué à l'iode 125 ([I¹²⁵]-DOI) aux récepteurs 5-HT_{2A} pourrait aider à confirmer la première hypothèse. La seconde hypothèse pourrait être étudiée en utilisant la méthode de l'analyse globale des activités de l'ensemble des protéines cellulaires par micropuces protéomiques.

À noter que l'effet prolifératif du DOI a été analysé avec le sel de tétrazolium MTT (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium). Ce dernier est réduit par l'activité déshydrogénase mitochondriale en formazan. Ainsi, la quantité de formazan formée et mesurable est proportionnelle au nombre de cellules viables. Il faut noter que le processus de viabilité cellulaire ne reflète par nécessairement le processus de prolifération cellulaire. En effet, le processus de viabilité cellulaire se traduit par une augmentation de la survie cellulaire, alors que la prolifération cellulaire se traduit par une augmentation du nombre de cellules et donc de la quantité d'ADN néo-synthétisée. Ces deux processus doivent être également distingués du processus de croissance cellulaire qui démontre une augmentation de la taille cellulaire. Dans la présente étude, l'effet prolifératif du DOI a été analysé par la technique de cytométrie en flux qui permet d'étudier l'effet du DOI sur la progression des cellules dans le cycle cellulaire.

Après avoir démontré la fonctionnalité du récepteur 5-HT_{2A} (effet mitogénique) dans les cellules JEG-3 et BeWo, nous avons démontré que l'effet prolifératif du DOI est associé à une stimulation des voies de signalisation MEK/ERK1/2 et JAK2/STAT3. Ce résultat a été rapporté dans plusieurs types cellulaires (Greene *et al.*, 2000, Grewal *et al.*, 1999, Guillet-Deniau *et al.*, 1997). Dans le processus de placentation, ces deux voies de signalisation font partie des voies déterminantes dans l'engagement du trophoblaste vers la migration/prolifération ou vers la différenciation/fusion. En effet, l'activation de la voie ERK1/2 est liée à la modulation de la voie de syncytialisation du trophoblaste (différenciation morphologique et biochimique) alors que la voie JAK2/STAT3 est liée au processus de la différenciation invasive (prolifération/migration/invasion) (Corvinus *et al.*, 2003, Daoud *et al.*, 2005, Fitzgerald *et al.*, 2005b, Poehlmann *et al.*, 2005, Takeda *et al.*, 1997, Vaillancourt *et al.*, 2009).

Les résultats du **chapitre 2** démontrent que la prolifération des cellules JEG-3 qui est une composante de l'invasion trophoblastique implique l'activation de deux voies de signalisation JAK2/STAT3 et G_{q/11}/PLCβ/MAPK. Par ailleurs, nos résultats montrent que l'activation d'ERK1/2 nécessite une activation préalable de la voie JAK2/STAT3. Bien que le lien entre les voies ERK1/2 et STAT3 a été établie dans notre étude, l'effecteur commun intégrant les deux voies de signalisation reste à identifier. Une étude intéressante décortiquant le lien moléculaire entre les voie Ras/Raf/ERK1/2 et

JAK2/STAT3 activées dans les cellules du muscle lisse vasculaire en réponse à la stimulation du récepteur à l'angiotensine, AT1 (RCPG_{q11}) a démontré que la protéine Raf-1 est le point de convergence entre les voies JAK2/STAT3 et Ras/Raf/ERK1/2 (Marrero *et al.*, 1995, Marrero *et al.*, 1998). L'inhibition de JAK2 par AG490 empêche l'interaction entre ces deux voies de signalisation et par conséquent inhibe la prolifération cellulaire et l'activation de la protéine ERK1/2 (Marrero *et al.*, 1998). Pour confirmer ce mécanisme dans notre modèle cellulaire, une inactivation spécifique de JAK2 par la technique d'ARNi suivi d'une vérification de l'état de phosphorylation de Raf-1 permettrait de confirmer ou infirmer le rôle de JAK2 dans la l'activation de l'axe PLC/PKC/Ras/Raf-1 et par conséquent dans l'activation d'ERK1/2. Un autre moyen de démontrer l'interconnexion entre la protéine JAK2 et la voie PLC/PKC/Ras/Raf/ERK1/2 au niveau de la protéine Raf-1 est de réaliser des études de co-immunoprécipitation avec des anticorps anti-JAK2 et vérifier la présence de Raf-1 dans le complexe protéique immunoprécipité par immunobuvardage de type Western.

Les études de la conversation croisée entre la voie STAT3 et la voie ERK1/2 ont rapporté des niveaux d'hierarchisations différents entre ces deux voies de signalisation. En effet, des études ont démontré que l'activation de la voie des ERK1/2 est requise pour une activité maximale de la protéine STAT3 (Plaza-Menacho, van der Sluis *et al.*, 2007), alors que d'autres études suggère plutôt l'inverse. Dans cette dernière situation, la modulation positive de l'activation d'ERK1/2 par la voie JAK2/STAT3 peut se faire par les modulateurs répresseurs de la signalisation JAK/STAT ; les protéines. SOCS. L'isoforme SOCS3 induit par la voie STAT3, grâce à sa liaison physique, inactive la protéine RasGAP, un régulateur de la voie Ras, conduisant à une activation de la voie ERK1/2 (Rawlings, Rosler *et al.*, 2004). Cette dernière hypothèse pourrait être vérifiée par une analyse par PCR en temps réel des niveaux d'expression de SOCS3 dans les cellules JEG-3 après traitement par le DOI. Des tests d'invalidation de la protéine SOCS3 en utilisant la technique d'interférence par ARN double brin (ARNi) pourrait également nous renseigner sur l'état de phosphorylation de la protéine ERK1/2. En conclusion, bien que la conversation croisée entre les voies MEK/ERK1/2 et JAK2/STAT3 a déjà été démontrée dans plusieurs types cellulaires, nous sommes les premiers à démontrer

l'importance de la protéine JAK2 dans l'activation de ERK1/2 dans le trophoblaste humain.

Dans le **chapitre 3**, nous avons étudié le rôle du récepteur 5-HT_{2A} dans la stimulation de l'invasion trophoblastique et les mécanismes cellulaires impliqués. De plus en plus de travaux critiquent les cellules JEG-3 comme modèle placentaire. Ces études considèrent que les cellules JEG-3 (issues de choriocarcinome placentaire) ne reflètent pas ce qui se passe réellement dans le trophoblaste humain invasif et décrivent ces cellules comme ayant un comportement *trophoblast-like* commun à toutes les cellules cancéreuses. Pour pallier à ce problème, nous avons choisi deux autres modèles placentaires du trophoblaste extravilleux, à savoir, la lignée cellulaire HTR-8/SVneo issue de la transfection d'explants de trophoblaste extravilleux de premier trimestre (Graham *et al.*, 1993) et les primocultures de trophoblaste extravilleux du premier trimestre. Dans un premier temps, nous avons démontré que le récepteur 5-HT_{2A} est exprimé dans les primocultures de trophoblaste extravilleux et dans les cellules HTR-8/SVneo. L'analyse semi-quantitative des transcrits du récepteur 5-HT_{2A} démontre une plus grande abondance des transcrits du 5-HT_{2A} dans les lignées trophoblastiques JEG-3 et HTR-8/SVneo *vs* les primocultures de trophoblaste extravilleux. Ce résultat suggère que la surexpression des transcrits du récepteur 5-HT_{2A} reflète la différence phénotypique entre le trophoblaste primaire *vs* les lignées trophoblastiques et pourrait expliquer le fort pouvoir invasif des lignées trophoblastiques (JEG-3 et HTR-8/SVneo) *vs* les primocultures. La surexpression du récepteur 5-HT_{2A} et une altération de la signalisation 5-HT_{2A} ont été observées dans les cellules d'ostéosarcomes fortement invasives *vs* les cellules d'ostéoblastes normales (non invasives) (Bracha *et al.*, 2013). Les mêmes observations ont été faites pour les cellules cancéreuses de gliome *vs* les astrocytes fœtaux sains humaines (Merzak *et al.*, 1996). Dans ces dernières cellules, les transcrits codant pour les différents types de récepteurs de la sérotonine sont présents exceptés les transcrits codant pour les récepteurs 5-HT_{2A}. Le traitement des lignées de gliomes (exprimant 5-HT_{2A}) par la sérotonine stimule leurs capacités prolifératives, migratoires et invasives probablement via l'activation des récepteurs 5-HT_{2A}, bien que le mécanisme moléculaire impliqué n'a pas été étudié (Merzak *et al.*, 1996).

L'invasion des tissus utérins par le trophoblaste extravilleux nécessite la sécrétion par ce dernier de MMPs capable de dégrader la matrice extracellulaire. Le trophoblaste extravilleux sécrète plusieurs métalloprotéases. Parmi celles-ci, les plus étudiées sont la MMP-2 et la MMP-9 (voir section II.3.2). Nous avons démontré que l'activation spécifique du récepteur 5-HT_{2A} stimule l'expression (ARNm et protéines) et l'activité des métalloprotéases (MMPs)-9 et -2 dans les lignées trophoblastiques JEG-3 et HTR-8/SV/neo mais pas dans les primocultures du trophoblaste extravilleux. Cette différence entre les lignées et les primocultures peut être expliquée par la différence entre les phénotypes des lignées trophoblastiques vs primocultures. Par exemple, les lignées trophoblastiques JEG-3 sont connues pour avoir des capacités invasives intrinsèques plus importantes que les primocultures due à la présence d'un grand pool de protéine STAT3 constitutivement active (Corvinus *et al.*, 2003, Fitzgerald *et al.*, 2005a, Fitzgerald *et al.*, 2005b). Les cellules trophoblastiques sont un groupe hétérogène de cellules fœtales formant l'interface fœto-maternelle et qui affichent un large éventail de fonctions. La régulation de leur comportement dépend de leur profil d'expression génique. Cette expression est en partie sous le contrôle des micros ARN (miARN) qui sont de petites molécules d'ARN simple brin et capables de moduler l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel. La comparaison des profils d'expression de ces miARNs a montré une grande différence entre les primocultures du trophoblaste extravilleux du premier trimestre et celui des lignées de cellules trophoblastiques JEG-3 et HTR-8/SVneo (Morales-Prieto *et al.*, 2012).

Bien que l'activité des MMP-2 et MMP-9 est augmentée dans les lignées mais pas dans les primocultures, les résultats obtenus dans les lignées trophoblastiques sont en accord avec d'autres études confirmant le rôle primordial des MMP-9 et MMP-2 dans l'invasion du trophoblaste extravilleux (Cohen *et al.*, 2009, Fluhr *et al.*, 2008, Onogi *et al.*, 2011). Dans ces cellules, l'expression et l'activité de MMP-9 et MMP-2 sont régulées par plusieurs facteurs de croissance et hormones via les voies de signalisation ERK1/2 et STAT3 (Smola-Hess *et al.*, 2001, Takino *et al.*, 2004, Xie *et al.*, 2004). L'analyse des promoteurs de MMP-2 et MMP-9 montre la présence de sites de fixation pour la protéine STAT3 et pour des facteurs de transcription activés par la protéine ERK1/2, comme les facteurs SP-1 et AP-1 (Chung *et al.*, 2004, Kuo *et al.*, 2006, Milanini-Mongiat *et al.*,

2002, Qin *et al.*, 1999, Sato *et al.*, 1993, Xie *et al.*, 2004). Ces observations nous ont poussé à émettre l'hypothèse que l'activation des MMP-2 et MMP-9 dans les lignées trophoblastiques traitées par le DOI implique principalement l'activation de STAT3. En effet, nos résultats confirment notre hypothèse puisque seule l'inhibition de la voie STAT3, et non ERK1/2, bloque l'effet stimulant du DOI sur l'expression de MMP-2 et MMP-9.

Le procédé d'invasion tumorale a relevé l'importance de l'activité de STAT3. Une activité aberrante de la forme phosphorylée de STAT3 a été reportée dans des cellules ayant un comportement néoplasique comme l'hyperplasie et l'invasion (Bromberg *et al.*, 1999a, Bromberg *et al.*, 1999b). STAT3 constitutivement active est impliqué dans la régulation de la transcription de facteurs liés à la motilité cellulaire et à la production de protéases nécessaires à l'invasion tumorale (Boccaccio *et al.*, 1998, Bowman *et al.*, 2000, Yeung *et al.*, 1998, Zhang *et al.*, 2002a). Dans ce contexte, quelle pourrait être la pertinence de l'implication de STAT3 dans l'invasion trophoblastique des grossesses pathologiques ? La réponse à cette question n'était pas possible avant que les chercheurs découvrent un lien entre les grossesses pathologiques (prééclampsie et restriction de croissance intra-utérine) et le processus d'invasion trophoblastique. Dans ce type de grossesses caractérisées par un défaut d'invasion du trophoblaste, le placenta se trouve, non seulement mal ancré dans le tissu de la matrice maternelle, mais souffre aussi d'un manque de vascularisation qui se traduit par un risque plus élevé de restriction de croissance intra-utérine et un décollement prématuré du placenta (Bischof *et al.*, 1996, Matthiesen *et al.*, 2005, Zhou *et al.*, 1997a). Jusqu'à présent, rien n'est indiqué sur le rôle de STAT3 dans la dérégulation de l'invasion du trophoblaste dans ce genre de grossesses, mais les données présentées ci-dessus suggèrent son implication. Ainsi, la prééclampsie pourrait être associée à une activation réduite de l'activité de STAT3. Dans les grossesses prééclamptiques, la concentration plasmatique de la sérotonine et l'excrétion urinaire des métabolites de la sérotonine (comme l'acide 5-hydroxyindolacétique (5-HIAA)) sont augmentés (Bolte *et al.*, 2001, Carrasco *et al.*, 1998). Par ailleurs, une réduction de l'efficacité catalytique de la monoamine oxydase-A (MAO-A), fortement exprimée dans le placenta et enzyme majeur de la dégradation de la sérotonine, et une réduction de la production de la sérotonine a été rapportée (Sivasubramaniam *et al.*, 2002; Lanoix *et al.*,

2012). Par ailleurs, dans les grossesses compliquées par un diabète gestationnel, les niveaux d'expression du récepteur 5-HT_{2A} et du transporteur de la sérotonine sont diminués (Viau *et al.*, 2009) et pourrait ainsi altérer la signalisation dépendante de STAT3 et donc l'invasion du trophoblaste et les fonctions du trophoblaste villositaire, tels que le transport de glucose...). En outre, les protéines STAT3 activées par les récepteurs 5-HT_{2A} sont impliquées dans l'absorption du glucose musculaire (Guillet-Deniau *et al.*, 1997). L'effet de la sérotonine sur la fonction du trophoblaste ne se limite pas au récepteur 5-HT_{2A}, puisque, d'autres récepteurs de la sérotonine sont exprimés par le trophoblaste (5-HT_{1A}, 5-HT_{2B} et 2C). Une meilleure caractérisation du système sérotonine dans le trophoblaste (production de sérotonine, récepteurs de la sérotonine, transporteur) s'avère primordiale pour comprendre le rôle et le mécanisme d'action de la sérotonine et de ses récepteurs dans la fonction du trophoblaste.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Les résultats obtenus dans le cadre de ce projet doctoral ont permis de mettre en lumière le rôle de la sérotonine et de son récepteur 5-HT_{2A} dans la fonction invasive du trophoblaste. La fonction invasive est un processus physiologique complexe mais important dans la mise en place du placenta et par conséquent dans le bien-être du fœtus. Cette étude montre que l'activation du récepteur 5-HT_{2A} exerce des effets mitogéniques sur les cellules trophoblastiques. Cette prolifération dépendante du récepteur 5-HT_{2A} est associée à une progression dans le cycle cellulaire du trophoblaste et nécessite une activation des voies de signalisation JAK2/STAT3 et MEK/ERK1/2. L'interconnexion entre les deux voies de signalisation montre que la co-activation préalable des protéines JAK2/STAT3 et de l'axe PLC/PKC/Raf est nécessaire pour l'activation de la protéine ERK1/2. L'activation du récepteur 5-HT_{2A} par le DOI stimule la migration et l'invasion du trophoblaste extravilleux. Ce pouvoir pro-invasif du récepteur 5-HT_{2A} est associé à une augmentation de l'expression et de l'activité des MMP-2 et MMP-9 et se fait via un mécanisme moléculaire impliquant la voie de signalisation JAK2/STAT3 dans les lignées trophoblastiques mais pas dans les primocultures du trophoblaste extravilleux du premier trimestre. Ce constat reflète la complexité des différents modèles de cellules trophoblastiques disponibles et justifie la critique grandissante vis-à-vis de l'utilisation de ces cellules comme modèles pour les études *in vitro* du placenta (*ex.* lignées *vs* primocultures et lignées entre-elles). Des études complémentaires doivent être réalisées sur les primocultures du trophoblaste du premier trimestre pour la caractérisation du rôle et du mode d'action du récepteur 5-HT_{2A} dans la différenciation invasive du trophoblaste extravilleux dans des grossesses normales *vs* des grossesses pathologiques (diabète gestationnel, prééclampsie, restriction de croissance intra-utérine). Dans l'ensemble, ces travaux ont permis de démontrer le rôle et le mécanisme d'action du récepteur 5-HT_{2A} dans l'invasion du trophoblaste *in vitro*. Ces travaux suggèrent que la sérotonine (d'origine placentaire et/ou maternelle), et en partie via son récepteur 5-HT_{2A}, pourrait exercer un effet (autocrine et/ou paracrine) sur le développement du trophoblaste et par conséquent sur le bon déroulement de la grossesse.

BIBLIOGRAPHIE

- Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A & Kemler R (1997) beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *The EMBO journal* 16(13):3797-3804.
- Achison M, Elton CM, Hargreaves PG, Knight CG, Barnes MJ & Farndale RW (2001) Integrin-independent tyrosine phosphorylation of p125(fak) in human platelets stimulated by collagen. *J Biol Chem* 276(5):3167-3174.
- Aghajanian GK & Marek GJ (1999) Serotonin, via 5-HT_{2A} receptors, increases EPSCs in layer V pyramidal cells of prefrontal cortex by an asynchronous mode of glutamate release. *Brain Res* 825(1-2):161-171.
- Aghajanova L (2004) Leukemia inhibitory factor and human embryo implantation. *Ann N Y Acad Sci* 1034:176-183.
- Ahlenius S, Larsson K & Svensson L (1980) Further evidence for an inhibitory role of central 5-HT in male rat sexual behavior. *Psychopharmacology (Berl)* 68(3):217-220.
- Ahn Victoria E, Chu Matthew L-H, Choi H-J, Tran D, Abo A & Weis William I (2011) Structural Basis of Wnt Signaling Inhibition by Dickkopf Binding to LRP5/6. *Developmental cell* 21(5):862-873.
- Al-Nasiry S, Spitz B, Hanssens M, Luyten C & Pijnenborg R (2006) Differential effects of inducers of syncytialization and apoptosis on BeWo and JEG-3 choriocarcinoma cells. *Hum Reprod* 21(1):193-201.
- Ali MS, Sayeski PP, Dirksen LB, Hayzer DJ, Marrero MB & Bernstein KE (1997) Dependence on the motif YIPP for the physical association of Jak2 kinase with the intracellular carboxyl tail of the angiotensin II AT1 receptor. *J Biol Chem* 272(37):23382-23388.
- Alsat E, Guibourdenche J, Couturier A & Evain-Brion D (1998) Physiological role of human placental growth hormone. *Mol Cell Endocrinol* 140(1-2):121-127.
- Alsat E, Wyplosz P, Malassine A, Guibourdenche J, Porquet D, Nessmann C & Evain-Brion D (1996) Hypoxia impairs cell fusion and differentiation process in human cytotrophoblast, in vitro. *J Cell Physiol* 168(2):346-353.
- Amargos-Bosch M, Bortolozzi A, Puig MV, Serrats J, Adell A, Celada P, Toth M, Mengod G & Artigas F (2004) Co-expression and in vivo interaction of

- serotonin1A and serotonin2A receptors in pyramidal neurons of prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 14(3):281-299.
- Amireault P, Sibon D & Cote F (2013) Life without peripheral serotonin: insights from tryptophan hydroxylase 1 knockout mice reveal the existence of paracrine/autocrine serotonergic networks. *ACS Chem Neurosci* 4(1):64-71.
- Amour A, Knight CG, Webster A, Slocombe PM, Stephens PE, Knauper V, Docherty AJ & Murphy G (2000) The in vitro activity of ADAM-10 is inhibited by TIMP-1 and TIMP-3. *FEBS Lett* 473(3):275-279.
- Amour A, Slocombe PM, Webster A, Butler M, Knight CG, Smith BJ, Stephens PE, Shelley C, Hutton M, Knauper V, Docherty AJ & Murphy G (1998) TNF-alpha converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3. *FEBS Lett* 435(1):39-44.
- Anacker J, Segerer SE, Hagemann C, Feix S, Kapp M, Bausch R & Kammerer U (2011) Human decidua and invasive trophoblasts are rich sources of nearly all human matrix metalloproteinases. *Mol Hum Reprod* 17(10):637-652.
- Andreev J, Galisteo ML, Kranenburg O, Logan SK, Chiu ES, Okigaki M, Cary LA, Moolenaar WH & Schlessinger J (2001) Src and Pyk2 mediate G-protein-coupled receptor activation of epidermal growth factor receptor (EGFR) but are not required for coupling to the mitogen-activated protein (MAP) kinase signaling cascade. *J Biol Chem* 276(23):20130-20135.
- Anteby EY, Greenfield C, Natanson-Yaron S, Goldman-Wohl D, Hamani Y, Khudyak V, Ariel I & Yagel S (2004) Vascular endothelial growth factor, epidermal growth factor and fibroblast growth factor-4 and -10 stimulate trophoblast plasminogen activator system and metalloproteinase-9. *Mol Hum Reprod* 10(4):229-235.
- Aplin JD (1991) Implantation, trophoblast differentiation and haemochorial placentation: mechanistic evidence in vivo and in vitro. *Journal of cell science* 99 (Pt 4):681-692.
- Aplin JD (1993) Expression of integrin alpha 6 beta 4 in human trophoblast and its loss from extravillous cells. *Placenta* 14(2):203-215.
- Aplin JD, Haigh T, Jones CJ, Church HJ & Vicovac L (1999) Development of cytotrophoblast columns from explanted first-trimester human placental villi: role of fibronectin and integrin alpha5beta1. *Biol Reprod* 60(4):828-838.

- Aplin JD, Straszewski-Chavez SL, Kalionis B, Dunk C, Morrish D, Forbes K, Baczyk D, Rote N, Malassine A & Knofler M (2006) Trophoblast differentiation: progenitor cells, fusion and migration -- a workshop report. *Placenta* 27 Suppl A:S141-143.
- Apps R, Murphy SP, Fernando R, Gardner L, Ahad T & Moffett A (2009) Human leucocyte antigen (HLA) expression of primary trophoblast cells and placental cell lines, determined using single antigen beads to characterize allotype specificities of anti-HLA antibodies. *Immunology* 127(1):26-39.
- Arnaudeau S, Arboit P, Bischof P, Shin-ya K, Tomida A, Tsuruo T, Irion O & Cohen M (2009) Glucose-regulated protein 78: a new partner of p53 in trophoblast. *Proteomics* 9(23):5316-5327.
- Athanassiades A & Lala PK (1998) Role of placenta growth factor (PlGF) in human extravillous trophoblast proliferation, migration and invasiveness. *Placenta* 19(7):465-473.
- Avraham H, Park SY, Schinkmann K & Avraham S (2000) RAFTK/Pyk2-mediated cellular signalling. *Cell Signal* 12(3):123-133.
- Bahn RS, Worsham A, Speeg KV, Jr., Ascoli M & Rabin D (1981) Characterization of steroid production in cultured human choriocarcinoma cells. *J Clin Endocrinol Metab* 52(3):447-450.
- Balkovetz DF, Tirupathi C, Leibach FH, Mahesh VB & Ganapathy V (1989) Evidence for an imipramine-sensitive serotonin transporter in human placental brush-border membranes. *J Biol Chem* 264(4):2195-2198.
- Banasr M, Hery M, Printemps R & Daszuta A (2004) Serotonin-induced increases in adult cell proliferation and neurogenesis are mediated through different and common 5-HT receptor subtypes in the dentate gyrus and the subventricular zone. *Neuropsychopharmacology* 29(3):450-460.
- Banes A, Florian JA & Watts SW (1999) Mechanisms of 5-hydroxytryptamine(2A) receptor activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 291(3):1179-1187.
- Banes AK, Shaw SM, Tawfik A, Patel BP, Ogbi S, Fulton D & Marrero MB (2005) Activation of the JAK/STAT pathway in vascular smooth muscle by serotonin. *American journal of physiology* 288(4):C805-812.

- Basu B, Desai R, Balaji J, Chaerkady R, Sriram V, Maiti S & Panicker MM (2008) Serotonin in pre-implantation mouse embryos is localized to the mitochondria and can modulate mitochondrial potential. *Reproduction* 135(5):657-669.
- Bauer S, Pollheimer J, Hartmann J, Husslein P, Aplin JD & Knofler M (2004) Tumor necrosis factor-alpha inhibits trophoblast migration through elevation of plasminogen activator inhibitor-1 in first-trimester villous explant cultures. *J Clin Endocrinol Metab* 89(2):812-822.
- Baxter G, Kennett G, Blaney F & Blackburn T (1995) 5-HT₂ receptor subtypes: a family re-united? *Trends Pharmacol Sci* 16(3):105-110.
- Behrens J, Jerchow BA, Wurtele M, Grimm J, Asbrand C, Wirtz R, Kuhl M, Wedlich D & Birchmeier W (1998) Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta. *Science* 280(5363):596-599.
- Behrens J, von Kries JP, Kuhl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R & Birchmeier W (1996) Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 382(6592):638-642.
- Benovic JL, Pike LJ, Cerione RA, Staniszewski C, Yoshimasa T, Codina J, Caron MG & Lefkowitz RJ (1985) Phosphorylation of the mammalian beta-adrenergic receptor by cyclic AMP-dependent protein kinase. Regulation of the rate of receptor phosphorylation and dephosphorylation by agonist occupancy and effects on coupling of the receptor to the stimulatory guanine nucleotide regulatory protein. *J Biol Chem* 260(11):7094-7101.
- Berg KA, Clarke WP, Chen Y, Ebersole BJ, McKay RD & Maayani S (1994) 5-Hydroxytryptamine type 2A receptors regulate cyclic AMP accumulation in a neuronal cell line by protein kinase C-dependent and calcium/calmodulin-dependent mechanisms. *Mol Pharmacol* 45(5):826-836.
- Bifulco G, Trencia A, Caruso M, Tommaselli GA, Miele C, di Carlo C, Beguinot F & Nappi C (2003) Leptin induces mitogenic effect on human choriocarcinoma cell line (JAR) via MAP kinase activation in a glucose-dependent fashion. *Placenta* 24(4):385-391.

- Bilban M, Tauber S, Haslinger P, Pollheimer J, Saleh L, Pehamberger H, Wagner O & Knofler M (2010) Trophoblast invasion: assessment of cellular models using gene expression signatures. *Placenta* 31(11):989-996.
- Biscardi JS, Maa MC, Tice DA, Cox ME, Leu TH & Parsons SJ (1999) c-Src-mediated phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on Tyr845 and Tyr1101 is associated with modulation of receptor function. *J Biol Chem* 274(12):8335-8343.
- Bischof P & Campana A (1996) A model for implantation of the human blastocyst and early placentation. *Human reproduction update* 2(3):262-270.
- Bischof P & Campana A (2000a) Molecular mediators of implantation. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 14(5):801-814.
- Bischof P, Haenggeli L & Campana A (1995a) Effect of leukemia inhibitory factor on human cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway. *Am J Reprod Immunol* 34(4):225-230.
- Bischof P, Martelli M, Campana A, Itoh Y, Ogata Y & Nagase H (1995b) Importance of matrix metalloproteinases in human trophoblast invasion. *Early Pregnancy* 1(4):263-269.
- Bischof P, Meisser A & Campana A (1998) Involvement of trophoblast in embryo implantation: regulation by paracrine factors. *J Reprod Immunol* 39(1-2):167-177.
- Bischof P, Meisser A & Campana A (2000b) Mechanisms of endometrial control of trophoblast invasion. *J Reprod Fertil Suppl* 55:65-71.
- Biswas SK & Sodhi A (2002) Tyrosine phosphorylation-mediated signal transduction in MCP-1-induced macrophage activation: role for receptor dimerization, focal adhesion protein complex and JAK/STAT pathway. *Int Immunopharmacol* 2(8):1095-1107.
- Bjorn SF, Hastrup N, Larsen JF, Lund LR & Pyke C (2000) Messenger RNA for membrane-type 2 matrix metalloproteinase, MT2-MMP, is expressed in human placenta of first trimester. *Placenta* 21(2-3):170-176.
- Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, Nelson N, Boiani N, Schooley KA, Gerhart M, Davis R, Fitzner JN, Johnson RS, Paxton RJ, March CJ & Cerretti DP (1997)

- A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 385(6618):729-733.
- Boccaccio C, Ando M, Tamagnone L, Bardelli A, Michieli P, Battistini C & Comoglio PM (1998) Induction of epithelial tubules by growth factor HGF depends on the STAT pathway. *Nature* 391(6664):285-288.
- Bolte AC, van Geijn HP & Dekker GA (2001) Pathophysiology of preeclampsia and the role of serotonin. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 95(1):12-21.
- Bonnin A, Goeden N, Chen K, Wilson ML, King J, Shih JC, Blakely RD, Deneris ES & Levitt P (2011a) A transient placental source of serotonin for the fetal forebrain. *Nature* 472(7343):347-350.
- Bonnin A & Levitt P (2011b) Fetal, maternal, and placental sources of serotonin and new implications for developmental programming of the brain. *Neuroscience* 197(0):1-7.
- Bortolozzi A, Diaz-Mataix L, Scorza MC, Celada P & Artigas F (2005) The activation of 5-HT receptors in prefrontal cortex enhances dopaminergic activity. *J Neurochem* 95(6):1597-1607.
- Bowman T, Garcia R, Turkson J & Jove R (2000) STATs in oncogenesis. *Oncogene* 19(21):2474-2488.
- Bracha S, Viall A, Goodall C, Stang B, Ruaux C, Seguin B & Chappell PE (2013) The expression and role of serotonin receptor 5HTR2A in canine osteoblasts and an osteosarcoma cell line. *BMC veterinary research* 9:251.
- Bromberg JF & Darnell JE, Jr. (1999a) Potential roles of Stat1 and Stat3 in cellular transformation. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 64:425-428.
- Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, Zhao Y, Pestell RG, Albanese C & Darnell JE, Jr. (1999b) Stat3 as an oncogene. *Cell* 98(3):295-303.
- Bruck K & Hinckel P (1980) Thermoregulatory noradrenergic and serotonergic pathways to hypothalamic units. *J Physiol* 304:193-202.
- Brunner E, Peter O, Schweizer L & Basler K (1997) pangolin encodes a Lef-1 homologue that acts downstream of Armadillo to transduce the Wiggless signal in *Drosophila*. *Nature* 385(6619):829-833.

- Burleigh DW, Kendzioriski CM, Choi YJ, Grindle KM, Grendell RL, Magness RR & Golos TG (2007) Microarray analysis of BeWo and JEG3 trophoblast cell lines: identification of differentially expressed transcripts. *Placenta* 28(5-6):383-389.
- Burnet PW, Eastwood SL, Lacey K & Harrison PJ (1995) The distribution of 5-HT1A and 5-HT2A receptor mRNA in human brain. *Brain Res* 676(1):157-168.
- Burrows TD, King A & Loke YW (1993) Expression of integrins by human trophoblast and differential adhesion to laminin or fibronectin. *Hum Reprod* 8(3):475-484.
- Burton GJ (2009) Oxygen, the Janus gas; its effects on human placental development and function. *Journal of Anatomy* 215(1):27-35.
- Burton GJ & Jauniaux E (2011) Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 25(3):287-299.
- Busch S, Renaud SJ, Schleussner E, Graham CH & Markert UR (2009) mTOR mediates human trophoblast invasion through regulation of matrix-remodeling enzymes and is associated with serine phosphorylation of STAT3. *Experimental cell research* 315(10):1724-1733.
- Calalb MB, Polte TR & Hanks SK (1995) Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. *Molecular and cellular biology* 15(2):954-963.
- Carmeliet P, Moons L, Lijnen R, Baes M, Lemaitre V, Tipping P, Drew A, Eeckhout Y, Shapiro S, Lupu F & Collen D (1997) Urokinase-generated plasmin activates matrix metalloproteinases during aneurysm formation. *Nature genetics* 17(4):439-444.
- Carpenter G (2000) EGF receptor transactivation mediated by the proteolytic production of EGF-like agonists. *Sci STKE* 2000(15):pe1.
- Carrasco G, Cruz MA, Gallaido V, Miguel P, Lagos M & Gonzalez C (1998) Plasma and platelet concentration and platelet uptake of serotonin in normal and pre-eclamptic pregnancies. *Life Sci* 62(15):1323-1332.
- Carter AM & Mess A (2007) Evolution of the placenta in eutherian mammals. *Placenta* 28(4):259-262.

- Cartwright JE, Kenny LC, Dash PR, Crocker IP, Aplin JD, Baker PN & Whitley GS (2002a) Trophoblast invasion of spiral arteries: a novel in vitro model. *Placenta* 23(2-3):232-235.
- Cartwright JE, Tse WK & Whitley GS (2002b) Hepatocyte growth factor induced human trophoblast motility involves phosphatidylinositol-3-kinase, mitogen-activated protein kinase, and inducible nitric oxide synthase. *Experimental cell research* 279(2):219-226.
- Carvalho CR, Carvalheira JB, Lima MH, Zimmerman SF, Caperuto LC, Amanso A, Gasparetti AL, Meneghetti V, Zimmerman LF, Velloso LA & Saad MJ (2003) Novel signal transduction pathway for luteinizing hormone and its interaction with insulin: activation of Janus kinase/signal transducer and activator of transcription and phosphoinositol 3-kinase/Akt pathways. *Endocrinology* 144(2):638-647.
- Cauzac M, Czuba D, Girard J & Hauguel-de Mouzon S (2003) Transduction of leptin growth signals in placental cells is independent of JAK-STAT activation. *Placenta* 24(4):378-384.
- Cha MS, Lee MJ, Je GH & Kwak JY (2001) Endogenous production of nitric oxide by vascular endothelial growth factor down-regulates proliferation of choriocarcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 282(4):1061-1066.
- Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A & Chakraborti T (2003) Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem* 253(1-2):269-285.
- Chakraborty C, Gleeson LM, McKinnon T & Lala PK (2002) Regulation of human trophoblast migration and invasiveness. *Can J Physiol Pharmacol* 80(2):116-124.
- Chaouloff F (2000) Serotonin, stress and corticoids. *J Psychopharmacol* 14(2):139-151.
- Chardonnens D, Cameo P, Aubert ML, Pralong FP, Islami D, Campana A, Gaillard RC & Bischof P (1999) Modulation of human cytotrophoblastic leptin secretion by interleukin-1alpha and 17beta-oestradiol and its effect on HCG secretion. *Mol Hum Reprod* 5(11):1077-1082.
- Choi JH, Lee HJ, Yang TH & Kim GJ (2012) Effects of hypoxia inducible factors-1alpha on autophagy and invasion of trophoblasts. *Clinical and experimental reproductive medicine* 39(2):73-80.

- Choy MY, St Whitley G & Manyonda IT (2000) Efficient, rapid and reliable establishment of human trophoblast cell lines using poly-L-ornithine. *Early Pregnancy* 4(2):124-143.
- Chung TW, Lee YC & Kim CH (2004) Hepatitis B viral HBx induces matrix metalloproteinase-9 gene expression through activation of ERK and PI-3K/AKT pathways: involvement of invasive potential. *FASEB J* 18(10):1123-1125.
- Cohen M & Bischof P (2009) Coculture of decidua and trophoblast to study proliferation and invasion. *Methods Mol Biol* 550:63-72.
- Cohen M, Meisser A, Haenggeli L & Bischof P (2006) Involvement of MAPK pathway in TNF-alpha-induced MMP-9 expression in human trophoblastic cells. *Mol Hum Reprod* 12(4):225-232.
- Cook EH, Jr., Fletcher KE, Wainwright M, Marks N, Yan SY & Leventhal BL (1994) Primary structure of the human platelet serotonin 5-HT_{2A} receptor: identify with frontal cortex serotonin 5-HT_{2A} receptor. *J Neurochem* 63(2):465-469.
- Corvinus FM, Fitzgerald JS, Friedrich K & Markert UR (2003) Evidence for a correlation between trophoblast invasiveness and STAT3 activity. *Am J Reprod Immunol* 50(4):316-321.
- Cote F, Fligny C, Bayard E, Launay JM, Gershon MD, Mallet J & Vodjdani G (2007) Maternal serotonin is crucial for murine embryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(1):329-334.
- Cote F, Fligny C, Fromes Y, Mallet J & Vodjdani G (2004) Recent advances in understanding serotonin regulation of cardiovascular function. *Trends Mol Med* 10(5):232-238.
- Cowen PJ, Anderson IM & Gartside SE (1990) Endocrinological responses to 5-HT. *Ann N Y Acad Sci* 600:250-257; discussion 257-259.
- Cox DA, Watts SW & Cohen ML (1996) Neomycin selectively inhibits 5-hydroxytryptamine-induced contraction in the guinea pig trachea. *J Pharmacol Exp Ther* 277(2):954-959.
- Crocker IP, Cooper S, Ong SC & Baker PN (2003) Differences in apoptotic susceptibility of cytotrophoblasts and syncytiotrophoblasts in normal pregnancy to those

- complicated with preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Am J Pathol* 162(2):637-643.
- Curzon G (1990) Serotonin and appetite. *Ann N Y Acad Sci* 600:521-530; discussion 530-521.
- Dalton P, Christian HC, Redman CW, Sargent IL & Boyd CA (2007) Membrane trafficking of CD98 and its ligand galectin 3 in BeWo cells--implication for placental cell fusion. *The FEBS journal* 274(11):2715-2727.
- Damsky CH, Fitzgerald ML & Fisher SJ (1992) Distribution patterns of extracellular matrix components and adhesion receptors are intricately modulated during first trimester cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway, in vivo. *The Journal of clinical investigation* 89(1):210-222.
- Daoud G, Amyot M, Rassart E, Masse A, Simoneau L & Lafond J (2005) ERK1/2 and p38 regulate trophoblasts differentiation in human term placenta. *The Journal of physiology* 566(Pt 2):409-423.
- Daub H, Weiss FU, Wallasch C & Ullrich A (1996) Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature* 379(6565):557-560.
- Decker MW & McGaugh JL (1991) The role of interactions between the cholinergic system and other neuromodulatory systems in learning and memory. *Synapse* 7(2):151-168.
- Dhillon AS, Hagan S, Rath O & Kolch W (2007) MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* 26(22):3279-3290.
- Dilly M, Hambruch N, Haeger JD & Pfarrer C (2010) Epidermal growth factor (EGF) induces motility and upregulates MMP-9 and TIMP-1 in bovine trophoblast cells. *Mol Reprod Dev* 77(7):622-629.
- Dimo B, Ioannidis I, Karameris A, Vilaras G, Tzoumakari P, Nonni A, Patsouris E & Lazaris AC (2012) Comparative study of the immunohistochemical expression of tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 between clearly invasive carcinomas and "in situ" trophoblast invasion. *Med Oncol* 29(3):2270-2275.
- Dixon RA, Kobilka BK, Strader DJ, Benovic JL, Dohlman HG, Frielle T, Bolanowski MA, Bennett CD, Rands E, Diehl RE, Mumford RA, Slater EE, Sigal IS, Caron MG, Lefkowitz RJ & Strader CD (1986) Cloning of the gene and cDNA for

- mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature* 321(6065):75-79.
- Dostal DE, Hunt RA, Kule CE, Bhat GJ, Karoor V, McWhinney CD & Baker KM (1997) Molecular mechanisms of angiotensin II in modulating cardiac function: intracardiac effects and signal transduction pathways. *J Mol Cell Cardiol* 29(11):2893-2902.
- Eeckhout Y & Vaes G (1977) Further studies on the activation of procollagenase, the latent precursor of bone collagenase. Effects of lysosomal cathepsin B, plasmin and kallikrein, and spontaneous activation. *Biochem J* 166(1):21-31.
- Eglen RM, Alvarez R, Carter D, Leung E, Jakeman L, To Z & Tsou AP (1997) Cloned and native guinea pig 5-HT₇ receptors. Characterization using an integrated approach. *Ann N Y Acad Sci* 812:216-217.
- Eide BL, Turck CW & Escobedo JA (1995) Identification of Tyr-397 as the primary site of tyrosine phosphorylation and pp60src association in the focal adhesion kinase, pp125FAK. *Molecular and cellular biology* 15(5):2819-2827.
- El-Adawi H, Deng L, Tramontano A, Smith S, Mascareno E, Ganguly K, Castillo R & El-Sherif N (2003) The functional role of the JAK-STAT pathway in post-infarction remodeling. *Cardiovasc Res* 57(1):129-138.
- English WR, Puente XS, Freije JM, Knauper V, Amour A, Merryweather A, Lopez-Otin C & Murphy G (2000) Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MMP17) has tumor necrosis factor-alpha convertase activity but does not activate pro-MMP2. *J Biol Chem* 275(19):14046-14055.
- Erickson JD, Eiden LE & Hoffman BJ (1992) Expression cloning of a reserpine-sensitive vesicular monoamine transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(22):10993-10997.
- Erspamer V & Asero B (1953) Isolation of enteramine from extracts of posterior salivary glands of *Octopus vulgaris* and of *Discoglossus pictus* skin. *J Biol Chem* 200(1):311-318.
- Fagotto F, Jho E, Zeng L, Kurth T, Joos T, Kaufmann C & Costantini F (1999) Domains of axin involved in protein-protein interactions, Wnt pathway inhibition, and intracellular localization. *The Journal of cell biology* 145(4):741-756.

- Fargin A, Raymond JR, Lohse MJ, Kobilka BK, Caron MG & Lefkowitz RJ (1988) The genomic clone G-21 which resembles a beta-adrenergic receptor sequence encodes the 5-HT_{1A} receptor. *Nature* 335(6188):358-360.
- Feng HC, Choy MY, Deng W, Wong HL, Lau WM, Cheung AN, Ngan HY & Tsao SW (2005) Establishment and characterization of a human first-trimester extravillous trophoblast cell line (TEV-1). *J Soc Gynecol Investig* 12(4):e21-32.
- Feng J, Cai X, Zhao J & Yan Z (2001) Serotonin receptors modulate GABA(A) receptor channels through activation of anchored protein kinase C in prefrontal cortical neurons. *J Neurosci* 21(17):6502-6511.
- Ferrand A, Kowalski-Chauvel A, Bertrand C, Escriet C, Mathieu A, Portolan G, Pradayrol L, Fourmy D, Dufresne M & Seva C (2005) A novel mechanism for JAK2 activation by a G protein-coupled receptor, the CCK2R: implication of this signaling pathway in pancreatic tumor models. *J Biol Chem* 280(11):10710-10715.
- Filshie GM, Maynard P, Hutter C, Cooper JC, Robinson G & Rubin P (1992) Urinary 5-hydroxyindole acetate concentration in pregnancy induced hypertension. *BMJ (Clinical research ed)* 304(6836):1223.
- Fiorica-Howells E, Hen R, Gingrich J, Li Z & Gershon MD (2002) 5-HT_{2A} receptors: location and functional analysis in intestines of wild-type and 5-HT_{2A} knockout mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282(5):G877-893.
- Fisher SJ, Cui TY, Zhang L, Hartman L, Grahl K, Zhang GY, Tarpey J & Damsky CH (1989) Adhesive and degradative properties of human placental cytotrophoblast cells in vitro. *The Journal of cell biology* 109(2):891-902.
- Fitzgerald JS, Busch S, Wengenmayer T, Foerster K, de la Motte T, Poehlmann TG & Markert UR (2005a) Signal transduction in trophoblast invasion. *Chem Immunol Allergy* 88:181-199.
- Fitzgerald JS, Tsareva SA, Poehlmann TG, Berod L, Meissner A, Corvinus FM, Wiederanders B, Pfitzner E, Markert UR & Friedrich K (2005b) Leukemia inhibitory factor triggers activation of signal transducer and activator of transcription 3, proliferation, invasiveness, and altered protease expression in choriocarcinoma cells. *Int J Biochem Cell Biol* 37(11):2284-2296.

- Florian JA & Watts SW (1998) Integration of mitogen-activated protein kinase kinase activation in vascular 5-hydroxytryptamine_{2A} receptor signal transduction. *J Pharmacol Exp Ther* 284(1):346-355.
- Fluhr H, Bischof-Islami D, Krenzer S, Licht P, Bischof P & Zygmunt M (2008) Human chorionic gonadotropin stimulates matrix metalloproteinases-2 and -9 in cytotrophoblastic cells and decreases tissue inhibitor of metalloproteinases-1, -2, and -3 in decidualized endometrial stromal cells. *Fertil Steril* 90(4 Suppl):1390-1395.
- Forrest LR, Tavoulari S, Zhang YW, Rudnick G & Honig B (2007) Identification of a chloride ion binding site in Na⁺/Cl⁻-dependent transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(31):12761-12766.
- Fournier T, Guibourdenche J, Handschuh K, Tsatsaris V, Rauwel B, Davrinche C & Evain-Brion D (2011) PPAR_γ and human trophoblast differentiation. *J Reprod Immunol* 90(1):41-49.
- Francken BJ, Jurzak M, Vanhauwe JF, Luyten WH & Leysen JE (1998) The human 5-HT_{2A} receptor couples to Gi/Go proteins and inhibits adenylate cyclase in HEK 293 cells. *Eur J Pharmacol* 361(2-3):299-309.
- Fukata M, Nakagawa M & Kaibuchi K (2003) Roles of Rho-family GTPases in cell polarisation and directional migration. *Curr Opin Cell Biol* 15(5):590-597.
- Gaddum JH & Picarelli ZP (1957) Two kinds of tryptamine receptor. *Br J Pharmacol Chemother* 12(3):323-328.
- Garcia MC & Kim HY (1997) Mobilization of arachidonate and docosahexaenoate by stimulation of the 5-HT_{2A} receptor in rat C6 glioma cells. *Brain Res* 768(1-2):43-48.
- Garnovskaya MN, Nebigil CG, Arthur JM, Spurney RF & Raymond JR (1995) 5-Hydroxytryptamine_{2A} receptors expressed in rat renal mesangial cells inhibit cyclic AMP accumulation. *Mol Pharmacol* 48(2):230-237.
- Genbacev O, Joslin R, Damsky CH, Polliotti BM & Fisher SJ (1996) Hypoxia alters early gestation human cytotrophoblast differentiation/invasion in vitro and models the placental defects that occur in preeclampsia. *The Journal of clinical investigation* 97(2):540-550.

- Genbacev O, Zhou Y, Ludlow JW & Fisher SJ (1997) Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science* 277(5332):1669-1672.
- Gewirtz JC & Marek GJ (2000) Behavioral evidence for interactions between a hallucinogenic drug and group II metabotropic glutamate receptors. *Neuropsychopharmacology* 23(5):569-576.
- Gleeson LM, Chakraborty C, McKinnon T & Lala PK (2001) Insulin-like growth factor-binding protein 1 stimulates human trophoblast migration by signaling through alpha 5 beta 1 integrin via mitogen-activated protein Kinase pathway. *J Clin Endocrinol Metab* 86(6):2484-2493.
- Glennon RA, Dukat M, Grella B, Hong S, Costantino L, Teitler M, Smith C, Egan C, Davis K & Mattson MV (2000) Binding of beta-carbolines and related agents at serotonin (5-HT₂) and 5-HT_{1A}), dopamine (D₂) and benzodiazepine receptors. *Drug Alcohol Depend* 60(2):121-132.
- Goldberg GI, Strongin A, Collier IE, Genrich LT & Marmer BL (1992) Interaction of 92-kDa type IV collagenase with the tissue inhibitor of metalloproteinases prevents dimerization, complex formation with interstitial collagenase, and activation of the proenzyme with stromelysin. *J Biol Chem* 267(7):4583-4591.
- Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H & Thorgeirsson UP (1997) Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 74(2):111-122.
- Graham CH (1998) The 7th European Placenta Group Meeting, Vigso, Denmark, 13-17 December 1997. *Placenta* 19(4):341-344.
- 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 research* 214(1):93-99.
- Graham CH, Hawley TS, Hawley RG, MacDougall JR, Kerbel RS, Khoo N & Lala PK (1993) Establishment and characterization of first trimester human trophoblast cells with extended lifespan. *Experimental cell research* 206(2):204-211.

- Graham CH, Lysiak JJ, McCrae KR & Lala PK (1992) Localization of transforming growth factor-beta at the human fetal-maternal interface: role in trophoblast growth and differentiation. *Biol Reprod* 46(4):561-572.
- Green AR (2006) Neuropharmacology of 5-hydroxytryptamine. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1:S145-152.
- Greene EL, Houghton O, Collinsworth G, Garnovskaya MN, Nagai T, Sajjad T, Bheemanathini V, Grewal JS, Paul RV & Raymond JR (2000) 5-HT_{2A} receptors stimulate mitogen-activated protein kinase via H₂O₂ generation in rat renal mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 278(4):F650-658.
- Grewal JS, Mukhin YV, Garnovskaya MN, Raymond JR & Greene EL (1999) Serotonin 5-HT_{2A} receptor induces TGF-beta₁ expression in mesangial cells via ERK: proliferative and fibrotic signals. *Am J Physiol* 276(6 Pt 2):F922-930.
- Guillet-Deniau I, Burnol AF & Girard J (1997) Identification and localization of a skeletal muscle serotonin 5-HT_{2A} receptor coupled to the Jak/STAT pathway. *J Biol Chem* 272(23):14825-14829.
- Hall A (2005) Rho GTPases and the control of cell behaviour. *Biochem Soc Trans* 33(Pt 5):891-895.
- Hamada S, Senzaki K, Hamaguchi-Hamada K, Tabuchi K, Yamamoto H, Yamamoto T, Yoshikawa S, Okano H & Okado N (1998) Localization of 5-HT_{2A} receptor in rat cerebral cortex and olfactory system revealed by immunohistochemistry using two antibodies raised in rabbit and chicken. *Brain Res Mol Brain Res* 54(2):199-211.
- Handsuh 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.
- Hata A, Lagna G, Massague J & Hemmati-Brivanlou A (1998) Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. *Genes Dev* 12(2):186-197.
- Hernandez-Vargas P, Lopez-Franco O, Sanjuan G, Ruperez M, Ortiz-Munoz G, Suzuki Y, Aguado-Roncero P, Perez-Tejerizo G, Blanco J, Egido J, Ruiz-Ortega M & Gomez-Guerrero C (2005) Suppressors of cytokine signaling regulate angiotensin

- II-activated Janus kinase-signal transducers and activators of transcription pathway in renal cells. *J Am Soc Nephrol* 16(6):1673-1683.
- Hertz R (1959) Choriocarcinoma of women maintained in serial passage in hamster and rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 102:77-81.
- Hill CS (2009) Nucleocytoplasmic shuttling of Smad proteins. *Cell Res* 19(1):36-46.
- Hoffmann P, Feige JJ & Alfaidy N (2006) Expression and oxygen regulation of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor/prokineticin-1 and its receptors in human placenta during early pregnancy. *Endocrinology* 147(4):1675-1684.
- Hoffmann P, Saoudi Y, Benharouga M, Graham CH, Schaal JP, Mazouni C, Feige JJ & Alfaidy N (2009) Role of EG-VEGF in human placentation: Physiological and pathological implications. *J Cell Mol Med* 13(8B):2224-2235.
- Horita H, Kuroda E, Hachisuga T, Kashimura M & Yamashita U (2007) Induction of prostaglandin E2 production by leukemia inhibitory factor promotes migration of first trimester extravillous trophoblast cell line, HTR-8/SVneo. *Hum Reprod* 22(7):1801-1809.
- Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR & Humphrey PP (1994) International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol Rev* 46(2):157-203.
- Hoyer D, Hannon JP & Martin GR (2002) Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 71(4):533-554.
- Hu T, Kao CY, Hudson RT, Chen A & Draper RK (1999) Inhibition of secretion by 1,3-Cyclohexanebis(methylamine), a dibasic compound that interferes with coatamer function. *Mol Biol Cell* 10(4):921-933.
- Huang WQ, Zhang CL, Di XY & Zhang RQ (1998) Studies on the localization of 5-hydroxytryptamine and its receptors in human placenta. *Placenta* 19(8):655-661.
- Huang YQ, Li JJ & Karparkin S (2000) Thrombin inhibits tumor cell growth in association with up-regulation of p21(waf/cip1) and caspases via a p53-independent, STAT-1-dependent pathway. *J Biol Chem* 275(9):6462-6468.
- Huppertz B, Kertschanska S, Demir AY, Frank HG & 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(1):133-148.
- Huppertz B, Tews DS & Kaufmann P (2001) Apoptosis and syncytial fusion in human placental trophoblast and skeletal muscle. *International review of cytology* 205:215-253.
- Hurskainen T, Seiki M, Apte SS, Syrjakallio-Ylitalo M, Sorsa T, Oikarinen A & Autio-Harminen H (1998) Production of membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT-MMP-1) in early human placenta. A possible role in placental implantation? *J Histochem Cytochem* 46(2):221-229.
- Hustin J & Schaaps JP (1987) Echographic [corrected] and anatomic studies of the maternotrophoblastic border during the first trimester of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 157(1):162-168.
- Ichikawa N, Zhai YL, Shiozawa T, Toki T, Noguchi H, Nikaido T & Fujii S (1998) Immunohistochemical analysis of cell cycle regulatory gene products in normal trophoblast and placental site trophoblastic tumor. *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists* 17(3):235-240.
- Ilic D, Genbacev O, Jin F, Caceres E, Almeida EA, Bellingard-Dubouchaud V, Schaefer EM, Damsky CH & Fisher SJ (2001) Plasma membrane-associated pY397FAK is a marker of cytotrophoblast invasion in vivo and in vitro. *Am J Pathol* 159(1):93-108.
- Ino K, Uehara C, Kikkawa F, Kajiyama H, Shibata K, Suzuki T, Khin EE, Ito M, Takeuchi M, Itakura A & Mizutani S (2003) Enhancement of aminopeptidase A expression during angiotensin II-induced choriocarcinoma cell proliferation through AT1 receptor involving protein kinase C- and mitogen-activated protein kinase-dependent signaling pathway. *J Clin Endocrinol Metab* 88(8):3973-3982.
- Irving JA & Lala PK (1995) Functional role of cell surface integrins on human trophoblast cell migration: regulation by TGF-beta, IGF-II, and IGFBP-1. *Experimental cell research* 217(2):419-427.

- Isaka K, Usuda S, Ito H, Sagawa Y, Nakamura H, Nishi H, Suzuki Y, Li YF & Takayama M (2003) Expression and activity of matrix metalloproteinase 2 and 9 in human trophoblasts. *Placenta* 24(1):53-64.
- Ivey ME, Osman N & Little PJ (2008) Endothelin-1 signalling in vascular smooth muscle: pathways controlling cellular functions associated with atherosclerosis. *Atherosclerosis* 199(2):237-247.
- Izumi Y, Hirata M, Hasuwa H, Iwamoto R, Umata T, Miyado K, Tamai Y, Kurisaki T, Sehara-Fujisawa A, Ohno S & Mekada E (1998) A metalloprotease-disintegrin, MDC9/meltrin-gamma/ADAM9 and PKCdelta are involved in TPA-induced ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. *The EMBO journal* 17(24):7260-7272.
- Jacobs BL & Fornal CA (1999) Activity of serotonergic neurons in behaving animals. *Neuropsychopharmacology* 21(2 Suppl):9S-15S.
- Jacquemin P, Sapin V, Alsat E, Evain-Brion D, Dolle P & Davidson I (1998) Differential expression of the TEF family of transcription factors in the murine placenta and during differentiation of primary human trophoblasts in vitro. *Dev Dyn* 212(3):423-436.
- Jaffe AB & Hall A (2005) Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:247-269.
- Jaffe R (1993) Investigation of abnormal first-trimester gestations by color Doppler imaging. *J Clin Ultrasound* 21(8):521-526.
- Jauniaux E, Jurkovic D, Campbell S & Hustin J (1992) Doppler ultrasonographic features of the developing placental circulation: Correlation with anatomic findings. *Am J Obstet Gynecol* 166(2):585-587.
- Jauniaux E, Watson A & Burton G (2001) Evaluation of respiratory gases and acid-base gradients in human fetal fluids and uteroplacental tissue between 7 and 16 weeks' gestation. *Am J Obstet Gynecol* 184(5):998-1003.
- Ji TH, Grossmann M & Ji I (1998) G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J Biol Chem* 273(28):17299-17302.
- Johnson MS, Robertson DN, Holland PJ, Lutz EM & Mitchell R (2006) Role of the conserved NPxxY motif of the 5-HT_{2A} receptor in determining selective

- interaction with isoforms of ADP-ribosylation factor (ARF). *Cell Signal* 18(10):1793-1800.
- Jouvet M (1999) Sleep and serotonin: an unfinished story. *Neuropsychopharmacology* 21(2 Suppl):24S-27S.
- Ju H, Venema VJ, Liang H, Harris MB, Zou R & Venema RC (2000) Bradykinin activates the Janus-activated kinase/signal transducers and activators of transcription (JAK/STAT) pathway in vascular endothelial cells: localization of JAK/STAT signalling proteins in plasmalemmal caveolae. *Biochem J* 351(Pt 1):257-264.
- Kabir-Salmani M, Shiokawa S, Akimoto Y, Hasan-Nejad H, Sakai K, Nagamatsu S, Nakamura Y, Hosseini A & Iwashita M (2002) Characterization of morphological and cytoskeletal changes in trophoblast cells induced by insulin-like growth factor-I. *J Clin Endocrinol Metab* 87(12):5751-5759.
- Kamens J, Paskind M, Hugunin M, Talanian RV, Allen H, Banach D, Bump N, Hackett M, Johnston CG, Li P & et al. (1995) Identification and characterization of ICH-2, a novel member of the interleukin-1 beta-converting enzyme family of cysteine proteases. *J Biol Chem* 270(25):15250-15256.
- Karmakar S & Das C (2002) Regulation of trophoblast invasion by IL-1beta and TGF-beta1. *Am J Reprod Immunol* 48(4):210-219.
- Kashiwagi M, Tortorella M, Nagase H & Brew K (2001) TIMP-3 is a potent inhibitor of aggrecanase 1 (ADAM-TS4) and aggrecanase 2 (ADAM-TS5). *J Biol Chem* 276(16):12501-12504.
- 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.
- Keely SJ, Calandrella SO & Barrett KE (2000) Carbachol-stimulated transactivation of epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinase in T(84) cells is mediated by intracellular Ca^{2+} , PYK-2, and p60(src). *J Biol Chem* 275(17):12619-12625.
- Kelly E, Bailey CP & Henderson G (2008) Agonist-selective mechanisms of GPCR desensitization. *Br J Pharmacol* 153 Suppl 1:S379-388.

- Keryer G, Alsat E, Tasken K & Evain-Brion D (1998) Cyclic AMP-dependent protein kinases and human trophoblast cell differentiation in vitro. *Journal of cell science* 111 (Pt 7):995-1004.
- Khokhlatchev AV, Canagarajah B, Wilsbacher J, Robinson M, Atkinson M, Goldsmith E & Cobb MH (1998) Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell* 93(4):605-615.
- Khoo NK, Bechberger JF, Shepherd T, Bond SL, McCrae KR, Hamilton GS & Lala PK (1998) SV40 Tag transformation of the normal invasive trophoblast results in a premalignant phenotype. I. Mechanisms responsible for hyperinvasiveness and resistance to anti-invasive action of TGFbeta. *Int J Cancer* 77(3):429-439.
- Kim H, Toyofuku Y, Lynn FC, Chak E, Uchida T, Mizukami H, Fujitani Y, Kawamori R, Miyatsuka T, Kosaka Y, Yang K, Honig G, van der Hart M, Kishimoto N, Wang J, Yagihashi S, Tecott LH, Watada H & German MS (2010) Serotonin regulates pancreatic beta cell mass during pregnancy. *Nature medicine* 16(7):804-808.
- Kita N, Mitsushita J, Ohira S, Takagi Y, Ashida T, Kanai M, Nikaido T & Konishi I (2003) Expression and activation of MAP kinases, ERK1/2, in the human villous trophoblasts. *Placenta* 24(2-3):164-172.
- 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. *Archives of gynecology and obstetrics* 256(2):85-88.
- Klempan T, Hudon-Thibeault AA, Oufkir T, Vaillancourt C & Sanderson JT (Stimulation of serotonergic 5-HT2A receptor signaling increases placental aromatase (CYP19) activity and expression in BeWo and JEG-3 human choriocarcinoma cells. *Placenta* 32(9):651-656.
- Kliman HJ & Feinberg RF (1990) Human trophoblast-extracellular matrix (ECM) interactions in vitro: ECM thickness modulates morphology and proteolytic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(8):3057-3061.
- Kliman HJ, Nestler JE, Sermasi E, Sanger JM & Strauss JF, 3rd (1986) Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinology* 118(4):1567-1582.

- Knofler M (2010) Critical growth factors and signalling pathways controlling human trophoblast invasion. *Int J Dev Biol* 54(2-3):269-280.
- Kovo M, Kogman N, Ovadia O, Nakash I, Golan A & Hoffman A (2008) Carrier-mediated transport of metformin across the human placenta determined by using the ex vivo perfusion of the placental cotyledon model. *Prenatal diagnosis* 28(6):544-548.
- Kretschmar M & Massague J (1998) SMADs: mediators and regulators of TGF-beta signaling. *Curr Opin Genet Dev* 8(1):103-111.
- Krupnick JG & Benovic JL (1998) The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38:289-319.
- Kudo Y, Boyd CA, Kimura H, Cook PR, Redman CW & Sargent IL (2003) Quantifying the syncytialisation of human placental trophoblast BeWo cells grown in vitro. *Biochim Biophys Acta* 1640(1):25-31.
- Kume A, Nishiura H, Suda J & Suda T (1997) Focal adhesion kinase upregulated by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor but not by interleukin-3 in differentiating myeloid cells. *Blood* 89(9):3434-3442.
- Kuo L, Chang HC, Leu TH, Maa MC & Hung WC (2006) Src oncogene activates MMP-2 expression via the ERK/Sp1 pathway. *J Cell Physiol* 207(3):729-734.
- Kurjak A, Zudenigo D, Predanic M & Kupesic S (1993a) Recent advances in the Doppler study of early fetomaternal circulation. *J Perinat Med* 21(6):419-439.
- Kurjak A, Zudenigo D, Salihagic A & Predanic M (1993b) [New findings about placental circulation using ultrasound]. *Lijec Vjesn* 115(1-2):53-59.
- Kurrasch-Orbaugh DM, Parrish JC, Watts VJ & Nichols DE (2003a) A complex signaling cascade links the serotonin_{2A} receptor to phospholipase A₂ activation: the involvement of MAP kinases. *J Neurochem* 86(4):980-991.
- Kurrasch-Orbaugh DM, Watts VJ, Barker EL & Nichols DE (2003b) Serotonin 5-hydroxytryptamine 2A receptor-coupled phospholipase C and phospholipase A₂ signaling pathways have different receptor reserves. *J Pharmacol Exp Ther* 304(1):229-237.
- Kursar JD, Nelson DL, Wainscott DB, Cohen ML & Baez M (1992) Molecular cloning, functional expression, and pharmacological characterization of a novel serotonin

- receptor (5-hydroxytryptamine_{2F}) from rat stomach fundus. *Mol Pharmacol* 42(4):549-557.
- Kyriakis JM & Avruch J (2001) Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 81(2):807-869.
- Labied S, Blacher S, Carmeliet P, Noel A, Frankenne F, Foidart JM & Munaut C (2011) Transient reduction of placental angiogenesis in PAI-1-deficient mice. *Physiol Genomics* 43(4):188-198.
- Lacroix MC, Guibourdenche J, Fournier T, Laurendeau I, Igout A, Goffin V, Pantel J, Tsatsaris V & Evain-Brion D (2005) Stimulation of human trophoblast invasion by placental growth hormone. *Endocrinology* 146(5):2434-2444.
- Lala PK, Lee BP, Xu G & Chakraborty C (2002) Human placental trophoblast as an in vitro model for tumor progression. *Can J Physiol Pharmacol* 80(2):142-149.
- Lanoix D, Lacasse AA, Reiter RJ & Vaillancourt C (2013) Melatonin: the smart killer: the human trophoblast as a model. *Mol Cell Endocrinol* 348(1):1-11.
- Leco KJ, Khokha R, Pavloff N, Hawkes SP & Edwards DR (1994) Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) is an extracellular matrix-associated protein with a distinctive pattern of expression in mouse cells and tissues. *J Biol Chem* 269(12):9352-9360.
- Lecouter J, Lin R & Ferrara N (2004) EG-VEGF: a novel mediator of endocrine-specific angiogenesis, endothelial phenotype, and function. *Ann N Y Acad Sci* 1014:50-57.
- Leonard WJ & O'Shea JJ (1998) Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol* 16:293-322.
- Lewis MP, Clements M, Takeda S, Kirby PL, Seki H, Lonsdale LB, Sullivan MH, Elder MG & White JO (1996) Partial characterization of an immortalized human trophoblast cell-line, TCL-1, which possesses a CSF-1 autocrine loop. *Placenta* 17(2-3):137-146.
- Li N, Wallen NH, Ladjevardi M & Hjerdahl P (1997) Effects of serotonin on platelet activation in whole blood. *Blood Coagul Fibrinolysis* 8(8):517-523.
- Librach CL, Feigenbaum SL, Bass KE, Cui TY, Verastas 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(25):17125-17131.
- Librach CL, Werb Z, Fitzgerald ML, Chiu K, Corwin NM, Esteves RA, Grobelny D, Galardy R, Damsky CH & Fisher SJ (1991) 92-kD type IV collagenase mediates invasion of human cytotrophoblasts. *The Journal of cell biology* 113(2):437-449.
- Liebmann C (2001) Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathway: paradigms of multiplicity. *Cell Signal* 13(11):777-785.
- Lijnen HR (2001) Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *Thromb Haemost* 86(1):324-333.
- Lim KH, Zhou Y, Janatpour M, McMaster M, Bass K, Chun SH & Fisher SJ (1997) Human cytotrophoblast differentiation/invasion is abnormal in pre-eclampsia. *Am J Pathol* 151(6):1809-1818.
- Loechel F, Fox JW, Murphy G, Albrechtsen R & Wewer UM (2000) ADAM 12-S cleaves IGFBP-3 and IGFBP-5 and is inhibited by TIMP-3. *Biochem Biophys Res Commun* 278(3):511-515.
- Logan SK, Fisher SJ & Damsky CH (1992) Human placental cells transformed with temperature-sensitive simian virus 40 are immortalized and mimic the phenotype of invasive cytotrophoblasts at both permissive and nonpermissive temperatures. *Cancer Res* 52(21):6001-6009.
- Lohse MJ, Benovic JL, Codina J, Caron MG & Lefkowitz RJ (1990) beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science* 248(4962):1547-1550.
- Luchtefeld M, Drexler H & Schieffer B (2003) 5-Lipoxygenase is involved in the angiotensin II-induced NAD(P)H-oxidase activation. *Biochem Biophys Res Commun* 308(3):668-672.
- Luttrell LM, Hawes BE, van Biesen T, Luttrell DK, Lansing TJ & Lefkowitz RJ (1996) Role of c-Src tyrosine kinase in G protein-coupled receptor- and Gbetagamma subunit-mediated activation of mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 271(32):19443-19450.

- Lysiak JJ, Han VK & Lala PK (1993) Localization of transforming growth factor alpha in the human placenta and decidua: role in trophoblast growth. *Biol Reprod* 49(5):885-894.
- Lysiak JJ, Johnson GR & Lala PK (1995) Localization of amphiregulin in the human placenta and decidua throughout gestation: role in trophoblast growth. *Placenta* 16(4):359-366.
- MacPhee DJ, Mostachfi H, Han R, Lye SJ, Post M & Caniggia I (2001) Focal adhesion kinase is a key mediator of human trophoblast development. *Lab Invest* 81(11):1469-1483.
- Malassine A & Cronier L (2002) Hormones and human trophoblast differentiation: a review. *Endocrine* 19(1):3-11.
- Malassine A & Cronier L (2005) Involvement of gap junctions in placental functions and development. *Biochim Biophys Acta* 1719(1-2):117-124.
- Malassine A, Frenzo JL & Evain-Brion D (2003) A comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model. *Human reproduction update* 9(6):531-539.
- Manning BD & Cantley LC (2007) AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129(7):1261-1274.
- Marek GJ (2009) Activation of adenosine(1) (A(1)) receptors suppresses head shakes induced by a serotonergic hallucinogen in rats. *Neuropharmacology* 56(8):1082-1087.
- Marek GJ, Wright RA, Gewirtz JC & Schoepp DD (2001) A major role for thalamocortical afferents in serotonergic hallucinogen receptor function in the rat neocortex. *Neuroscience* 105(2):379-392.
- Marek GJ & Zhang C (2008) Activation of metabotropic glutamate 5 (mGlu5) receptors induces spontaneous excitatory synaptic currents in layer V pyramidal cells of the rat prefrontal cortex. *Neuroscience letters* 442(3):239-243.
- Marrero MB, Schieffer B, Paxton WG, Heerdt L, Berk BC, Delafontaine P & Bernstein KE (1995) Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT1 receptor. *Nature* 375(6528):247-250.

- Marrero MB, Venema VJ, Ju H, Eaton DC & Venema RC (1998) Regulation of angiotensin II-induced JAK2 tyrosine phosphorylation: roles of SHP-1 and SHP-2. *Am J Physiol* 275(5 Pt 1):C1216-1223.
- Marshall MS (1995) Ras target proteins in eukaryotic cells. *FASEB J* 9(13):1311-1318.
- Martinez-Hernandez MG, Baiza-Gutman LA, Castillo-Trapala A & Armant DR (2011) Regulation of proteinases during mouse peri-implantation development: urokinase-type plasminogen activator expression and cross talk with matrix metalloproteinase 9. *Reproduction* 141(2):227-239.
- Massague J (1998) TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67:753-791.
- Matozaki T, Nakanishi H & Takai Y (2000) Small G-protein networks: their crosstalk and signal cascades. *Cell Signal* 12(8):515-524.
- Matthiesen L, Berg G, Ernerudh J, Ekerfelt C, Jonsson Y & Sharma S (2005) Immunology of preeclampsia. *Chem Immunol Allergy* 89:49-61.
- McKinnon T, Chakraborty C, Gleeson LM, Chidiac P & Lala PK (2001) Stimulation of human extravillous trophoblast migration by IGF-II is mediated by IGF type 2 receptor involving inhibitory G protein(s) and phosphorylation of MAPK. *J Clin Endocrinol Metab* 86(8):3665-3674.
- Meekins JW, Luckas MJ, Pijnenborg R & McFadyen IR (1997) Histological study of decidual spiral arteries and the presence of maternal erythrocytes in the intervillous space during the first trimester of normal human pregnancy. *Placenta* 18(5-6):459-464.
- Meisser A, Cameo P, Islami D, Campana A & Bischof P (1999a) Effects of interleukin-6 (IL-6) on cytotrophoblastic cells. *Mol Hum Reprod* 5(11):1055-1058.
- Meisser A, Chardonens D, Campana A & Bischof P (1999b) Effects of tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1 alpha, macrophage colony stimulating factor and transforming growth factor beta on trophoblastic matrix metalloproteinases. *Mol Hum Reprod* 5(3):252-260.
- Merchant SJ, Crocker IP, Baker PN, Tansinda D, Davidge ST & Guilbert LJ (2004a) Matrix metalloproteinase release from placental explants of pregnancies complicated by intrauterine growth restriction. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* 11(2):97-103.

- Merchant SJ & Davidge ST (2004b) The role of matrix metalloproteinases in vascular function: implications for normal pregnancy and pre-eclampsia. *BJOG* 111(9):931-939.
- Merzak A, Koochekpour S, Fillion MP, Fillion G & Pilkington GJ (1996) Expression of serotonin receptors in human fetal astrocytes and glioma cell lines: a possible role in glioma cell proliferation and migration. *Brain Res Mol Brain Res* 41(1-2):1-7.
- Mi S, Lee X, Li X, Veldman GM, Finnerty H, Racie L, LaVallie E, Tang XY, Edouard P, Howes S, Keith JC, Jr. & McCoy JM (2000) Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature* 403(6771):785-789.
- Milanini-Mongiati J, Pouyssegur J & Pages G (2002) Identification of two Sp1 phosphorylation sites for p42/p44 mitogen-activated protein kinases: their implication in vascular endothelial growth factor gene transcription. *J Biol Chem* 277(23):20631-20639.
- 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(5):1101-1105.
- Miyazono K, ten Dijke P & Heldin CH (2000) TGF-beta signaling by Smad proteins. *Adv Immunol* 75:115-157.
- Monkley SJ, Delaney SJ, Pennisi DJ, Christiansen JH & Wainwright BJ (1996) Targeted disruption of the Wnt2 gene results in placentation defects. *Development* 122(11):3343-3353.
- Moore NP, Saghir SA, Clark AJ, Hansen SC, Carney EW, Marshall VA, Rasoulpour R & Bartels MJ (2012) Toxicokinetic profile of N-(2-aminoethyl)ethanolamine in the female Wistar rat and distribution into the late gestation fetus and milk. *Birth defects research. Part B, Developmental and reproductive toxicology* 95(2):107-115.
- Morales-Prieto DM, Chaiwangyen W, Ospina-Prieto S, Schneider U, Herrmann J, Gruhn B & Markert UR (2012) MicroRNA expression profiles of trophoblastic cells. *Placenta* 33(9):725-734.

- Mordret G (1993) MAP kinase kinase: a node connecting multiple pathways. *Biol Cell* 79(3):193-207.
- Morrish DW, Bhardwaj D & Paras MT (1991) Transforming growth factor beta 1 inhibits placental differentiation and human chorionic gonadotropin and human placental lactogen secretion. *Endocrinology* 129(1):22-26.
- Morrish DW, Manickavel V, Jewell LD & Siy O (1987) Immunolocalization of alpha and beta chains of human chorionic gonadotropin, placental lactogen and pregnancy-specific beta-glycoprotein in term placenta by a touch preparation method. *Histochemistry* 88(1):57-60.
- Moss ML, Jin SL, Milla ME, Bickett DM, Burkhart W, Carter HL, Chen WJ, Clay WC, Didsbury JR, Hassler D, Hoffman CR, Kost TA, Lambert MH, Leesnitzer MA, McCauley P, McGeehan G, Mitchell J, Moyer M, Pahel G, Rocque W, Overton LK, Schoenen F, Seaton T, Su JL, Becherer JD & et al. (1997) Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nature* 385(6618):733-736.
- Myers JE, Merchant SJ, Macleod M, Mires GJ, Baker PN & Davidge ST (2005) MMP-2 levels are elevated in the plasma of women who subsequently develop preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 24(2):103-115.
- Nachtigall MJ, Kliman HJ, Feinberg RF, Olive DL, Engin O & Arici A (1996) The effect of leukemia inhibitory factor (LIF) on trophoblast differentiation: a potential role in human implantation. *J Clin Endocrinol Metab* 81(2):801-806.
- Nagase H & Woessner JF, Jr. (1999) Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 274(31):21491-21494.
- Nakagawa K, Sogo S, Hioki K, Tokunaga R & Taketani S (1998) Acquisition of cell adhesion and induction of focal adhesion kinase of human colon cancer Colo 201 cells by retinoic acid-induced differentiation. *Differentiation* 62(5):249-257.
- Nakagawa O, Fujisawa K, Ishizaki T, Saito Y, Nakao K & Narumiya S (1996) ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice. *FEBS Lett* 392(2):189-193.
- Ni W & Watts SW (2006) 5-hydroxytryptamine in the cardiovascular system: focus on the serotonin transporter (SERT). *Clin Exp Pharmacol Physiol* 33(7):575-583.

- Nicotra A, Pierucci F, Parvez H & Senatori O (2004) Monoamine oxidase expression during development and aging. *Neurotoxicology* 25(1-2):155-165.
- Nishida Y, Miyamori H, Thompson EW, Takino T, Endo Y & Sato H (2008) Activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) by membrane type 1 matrix metalloproteinase through an artificial receptor for proMMP-2 generates active MMP-2. *Cancer research* 68(21):9096-9104.
- Oktay K, Brzyski RG, Miller EB & Krugman D (1994) Association of serum beta-hCG levels with myosalpingeal invasion and viable trophoblast mass in tubal pregnancy. *Obstet Gynecol* 84(5):803-806.
- Onogi A, Naruse K, Sado T, Tsunemi T, Shigetomi H, Noguchi T, Yamada Y, Akasaki M, Oi H & Kobayashi H (2011) Hypoxia inhibits invasion of extravillous trophoblast cells through reduction of matrix metalloproteinase (MMP)-2 activation in the early first trimester of human pregnancy. *Placenta* 32(9):665-670.
- Overall CM & Lopez-Otin C (2002) Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat Rev Cancer* 2(9):657-672.
- Page-McCaw A, Ewald AJ & Werb Z (2007) Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(3):221-233.
- Paiva P, Salamonsen LA, Manuelpillai U, Walker C, Tapia A, Wallace EM & Dimitriadis E (2007) Interleukin-11 promotes migration, but not proliferation, of human trophoblast cells, implying a role in placentation. *Endocrinology* 148(11):5566-5572.
- Paria BC, Ma W, Tan J, Raja S, Das SK, Dey SK & Hogan BL (2001) Cellular and molecular responses of the uterus to embryo implantation can be elicited by locally applied growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(3):1047-1052.
- Park ES, Kim H, Suh JM, Park SJ, Kwon OY, Kim YK, Ro HK, Cho BY, Chung J & Shong M (2000) Thyrotropin induces SOCS-1 (suppressor of cytokine signaling-1) and SOCS-3 in FRTL-5 thyroid cells. *Mol Endocrinol* 14(3):440-448.
- Parr BA, Cornish VA, Cybulsky MI & McMahon AP (2001) Wnt7b regulates placental development in mice. *Dev Biol* 237(2):324-332.

- Pattillo RA & Gey GO (1968a) The establishment of a cell line of human hormone-synthesizing trophoblastic cells in vitro. *Cancer research* 28(7):1231-1236.
- Pattillo RA, Gey GO, Delfs E & Mattingly RF (1968b) In vitro identification of the trophoblastic stem cell of the human villous placenta. *Am J Obstet Gynecol* 100(4):582-588.
- Pattillo RA, Husa RO, Huang WY, Delfs E & Mattingly RF (1972) Estrogen production by trophoblastic tumors in tissue culture. *J Clin Endocrinol Metab* 34(1):59-61.
- Pattillo RA, Husa RO, Ruckert AC, Kurtz JW, Cade JM & Rinke ML (1979) Human chorionic gonadotropin in BeWo trophoblastic cells after 12 years in continuous culture: retention of intact human chorionic gonadotropin secretion in mechanically versus enzyme-dispersed cells. *Endocrinology* 105(4):967-974.
- Pavan L, Tarrade A, Hermouet A, Delouis C, Titeux M, Vidaud M, Therond P, Evain-Brion D & Fournier T (2003) Human invasive trophoblasts transformed with simian virus 40 provide a new tool to study the role of PPARgamma in cell invasion process. *Carcinogenesis* 24(8):1325-1336.
- Pazos A, Cortes R & Palacios JM (1985a) Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. II. Serotonin-2 receptors. *Brain Res* 346(2):231-249.
- Pazos A & Palacios JM (1985b) Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. I. Serotonin-1 receptors. *Brain Res* 346(2):205-230.
- Pei D & Weiss SJ (1995) Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Nature* 375(6528):244-247.
- Pelletier S, Duhamel F, Coulombe P, Popoff MR & Meloche S (2003) Rho family GTPases are required for activation of Jak/STAT signaling by G protein-coupled receptors. *Molecular and cellular biology* 23(4):1316-1333.
- Peroutka SJ & Snyder SH (1979) Multiple serotonin receptors: differential binding of [3H]5-hydroxytryptamine, [3H]lysergic acid diethylamide and [3H]spiroperidol. *Mol Pharmacol* 16(3):687-699.
- Pitcher JA, Freedman NJ & Lefkowitz RJ (1998) G protein-coupled receptor kinases. *Annu Rev Biochem* 67:653-692.

- Poehlmann TG, Fitzgerald JS, Meissner A, Wengenmayer T, Schleussner E, Friedrich K & Markert UR (2005) Trophoblast invasion: tuning through LIF, signalling via Stat3. *Placenta* 26 Suppl A:S37-41.
- 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(6):838-846.
- Pollheimer J, Loregger T, Sonderegger S, Saleh L, Bauer S, Bilban M, Czerwenka K, Husslein P & Knofler M (2006) Activation of the canonical wingless/T-cell factor signaling pathway promotes invasive differentiation of human trophoblast. *Am J Pathol* 168(4):1134-1147.
- Pospechova K, Rozehnal V, Stejskalova L, Vrzal R, Pospisilova N, Jamborova G, May K, Siegmund W, Dvorak Z, Nachtigal P, Semecky V & Pavek P (2009) Expression and activity of vitamin D receptor in the human placenta and in choriocarcinoma BeWo and JEG-3 cell lines. *Mol Cell Endocrinol* 299(2):178-187.
- Premont RT & Gainetdinov RR (2007) Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Annu Rev Physiol* 69:511-534.
- Prenzel N, Zwick E, Daub H, Leserer M, Abraham R, Wallasch C & Ullrich A (1999) EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature* 402(6764):884-888.
- Prouillac C, Videmann B, Mazallon M & Lecoecur S (2009) Induction of cells differentiation and ABC transporters expression by a myco-estrogen, zearalenone, in human choriocarcinoma cell line (BeWo). *Toxicology* 263(2-3):100-107.
- Qin H, Sun Y & Benveniste EN (1999) The transcription factors Sp1, Sp3, and AP-2 are required for constitutive matrix metalloproteinase-2 gene expression in astrogloma cells. *J Biol Chem* 274(41):29130-29137.
- Qiu Q, Yang M, Tsang BK & Gruslin A (2004a) Both mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signalling are required in epidermal growth factor-induced human trophoblast migration. *Mol Hum Reprod* 10(9):677-684.

- Qiu Q, Yang M, Tsang BK & Gruslin A (2004b) EGF-induced trophoblast secretion of MMP-9 and TIMP-1 involves activation of both PI3K and MAPK signalling pathways. *Reproduction* 128(3):355-363.
- Rajagopalan S, Meng XP, Ramasamy S, Harrison DG & Galis ZS (1996) Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. *The Journal of clinical investigation* 98(11):2572-2579.
- Rapport MM, Green AA & Page IH (1947) Purification of the substance which is responsible for the vasoconstrictor activity of serum. *Fed Proc* 6(1 Pt 2):184.
- Rawlings JS, Rosler KM & Harrison DA (2004) The JAK/STAT signaling pathway. *Journal of cell science* 117(Pt 8):1281-1283.
- Raza SL, Nehring LC, Shapiro SD & Cornelius LA (2000) Proteinase-activated receptor-1 regulation of macrophage elastase (MMP-12) secretion by serine proteinases. *J Biol Chem* 275(52):41243-41250.
- Redman CW & Sargent IL (2003) Pre-eclampsia, the placenta and the maternal systemic inflammatory response--a review. *Placenta* 24 Suppl A:S21-27.
- Rodesch F, Simon P, Donner C & Jauniaux E (1992) Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy. *Obstetrics and Gynecology* 80(2):283-285.
- Rosario GX, Konno T & Soares MJ (2008) Maternal hypoxia activates endovascular trophoblast cell invasion. *Dev Biol* 314(2):362-375.
- Roth B & Westkaemper R (2006) Structure and Function Reveal Insights in the Pharmacology of 5-HT Receptor Subtypes. *The Serotonin Receptors*, (The Receptors: Humana Press, 10.1007/978-1-59745-080-5_2. p 39-58.
- Roth BL, Willins DL, Kristiansen K & Kroeze WK (1998) 5-Hydroxytryptamine2-family receptors (5-hydroxytryptamine2A, 5-hydroxytryptamine2B, 5-hydroxytryptamine2C): where structure meets function. *Pharmacol Ther* 79(3):231-257.
- Roth I & Fisher SJ (1999) IL-10 is an autocrine inhibitor of human placental cytotrophoblast MMP-9 production and invasion. *Dev Biol* 205(1):194-204.

- Roux PP & Blenis J (2004) ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* 68(2):320-344.
- Sanders-Bush E, Fentress H & Hazelwood L (2003) Serotonin 5-HT₂ receptors: molecular and genomic diversity. *Mol Interv* 3(6):319-330.
- Sartori MT, Serena A, Saggiorato G, Campegi S, Faggian D, Pagnan A & Paternoster DM (2008) Variations in fibrinolytic parameters and inhibin-A in pregnancy: related hypertensive disorders. *J Thromb Haemost* 6(2):352-358.
- Sasaguri T, Teruya H, Ishida A, Abumiya T & Ogata J (2000) Linkage between alpha(1) adrenergic receptor and the Jak/STAT signaling pathway in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 268(1):25-30.
- Sato H, Kita M & Seiki M (1993) v-Src activates the expression of 92-kDa type IV collagenase gene through the AP-1 site and the GT box homologous to retinoblastoma control elements. A mechanism regulating gene expression independent of that by inflammatory cytokines. *J Biol Chem* 268(31):23460-23468.
- Saucier C, Morris SJ & Albert PR (1998) Endogenous serotonin-2A and -2C receptors in Balb/c-3T3 cells revealed in serotonin-free medium: desensitization and down-regulation by serotonin. *Biochem Pharmacol* 56(10):1347-1357.
- Schaller MD (2001) Biochemical signals and biological responses elicited by the focal adhesion kinase. *Biochim Biophys Acta* 1540(1):1-21.
- Schaller MD, Borgman CA, Cobb BS, Vines RR, Reynolds AB & Parsons JT (1992) pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(11):5192-5196.
- Schaller MD, Hildebrand JD, Shannon JD, Fox JW, Vines RR & Parsons JT (1994) Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src. *Molecular and cellular biology* 14(3):1680-1688.
- Schlaepfer DD & Mitra SK (2004) Multiple connections link FAK to cell motility and invasion. *Curr Opin Genet Dev* 14(1):92-101.
- 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 mechanism for control of trophoblast invasion. *Am J Obstet Gynecol* 171(3):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(3):457-461.
- Shiokawa S, Iwashita M, Akimoto Y, Nagamatsu S, Sakai K, Hanashi H, Kabir-Salmani M, Nakamura Y, Uehata M & Yoshimura Y (2002) Small guanosine triphosphatase RhoA and Rho-associated kinase as regulators of trophoblast migration. *J Clin Endocrinol Metab* 87(12):5808-5816.
- Shiu SY, Xi SC, Xu JN, Mei L, Pang SF, Yao KM & Wong JT (2000) Inhibition of malignant trophoblastic cell proliferation in vitro and in vivo by melatonin. *Life Sci* 67(17):2059-2074.
- Shum JK, Melendez JA & Jeffrey JJ (2002) Serotonin-induced MMP-13 production is mediated via phospholipase C, protein kinase C, and ERK1/2 in rat uterine smooth muscle cells. *J Biol Chem* 277(45):42830-42840.
- Simon C, Frances A, Piquette GN, el Danasouri I, Zurawski G, Dang W & Polan ML (1994) Embryonic implantation in mice is blocked by interleukin-1 receptor antagonist. *Endocrinology* 134(2):521-528.
- Sivasubramaniam SD, Finch CC, Billett MA, Baker PN & Billett EE (2002) Monoamine Oxidase Expression and Activity in Human Placentae from Pre-eclamptic and Normotensive Pregnancies. *Placenta* 23(2-3):163-171.
- Smola-Hess S, Schnitzler R, Hadaschik D, Smola H, Mauch C, Krieg T & Pfister H (2001) CD40L induces matrix-metalloproteinase-9 but not tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in cervical carcinoma cells: imbalance between NF-kappaB and STAT3 activation. *Experimental cell research* 267(2):205-215.
- Sonderregger S, Husslein H, Leisser C & Knofler M (2007) Complex expression pattern of Wnt ligands and frizzled receptors in human placenta and its trophoblast subtypes. *Placenta* 28 Suppl A:S97-102.
- Sonier B, Arseneault M, Lavigne C, Ouellette RJ & Vaillancourt C (2006) The 5-HT_{2A} serotonergic receptor is expressed in the MCF-7 human breast cancer cell line

- and reveals a mitogenic effect of serotonin. *Biochem Biophys Res Commun* 343(4):1053-1059.
- Sonier B, Lavigne C, Arseneault M, Ouellette R & Vaillancourt C (2005) Expression of the 5-HT_{2A} serotonergic receptor in human placenta and choriocarcinoma cells: mitogenic implications of serotonin. *Placenta* 26(6):484-490.
- Soriano SF, Serrano A, Hernanz-Falcon P, Martin de Ana A, Monterrubio M, Martinez C, Rodriguez-Frade JM & Mellado M (2003) Chemokines integrate JAK/STAT and G-protein pathways during chemotaxis and calcium flux responses. *European journal of immunology* 33(5):1328-1333.
- Staun-Ram E, Goldman S, Gabarin D & Shalev E (2004) Expression and importance of matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and -9) in human trophoblast invasion. *Reprod Biol Endocrinol* 2:59.
- Stein JV, Soriano SF, M'Rini C, Nombela-Arrieta C, de Buitrago GG, Rodriguez-Frade JM, Mellado M, Girard JP & Martinez AC (2003) CCR7-mediated physiological lymphocyte homing involves activation of a tyrosine kinase pathway. *Blood* 101(1):38-44.
- Sternlicht MD & Werb Z (2001) How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:463-516.
- Strasser RH, Benovic JL, Caron MG & Lefkowitz RJ (1986a) Beta-agonist- and prostaglandin E₁-induced translocation of the beta-adrenergic receptor kinase: evidence that the kinase may act on multiple adenylate cyclase-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(17):6362-6366.
- Strasser RH, Sibley DR & Lefkowitz RJ (1986b) A novel catecholamine-activated adenosine cyclic 3',5'-phosphate independent pathway for beta-adrenergic receptor phosphorylation in wild-type and mutant S49 lymphoma cells: mechanism of homologous desensitization of adenylate cyclase. *Biochemistry* 25(6):1371-1377.
- Strongin AY, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA & Goldberg GI (1995) Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem* 270(10):5331-5338.

- Sufka KJ, Schomburg FM & Giordano J (1992) Receptor mediation of 5-HT-induced inflammation and nociception in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 41(1):53-56.
- Sullivan MH (2004) Endocrine cell lines from the placenta. *Mol Cell Endocrinol* 228(1-2):103-119.
- Takai Y, Sasaki T, Tanaka K & Nakanishi H (1995) Rho as a regulator of the cytoskeleton. *Trends Biochem Sci* 20(6):227-231.
- Takeda K, Noguchi K, Shi W, Tanaka T, Matsumoto M, Yoshida N, Kishimoto T & Akira S (1997) Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(8):3801-3804.
- Takino T, Miyamori H, Watanabe Y, Yoshioka K, Seiki M & Sato H (2004) Membrane type 1 matrix metalloproteinase regulates collagen-dependent mitogen-activated protein/extracellular signal-related kinase activation and cell migration. *Cancer research* 64(3):1044-1049.
- Tamir H, Hsiung SC, Yu PY, Liu KP, Adlersberg M, Nunez EA & Gershon MD (1992) Serotonergic signalling between thyroid cells: protein kinase C and 5-HT₂ receptors in the secretion and action of serotonin. *Synapse* 12(2):155-168.
- Tapia A, Salamonsen LA, Manuelpillai U & Dimitriadis E (2008) Leukemia inhibitory factor promotes human first trimester extravillous trophoblast adhesion to extracellular matrix and secretion of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and -2. *Hum Reprod* 23(8):1724-1732.
- 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.
- Taylor RN, Newman ED & Chen SA (1991) Forskolin and methotrexate induce an intermediate trophoblast phenotype in cultured human choriocarcinoma cells. *Am J Obstet Gynecol* 164(1 Pt 1):204-210.
- Teng YC, Lin QD, Lin JH, Ding CW & Zuo Y (2009) Coagulation and fibrinolysis related cytokine imbalance in preeclampsia: the role of placental trophoblasts. *J Perinat Med* 37(4):343-348.
- Tomar A & Schlaepfer DD (2009) Focal adhesion kinase: switching between GAPs and GEFs in the regulation of cell motility. *Curr Opin Cell Biol* 21(5):676-683.

- Tsao P & von Zastrow M (2000a) Downregulation of G protein-coupled receptors. *Curr Opin Neurobiol* 10(3):365-369.
- Tsao PI & von Zastrow M (2000b) Type-specific sorting of G protein-coupled receptors after endocytosis. *J Biol Chem* 275(15):11130-11140.
- Tsatas D, Baker MS & Rice GE (1999) Differential expression of proteases in human gestational tissues before, during and after spontaneous-onset labour at term. *Journal of reproduction and fertility* 116(1):43-49.
- Turner JH & Raymond JR (2005) Interaction of calmodulin with the serotonin 5-hydroxytryptamine_{2A} receptor. A putative regulator of G protein coupling and receptor phosphorylation by protein kinase C. *J Biol Chem* 280(35):30741-30750.
- Twarog BM (1988) Serotonin: history of a discovery. *Comp Biochem Physiol C* 91(1):21-24.
- Tyce GM (1990) Origin and metabolism of serotonin. *J Cardiovasc Pharmacol* 16 Suppl 3:S1-7.
- Udenfriend S & Weissbach H (1958) Turnover of 5-hydroxytryptamine (serotonin) in tissues. *Proc Soc Exp Biol Med* 97(4):748-751.
- Ushigome F, Takanaga H, Matsuo H, Yanai S, Tsukimori K, Nakano H, Uchiumi T, Nakamura T, Kuwano M, Ohtani H & Sawada Y (2000) Human placental transport of vinblastine, vincristine, digoxin and progesterone: contribution of P-glycoprotein. *Eur J Pharmacol* 408(1):1-10.
- Vaillancourt C, Lanoix D, Le Bellego F, Daoud G & Lafond J (2009) Involvement of MAPK signalling in human villous trophoblast differentiation. *Mini Rev Med Chem* 9(8):962-973.
- Van Aelst L & D'Souza-Schorey C (1997) Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev* 11(18):2295-2322.
- Vargas A, Larocque E, Toufaily C, Rassart E, Lafond J & Barbeau B (A new luciferase-based quantitative assay for the evaluation of human trophoblast fusion. *Reprod Sci* 19(4):374-382.
- Vettraino IM, Roby J, Tolley T & Parks WC (1996) Collagenase-I, stromelysin-I, and matrilysin are expressed within the placenta during multiple stages of human pregnancy. *Placenta* 17(8):557-563.

- Viau M, Lafond J & Vaillancourt C (2009) Expression of placental serotonin transporter and 5-HT 2A receptor in normal and gestational diabetes mellitus pregnancies. *Reprod Biomed Online* 19(2):207-215.
- Vicovac L, Jones CJ & Aplin JD (1995) Trophoblast differentiation during formation of anchoring villi in a model of the early human placenta in vitro. *Placenta* 16(1):41-56.
- Vignery A (2000) Osteoclasts and giant cells: macrophage-macrophage fusion mechanism. *International journal of experimental pathology* 81(5):291-304.
- Vila-Coro AJ, Rodriguez-Frade JM, Martin De Ana A, Moreno-Ortiz MC, Martinez AC & Mellado M (1999) The chemokine SDF-1alpha triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway. *FASEB J* 13(13):1699-1710.
- Walther DJ & Bader M (1999) Serotonin synthesis in murine embryonic stem cells. *Brain Res Mol Brain Res* 68(1-2):55-63.
- Walther DJ & Bader M (2003) A unique central tryptophan hydroxylase isoform. *Biochem Pharmacol* 66(9):1673-1680.
- Watson ED & Cross JC (2005) Development of structures and transport functions in the mouse placenta. *Physiology (Bethesda)* 20:180-193.
- Watts SW (2002) Serotonin-induced contraction in mesenteric resistance arteries: signaling and changes in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension. *Hypertension* 39(3):825-829.
- Watts SW, Yang P, Banes AK & Baez M (2001) Activation of Erk mitogen-activated protein kinase proteins by vascular serotonin receptors. *J Cardiovasc Pharmacol* 38(4):539-551.
- Weisberg E, Sattler M, Ewaniuk DS & Salgia R (1997) Role of focal adhesion proteins in signal transduction and oncogenesis. *Crit Rev Oncog* 8(4):343-358.
- Weiss SJ, Peppin G, Ortiz X, Ragsdale C & Test ST (1985) Oxidative autoactivation of latent collagenase by human neutrophils. *Science* 227(4688):747-749.
- Whitaker-Azmitia PM (1999) The discovery of serotonin and its role in neuroscience. *Neuropsychopharmacology* 21(2 Suppl):2S-8S.

- Widmann C, Gibson S, Jarpe MB & Johnson GL (1999) Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* 79(1):143-180.
- Wikstrom AK, Nash P, Eriksson UJ & Olovsson MH (2009) Evidence of increased oxidative stress and a change in the plasminogen activator inhibitor (PAI)-1 to PAI-2 ratio in early-onset but not late-onset preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 201(6):597 e591-598.
- Wilkinson LO, Auerbach SB & Jacobs BL (1991) Extracellular serotonin levels change with behavioral state but not with pyrogen-induced hyperthermia. *J Neurosci* 11(9):2732-2741.
- Will H, Atkinson SJ, Butler GS, Smith B & Murphy G (1996) The soluble catalytic domain of membrane type 1 matrix metalloproteinase cleaves the propeptide of progelatinase A and initiates autoproteolytic activation. Regulation by TIMP-2 and TIMP-3. *J Biol Chem* 271(29):17119-17123.
- Wisden W, Parker EM, Mahle CD, Grisel DA, Nowak HP, Yocca FD, Felder CC, Seeburg PH & Voigt MM (1993) Cloning and characterization of the rat 5-HT5B receptor. Evidence that the 5-HT5B receptor couples to a G protein in mammalian cell membranes. *FEBS Lett* 333(1-2):25-31.
- Woessner JF, Jr. (1991) Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* 5(8):2145-2154.
- Wolfe MW (2006) Culture and transfection of human choriocarcinoma cells. *Methods Mol Med* 121:229-239.
- Wong M & Fish EN (1998) RANTES and MIP-1alpha activate stats in T cells. *J Biol Chem* 273(1):309-314.
- Wrana JL & Attisano L (2000) The Smad pathway. *Cytokine Growth Factor Rev* 11(1-2):5-13.
- Wu D, Luo S, Wang Y, Zhuang L, Chen Y & Peng C (2001) Smads in human trophoblast cells: expression, regulation and role in TGF-beta-induced transcriptional activity. *Mol Cell Endocrinol* 175(1-2):111-121.
- Wu EH, Lo RK & Wong YH (2003) Regulation of STAT3 activity by G16-coupled receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 303(3):920-925.

- Xie TX, Wei D, Liu M, Gao AC, Ali-Osman F, Sawaya R & Huang S (2004) Stat3 activation regulates the expression of matrix metalloproteinase-2 and tumor invasion and metastasis. *Oncogene* 23(20):3550-3560.
- Xu G, Chakraborty C & Lala PK (2001a) Expression of TGF-beta signaling genes in the normal, premalignant, and malignant human trophoblast: loss of smad3 in choriocarcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 287(1):47-55.
- Xu G, Chakraborty C & Lala PK (2002) Restoration of TGF-beta regulation of plasminogen activator inhibitor-1 in Smad3-restituted human choriocarcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 294(5):1079-1086.
- Xu P, Wang Y, Piao Y, Bai S, Xiao Z, Jia Y, Luo S & Zhuang L (2001b) Effects of matrix proteins on the expression of matrix metalloproteinase-2, -9, and -14 and tissue inhibitors of metalloproteinases in human cytotrophoblast cells during the first trimester. *Biol Reprod* 65(1):240-246.
- Yagel S, Geva TE, Solomon H, Shimonovitz S, Reich R, Finci-Yeheskel Z, Mayer M & Milwidsky A (1993) High levels of human chorionic gonadotropin retard first trimester trophoblast invasion in vitro by decreasing urokinase plasminogen activator and collagenase activities. *J Clin Endocrinol Metab* 77(6):1506-1511.
- Yamada M & Yasuhara H (2004) Clinical pharmacology of MAO inhibitors: safety and future. *Neurotoxicology* 25(1-2):215-221.
- Yan C & Boyd DD (2007) Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *J Cell Physiol* 211(1):19-26.
- Yan X, Liu Z & Chen Y (2009) Regulation of TGF-beta signaling by Smad7. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 41(4):263-272.
- Yashwanth R, Rama S, Anbalagan M & Rao AJ (2006) Role of estrogen in regulation of cellular differentiation: a study using human placental and rat Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol* 246(1-2):114-120.
- Yavarone MS, Shuey DL, Sadler TW & Lauder JM (1993) Serotonin uptake in the ectoplacental cone and placenta of the mouse. *Placenta* 14(2):149-161.
- Yeung YG, Wang Y, Einstein DB, Lee PS & Stanley ER (1998) Colony-stimulating factor-1 stimulates the formation of multimeric cytosolic complexes of signaling

- proteins and cytoskeletal components in macrophages. *J Biol Chem* 273(27):17128-17137.
- Youdim MB (1988) Platelet monoamine oxidase B: use and misuse. *Experientia* 44(2):137-141.
- Youdim MB, Edmondson D & Tipton KF (2006) The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. *Nat Rev Neurosci* 7(4):295-309.
- Zhang C & Marek GJ (2008) AMPA receptor involvement in 5-hydroxytryptamine_{2A} receptor-mediated pre-frontal cortical excitatory synaptic currents and DOI-induced head shakes. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32(1):62-71.
- Zhang J, Cao YJ, Zhao YG, Sang QX & Duan EK (2002a) Expression of matrix metalloproteinase-26 and tissue inhibitor of metalloproteinase-4 in human normal cytotrophoblast cells and a choriocarcinoma cell line, JEG-3. *Mol Hum Reprod* 8(7):659-666.
- Zhang Y, Damjanoska KJ, Carrasco GA, Dudas B, D'Souza DN, Tetzlaff J, Garcia F, Hanley NR, Scripathirathan K, Petersen BR, Gray TS, Battaglia G, Muma NA & Van de Kar LD (2002b) Evidence that 5-HT_{2A} receptors in the hypothalamic paraventricular nucleus mediate neuroendocrine responses to (-)DOI. *J Neurosci* 22(21):9635-9642.
- Zhao MR, Qiu W, Li YX, Zhang ZB, Li D & Wang YL (2006) Dual effect of transforming growth factor beta1 on cell adhesion and invasion in human placenta trophoblast cells. *Reproduction* 132(2):333-341.
- Zhou Y, Damsky CH, Chiu K, Roberts JM & Fisher SJ (1993) Preeclampsia is associated with abnormal expression of adhesion molecules by invasive cytotrophoblasts. *The Journal of clinical investigation* 91(3):950-960.
- Zhou Y, Damsky CH & Fisher SJ (1997a) Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. One cause of defective endovascular invasion in this syndrome? *The Journal of clinical investigation* 99(9):2152-2164.
- Zhou Y, Fisher SJ, Janatpour M, Genbacev O, Dejana E, Wheelock M & Damsky CH (1997b) Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate.

A strategy for successful endovascular invasion? *The Journal of clinical investigation* 99(9):2139-2151.

Zygmunt M, Hahn D, Kiesenbauer N, Munstedt K & Lang U (1998a) Invasion of cytotrophoblastic (JEG-3) cells is up-regulated by interleukin-15 in vitro. *Am J Reprod Immunol* 40(5):326-331.

Zygmunt M, Hahn D, Munstedt K, Bischof P & Lang U (1998b) Invasion of cytotrophoblastic JEG-3 cells is stimulated by hCG in vitro. *Placenta* 19(8):587-593.